



**TOKAT İLİ PATATES ÜRETİM ALANLARINDA
GÖRÜLEN BAZI VİRAL ETMENLERİN
BELİRLENMESİ
AFİDE MERVE ENGÜR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI
Dr. Öğr. Üyesi Şerife TOPKAYA
Ocak - 2020
Her hakkı saklıdır**

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TOKAT İLİ PATATES ÜRETİM ALANLARINDA GÖRÜLEN BAZI VİRAL
ETMENLERİN BELİRLENMESİ

AFİDE MERVE ENGÜR

TOKAT
Ocak - 2020

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

**Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi tarafından
2018/50 nolu proje ile desteklenmiştir.**

AFİDE MERVE ENGÜR tarafından hazırlanan “Tokat İli Patates Üretim Alanlarında Görülen Bazı Viral Etmenlerin Belirlenmesi” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 20 OCAK 2020 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BİTKİ KORUMA Anabilim dalında **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

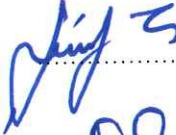


Dr. Öğr. Üyesi Şerife TOPKAYA

Üye

Prof. Dr. Nazlı Dide KUTLUK YILMAZ

Üye

Prof. Dr. Yusuf YANAR


.....

.....

.....

ONAY


Prof. Dr. Çetin ÇEKİCİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdđi yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

AFİDE MERVE ENGÜR

20 Ocak 2020

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TOKAT İLİ PATATES ÜRETİM ALANLARINDA GÖRÜLEN BAZI VİRAL ETMENLERİN BELİRLENMESİ

AFİDE MERVE ENGÜR

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI:DR. ÖĞR. ÜYESİ ŞERİFE TOPKAYA)

Tokat ilinde yürütülen bu çalışmada patates üretiminin yoğun olarak yapıldığı Merkez, Niksar, Erbaa, Başçiftlik ve Artova ilçelerindeki patates üretim alanlarında virüs belirtisi gösteren patates bitkilerinin yapraklarından ve yumrularından örnekler toplanmıştır. Toplanan 418 yaprak ve 91 yumru örneği *Potato virus Y* (PVY), *Potato virus S* (PVS), *Potato virus X* (PVX) ve *Potato leafroll virus* (PLRV) virüslerinin varlığını tespit etmek amacıyla, virüslere spesifik primerler kullanılarak moleküler bir yöntem olan RT-PCR testine tabi tutulmuştur. Test edilen 418 tane yaprak örneğinin 220'sinde (%52.63), 91 tane yumru örneğinin ise 68'inde (%74.72) bir veya birden fazla virüs tespit edilmiştir. Toplam 418 adet bitki örneğinin 197'si PVY (%47.12), 70'i PVS (%16.74), 25'i PVX (%5.98), 22'si ise PLRV (%5.26) ile enfekteli bulunmuştur. Çimlendirilen 91 adet yumrunun 67'si PVY (%73.62), 6'sı PVS (%6.59) ve 1'i ise PLRV (%1.09) ile enfekteli olarak tespit edilmiştir. Tokat Merkez ve ilçelerinden toplanan bitki ve yumru örneklerinde en yaygın görülen virüsün PVY olduğu ve bunu PVS' nin izlediği belirlenmiştir. PVX ve PLRV virüs etmenlerinin ise az sayıda bulunduğu saptanmıştır. En yaygın çoklu enfeksiyon PVY + PVS olarak bulunmuştur. Testlemeler sonucunda pozitif sonuç alınan izolatlarla biyolojik indeksleme çalışmaları yapılmıştır. Bazı pozitif izolatların sekans analizleri sonucunda elde edilen veriler gen bankasına kayıtlı izolatlarla karşılaştırılması yapılarak filogenetik analizleri yapılmıştır.

2020, 70 SAYFA

ANAHTAR KELİMELER: Patates, *Potato virus Y* (PVY), *Potato virus S* (PVS), *Potato virus X* (PVX), *Potato leafroll virus* (PLRV), RT-PCR

ABSTRACT

MASTER THESIS

DETERMINATION OF SOME VIRAL FACTORS POTATO PRODUCTION AREAS IN TOKAT PROVINCE

TOKAT GAZIOSMANPASA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION

(SUPERVISOR:) ASST. PROF. DR. SERIFE TOPKAYA

In the scope of present study, potato leaves and tuber samples, showing virus like symptoms, were collected from potato production areas in Centrum, Niksar, Erbaa, Başçiftlik and Artova districts of Tokat. Total 418 leaves and 91 tuber samples were tested with two step polymerase chain reaction (PCR) using virus-specific primers to *Potato virus Y* (PVY), *Potato virus S* (PVS), *Potato virus X* (PVX), *Potato leafroll virus* (PLRV). Single or dual infections of these viruses have been determined in 220 (%52.63) leaves samples and 68 (%74.72) tubers samples. 197 (%47.12) out of 418 leaves samples were infected with PVY, 70 out of 418 samples with PVS (%16.74), 25 of samples with PVX (%5.98) and 22 of samples with PLRV (%5.26). 67 (%73.62) out of 91 tubers samples tested resulted with positive with PVY, 6 out of 91 samples with PVS (%6.59) and 1 of samples with PLRV (%1.09). Sequence analysis of some pozitif isolates was obtained and compared with isolates which recorded in Genbank for phylogenetic analysis tree.

2020, 70 PAGE

KEYWORDS: Potato, *Potato virus Y* (PVY), *Potato virus S* (PVS), *Potato virus X* (PVX), *Potato leafroll virus* (PLRV), RT-PCR

ÖNSÖZ

Öncelikle, bu çalışmada çalışmamın her aşamasında yardımını ve desteğini benden esirgemeyen ve her konuda yanımda olan danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi ŞERİFE TOPKAYA'ya (Gaziosmanpaşa Üniversitesi-Bitki Koruma Anabilim Dalı) teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans öğrencileri; VİLDAN KİLİNÇ ve BURAK GÜVENATES'e teşekkür ederim.

Ayrıca tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisans öğrenimim süresince de beni hep destekleyen, her türlü fedakârlıkta bulunan, maddi manevi her zaman yanımda olan annem ŞERİFE ENGÜR' e ve babam SABRİ ENGÜR' e sonsuz minnet ve sevgilerimi sunar, teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak, lisans eğitimim boyunca olduğu gibi yüksek lisans öğrenimim süresince de yardım ve desteğini benden esirgemeyen, varlığıyla bana her zaman güç veren değerli dostlarım ÇİĞDEM ÖZYİĞİT' e ve SABRİ TUGAY MERT' e en içten teşekkürlerimi sunarım.

AFİDE MERVE ENGÜR

20 Ocak 2020

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1 Dünya’da Yapılan Çalışmalar	10
2.2 Ülkemizde Yapılan Çalışmalar	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	17
3.1 Materyal.....	17
3.1.1 Yaprak ve yumru örnekleri	17
3.1.2 Test bitkileri	18
3.1.3 Çalışmada kullanılan primerler	18
3.2 Yöntem	19
3.2.1 Hastalıklı bitki örneklerinin toplanması.....	19
3.2.2 Yumru çimlendirme çalışmaları.....	20
3.2.3 RNA izolasyonu	21
3.2.4 Komplementer DNA (cDNA) sentezi.....	23
3.2.5 PCR çalışmaları.....	23
3.2.6 Agaroz jel elektroforez çalışmaları	24
3.2.7 Filogenetik analiz çalışmaları	24
3.2.8 Biyolojik indeksleme çalışmaları	24
4. BULGULAR.....	26
4.1 Tokat İli Patates Üretim Alanlarında Virüslerin Bulunma Durumları.....	26
4.2 RT-PCR Çalışmalarından Elde Edilen Sonuçlar.....	28

4.2.1 Yaprak örneklerinin RT-PCR ile testlenmesi sonucu elde edilen bulgular.....	32
4.2.2 Yumurta örneklerinin RT-PCR ile testlenmesi sonucu elde edilen bulgular.....	46
4.3 Filogenetik Analiz Sonuçları	51
4.3.1 PVY izolatlarının P1 genine göre filogenetik analizi	52
4.3.2 PVX izolatlarının kılıf protein genine göre filogenetik analizi	53
4.3.3 PVS izolatlarının kılıf protein genine göre filogenetik analizi.....	53
4.3.4 PLRV izolatlarının kılıf protein genine göre filogenetik analizi	54
4.4 Biyolojik İndeksleme Çalışmaları.....	55
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	58
6. KAYNAKLAR	64
7. ÖZGEÇMİŞ.....	70

SİMGELER ve KISALTMALAR

Kısaltmalar	Açıklama
Bp	Baz çifti
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
M	Molar
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PLRV	<i>Potato leaf roll virus</i>
PVS	<i>Potato virus S</i>
PVX	<i>Potato virus X</i>
PVY	<i>Potato virus Y</i>
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikada Devir
RT	Ters Transkripsiyon
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UV	Ultraviyole
V	Volt
µl	Mikrolitre

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1.	Sürvey yapılan ilçeler.....	17
Şekil 3.2.	Ekilen yumruların serada çimlendirilmesi.....	21
Şekil 4.1.	a) Bodurlaşma ve yapraklarda kıvrılma b) Sarı nekrotik lekeler c) Damarlardan başlayan renk açılmaları d) Şekil bozukluğu ve kabarcıklaşma.....	27
Şekil 4.2.	Yumru gözlerinde hilal şeklinde oyuklar.....	27
Şekil 4.3.	PVY'ye spesifik primerle yapılan bazı izolatlara ait RT-PCR sonucu.....	28
Şekil 4.4.	PLRV'ye spesifik primerle yapılan bazı izolatlara ait RT-PCR sonucu.....	28
Şekil 4.5.	PVX'e spesifik primerle yapılan bazı izolatlara ait RT-PCR sonucu.....	29
Şekil 4.6.	PVS'e spesifik primerle yapılan bazı izolatlara ait RT-PCR sonucu.....	29
Şekil 4.7.	PVY ile enfeksiyon tespit edilen patates örneklerindeki belirtiler.....	30
Şekil 4.8.	PVS ile enfeksiyon tespit edilen patates örneklerindeki belirtiler.....	30
Şekil 4.9.	PVX ile enfeksiyon tespit edilen patates örneklerindeki belirtiler.....	31
Şekil 4.10.	PVY ve PVX ile karışık enfeksiyon tespit edilen patates örneklerindeki belirtiler.....	31
Şekil 4.11.	PVY ve PVS ile karışık enfeksiyon tespit edilen patates örneklerindeki belirtiler.....	32
Şekil 4.12.	PVY ile elde edilen filogenetik ağaç.....	52
Şekil 4.13.	PVX ile elde edilen filogenetik ağaç.....	53
Şekil 4.14.	PVS ile elde edilen filogenetik ağaç.....	54
Şekil 4.15.	PLRV ile elde edilen filogenetik ağaç.....	55
Şekil 4.16.	PVY pozitif yaprak örneği ile yapılan mekanik inokulasyon sonucunda a) Chenopodium album b) Nicotiana tabacum test bitkilerinde inokulasyon yapılan yapraklarda oluşan klorotik lekeler ve sararmalar.....	56
Şekil 4.17.	PVS pozitif yaprak örneği ile yapılan mekanik inokulasyon sonucunda, inokulasyon yapılan yapraklarda; a) Chenopodium album test bitkisinde klorotik lokal lekeler b) Nicotiana tabacum test bitkisinde oluşan sararma.....	57
Şekil 4.18.	PVX pozitif yaprak örneği ile yapılan mekanik inokulasyon sonucunda Xhanti 81 test bitkisinde inokulasyon yapılan yapraklarda oluşan damarlar arası mozaik.....	57

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1.	Dünya patates Üretimi.....	2
Çizelge 1.2.	İllere göre patates üretimimiz.....	3
Çizelge 3.1.	Mekaniksel inokulasyon çalışmalarında kullanılan test bitkileri ve temin edildikleri yerler.....	18
Çizelge 3.2.	Çalışmada kullanılan primerler.....	19
Çizelge 3.3.	İlçelerde ekim yapılan alan(dekar), alınan yaprak ve yumru örneklerinin sayıları.....	20
Çizelge 4.1.	Tokat ili Merkez ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları.....	32
Çizelge 4.2.	Tokat ili Niksar ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları.....	36
Çizelge 4.3.	Tokat ili Erbaa ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları.....	39
Çizelge 4.4.	Tokat ili Başçiftlik ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları.....	41
Çizelge 4.5.	Tokat ili Artova ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları.....	43
Çizelge 4.6.	2018 yılında yürütülen sürvey çalışmalarında Tokat iline ait Merkez, Niksar, Erbaa, Artova ve Başçiftlik ilçelerinin patates üretim alanlarından alınan yaprak örneklerinde PVY, PVS, PVX ve PLRV'nin bulunma durumları.....	45
Çizelge 4.7.	2018 yılında yürütülen sürvey çalışmalarında Tokat iline ait Merkez, Niksar, Erbaa, Artova ve Başçiftlik ilçelerinin patates üretim alanlarından alınan yaprak örneklerinde PVY, PVS, PVX ve PLRV'nin karışık enfeksiyonlarının bulunma durumları.....	46
Çizelge 4.8.	Tokat ili Niksar ilçesi çimlendirilen yumru örneklerinin RT-PCR sonuçları.....	46
Çizelge 4.9.	Tokat ili Erbaa ilçesi çimlendirilen yumru örneklerinin RT-PCR sonuçları.....	48
Çizelge 4.10.	Tokat ili Artova ilçesi çimlendirilen yumru örneklerinin RT-PCR sonuçları.....	49
Çizelge 4.11.	2018 yılında yürütülen sürvey çalışmalarında Tokat iline ait Merkez, Niksar, Erbaa, Artova ve Başçiftlik ilçelerinin patates üretim alanlarından alınan yumru örneklerinde PVY, PVS, PVX ve PLRV'nin bulunma durumları.....	50
Çizelge 4.12.	Çoklu enfeksiyonların kombinasyon şekilleri ve örnek sayıları.....	51

1. GİRİŞ

Patates (*Solanum tuberosum* L.), *Solanaceae* familyası içinde yer alan, insanların buğdaygillerden sonra en fazla tükettiği bitkisel kaynaklı besindir. Yumrularının nişasta, protein, B1, B2, B6 ve C vitaminlerine ek olarak besin elementlerini bulundurmasının yanı sıra nişasta, alkol ve ispirto endüstrilerinin ham maddesini oluşturan önemli bir kültür bitkisidir (Esendal, 1990). Farklı toprak ve iklim koşullarına kolayca uyum sağlayabilen patates, ayrıca birim alandan alınan ürünün fazla olması, fiyatının ucuz olması, geniş alanlarda yetiştirilmesi, besin değerinin yüksek olması, üretim imkânının geniş olması ve sofralık ya da endüstriyel olarak çok değişik kullanım alanlarının bulunması gibi nedenlerden dolayı Dünya’da yaygın bir üretime sahiptir. Yüksek oranda nişasta ve düşük oranda protein içermesiyle patates, binlerce yıldır insanlar için sağlıklı bir beslenme kaynağı olmuştur. Patates, birim alanda yüksek kuru madde üretimi sağlayarak, kuru maddeyi oluşturan bileşiklerin eşit dağılması ve etkinlik değerinin yüksek olması gibi özellikleriyle doğadan insanlığa olan bir armağandır (Güner ve Yorgancı, 2009). 19. yüzyıl sonlarında patatesin Türkiye’ye ilk kez Rusya üzerinden Doğu Karadeniz Bölgesi’ne ve devamında batıdan Trakya Bölgesi’ne girdiği saptanmıştır (İlisulu, 1957).

Patates ülkemize 1850’li yıllarda getirilmiş fakat gıda değeri anlaşılmadığı için genel olarak gelişme gösterememiştir. Gıda maddesi olarak farklı şekillerde tüketilebilen patatesin değeri tüm Dünya’da olduğu gibi ülkemizde de zamanla anlaşılmıştır. Özellikle geri kalmış ülkelerde değerli besin maddeleri içermesinden dolayı halkın temel gıda maddesi ihtiyacını karşılayan patates, enerji kaynağı olarak yemeklerde değerlendirilmesinin yanı sıra işlenerek (cips, kızartma, püre v.s.) de tüketilmektedir. Ayrıca ekmeklerin lezzetini artırmak ve bayatlamasını geciktirmek için ekmek ununa patates unu karıştırılmaktadır. Yemeklik olarak kullanılmayan ve endüstride değerlendirilemeyecek durumdaki patates yumruları da hayvan yemi olarak kullanılabilir. Patates, yetiştirildiği ülkede, birim alandan alınan ürün miktarının fazla olması nedeniyle ülke ekonomisine ve üreticiye büyük oranda katkı sağlamaktadır (Arioğlu, 1997).

Patates serin ve ılıman iklim bitkisi olmasına rağmen farklı iklim koşullarına rahatlıkla adapte olabilmektedir. Aynı zamanda alternatif ürünlere göre birim alandaki net getirisi daha fazladır. Bu özelliğinden dolayı patates, Dünya'nın hemen her ülkesinde üretilmektedir. Türkiye 2017 yılında, patates üretiminde Dünya'da 14. sırada bulunmaktadır (FAOStat, 2017).

Çizelge 1.1. Dünya patates üretimi (ton) (FAOStat, 2017)

Ülkeler	2015	2016	2017	2017 (%)
Çin	94 916 682	95 706 605	99 205 580	25.56
Hindistan	48 009 000	43 417 000	48 605 000	12.52
Rusya	33 645 799	31 107 797	29 589 976	7.62
Ukrayna	20 839 270	21 750 290	22 208 220	5.72
ABD	20 012 720	20 022 070	20 017 350	5.16
Almanya	10 370 200	10 772 100	11 720 000	3.02
Bangladeş	9 254 285	9 474 099	10 215 957	2.63
Polonya	6 313 669	8 872 445	9 171 733	2.36
Hollanda	6 651 692	6 534 338	7 391 881	1.90
Fransa	7 119 837	6 834 680	7 342 203	1.89
Belarus	5 995 298	5 984 069	6 414 755	1.65
Birleşik Krallık	5 644 000	5 395 000	6 218 000	1.60
İran	5 140 623	4 995 327	5 102 342	1.31
Türkiye	4 760 000	4 750 000	4 800 000	1.24
Peru	4 704 976	4 514 239	4 776 294	1.23
Cezayir	4 539 577	4 758 137	4 606 403	1.19
Belçika	3 689 994	3 402 787	4 416 665	1.14
Kanada	4 328 423	4 323 524	4 410 829	1.14
Mısır	4 955 445	4 113 441	4 325 478	1.11
Pakistan	3 997 579	3 974 248	4 142 399	1.07
Diğer	71 744 646	73 606 484	73 568 190	18.95
Toplam	376 577 033	347 252 075	388 190 675	100.00

Ülkemiz patates üretimi, 2018 istatistiklerine göre, 1 359 373 da alanda 4 550 milyon ton olarak kaydedilmiştir (TÜİK, 2018). 2018 yılında en fazla üretimi yaparak kayda geçen 10 il sırasıyla; Niğde, Konya, Afyon, Kayseri, İzmir, Nevşehir, Adana, Aksaray, Sivas ve Bolu'dur (TÜİK, 2018). Tokat'ta ise 24 291 da alanda 61 385 ton üretim yapılmaktadır (TÜİK, 2018).

Çizelge 1.2. İllere göre patates üretimimiz (Ton) (TUİK, 2018)

İl	2014	2015	2016	2017	2018	2018 %
Niğde	618 853	674 773	892 297	835 200	732 188	16.09
Konya	509 188	493 748	549 802	567 076	611 957	13.45
Afyonkarahisar	301 579	434 929	476 900	473 016	455 352	10.01
Kayseri	285 770	287 835	305 470	351 270	385 913	8.48
İzmir	391 347	407 745	367 706	396 130	330 143	7.26
Nevşehir	218 952	301 039	255 773	249 626	269 620	5.93
Adana	206 120	219 221	221 397	241 196	219 076	4.81
Aksaray	239 728	242 302	210 959	207 810	202 371	4.45
Sivas	171 663	263 167	202 524	182 149	169 737	3.73
Bolu	280 735	249 603	226 919	164 778	150 327	3.30
Bitlis	132 504	212 490	163 992	154 696	150 043	3.30
Erzurum	83 490	78 516	72 173	75 708	85 729	1.88
Hatay	51 802	70 231	109 961	148 858	71 145	1.56
Tokat	69 815	70 764	67 902	72 542	61 385	1.35
Diğer	604 454	753 637	626 225	679 945	655 014	14.40
Toplam	4 166 000	4 760 000	4 750 000	4 800 000	4 550 000	100.00

Birim alandan elde edilen verim, Türkiye’de Dünya ortalamasının üzerindedir. Ancak virüslerden arî tohumluk kullanımındaki yetersizlikten dolayı verim açısından gelişmiş ülkelerin oldukça altındadır. Yumrularıyla üretilen patatesten enfeksiyon oluşturan virüsler yumrular ile yıldan yıla, yıl içerisinde de vektörlerle ya da mekaniksel yollarla taşınarak hızlı bir şekilde yayılım gösterir (Jones, 1988; Bostan ve ark., 2006). Ayrıca tohumluğun kısa zaman içerisinde yozlaşmasına neden olur ve çoğunlukla üç yıldan sonra aynı tohumluk kullanılırsa enfeksiyon oranı artarak verimde önemli kayıplar meydana gelmektedir (Spiegel and Martin, 1993; Slack, 1995). Virüs hastalıkları doğrudan kimyasal mücadele ile kontrol edilemez (Walkey, 1991). Bu kapsamda virüs hastalıklarından arî tohumluk kullanımı ile verim kayıpları önlenir. 25’ten fazla virüsün ve bir viroid’in doğal yollarla patatesi enfekte ettiği fakat bu virüslerin genelinde sınırlı alanlarda bulunduğu, yalnızca Patates Y virüsü (PVY), Patates yaprak kıvrılma virüsü (PLRV), Patates X virüsü (PVX) ve Patates S virüsü (PVS)’nün Dünya genelinde şiddetli enfeksiyonlara neden olduğu ve verimde önemli kayıplara yol açtıkları yapılan çalışmalarda kaydedilmiştir (McDonald, 1984; Hooker, 1986; Shukla et al., 1994; Salazar, 1996; Brunt, 2001). Ayrıca bitkiler, tarlada enfeksiyon kaynağı bulunduğu sürece mekaniksel olarak ve vektörlerle taşınarak bu virüslerden bazıları tarafından kısa sürede enfeksiyona maruz kalmaktadır (McDonald, 1984; Singh, 1999).

Tokat ilinde patateste viral etmenlerin bulunmasıyla ilgili daha önceden yapılmış az sayıda çalışma bulunmaktadır. Kutluk Yılmaz ve ark., 2003 yılında patates yaprak ve yumrularında enfeksiyon yapan virüsleri ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) yöntemi kullanarak araştırmışlardır. Test sonucunda 168 yaprak örneğinde PVY'yi diğer virüslerle karışık enfekteli olarak tespit etmişlerdir. PVY, PLRV ile karışık olarak %2.98, PVX ve PVS ile karışık olarak ise yine %2.98 oranında saptanmıştır. Çalışmada ayrıca 159 adet yumru örneği test edilmiş ve PVY enfeksiyonu %10 oranında belirlenmiştir. Patates yumrularında en yaygın karışık enfeksiyonu PVY ve PVS olarak (%23.64) belirlemişlerdir.

Bu çalışma ile Tokat ili patates üretim alanlarında ELISA yönteminden farklı olarak PCR yöntemi ve biyolojik indeksleme çalışmaları ile PVY, PVX, PVS ve PLRV viral etmenlerinin tanılanması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Patates Y virüsü (*Potato Virus Y*, PVY), Dünya’da patates tarımının yapıldığı her yerde bulunan ve patateslerde ürün kaybına yol açan önemli virüs hastalıklarından biridir. 730x11 nm boyutlarında tek sarmal RNA içeren PVY, ipliksi helix yapısında partiküllere sahip, *Potyvirüs* grubuna dahildir (Delgado-Sanchez and Grogan, 1970; Hooker, 1986). Genomik RNA tek bir polyproteini kodlar (Riechmann ve diğ., 1992). Bu polyprotein, proteaz enziminin proteolitik kesimi sonucunda birden fazla peptit bağı koparmasıyla; protein 1 (P1), yardımcı bileşen-proteinaz (helper component–proteinase=HC-Pro), protein 3 (P3), 6 kilodalton protein 1 (6K1), sitoplazmik inklüzyon (CI), 6 kilodalton protein 2 (6K2), genom-bağlı viral protein (viral protein genome-linked=VPg), nüklear inklüzyon a (NIa), nüklear inklüzyon b (NIb) ve RNA-dependant RNA polimeraz (NIb-Pol) ve kılıf proteini (Coat Protein=CP) olmak üzere toplam 10 adet işlevsel viral proteine dönüşür (UrcuquiInchima ve diğ., 2001; Grzela ve diğ., 2008). PVY’nin, çoğunluğu *Solanaceae* familyasında bulunan 60’dan fazla bitki türünde enfeksiyona neden olduğu belirtilmiştir (Hooker, 1986). PVY, patateste kolonize olmayan *M. persicae* (Sulz.), *Aphis gossypii* (Kaltenb.), *Aphis fabae* (David.), *Rhopalosiphum padi* (L.), *Rhopalosiphum maidis* (Fitch.), *Rhopalosiphoninus latysiphon* (David.), *Acyrtosiphon pisum* (Harr.), *Aulocorhthum solani* (Kaltenb.), *Brevicoryne brassicae* (L.), *Diuraphis noxia* (Kurdj.), *Schizaphis graminum* (Rond.), *Diuraphis noxia* (Kurdj.), *Metopolophium dirhodum* (Walk.), *Sitobion avenae* (Fab.), *Capitophorus elaeagni* (delGuerc.) ve kolonize olan *Aphis nasturtii* (Kaltenb.), *Macrosiphum euphorbiae* (Thom.), *M. persicae* (Ragsdale et al., 2001; Alyokhin et al., 2002) gibi 50’nin üzerinde kanatlı afit türü ile non persistent olarak ve mekaniksel olarak da bitki öz suyu ile taşınabilmektedir (MacGillivray, 1981; Halbert et al., 1993; Slack, 1995; DiFonzo et al., 1996; Heimback et al., 1998; Alyokhin et al., 2002). Belirtiler değişmekle beraber, yapraklarda kıvrıcılık ve lekelenme belirtileri, virüs ırkı ile patates çeşidi arasındaki ilişkilere bağlı olarak değişmektedir. (Asscheman ve ark., 1996, Brunt ve ark., 1990, Stevenson ve ark., 2001).

Patates Y virüsü’nün Y^N, Y^O ve Y^C olmak üzere farklı ırkları bulunmaktadır. PVY^N yapraklarda küçülmelere, klorotik veya nekrotik halkalara ve lekelerle ayrıca damarlar arasında açık yeşil renkte beneklenmelere neden olmaktadır. PVY^O tepe yapraklarının

kurmasına ve bu yaprakların dallarda asılı kalmasına ya da yaprakların dökülmesine neden olurken bitkilerde cüceleşme, kıvrıkcılığın beraberinde nekrozlar şeklinde belirtiler göstermektedir. PVY'nin N ve O grupları arasında bazı rekombinant izolatların oluştuğu bildirilmiştir. N ve O grupları arasındaki izolatların rekombinasyonları sonucunda oluşan izolatların bazıları NTN (PVY^{NTN}), Wilga (PVY^{N-Wi}) ve N:O (PVY^{N:O}) 'dur. PVY^{NTN} ırkı patates yumru nekrotik halkalı leke hastalığına (Potato Tuber Necrotic Ringspot Disease: PTNRD) neden olur. Bu ırk bazı patates çeşitlerinde hem yapraklar hem de yumrular üzerinde ciddi hasara neden olabilmektedir. Enfekteli yumrunun kabuğunda düzensiz kahverengimsi halkalar görülür, daha sonra bu lekeler nekrotik alanlara döner ve yumru içe çöker (Jones ve ark., 2003). PVY^C'nin semptomları ise yaprak ve gövde sapında nekrozlar ve mozaikler, damarlarda incelmeye, damarlar boyunca bantlaşma şeklinde görülürken yapraklardaki benekler, mozaikler ve nekrotik halkalar ön plana çıkmaktadır. Yumrulardaki gözlerin etrafında oluşan nekrozlar bitkinin ölümüyle sonuçlanmaktadır (Asscherman ve ark., 1996, Brunt ve ark., 1990, Stevenson ve ark., 2001).

Patates yetiştiriciliği yapılan ülkelerde oldukça yaygın olan diğer bir viral etmen Patates X virüsü (*Potato virus X*, PVX)'dür. Pozitif duyarlı, tek sarmal RNA'ya (ssRNA) sahip olan PVX, 515x13 nm boyutlarında ve esnek çubuk şeklindedir (Bercks, 1970). PVX'in genom segmentleri üzerinde beş tane protein yer almaktadır. Capsid protein (CP), genom kapsüllenmesi için gereklidir. TGB1 helikaz ve viral RNA ile birlikte ribonükleoprotein kompleksleri oluşturmaktadır. RNA replikasyon protein (ORF1 protein), RNA replikasyonunda görevlidir. Bu proteinin merkezi kısmı bir ATP bağlayıcı helikaz olarak işlev görmektedir. Hareket ve gen susturma proteini olan TGBp1 (TGBp1), viral genomun doğrudan plazmosdesmata yoluyla komşu bitki hücrelerine taşınmasında rol oynamaktadır. Hareket proteinleri olan TGBp2 ve TGBp3, plazmosdesmata yoluyla komşu bitki hücrelerine genom taşınmasını kolaylaştırarak hücreden hücreye viral yayılmada rol oynamaktadır. PVX, hasat makineleriyle, bitkilerin yaprak, sürgün ve köklerinin temasıyla, bazı böceklerin ağız parçalarıyla ve yumruların kesiminde kullanılan araçlarla mekaniksel olarak taşınabilmekte, ancak vektörlerle taşınmamaktadır (Hooker, 1986). Ayrıca *Solanaceae* familyası içerisinde yer alan patates, domates ve tütün gibi birçok bitki türünde sistemik enfeksiyon oluşturmaktadır

(Hooker, 1986). Patates bitkisinin yapraklarında küçülme, mozaik ve bitkide cüceleşmeye neden olmakla birlikte; bu belirtiler çevre şartlarına, bitki çeşidine, bitkinin biyolojik dönemine ve diğer virüslerle beraber bulunma durumuna göre değişebilmektedir. Ancak, bazı çeşitlerde ise belirgin bir semptomla yol açmamaktadır (McDonald, 1984; Hooker, 1986; Bostan ve Demirci, 2001).

Patates S virüsü (*Potato Virus S*, PVS), *Carlavirus* grubu içerisinde yer alan, tek sarmal pozitif RNA (ssRNA) içeren ve 700x13 nm boyutlarında bir virüstür (Hooker, 1986). PVS'in genom segmentleri üzerinde beş tane protein yer almaktadır. Capsid protein (CP), genom kapsüllenmesi için gereklidir. TGBp1 helikaz ve viral RNA ile birlikte ribonükleoprotein kompleksleri oluşturmaktadır. Hareket ve susturma proteini TGBp1 (TGBp1), viral genomun doğrudan plazmosdesmata yoluyla komşu bitki hücrelerine taşınmasında rol oynamaktadır. Hareket proteini TGBp2 (TGBp2) ve Hareket proteini TGBp3 (TGBp3), plazmosdesmata yoluyla komşu bitki hücrelerine genom taşınmasını kolaylaştırarak hücreden hücreye viral yayılda rol oynamaktadır. Potansiyel etki mekanizması siRNA'ların birikmesinde dayanmaktadır. PVS'in en önemli vektörü *M. persicae* olmakla birlikte; bazı afitlerle non persistent olarak ve doğal yollarla da mekaniksel olarak taşınabilir (MacGillivray, 1981; Hooker, 1986; Woodford et al., 1995; DiFonzo et al., 1996). Patateslerde PVS enfeksiyonundan kaynaklanan %10-20 oranında ürün kaybı görülebilmektedir. Yaprakların üst yüzeyinden bakıldığında damarların içe doğru çökmesi veya derinleşmesi hastalığın en belirgin belirtisidir. Bitkinin yumruları ve yeşil kısmı sağlıklı bitkilere göre daha küçük kalmaktadır. Yaşlı yapraklarda düzensiz sararmalara ve yapraklarda bronz lekelenmelere neden olan bazı PVS ırkları da bulunmaktadır (Asscheman ve ark., 1996, Brunt ve ark., 1990, Stevenson ve ark., 2001).

Patates bitkisi üzerinde çalışılan ilk virüs hastalıklarından biri olan, Patateslerde yaprak kıvrıcıklığı virüs hastalığı etmeni, *Potato leafroll virus* (PLRV) *Luteovirus* grubunda yer almaktadır (Asscheman ve ark., 1996, Brunt ve ark., 1990, Stevenson ve ark., 2001). Tek sarmal pozitif RNA (ssRNA) içeren, 24 nm çapında, isometrik partiküllü bir virüstür (Peters, 1970; Hooker, 1986). PLRV'nin genom segmentleri üzerinde sekiz tane protein yer almaktadır. Minor capsid protein P3-RTD (RT protein), afit iletiminde yer alan viral kapsidin küçük bileşenidir. Major capsid protein (CP), majör kapsid proteini olarak görev

yapar. Hareket proteini (MP), viral genomu herhangi bir tomurcuklanma olmaksızın doğrudan plazmosdesmata yoluyla komşu bitki hücrelerine aktarır. Hareket proteini, konukçu hücre duvarı bariyerini atlayarak, etkili hücrenin hücre çoğalmasına izin verir. Çoğalmayla ilişkili protein (Rap1), virüs replikasyonunda rol oynar. Protein P1-P2, RNA'ya bağlı RNA polimerazın (RdRp) salındığı öncü maddedir. RNA'ya bağlı RNA polimeraz, virüs replikasyonunda önemli bir rol oynar. Susturucu baskılayıcı P0 (Protein ORF0), transkripsiyonel gen susturma (PTGS) olarak da bilinen RNA aracılı gen susturmayı baskılayıcı, viral RNA'ların birikmesini sınırlayan bir bitki viral savunma mekanizmasıdır. ORF1 tarafından kodlanan P1 protein, VPg molekülünün RNA sentezinin başlangıcında salındığı öncü maddedir ve virüsün çoğalması için gereklidir. P6 proteinin (ORF6 protein) fonksiyonu henüz bilinmemektedir. PLRV, ilk kez 1916 yılında tanımlanmıştır ve 1967 yılında purifikasyonu yapılmıştır. Patates üretimi yapılan ülkelerin hepsinde görülmektedir. PLRV, bitkinin floem dokusunda yoğun şekilde bulunan, mekaniksel yollarla taşınmayan ve konukçu çevresi dar olan bir virüstür. En önemli vektörü yeşil şeftali afiti (*M. persicae*) olup persistent olarak 10'dan fazla afit türüyle taşınmaktadır (MacGillivray, 1981; Slack, 1995; Salazar, 1996; Singh et al., 1997; Gildow et al., 2000). Erken dönem enfeksiyonları bitkilerin daha fazla zarar görmesine neden olur. İklim koşulları, virüsün ırkı ve patatesin çeşidi oluşan belirtileri etkilemektedir. İlk belirtiler tepe yapraklarında kıvrılma ve hafif sararma şeklinde ortaya çıkmaktadır. Bunun devamında ise tüm bitkide belirginleşmektedir. Bazı çeşitlerin yumrularında nekrozlar meydana gelmektedir. Hastalıklı bitkilerin gelişimi geri kalmaktadır (Asscheman ve ark., 1996, Brunt ve ark., 1990, Stevenson ve ark., 2001).

Bu dört virüs etmeninin birlikte veya tek bulunma durumlarına, enfeksiyon zamanına ve çeşide göre neden oldukları verim kayıpları değişmektedir. PVY'nün %54–80, PLRV'nün %45–90, PVX'in %10–15, PVS'in %10–20, , PVX ile PVS'in %10–30, PVX ile PVM'in (Patates M virüsü) birlikte %20, PVX ile PVY'nin ise daha fazla verim kaybına neden olduğu ortaya konmuştur (Özalp, 1964; Wright, 1970; Beemster and Rozendaal, 1972; Pietrak, 1981; Hooker, 1986; Love and Tauer, 1988; Whirdworth et al., 1993). PYV, PLRV, PVX ve PVS tarlada inokulum kaynağı bulundukça vektörlerle veya mekaniksel olarak yayılış gösterir. Non persistent olarak taşınan PVS ve PVY'nin inokulum kaynağı yoksa yayılması engellenebilir. Fakat PLRV, persistent olarak taşınmasının yanı sıra

rüzgarla 40–150 km uzaklığa sürüklenabilen kanatlı *M. persicae* formlarıyla taşınmaktadır (Radcliffe and Ragsdale, 2002; Nault, 1997). Tohumluk ve ticari üretim alanlarının birbirlerinden ayrılarak dışardan gelebilecek bulaşmaların önlenmesi bu virüslerin mücadelesinde önemlidir. PVX yalnızca mekaniksel yollarla taşındığından dolayı virüsten ari tohumluk kullanımı yeterlidir. Virüslerden kaynaklanan verim kayıplarını önlemek için ithal edilen ve ithal edildikten sonra çoğaltılan tohumluk yumrular rutin olarak testlenmelidir (Jones, 1988; Matthews, 1993; Spiegel and Martin, 1993).

Polymerase Chain Reaction (PCR) ve Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemleri virüslerin belirlenmesinde rahatlıkla kullanılabilir (Singh ve Somerville, 1992; Barker ve ark., 1993; Spiegel ve Martin, 1993). Ancak PCR, ELISA'ya göre 100-10.000 kat daha duyarlı ve spesifiktir (Vunsh ve ark., 1990; Koerschneck ve ark., 1991; Rowhani ve ark., 1995).

Genetik materyal (DNA veya RNA) üzerinde belirlenen bölgenin, spesifik primerlerin (antisense=reverse ve sense=forward) yanı sıra Taq polimeraz enzimi ile otomatik bir “termocycle” sistemle (PCR cihazı) çoğaltılmasına PCR denir (Mathews, 1993). PCR ile aynı anda birden fazla virüs belirlenebileceği gibi, tek tek de belirlenebilmektedir. Chamberlain and Chamberlain (1994), tarafından ilk kez m-RT-PCR, DNA içeren 9 farklı virüsün DNA kalıpları kullanılarak uygulanmıştır. Bariana et al. (1994) ise 5 farklı virüsün birbirinden ayrı olarak pürüfiye RNA'larını kullanarak bitki virüslerine adapte etmiş devamında virüslerin direk dokudan belirlenmesi için kullanmıştır (Singh et al. 1996; Jacobi et al. 1998). Aynı ya da farklı gruplarda bulunan iki veya daha fazla virüs ile viroidi belirlemek için zeytinlerde (Bertolini et al. 2001); elmalarda (Menzel et al. 2002); muzlarda (Sharman et al. 2000); turp ve şeker pancarında (Hauser et al. 2000); ladin ve çamlarda (Jakobi et al. 1998); havuçlarda (Vercruysse et al. 2000) ve farklı bitkilerde bulunan viroidlerde (Ito et al. 2002; Bostan et al. 2004); afitlerde (Singh et al. 1996) ve patatesten (Singh and Singh 1996; Nie and Singh 2001) uygulanmıştır.

Ekonomik açıdan önemli olan, vejetatif olarak çoğaltılan ve birden fazla virüsün konukçusu durumundaki bitkilerde virüslerin belirlenmesi için yapılan sertifikasyon

programları, günümüzdeki virüs hastalıkları için RT-PCR tekniğinin en fazla kullanıldığı alandır. Özellikle vejetatif olarak çoğaltılan kültür bitkilerinin çoğu aynı anda birden fazla virüsün veya viroidin enfeksiyonuna maruz kalabilmektedir. Uygulamalardaki temel esaslar açısından bakıldığında bu etmenlerin birbirinden ayrı olarak belirlenmeye çalışılması sorunlar doğurmaktadır. Bu nedenle sörvey ve sertifikasyon çalışmalarında mRT-PCR yönteminin iyileştirilmesi önemli yararlar sağlamıştır (Bertolini et al. 2001).

Ülkemizde PVY, PLRV, PVS ve PVX virüs etmenleri üzerine birçok çalışma yapılmış olup bu çalışmalar daha çok viral etmenlerin tespiti üzerine odaklanmıştır (Bostan, 1996; Yardımcı ve Bostan, 1996; Güner ve Yorgancı, 2006).

2.1 Dünya’da Yapılan Çalışmalar

PCR ve ELISA testlerini karşılaştırmak suretiyle patates yumrularında PVY’ yi belirlemek için yapılan bir çalışmada hasattan sonra üç hafta boyunca depolanan yumrulara bile her iki yöntem ile, PVY’nin güvenilir olarak saptanabildiği bildirilmiştir (Barker ve ark., 1993).

PCR ve ELISA yöntemleri kullanılarak mini yumrular ile dormant yumrulara PLRV’ün tespitini geliştirmeye yönelik yapılan çalışmada PCR yöntemi ile gerek tarlada yetiştirilen yumrulara, gerekse in vitro’da çoğaltılan yumrulara etmen saptanırken, ELISA testi ile sadece dormant haldeki mini yumrulara PLRV’ün bulunduğu bildirilmiştir (Spiegel ve Martin, 1993).

Singh ve Singh (1996), RT-PCR ve nükleik asit spot hibridizasyon (NASH) yöntemleri ile dormant yumrulara PVY’nün tespitini etkileyen faktörler üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir.

Yugoslavya’da PVY’nin %10-100 oranı ile en yaygın virüs olduğunu belirten Gavran (1997), PLRV’nin % 10-100, PVX’in % 10-17, PVA’nın % 0-25, PVS’nin % 0-12 oranında bulunduğunu ELISA testi ile saptamıştır.

Tohum kökenli PVY'nin Shepody ve Russet Norkotah çeşidi patateslerde farklı belirtilere neden olduğu ve patates üretimini (tohumluk veya ticari amaçlı) olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir (Hane and Hamm, 1999).

Singh (1999), PVY^O ile enfekteli farklı çeşitlere ait patates bitkilerinden hasat edilen yumrulardan virüsün belirlenmesinde ELISA ve RT-PCR tekniklerini karşılaştırmıştır.

Patateste enfeksiyona neden olan virüslerin mRT-PCR ile belirlenmesine yönelik olarak yapılan bir çalışmada PLRV ve patates iğ yumru viroidi (*Potato spindle tuber viroid - PSTVd*) hariç PVX, PVY, PVA ve PVS'nün cDNA sentezinde oligo dT kullanarak bu virüsler tek reaksiyonda belirlenmiş ve cDNA aşamasında işlemleri kolaylaştırmak için oligo dT primer kullanımının işlevliliği ve bu amaçla kullanılabileceği kaydedilmiştir (Nie ve Singh, 2001).

Ali ve ark. (2002), Pakistan'ın farklı bölgelerinde yetiştirilen patateslerde önemli sorunlara neden olan PLRV, PVY, PVS, PVX ve PVA virüslerinin varlığını tespit etmişlerdir.

Polonya'da Baszta çeşidi patates bitkisinde PVY (%32), PVS (%19), PVM (%7) ve PLRV (%0.01)'nin varlığı tespit edilmiştir (Kostiw, 2002).

Meksika'da yürütülen çalışmada patates klonlarından testlenen yaprak ve yumru örneklerinde PVX, PVY, PVS, PLRV ve PAMV (*Potato aucuba mosaic virus*) bulunmuştur (Lozoya-Saldana ve ark., 2002).

Multiplex RT-PCR ile farklı gruplarda yer alan virüsler aynı reaksiyonda belirlenebildiği gibi, bir virüsün farklı izolatları da belirlenebilmektedir. PVY'nin farklı ırklarını (PVY^O, PVY^N, EU-PVY^{NTN}, NA-PVY^{NTN}) multiplex RT-PCR ile tek reaksiyonda belirlenebildiği saptanmıştır (Nie ve Singh, 2002).

Araştırmacılar PVY, PLRV ve PVX virüs etmenlerinin teşhisi için multiplex RT-PCR ve nested RT-PCR yöntemleri kullanmışlar ve bunun sonucunda nested PCR yönteminin daha hassas olduğunu tespit etmişlerdir (Shalaby ve ark., 2002).

PVX ve PVY'nin RT-PCR ile güvenilir tespitini değerlendirmek amacıyla özellikle tohumluk yumrulardaki virüs içeriğinin testlenmesinde etkili bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Verma ve ark., 2003).

Hasat sonrası yumrularda bulunan virüslerin belirlenmesi için ELISA testi ve RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada araştırmacılar her iki uygulamanın da avantaj ve dezavantajları olduğunu saptamışlardır (Fox ve ark., 2005).

Croslin ve ark. (2006), Kuzey Amerika'da Washington ve Oregon'da patates tohumu yetiştirilen alanlarda PVY⁰ ırkını sırasıyla % 16.4 ve % 25.9 oranında belirlemişlerdir. 2002 yılından 2003 yılına kadar tohumlarda PVY^{N:0} ırkı ile enfekteli olma oranının önemli bir şekilde artmış olduğunu belirtmişlerdir.

Ali ve ark. (2008), Suriye'de yaptıkları başka bir çalışmada PVY'nin %54.2 oranı ile en yaygın virüs olduğunu, PVS'nin %8.4, CMV'nin %3.7, PLRV'nin ise %0.9 oranında bulunduğunu ELISA testi ile belirlemişlerdir.

Rusya'da patatesin genellikle yüksek patojenik ırklara sahip olan ve gün geçtikçe yenileri eklenen çeşitli virüs ve viroidlerden etkilendiği ve bu hastalıkların tehlikeli boyuta ulaştığı tespit edilmiştir. Bunlar arasında PVY, PLRV ve *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd)'in daha sık görüldüğü belirtilmiştir. Yeni geliştirilen fluorescent amplification-based specific hybridization (FLASH-PCR) yöntemi ile PVA, PVY, PVX, PVM, PVS, PLRV, PMTV (*Potato mop-top virus*) ve PSTVd gibi majör patates etmenlerinin tanısı gerçekleştirilmiştir (Ryazantsev ve Zavriev, 2009).

2.2 Ülkemizde Yapılan Çalışmalar

Ülkemizde ilk çalışmalar patatesten hastalık meydana getiren viral etmenlerin patates üretim alanlarında semptomatolojik olarak belirlenmesi hakkında yapılmış olup, PVX'in ülkemizde bulunduğu tespit edilmiştir (Karaca, 1961).

Çalı ve Yalçın (1991), DAS-ELISA ve diğer yöntemleri kullanarak ithal edilmiş tohumluk patates yumrularındaki önemli virüs hastalıklarının araştırmak için yaptıkları çalışmada PLRV, PVY, PVX ile PVS'in özellikle sağlıklı yumrulara ortaya çıkmasının patates üretimini kötüye doğru götürdüğünü belirtmişlerdir.

Erzurum İlinde 1994-1995 yıllarında yapılan başka bir çalışmada ise dsRNA analizi ile PVX'in hastalık oranının ortalama %46.78, PVS'nin ise %23.95 olduğu belirtilmiştir (Bostan, 1996).

Ismail (1997), mekanik inokulasyon ile enfektelenmiş patateslerde ve bazı test bitkilerinde PVY'yi tespit etmek için ELISA testi kullanmıştır. PVY'nin güvenilir ve hızlı bir şekilde saptanabildiği belirtilmiştir. Ayrıca biber, domates, *Datura spp.* ve bütün bitkilerinde de ELISA testi ile virüsün varlığının tespit edilebildiği belirlenmiştir.

Gümüş ve Erkan (1998), Balıkesir/Ayvalık bölgesine ait patates yumrularında PLRV, PVX ve PVY'yi DAS-ELISA yöntemiyle araştırmışlar ve çalışma sonucunda patates yumrularında bu virüsleri PVY (%18), PVX (%11) ve PLRV (%14) olarak saptamışlardır.

Çıtır ve ark. (1999), Tokat İlinin Kazova ve Niksar ovalarında üretimi yapılan tohumluk patates yumrularında yaptıkları çalışmada PVX, PVY ve PLRV virüslerini biyolojik ve serolojik yöntemleri kullanarak araştırmışlardır.

Yardımcı ve Bostan (1999), Erzurum'da yürüttükleri bir çalışmada patateslerde en yaygın olarak sırasıyla PLRV (%42.2), PVX (%38.3), PVY (%7) oranlarında bu virüslerin varlığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca PVX+PLRV (%6.29), PVX+PVY (%2.96) ve PLRV+PVY'nün karışık enfeksiyonlarını bulmuşlardır. Virüs belirtisi görülmeyen

örneklerde ise DAS ELISA yöntemiyle PVY, PLRV ve PVY+PVS enfeksiyonlarını belirlenmiştir.

Bostan ve Açıkgöz (2000), PVX ve PVS virüslerinin neden oldukları belirtileri belirleyerek, bu virüslerin tespitinde dsRNA analizinin kullanımı hakkında bir araştırma yapmışlardır. dsRNA analizini kullanarak PVX'i saptamışlar, ancak PVS'nin bu yöntem ile belirlenemediğini bildirmişlerdir.

Bazı patates çeşitlerinde, Bostan ve Demirci (2001)'nin yaptıkları çalışmaya göre PVY ve PVX'in tek başına ve birbirileri ile karışık enfeksiyonları sonucunda ortaya çıkan belirtileri belirlemek amacıyla PVY'nin bitkilerde gelişme geriliği, sarılık yapraklarda nekrotik çizgiler ve dökülme şeklinde belirtiler oluşturduğunu, PVY ve PVX'nin birlikte oluşturduğu karışık enfeksiyonlarda ise yaprak yüzeyinde kabarma, kıvrırcıklaşma, mozaik ve gelişme geriliği belirtileri oluşturduğunu ortaya koymuşlardır.

Bazı patates çeşitlerinin dorman yumrularından ve yaprak örneklerinden, serada üretilen PLRV bulunan bitkilerde beslenen yeşil şeftali afidi (*M. persicae*) ile tarladaki sarı su tuzaklarından elde edilen kanatlı afitlerden PLRV'nin tespitinde RT-PCR tekniğini kullanarak PLRV'nin Kanada izolatının genomuna göre düzenlenmiş primer çiftinin virüsün Türkiye izolatının belirlenmesinde kullanım durumu araştırılmıştır. Sonuç olarak bu primer çifti ile sarı su tuzaklarından toplanan afitlerden PLRV'nin belirlenmediği bildirilmiştir (Bostan ve ark., 2004).

ELISA ile PVX ve PVY ile enfekteli olarak belirlenen patates çeşitleri sera şartlarında yetiştirilip, bu virüslerin neden oldukları belirtiler gözlemlenmiştir. Çalışmada PVX ve PVY virüslerinin tek ve birlikte bulunma durumları kıyaslanmıştır. Ancak, patates çeşitlerinde ayırt edici farklı bir belirtinin gözlenmediği bildirilmiştir (Bostan ve Demirci, 2004).

Bostan ve Haliloğlu (2004), Bolu, Erzurum, İzmir, Niğde, Nevşehir illerinde patates yumrularında sırasıyla PVY (%17.7), PLRV (%14.2), PVX (%11.8) ve PVS (%4.6)'i ELISA ile belirlemişlerdir. Ayrıca patates yumrularında PVY^N ırkını %13.4 oranında,

PVY^O ırkını ise %4.3 oranında saptamışlar, PVY^C ırkına ise incelenen örneklerin hiçbirisinde rastlamamışlardır.

Trabzon ve Bayburt illerinde ELISA ile test edilen yumruların %38.9 oranında PVX, %1.9 oranında PVY ile enfekteli olduğunu saptamışlardır. Bu örneklerin PLRV ile bulaşık olmadığını bildirmişlerdir (Arlı-Sökmen ve ark., 2005).

Erzurum ilinde 2003, 2004 ve 2005 yıllarında Marfona çeşidi patateslerde yapılan bir çalışmada PLRV, PVY ve PVS virüslerinin enfeksiyon oranları DAS-ELISA yöntemi ile araştırılmış ve en yaygın olarak sırasıyla PVY, PVS ve PLRV tespit edilmiştir. Bu virüs etmenlerinin karışık enfeksiyonları ise en yaygın olarak sırasıyla PVY+PVS, PLRV+PVY ve PLRV+PVS olarak saptanmıştır. RT-PCR yöntemiyle de patates yumrularında PVY, PVS ve PLRV'nin varlığını belirlenmiştir (Bostan ve ark., 2006).

Türkiye'de PVY'nin PVY^{N/NTN} ırkının coğrafik alt gruplarının orijinini belirlemek amacıyla özelleşmiş primerler kullanarak RT-PCR ile yapılan bir çalışmada, Türkiye'de bulunan izolatların Avrupa (EU-PVY^{N/NTN}) orijinli olduğu, Kuzey Amerika (NA-PVY^{N/NTN}) izolatına ise rastlanılmadığı, ülkemize bu strain tipinin ithal tohumlarla Avrupa ülkelerinden girdiği tespit edilmiştir (Bostan ve Dumlupınar, 2006).

2003 ve 2004 yıllarında, Niğde ve Nevşehir illerinde patates üretim alanlarındaki virüsleri DAS-ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. 2003 yılında en yaygın virüsleri sırasıyla PVY+PVS (%22.22), PVY (%18.18), PVS (%11.36), PLRV (%2.27), PVX+PVY (%2.27) olarak, 2004 yılında ise PVY (%51.6), PVY+PVS (%36.6) ve PVS (%1.6) olarak bulunmuştur (Güner ve Yorgancı, 2006).

Özdemir (2006), Afyon ili Sandıklı ilçesinde yürüttüğü çalışmada virüs tarzı belirti gösteren yumruların test bitkilerine mekanik inokulasyon uygulaması yapmıştır. Yumru örneklerinde DAS-ELISA yöntemiyle; PVY – tütün damar nekroz ırkı (PVY^N), PVX ve PLRV'nin varlığı araştırılmıştır. Bu çalışma ile Orta Anadolu Bölgesinde ilk kez patates yumrularındaki PVY^N ırkının varlığını saptamışlardır.

Afyon, Bolu, Nevşehir ve Niğde’ de patateslerde görülen virüs hastalıklarının oranları ve tanılanması Güner (2007) tarafından araştırılmıştır. Uygulanan DAS-ELISA testi sonucunda, PVY ve PVS diğerlerinden daha yoğun olarak bulunmuştur. Bazı patates çeşitlerinde, PVY ve PVS oluşturduğu reaksiyonlara göre incelenmiştir.

İzmir’in Ödemiş bölgesinde RT-PCR yöntemi kullanılarak patates yumrularında PVY, PVX, PVS ve PLRV virüslerinin varlığı araştırılmıştır. Beş patates çeşidinde dört viral etmenin varlığı tespit edilmiştir. Hiçbir yumruda dört viral etmen bir arada bulunmamıştır (Kökten, 2007).

Patateslerde önemli üç virüs hastalığının simptom göstermeyen patates bitkilerinde de çok yaygın olduğunu ve RT-PCR yönteminin bu virüslerin saptanmasında ELISA’ya göre çok daha başarılı bir şekilde kullanılabileceği belirtilmiştir. Gündoğan (2008), patateslerde PVY, PVX ve PVS’nin bulunma durumunu ELISA ve RT-PCR yöntemi kullanarak araştırmışlardır. İncelenen örneklerin sadece 3 tanesi PVY ve PVS ile ve bir tanesi PVY ve PVX ile karışık enfekteli bulunmuştur.

Güner ve Yorgancı (2009), 2003-2004 yıllarında Afyonkarahisar, Bolu illerinde yaptıkları surveyler sonucunda patates üretim alanlarındaki virüsleri DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri kullanarak araştırmışlardır. PVY’nin, Afyon ilinde % 20.46 ve Bolu ilinde ise % 13.06 oranında yaygın olduğunu belirtmişlerdir.

Adana, İçel illerinde 2003-2004 yıllarında yürütülen bir çalışmada patates üretim alanlarındaki virüsler DAS-ELISA ve PCR yöntemleri kullanarak araştırılmıştır ve PVY’nin, Afyonkarahisar ilinde % 20.46 ve Bolu ilinde ise % 13.06 oranında yaygın olarak bulunduğu belirlenmiştir (Özaydın, 2010).

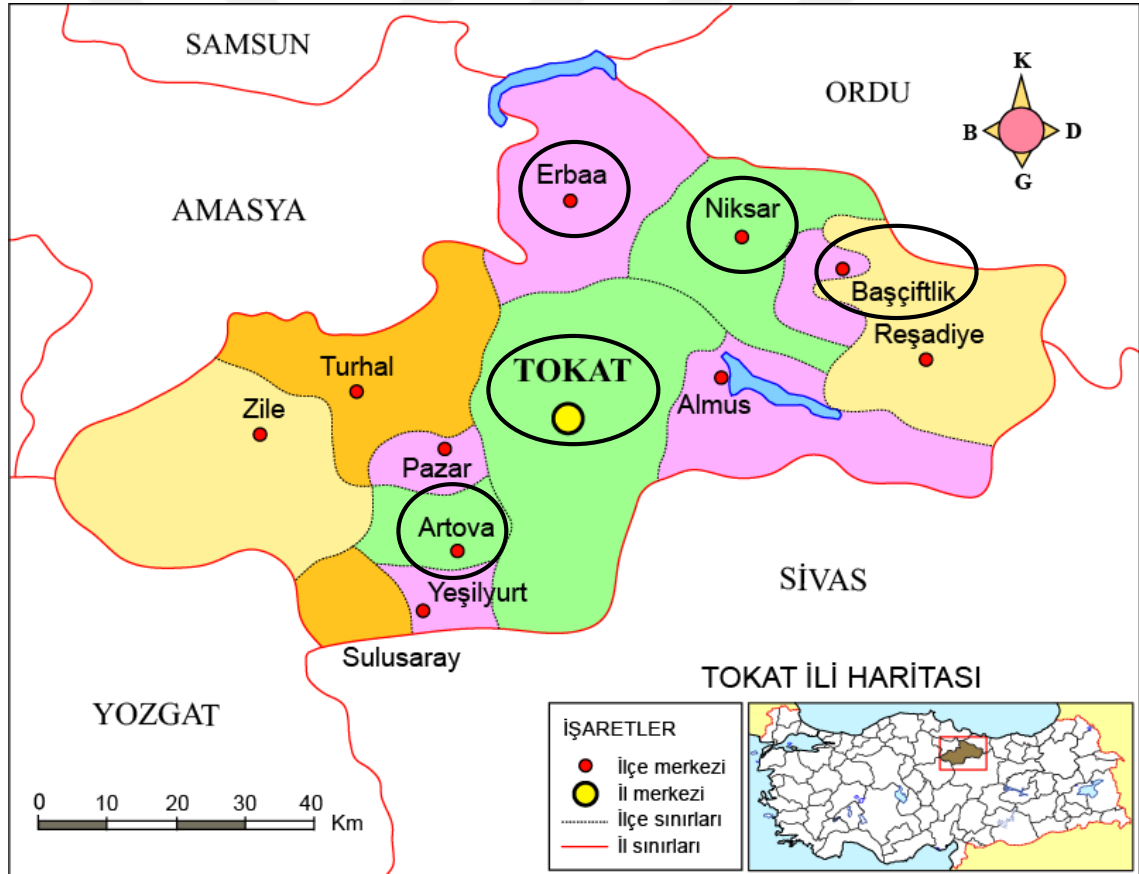
Hatay ilinde patates üretiminde önemli bazı viral sorunların belirlenmesi için yapılan bir çalışmada patateslerde en fazla PVY enfeksiyonu bulunmuştur (%49.5). Hatay’da bulunan patateslerde ilk defa AMV belirlenmiştir. Patates örneklerinde PVX belirlenmemiştir (Çarpar, 2016).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Yaprak ve yumru örnekleri

Çalışmanın ana materyalini 2018 yılında Tokat ili patates üretim alanlarında yapılan arazi surveylerinde toplanan patates yaprak örnekleri ve çiftçilerden elde edilmiş olan yumru örnekleri oluşturmuştur. Bu örneklerin temin edildiği ilçeler Şekil 3.1.'de gösterilmiştir. Surveylerde toplanan yaprak örnekleri buzdolabında -20 °C' de muhafaza edilmiştir. Toplanan yumrular çalışmalar yapıncaya kadar buzdolabında +4 °C' de bekletilmiştir.



Şekil 3.1. Sürvey yapılan ilçeler

3.1.2 Test bitkileri

Biyolojik indeksleme çalışmaları için, moleküler çalışmalar sonucunda tespit edilen virüslerden PVY için PA1-1 izolatu, PVS için PN13-1 izolatu, PVX için PA1-6 izolatu ve PLRV için de PN6-5 izolatu seçilmiştir ve bazı deney bitkilerinde simptom gelişimi izlenmiştir.

Mekanik inokulasyon çalışmalarında, havan ve havaneli, fosfat tampon çözeltisi, 2-mercaptoethanol, karborandum tozu ve çeşme suyu kullanılmıştır. Test bitkileri tohumları ve fidelerinin yetiştirilmesi amacıyla ise perlit, toprak ve torf karışımı (1:1:1), plastik saksılar, plastik viyoller kullanılmıştır.

PVY, PVS, PVX ve PLRV izolatlarının farklı konukçu bitkilerde reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılan mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan test bitkileri ve temin edildikleri yerler Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan test bitkileri ve temin edildikleri yerler

Latince Adı	Temin Edildiği Yer
<i>Nicotiana glutinosa</i>	Gaziosmanpaşa Üniv. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü-Viroloji
<i>Nicotiana tabacum subs. Xanthi 81</i>	Gaziosmanpaşa Üniv. Ziraat Fakültesi Tarla Bölümü
<i>Chenopodium album</i>	Gaziosmanpaşa Üniv. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü-Viroloji
<i>Amaranthus retroflexus</i>	Gaziosmanpaşa Üniv. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma BölümüHerboloji

3.1.3 Çalışmada kullanılan primerler

PVY, PVS, PVX ve PLRV virüs etmenleri için çalışmada kullanılan primerler Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan primerler (Peker, 2007)

Virüs	Baz dizimleri	Primerlerin spesifik olduğu bölge	Polarite	Beklenen bant büyüklüğü (bp)	Primerlerin bağlanma sıcaklığı
PVS	5'-TGGGGAATCAGTCCGGCTAGTC-3' 5'-ACTGGACCTGCGCTTAGGCT-3'	Kılıf protein	Sense Antisense	1100 bp	62°C
PLRV	5'- CGCGCTAACAGAGTTCAGCC-3' 5'-GCAATGGGGGTCCAATCAT-3'	Kılıf protein	Sense Antisense	336 bp	62°C
PVX	5'-TAGCACAACACAGGCCACAG-3' 5'-GGCAGCATTTCATTCAGCTTC-3'	Kılıf protein	Sense Antisense	562 bp	62°C
PVY	5'-AAGCTTCCATACTACCCGC-3' 5'-CATTTGTGCCCAATTGCC-3'	P1 protein	Sense Antisense	856 bp	58°C

3.2 Yöntem

3.2.1 Hastalıklı bitki örneklerinin toplanması

Virüs etmenlerin belirlenmesi için Tokat Tarım İl Müdürlüğü'nden alınan veriler doğrultusunda 2018 yılı Mart-Temmuz ayları arasında Tokat ilinde patates üretiminin yoğun olarak yapıldığı Niksar, Merkez, Erbaa, Başçiftlik ve Artova ilçelerinde arazi sürveysleri yapılmıştır. Yaz döneminde arazide virüs belirtisi gösteren bitkilerden yaprak örnekleri alınmıştır. Ayrıca hasat döneminde de hem tüketmek için, hem de gelecek yıl tohumluk olarak ayrılan virüs belirtisi gösteren ve göstermeyen yumrularından örnekleme yapılmıştır.

2018 yılında yürütülen bu çalışma kapsamında Tokat iline ait Merkez, Niksar, Erbaa, Artova ve Başçiftlik ilçeleri patates üretim alanlarından toplam 418 adet yaprak örneği alınmıştır. Ayrıca, hasat olgunluğuna erişen bitkilerin yumrularından da örnekleme yapılmıştır: Niksar ilçesinden 59 yumru, Erbaa ilçesinden 26 yumru, Artova ilçesinden ise 6 yumru toplanmıştır (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3. İlçelerde ekim yapılan alan(dekar), alınan yaprak ve yumru örneklerinin sayıları

İlçe Adı	Ekilen Alan(dekar)	İncelenen Tarla Sayısı	Alınan Yaprak Örneği Sayısı	Alınan Yumru Örneği Sayısı
Merkez	6 876	12	116	-
Erbaa	4 034	9	92	26
Niksar	10 060	14	101	59
Artova	1 015	5	44	6
Başçiftlik	2 934	8	65	-
Toplam	24 919	48	418	91

3.2.2 Yumru çimlendirme çalışmaları

Hasat olgunluğuna erişen patates bitkilerinden alınan 91 adet yumru sera koşullarında çimlendirilmiştir. Yumruları çimlendirmek amacıyla perlit, toprak ve torf karışımı (1:1:1) ile plastik saksılar kullanılmıştır. Yumrular ekilirken uygun şekilde etiketleme yapılmıştır. Daha sonra sera ortamında belirli aralıklarla sulama yapılarak yumrular çimlendirilmiştir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Ekilen yumruların serada çimlendirilmesi

Çimlenen yumrulardan alınan yaprak örnekleri kullanılana kadar saklanmak için etiketlenip -20°C ' de muhafaza edilmiştir.

3.2.3 RNA izolasyonu

Çalışmada Tokat ili patates üretim alanlarından toplanan yaprak örneklerinden ve kontrollü şartlarda çimlendirilen patates yumrularının yapraklarından RNA izolasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu çalışmaları Astruc ve ark. (1996)'nın önerdiği yönteme göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

a. Örnekler ekstraksiyon tampon çözeltisi [(100 mM Tris-HCl (pH.8.0), 50 mM EDTA (pH. 7.0), 5 mM NaCl, 10 mM 2-mercapto-ethanol (1/1000)] ile 1:2(w/v) oranında sulandırılarak ezme işlemi yapılmıştır.

b. Bitki öz suyundan 1 ml eppendorf tüpüne alınarak örnekler 3 dakika 4.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra, pellet üzerine 50 µl Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) (%20) ilave edilerek vorteks ile karıştırılmıştır.

c. Daha sonra tüpler 65°C'de 30 dakika ısı bloklarında inkube edilmiştir.

d. Tüplere 250 µl potasyum asetat (5M) ilave edilerek 20 dakika buz içerisinde bekletilip daha sonra 15 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

e. Süpernatant iki kısma ayrılarak, 500 µl'si yeni hazırlanmış eppendorf tüplerine konulup -70°C'de saklanılmıştır. Geriye kalan 500 µl süpernatant yeni hazırlanan eppendorf tüplerine konularak üzerine % 96'lık Ethanol'den 500 µl ilave edilerek ve 1 ml ye tamamlandıktan sonra vorteks ile karıştırılmıştır.

f. Sonra tüplere 50 µl sodium asetat (3M) ilave edilerek örnekler tekrar karıştırılıp -70°C'de bir gece bekletilmiştir.

g. Ertesi gün örnekler 15 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra sıvı kısım ortamdaki uzaklaştırılmıştır.

h. Eppendorf tüpleri ters çevrilerek filtre kağıdı üzerinde 5 dakika süre ile kurutulup pellet üzerine 1 ml ethanol (% 70) ilave edilerek yıkama işlemi yapılmıştır.

ı. Eppendorf tüplerde RNA'ları çöktürmek için 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilip tüp içerisindeki ethanol atılarak eppendorf tüpleri kurutulmaya bırakılmıştır.

Örneklerden elde edilen toplam RNA'lar 50 µl distile su ile sulandırıldıktan sonra kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4 Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Toplam RNA izolasyonu yapılan örneklerden elde edilen RNA'lar kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi yapılırken ependorf tüpler içerisinde 2 µl toplam RNA, 1µl random heksamer primer (5'-d(NNNNNN)-3'N = G, A, T veya C)(10µmol) ve 8 µl distile su ile karıştırılmıştır. Karışım 65 °C'de 5 dak. inkübasyondan sonra, buz üzerine alınıp 3 dak. buzda bekletilmiştir. Tüplerin içerisine 5X MMLV buffer (5X), 0.2 mM dNTP (25 mM), 0.5 µl random heksamer primer (10 µmol), 0.25 µl RNase inhibitör (10u/µl), 0.25 µl Reverse transcriptase (20-20u/µl) (Thermo Scientific)ve distile su bulunan karışımdan 10 µl ilave edilerek her bir tüp 20 µl'ye tamamlanmıştır. Tüpler daha sonra thermocycler cihazında 25°C'de 5 dakika, 42°C'de 60 dakika ve 72°C'de 10 dakika inkube edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.2.5 PCR çalışmaları

İlk aşamada elde edilen cDNA kalıp olarak kullanılarak virüslere spesifik primerlerle PCR işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada 2 µl cDNA, 5 µl 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 0.2 µl dNTP, 0.5 µl forward primer (100 pmol), 0.5 µl reverse primer (100 pmol), 1.5 µl MgCl₂ (25 mM), 0.25 µl Taq polimeraz enzimi (Promega) ve 0.25 µl Dimetilsülfoxid (DMSO) karıştırıldıktan sonra saf su ile 25 µl'ye tamamlanıp PCR cihazına yerleştirilmiştir.

RT-PCR da başlangıç denaturasyonu için 94°C'de 2 dak., döngü içerisindeki denaturasyon için 94°C'de 1 dakika, primerlerin bağlanması (primer annealing) için 58°C'de (PVY için) 30 sn. (diğer virüsler için 62°C), sentezin tamamlanması (primer ekstention) için 72°C'de 2 dak. tutulmuştur ve amplifikasyon 35 döngüde gerçekleştirilmiştir. Son olarak tamamlanmayan bölgelerin tamamlanabilmesi için örnekler 72°C'de 10 dak. (final extention) tutulmuştur.

3.2.6 Agaroz jel elektroforez çalışmaları

Elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez yöntemi ile analizi için %1,2 oranında agaroz jel hazırlanmıştır. Daha sonra içerisine 10 mg/ml ethidium bromür ilave edilmiştir. Örnekler 100 V'da 1 saat elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez işlemi sonunda jel görüntüleme cihazında PCR ürünleri incelenmiş ve jeldeki ürünlerin görüntüleri fotoğraflanmıştır.

3.2.7 Filogenetik analiz çalışmaları

Filogenetik çalışmalar için RT-PCR sonunda pozitif sonuç veren bazı izolatların RT-PCR ürünleri çift yönlü sekansa gönderilmiştir. PVY için üç (PM1-6, PA1-1, PE2-6) , PVS için sekiz (PA3-2, PA3-3, PN5-2, PN14-3, PN3-6, PB7-1, PB5-4, PB6-2), PLRV için yedi (PB2-1, PB5-9, PA4-10, PA4-4, PA3-4, PB4-2, PB5-1) ve PVX için üç örnek (PB7-6, PA3-3,PA1-5) sekansa gönderilmiştir. Sekanslama sonunda elde edilen veriler MEGA10 bilgisayar programı ile analiz edilmiştir. Veriler National Center for Biotechnology Information (NCBI) gen bankasında kayıtlı referans izolatlarla kıyaslanarak filogenetik ağaç oluşturulup akrabalık dereceleri karşılaştırılmıştır (Anonim, 2019). Çalışmada PVY için P1 protein, PVX, PVS, PLRV için kılıf protein bölgelerine ait sekans verileri elde edilmiştir. Elde edilen veriler MEGAX bilgisayar programında “neighbor-joining method” yöntemi ve 1000 bootstrap değeri kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.8 Biyolojik indeksleme çalışmaları

Mekanik inokulasyon çalışmaları; PCR testleri sonucunda PVY, PVX, PVS ve PLRV viral etmenleri için pozitif olarak tespit edilen örneklerin biyolojik tanısını yapmak için gerçekleştirilmiştir. Enfekteli bitkilerden alınan yapraklar, 1:5 oranında 2-Mercaptoethanol ve/veya %1'lik sodyum sülfid içeren 0.02 M Fosfat tampon çözeltisi (pH; 7.0) içeren steril porselen havanda ezildikten sonra, elde edilen bitki öz suları daha önceden karborandum tozu serpilmiş test bitkilerinin yapraklarına el veya cam spatül ile mekanik olarak inokule edilmiştir. Birkaç dakika beklendikten sonra inokule edilen

yapraklar eşme suyu ile yıkanmıştır. Daha sonra, bitkiler simptom çıkışını gözlemek için 2 hafta süre ile serada muhafaza edilmiştir (Özaydın, 2010).

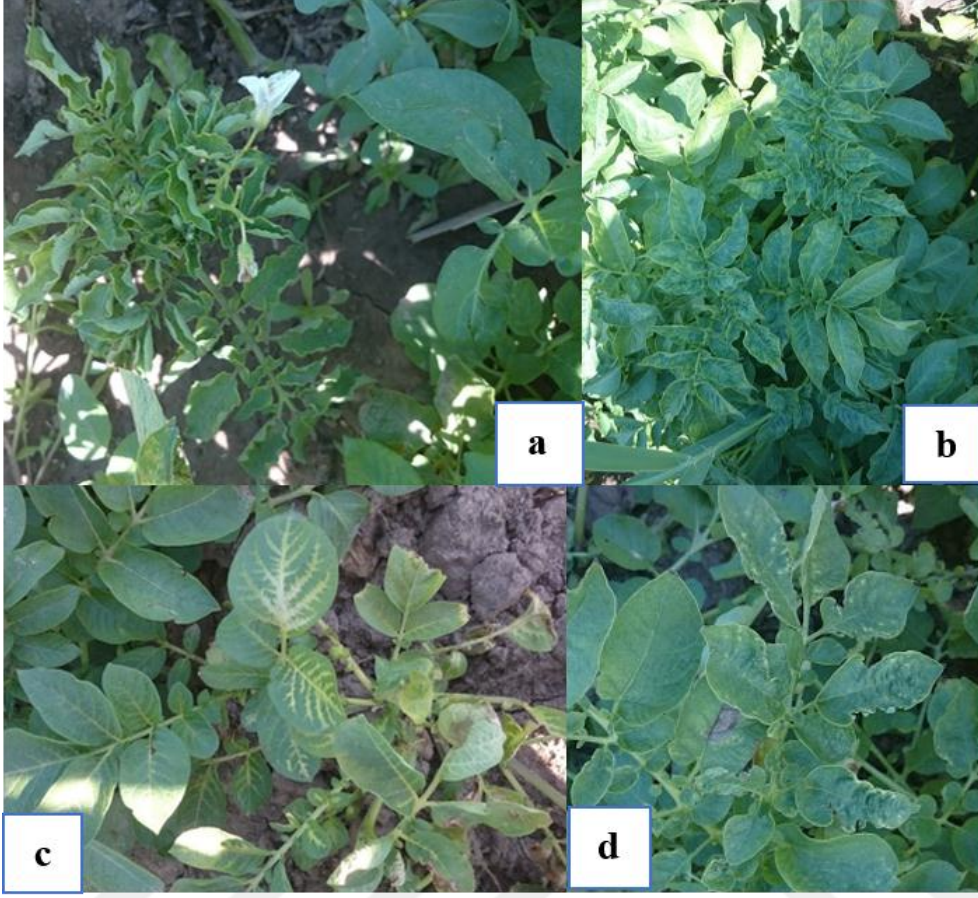


4. BULGULAR

Patates üretiminde ciddi sorunlar teşkil eden viral etmenlerden dolayı önemli miktarda verim ve ekonomik kayıplar meydana gelmektedir. Tokat ili ülkemizde patates üretimi açısından hatırı sayılır bir yere sahiptir. Ancak Tokat ilinde patates üretimini etkileyen viral etmenlerin belirlenmesi açısından yapılan çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile Tokat'ın yoğun şekilde patates üretimi yapılan Merkez, Niksar, Erbaa, Başçiftlik ve Artova ilçelerinde PVY, PLRV, PVX ve PVS virüs etmenlerini belirlemek amacıyla RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca araştırmanın devamında pozitif sonuç alınan örneklerle filogenetik analiz çalışmaları yapılmasının yanı sıra biyolojik indeksleme çalışmaları da yürütülmüştür.

4.1 Tokat İli Patates Üretim Alanlarında Virüslerin Bulunma Durumları

Örnekler araştırılan virüs etmenlerinin (PVY, PLRV, PVX, PVS) belirtilerine göre alınmıştır. Araziden toplanan örneklerin yapraklarında gözlenen belirtiler; sararma, nekrotik leke, yaprakların küçük kalması, bitkilerde bodurlaşma, damarların içe doğru çökmesi, tepe yapraklarında kıvrılma, yapraklarda şekil bozukluğu, damarlardan başlayan renk açılmaları, mozaik, damarlarda sararmalar, sarı nekrotik lekeler, yapraklarda gevrekleşme, damarlarda bantlaşma, yapraklarda kabarcıklaşma, damarlarda kıvrılma, yaprak kenarlarında kızarıklık, yaprak uçlarında kahverengileşme olarak gözlemlenmiştir. Yumrulara gözlenen belirtiler ise şekil bozukluğu, çatlamlar ve yumru gözlerinde hilal şeklinde oyuklar olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.1., Şekil 4.2.).



Şekil 4.1. a) Bodurlaşma ve yapraklarda kıvrılma b) Sarı nekrotik lekeler c) Damarlardan başlayan renk açılmaları d) Şekil bozukluğu ve kabarcıklaşma

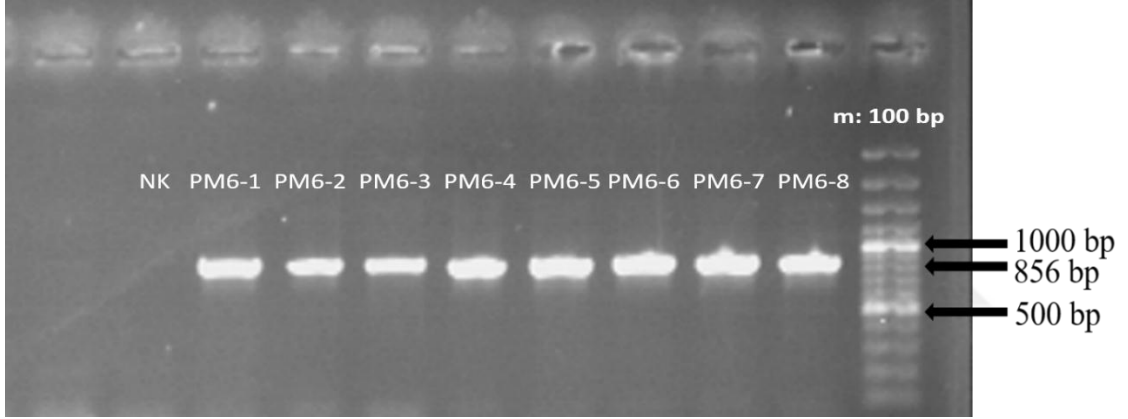


Şekil 4.2. Yumru gözlerinde hilal şeklinde oyuklar

4.2 RT-PCR Çalışmalarından Elde Edilen Sonuçlar

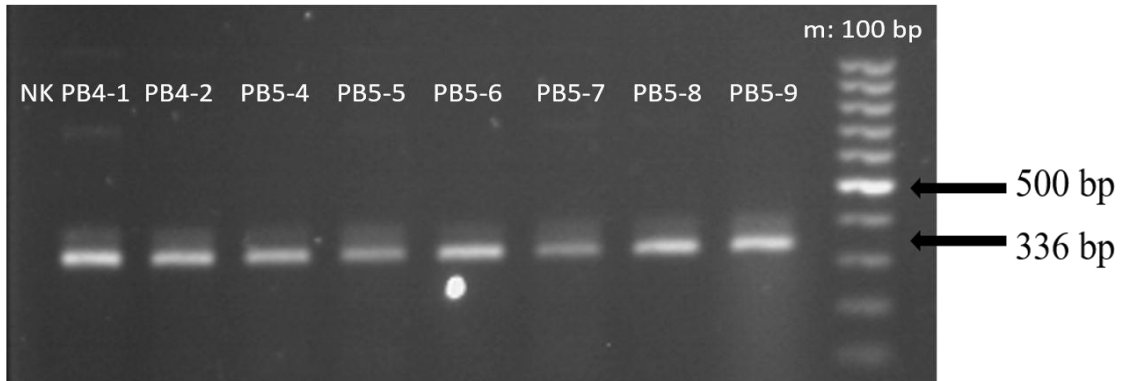
Tokat ili patates üretim alanlarında virüs etmenlerinin varlığını belirlemek amacıyla toplanan 418 yaprak örneği ve 91 yumru örneğinden total RNA izolasyonu yapılmıştır. PVY, PLRV, PVX ve PVS virüslerini tespit etmek için RNA izolasyonu yapılan örneklerden hexamer primerle cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra virüslere spesifik primerlerle RT-PCR yöntemi uygulanmıştır.

PVY'ye spesifik primerlerle yapılan RT-PCR sonucunda 197 yaprak örneğinde ve 66 yumru örneğinde beklenen büyüklükte (856 bp) bant elde edilmiştir (Şekil 4.3).



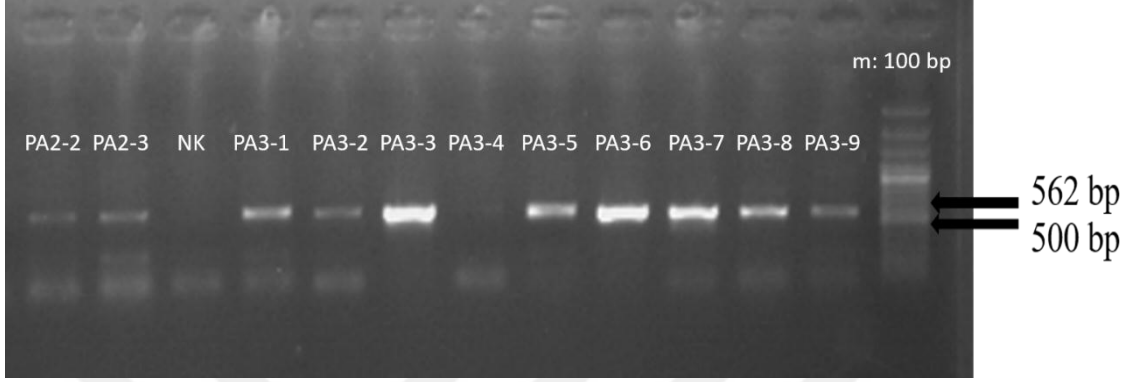
Şekil 4.3. PVY'ye spesifik primerle yapılan bazı izolatlarla ait RT-PCR sonucu.

PLRV'ye spesifik primerlerle yapılan RT-PCR sonucunda 22 yaprak örneğinde ve 1 yumru örneğinde beklenen büyüklükte (336 bp) bant elde edilmiştir (Şekil 4.4).



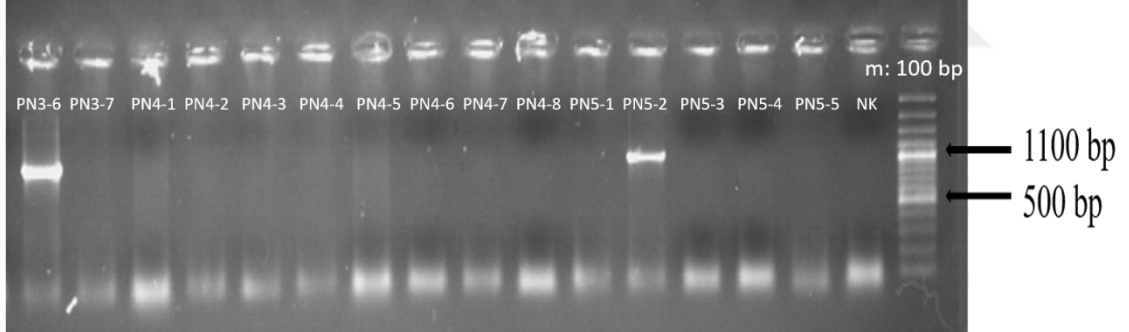
Şekil 4.4. PLRV'ye spesifik primerle yapılan bazı izolatlarla ait RT-PCR sonucu.

PVX' e spesifik primerlerle yapılan RT-PCR sonucunda yumru örneklerinde bant oluşumu gözlenmemiştir. Ancak 25 yaprak örneğinde beklenen büyüklükte (562 bp) bant elde edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. PVX' e spesifik primerlerle yapılan bazı izolatlara ait RT-PCR sonucu.

PVS' e spesifik primerlerle yapılan RT-PCR sonucunda 70 yaprak örneğinde ve 6 yumru örneğinde beklenen büyüklükte (1100 bp) bant elde edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. PVS' e spesifik primerlerle yapılan bazı izolatlara ait RT-PCR sonucu.

RT-PCR testlemeleri sonucunda belirlenen virüslerin belirtileri kontrol edilmiştir. PVY için enfekteli bitkilerde gözlenen belirtiler kıvrıcıklık, mozaik, sararma ve nekrotik lekeler (Şekil 4.7), PVS için gözlenen belirtiler sararma, gelişme geriliği ve damarların içe doğru çökmesi (Şekil 4.8), PLRV için gözlenen belirtiler sararma ve kıvrılma (Şekil 4.9), PVY ve PVX ile karışık enfekteli bitkilerde gözlenen belirtiler kıvrıcıklık, sararma ve mozaik (Şekil 4.10), PVY ve PVS ile karışık enfekteli bitkilerde gözlenen belirtiler ise nekrotik lekeler ve sararma (Şekil 4.11) olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. PVY ile enfekteli patates bitkilerinde gözlenen kıvrıcılık, mozaik, sararma ve nekrotik leke şeklindeki belirtilerin görünümü



Şekil 4.8. PVS ile enfekteli patates bitkilerinde gözlenen sararma, gelişme geriliği ve damarların içe doğru çökmesi şeklindeki belirtilerin görünümü



Şekil 4.9. PLRV ile enfekteli patates bitkilerinde gözlenen sararma ve kıvrılma şeklindeki belirtilerin görünümü



Şekil 4.10. PVY + PVX ile karışık olarak enfekteli patates bitkilerinde gözlenen kıvrıcılık, sararma ve mozaik şeklindeki belirtilerin görünümü



Şekil 4.11. PVY + PVS ile karışık olarak enfekteli patates bitkilerinde nekrotik leke ve sararma şeklindeki belirtilerin görünümü

4.2.1 Yaprak örneklerinin RT-PCR ile testlenmesi sonucu elde edilen bulgular

PVY, PVS, PVX ve PLRV virüs etmenlerinin varlığını tespit etmek için yapılan RT-PCR testi sonuçları örneklerin kodları ile birlikte Çizelge 4.1.- 4.5.'te verilmiştir.

Çizelge 4.1. Tokat ili Merkez ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları

Örnek Kodu	PVY	PVS	PVX	PLRV
PM1-1	-	-	-	-
PM1-2	-	-	-	-
PM1-3	-	-	-	-
PM1-4	-	-	-	-
PM1-5	-	-	-	-
PM1-6	+	-	-	-
PM1-7	-	-	-	-
PM1-8	-	-	-	-
PM2-1	-	-	-	-
PM2-2	-	-	-	-
PM2-3	-	-	-	-
PM2-4	-	-	-	-

Çizelge 4.1. (devam) Tokat ili Merkez ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları

Örnek Kodu	PVY	PVS	PVX	PLRV
PM2-5	-	-	-	-
PM2-6	-	-	-	-
PM2-7	-	-	-	-
PM2-8	-	-	-	-
PM3-1	+	-	-	-
PM3-2	+	+	-	-
PM3-3	+	-	-	-
PM3-4	+	-	-	-
PM3-5	+	-	-	-
PM3-6	+	-	-	-
PM3-7	+	-	-	-
PM3-8	-	-	-	-
PM3-9	+	-	-	-
PM3-10	+	-	-	-
PM4-1	-	-	-	-
PM4-2	-	-	-	-
PM4-3	+	-	-	-
PM4-4	+	-	-	-
PM4-5	+	-	-	-
PM4-6	+	-	-	-
PM4-7	+	-	-	-
PM4-8	+	-	-	-
PM4-9	-	-	-	-
PM4-10	+	-	-	-
PM5-1	-	-	-	-
PM5-2	+	-	-	-
PM5-3	+	-	-	-
PM5-4	+	-	-	-
PM5-5	+	-	-	-
PM5-6	-	-	-	-
PM5-7	+	-	-	-
PM5-8	-	-	-	-
PM5-9	+	-	-	-
PM5-10	+	-	-	-
PM6-1	+	-	-	-
PM6-2	+	-	-	-
PM6-3	+	-	-	-
PM6-4	+	-	-	-
PM6-5	+	-	-	-

Çizelge 4.1. (devam) Tokat ili Merkez ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları

Örnek Kodu	PVY	PVS	PVX	PLRV
PM6-6	+	-	-	-
PM6-7	+	-	-	-
PM6-8	+	-	-	-
PM6-9	+	-	-	-
PM6-10	+	-	-	-
PM7-1	+	-	-	-
PM7-2	+	-	-	-
PM7-3	+	-	-	-
PM7-4	+	-	-	-
PM7-5	+	-	-	-
PM7-6	+	-	-	-
PM7-7	+	-	-	-
PM7-8	+	-	-	-
PM7-9	+	-	-	-
PM7-10	+	-	-	-
PM8-1	+	-	-	-
PM8-2	+	-	-	-
PM8-3	+	-	-	-
PM8-4	+	-	-	-
PM8-5	+	-	-	-
PM8-6	+	-	-	-
PM8-7	+	-	-	-
PM8-8	+	-	-	-
PM8-9	+	-	-	-
PM8-10	-	-	-	-
PM9-1	-	-	-	-
PM9-2	-	-	-	-
PM9-3	-	-	-	-
PM9-4	-	-	-	-
PM9-5	-	-	-	-
PM9-6	-	-	-	-
PM9-7	-	-	-	-
PM9-8	-	-	-	-
PM9-9	-	-	-	-
PM9-10	-	-	-	-
PM10-1	-	-	-	-
PM10-2	-	-	-	-
PM10-3	-	-	-	-
PM10-4	-	-	-	-

Çizelge 4.1. (devam) Tokat ili Merkez ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları

Örnek Kodu	PVY	PVS	PVX	PLRV
PM10-5	+	-	-	-
PM10-6	-	-	-	-
PM10-7	-	-	-	-
PM10-8	+	-	-	-
PM10-9	-	-	-	-
PM10-10	-	-	-	-
PM11-1	+	-	-	-
PM11-2	-	-	-	-
PM11-3	-	-	-	-
PM11-4	-	-	-	-
PM11-5	-	-	-	-
PM11-6	-	-	-	-
PM11-7	-	-	-	-
PM11-8	-	-	-	-
PM11-9	-	-	-	-
PM11-10	-	-	-	-
PM12-1	+	-	-	-
PM12-2	-	-	-	-
PM12-3	+	-	-	-
PM12-4	+	-	-	-
PM12-5	+	-	-	-
PM12-6	+	-	-	-
PM12-7	-	-	-	-
PM12-8	-	-	-	-
PM12-9	+	-	-	-
PM12-10	+	-	-	-

+: pozitif sonuç -: negatif sonuç

RT-PCR testlemeleri sonucunda Çizelge 4.1’de belirtildiği gibi Tokat Merkez’den toplanan 116 örneğin 64 tanesi (%55.17) bir veya birden fazla virüs etmeni ile enfekteli olarak bulunmuştur. 116 adet örneğin 63 tanesinin (%54.31) PVY, 1 tanesinin (%0.86) PVS ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Tokat Merkez için toplanan örneklerde PVX ve PLRV virüs etmenleri ile enfekteli örnek tespit edilmemiştir. Enfekteli örneklerden 1 tanesinin PVY + PVS ile karışık enfeksiyon oluşturduğu belirlenmiştir. Virüsle bulaşık olduğu tespit edilen örneklerin içerisinde en yaygın olan etmen PVY olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.2. Tokat ili Niksar ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları

Örnek Kodu	PVY	PVS	PVX	PLRV
PN1-1	+	-	-	-
PN1-2	-	-	-	-
PN1-3	-	-	-	-
PN1-4	+	-	-	-
PN1-5	-	-	-	-
PN1-6	+	-	-	-
PN1-7	-	-	-	-
PN1-8	+	-	-	-
PN1-9	-	-	-	-
PN1-10	+	-	-	-
PN1-11	-	-	-	-
PN1-12	-	-	-	-
PN1-13	-	-	-	-
PN1-14	-	-	-	-
PN2-1	+	-	-	-
PN2-2	-	-	-	-
PN2-3	+	-	-	-
PN2-4	+	-	-	-
PN2-5	+	-	-	-
PN2-6	+	-	-	-
PN2-7	+	-	-	-
PN3-1	+	-	-	-
PN3-2	-	-	-	-
PN3-3	-	-	-	-
PN3-4	-	-	-	-
PN3-5	-	-	-	-
PN3-6	-	+	-	-
PN3-7	-	-	-	-
PN4-1	-	-	-	-
PN4-2	-	-	-	-
PN4-3	-	-	-	-
PN4-4	-	-	-	-
PN4-5	-	-	-	-
PN4-6	-	-	-	-
PN4-7	-	-	-	-
PN4-8	+	-	-	-
PN5-1	+	-	-	-
PN5-2	-	+	-	-
PN5-3	-	-	-	-

Çizelge 4.2. (devam) Tokat ili Niksar ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları

Örnek Kodu	PVY	PVS	PVX	PLRV
PN5-4	-	-	-	-
PN5-5	-	-	-	-
PN5-6	-	-	-	-
PN6-1	+	-	-	-
PN6-2	+	-	-	-
PN6-3	+	-	-	-
PN6-4	+	-	-	-
PN6-5	-	-	-	+
PN7-1	-	-	-	-
PN7-2	-	-	-	-
PN7-3	-	-	-	-
PN7-4	-	-	-	-
PN7-5	-	-	-	-
PN7-6	-	-	-	-
PN7-7	-	-	-	-
PN7-8	-	-	-	-
PN7-9	-	-	-	-
PN7-10	-	-	-	-
PN7-11	-	-	-	-
PN8-1	+	-	-	-
PN8-2	+	-	-	-
PN8-3	+	-	-	-
PN8-4	-	-	-	-
PN8-5	+	-	-	-
PN8-6	-	-	-	-
PN8-7	+	-	-	-
PN9-1	+	-	-	-
PN9-2	+	-	-	-
PN9-3	+	-	-	-
PN9-4	+	-	-	-
PN9-5	+	-	-	-
PN10-1	-	-	-	-
PN10-2	+	-	-	-
PN10-3	-	-	-	-
PN10-4	+	-	-	-
PN10-5	-	-	-	-
PN11-1	+	-	-	-
PN11-2	+	-	-	-
PN12-1	+	-	-	-

Çizelge 4.2. (devam) Tokat ili Niksar ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları

Örnek Kodu	PVY	PVS	PVX	PLRV
PN12-2	-	-	-	-
PN12-3	-	-	-	-
PN12-4	-	-	-	-
PN13-1	-	+	-	-
PN13-2	-	+	-	-
PN13-3	-	+	-	-
PN13-4	-	-	-	-
PN13-5	-	-	-	-
PN13-6	-	-	-	-
PN13-7	-	+	-	-
PN13-8	-	-	-	-
PN13-9	-	+	-	-
PN13-10	-	-	-	-
PN14-1	-	-	-	-
PN14-2	-	-	-	-
PN14-3	+	+	-	-
PN14-4	-	-	-	-
PN14-5	+	-	-	-
PN14-6	+	-	-	-
PN14-7	-	-	-	-
PN14-8	-	-	-	-
PN14-9	+	-	-	-
PN14-10	+	-	-	-

+: pozitif sonuç -: negatif sonuç

Çizelge 4.2. incelendiğinde RT-PCR testlemeleri sonucunda Tokat Niksar ilçesinden toplanan 101 adet örneğin 47 tanesi (%46.53) bir veya birden fazla virüs etmeni ile enfekteli olarak bulunmuştur. 101 adet örneğin 38 tanesi (%37.62) PVY, 8 tanesi (%7.92) PVS, 1 tanesi (%0.99) PLRV ile enfekteli olarak saptanmıştır. Tokat Niksar için toplanan örneklerde PVX ile enfekteli örnek tespit edilememiştir. Enfekteli örneklerden 1 tanesinin PVY + PVS ile karışık enfeksiyon oluşturduğu belirlenmiştir. Virüsle bulaşık olduğu tespit edilen örneklerin içerisinde en yaygın olan etmen PVY olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.3. Tokat ili Erbaa ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları

Örnek Kodu	PVY	PVS	PVX	PLRV
PE1-1	-	-	-	-
PE1-2	-	-	-	-
PE1-3	-	-	-	-
PE1-4	-	-	-	-
PE1-5	-	-	-	-
PE1-6	-	-	-	-
PE1-7	-	-	-	-
PE1-8	-	-	-	-
PE1-9	-	-	-	-
PE1-10	-	-	-	-
PE1-11	-	-	-	-
PE1-12	-	-	-	-
PE1-13	-	-	-	-
PE2-1	-	-	-	-
PE2-2	-	-	-	-
PE2-3	-	-	-	-
PE2-4	-	-	-	-
PE2-5	-	-	-	-
PE2-6	+	-	-	-
PE2-7	-	-	-	-
PE2-8	-	-	-	-
PE2-9	-	-	-	-
PE3-1	-	-	-	-
PE3-2	+	-	-	-
PE3-3	-	-	-	-
PE3-4	-	-	-	-
PE3-5	-	-	-	-
PE4-1	-	-	-	-
PE4-2	-	-	-	-
PE4-3	-	-	-	-
PE4-4	-	-	-	-
PE4-5	-	-	-	-
PE4-6	-	-	-	-
PE4-7	-	-	-	-
PE4-8	-	-	-	-
PE4-9	-	-	-	-
PE4-10	+	-	-	-
PE4-11	-	-	-	-
PE5-1	+	-	-	-

Çizelge 4.3. (devam) Tokat ili Erbaa ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları

Örnek Kodu	PVY	PVS	PVX	PLRV
PE5-2	+	-	-	-
PE5-3	+	-	-	-
PE5-4	+	-	-	-
PE5-5	+	-	-	-
PE5-6	+	-	-	-
PE5-7	+	-	-	-
PE5-8	-	-	-	-
PE5-9	+	-	-	-
PE5-10	+	-	-	-
PE5-11	-	-	-	-
PE5-12	-	-	-	-
PE5-13	-	-	-	-
PE6-1	-	-	-	-
PE6-2	-	-	-	-
PE6-3	-	-	-	-
PE6-4	-	-	-	-
PE6-5	-	-	-	-
PE6-6	-	-	-	-
PE6-7	-	-	-	-
PE6-8	-	-	-	-
PE6-9	-	-	-	-
PE6-10	-	-	-	-
PE6-11	-	-	-	-
PE6-12	-	-	-	-
PE7-1	-	-	-	-
PE7-2	-	-	-	-
PE7-3	-	-	-	-
PE7-4	-	-	-	-
PE7-5	-	-	-	-
PE7-6	-	-	-	-
PE7-7	-	-	-	-
PE7-8	+	-	-	-
PE8-1	-	-	-	-
PE8-2	-	-	-	-
PE8-3	-	-	-	-
PE8-4	-	-	-	-
PE8-5	-	-	-	-
PE8-6	-	-	-	-
PE8-7	-	-	-	-

Çizelge 4.3. (devam) Tokat ili Erbaa ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları

Örnek Kodu	PVY	PVS	PVX	PLRV
PE8-8	-	-	-	-
PE8-9	-	-	-	-
PE8-10	+	-	-	-
PE9-1	-	-	-	-
PE9-2	-	-	-	-
PE9-3	-	-	-	-
PE9-4	-	-	-	-
PE9-5	-	-	-	-
PE9-6	-	-	-	-
PE9-7	-	-	-	-
PE9-8	-	-	-	-
PE9-9	-	-	-	-
PE9-10	-	-	-	-
PE9-11	-	-	-	-

+: pozitif sonuç -: negatif sonuç

RT-PCR testlemeleri sonucunda Çizelge 4.3.'de görüldüğü gibi Tokat Erbaa ilçesinden toplanan 92 adet örneğin 14 tanesi (%15.21) PVY virüs etmeni ile enfekteli olarak bulunmuştur. Tokat ili Erbaa ilçesine ait incelenen örneklerde sadece PVY enfeksiyonu tespit edilirken, PVS, PVX ve PLRV ile enfekteli örnek tespit edilmemiştir (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.4. Tokat ili Başçiftlik ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları

Örnek kodu	PVY	PVS	PVX	PLRV
PB1-1	-	-	-	-
PB1-2	+	+	-	-
PB1-3	-	-	-	-
PB1-4	+	+	+	+
PB1-5	-	-	-	-
PB2-1	+	+	-	+
PB2-2	+	+	-	-
PB2-3	-	+	-	+
PB2-4	+	+	-	+
PB2-5	+	+	-	-
PB2-6	+	+	-	-
PB2-7	-	+	-	-
PB2-8	+	+	-	+

Çizelge 4.4. (devam) Tokat ili Başçiftlik ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları

Örnek Kodu	PVY	PVS	PVX	PLRV
PB3-1	+	+	-	-
PB3-2	+	+	-	-
PB3-3	+	+	-	-
PB3-4	-	+	-	+
PB3-5	+	+	-	-
PB4-1	+	+	-	+
PB4-2	+	-	-	+
PB4-3	+	-	-	-
PB4-4	+	-	-	-
PB4-5	+	-	-	-
PB4-6	+	-	-	-
PB4-7	+	-	-	-
PB4-8	+	-	-	-
PB4-9	+	-	-	-
PB4-10	+	-	-	-
PB5-1	+	+	+	+
PB5-2	+	+	-	-
PB5-3	+	+	-	-
PB5-4	+	+	-	+
PB5-5	+	+	-	+
PB5-6	+	+	-	+
PB5-7	+	+	-	+
PB5-8	-	+	-	+
PB5-9	-	+	-	+
PB5-10	+	+	-	-
PB5-11	+	+	-	-
PB6-1	+	+	-	-
PB6-2	+	+	-	-
PB6-3	+	-	-	-
PB6-4	-	+	-	+
PB6-5	+	+	-	-
PB6-6	+	+	-	+
PB6-7	+	+	-	+
PB6-8	+	+	-	-
PB6-9	+	+	-	-
PB7-1	+	+	-	-
PB7-2	+	+	-	-
PB7-3	+	+	-	-
PB7-4	+	+	-	-

Çizelge 4.4. (devam) Tokat ili Başçiftlik ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları

Örnek Kodu	PVY	PVS	PVX	PLRV
PB7-5	-	+	-	-
PB7-6	+	+	+	-
PB7-7	-	-	-	-
PB7-8	+	-	-	-
PB7-9	+	+	-	-
PB7-10	-	+	-	-
PB8-1	+	+	-	-
PB8-2	+	-	-	-
PB8-3	+	+	-	-
PB8-4	+	+	-	-
PB8-5	+	+	-	-
PB8-6	-	-	-	-
PB8-7	+	-	-	-

+ : pozitif sonuç - : negatif sonuç

Çizelge 4.4.'de belirtildiği gibi RT-PCR testlemeleri sonucunda Tokat Başçiftlik ilçesinden toplanan 65 adet örneğin 60 tanesi (%92.3) bir veya birden fazla virüs etmeni ile enfekteli olarak bulunmuştur. 65 adet örneğin 52 tanesi (%80) PVY, 47 tanesi (%72.3) PVS, 18 tanesi (%27.69) PLRV ve 3 tanesi de (%4.61) PVX ile enfekteli olarak tespit edilmiştir. Tokat Başçiftlik için toplanan enfekteli örneklerden 25 tanesinin PVY + PVS, 10 tanesinin PVY + PVS + PLRV, 5 tanesinin PVS + PLRV, 2 tanesinin PVY + PVS + PVX + PLRV, 1 tanesinin PVY + PVS + PVX ve 1 tanesinin de PVY + PLRV ile karışık enfeksiyon oluşturduğu belirlenmiştir. Virüsle bulaşık olduğu tespit edilen örneklerin içerisinde en yaygın olan etmenler PVY ve PVS olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.5. Tokat ili Artova ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları

Örnek Kodu	PVY	PVS	PVX	PLRV
PA1-1	+	-	-	-
PA1-2	+	-	-	-
PA1-3	-	-	-	-
PA1-4	-	-	-	-
PA1-5	+	+	+	-
PA1-6	-	-	+	-
PA2-1	+	-	+	-

Çizelge 4.5. (devam) Tokat ili Artova ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları

Örnek Kodu	PVY	PVS	PVX	PLRV
PA2-2	+	-	+	-
PA2-3	+	-	+	-
PA2-4	-	-	-	-
PA3-1	+	-	+	-
PA3-2	+	+	+	-
PA3-3	+	+	+	-
PA3-4	-	-	-	+
PA3-5	+	+	+	-
PA3-6	-	+	+	-
PA3-7	-	+	+	-
PA3-8	+	+	+	-
PA3-9	+	+	+	-
PA3-10	+	+	+	-
PA3-11	+	+	+	-
PA3-12	+	-	+	-
PA3-13	+	+	+	-
PA3-14	+	+	-	-
PA3-15	+	+	-	-
PA3-16	+	-	+	-
PA4-1	+	-	+	-
PA4-2	+	-	+	-
PA4-3	+	-	+	-
PA4-4	-	-	-	+
PA4-5	+	-	-	-
PA4-6	+	-	-	-
PA4-7	+	-	-	-
PA4-8	+	-	-	-
PA4-9	+	-	-	-
PA4-10	+	+	+	+
PA4-11	+	-	-	-
PA4-12	+	-	-	-
PA4-13	-	-	-	-
PA5-1	-	-	-	-
PA5-2	-	-	-	-
PA5-3	-	-	-	-
PA5-4	-	-	-	-
PA5-5	-	-	-	-

+: pozitif sonuç -: negatif sonuç

RT-PCR testlemeleri sonucunda; Artova ilçesinden alınan 44 adet örneğin 35 tanesi (%79.54) bir veya birden fazla virüs etmeni ile enfekteli olarak bulunmuştur. 44 adet örneğin 30 tanesi (%68.18) PVY, 22 tanesi (%50) PVX, 14 tanesi (%31.81) PVS ve 3 tanesi (%6.81) PLRV ile enfekteli olarak saptanmıştır. Tokat Artova için toplanan enfekteli örneklerden 9 tanesinin PVY + PVS + PVX, 9 tanesinin PVY + PVX, 2 tanesinin PVS + PVX, 2 tanesinin PVY + PVS ve 1 tanesinin PVY + PVS + PVX + PLRV ile karışık enfekteli olduğu belirlenmiştir. Virüsle bulaşık olduğu tespit edilen örneklerin içerisinde en yaygın olan etmenler PVY ve PVX olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5.).

Tokat Merkez ve ilçelerinden toplanan toplam 418 adet yaprak örneği PVY, PVS, PVX ve PLRV virüslerinin varlığı açısından test edilmiştir. Test edilen toplam 418 örneğin 220 tanesinde pozitif sonuç elde edilmiştir. RT-PCR yöntemiyle testlenen 418 adet bitki örneğinin 197 tanesi PVY (%47.12), 70 tanesi PVS (%16.74), 25 tanesi PVX (%5.98), 22 tanesi ise PLRV (%5.26) ile enfekteli bulunmuştur. Çizelge 4.6.- 4.7.'e göre Tokat iline ait Merkez, Niksar, Erbaa, Artova ve Başçiftlik ilçelerinin patates üretim alanlarından alınan yaprak örneklerinde bulunan virüslerin ilçelere göre dağılımı aşağıda gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. 2018 yılında yürütülen survey çalışmalarında Tokat iline ait Merkez, Niksar, Erbaa, Artova ve Başçiftlik ilçelerinin patates üretim alanlarından alınan yaprak örneklerinde PVY, PVS, PVX ve PLRV'nin bulunma durumları

			Enfekteli örnek sayısı ve bulaşıklık oranı (%)			
İlçe	Alınan örnek sayısı	Enfekteli örnek sayısı	PVY	PVS	PVX	PLRV
Merkez	116	64	63 (54.31)	1 (0.86)	-	-
Niksar	92	47	38 (41.30)	8 (8.69)	-	1 (1.08)
Erbaa	101	14	14 (13.86)	-	-	-
Başçiftlik	65	60	52 (80)	47 (72.30)	3 (4.61)	18 (27.69)
Artova	44	35	30 (68.18)	14 (31.81)	22 (50)	3 (6.81)
Toplam	418	220	197 (47.12)	70 (16.74)	25 (5.98)	22 (5.26)

Çizelge 4.7. 2018 yılında yürütülen sürvey çalışmalarında Tokat iline ait Merkez, Niksar, Erbaa, Artova ve Başçiftlik ilçelerinin patates üretim alanlarından alınan yaprak örneklerinde PVY, PVS, PVX ve PLRV'nin karışık enfeksiyonlarının bulunma durumları

			Enfekteli örnek sayısı ve bulaşıklık oranı (%)							
İlçe	Alınan örnek sayısı	Enfekteli örnek sayısı	PVY + PVS	PVY + PVX	PVY + PLRV	PVS + PVX	PVS + PLRV	PVY + PVS + PVX	PVY + PVS + PLRV	PVY + PVS + PVX + PLRV
Merkez	116	64	1(0.86)	-	-	-	-	-	-	-
Niksar	92	47	1(1.08)	-	-	-	-	-	-	-
Erbaa	101	14	-	-	-	-	-	-	-	-
Başçiftlik	65	60	25(38.46)	-	1(1.53)	-	5(7.69)	1(1.53)	10(15.38)	2(3.07)
Artova	44	35	2(4.54)	9(20.45)		2(4.54)	-	9(20.45)	-	1(2.27)
Toplam	418	220	29(6.93)	9(2.15)	1(0.23)	2(0.47)	5(1.19)	10(2.39)	10(2.39)	3(0.71)

4.2.2 Yumru örneklerinin RT-PCR ile testlenmesi sonucu elde edilen bulgular

PVY, PVS, PVX ve PLRV virüs etmenlerinin varlığını tespit etmek için yapılan RT-PCR testi sonuçları örneklerin kodları ile birlikte Çizelge 4.8.- 4.10.'da verilmiştir.

Çizelge 4.8. Tokat ili Niksar ilçesi çimlendirilen yumru örneklerinin RT-PCR sonuçları

Örnek Kodu	PVY	PVS	PVX	PLRV
PNY1-11	+	-	-	-
PNY1-12	+	-	-	-
PNY2-1	+	-	-	-
PNY2-2	+	-	-	-
PNY2-5	+	-	-	-
PNY3-1	+	-	-	-
PNY3-2	-	-	-	-
PNY3-5	-	-	-	-
PNY3-6	-	+	-	-
PNY3-7	-	-	-	-
PNY4-2	-	-	-	-
PNY4-3	+	-	-	-
PNY4-5	-	-	-	-

Çizelge 4.8. (devam) Tokat ili Niksar ilçesi çimlendirilen yumru örneklerinin RT-PCR sonuçları

Örnek Kodu	PVY	PVS	PVX	PLRV
PNY4-6	-	-	-	-
PNY4-8	+	-	-	-
PNY4-9	-	-	-	-
PNY4-10	-	-	-	-
PNY5-3	-	-	-	-
PNY5-6	-	-	-	-
PNY6-1	+	-	-	-
PNY6-5	+	-	-	+
PNY7-2	-	-	-	-
PNY7-3	+	+	-	-
PNY7-4	-	-	-	-
PNY7-8	-	-	-	-
PNY8-6	+	-	-	-
PNY14-3	+	+	-	-
PNY14-5	+	-	-	-
PNY14-13	+	-	-	-
PNY14-14	-	-	-	-
PNY14-16	+	-	-	-
PNY14-17	+	-	-	-
PNY14-18	+	-	-	-
PNY14-19	-	-	-	-
PNY14-20	+	-	-	-
PNY14-21	+	-	-	-
PNY15-3	+	+	-	-
PNY15-6	+	-	-	-
PNY15-10	+	-	-	-
PNY15-11	+	-	-	-
PNY15-12	+	-	-	-
PNY16-4	+	-	-	-
PNY16-5	+	-	-	-
PNY16-6	+	-	-	-
PNY16-11	+	-	-	-
PNY16-12	+	-	-	-
PNY16-15	+	-	-	-
PNY16-16	+	-	-	-
PNY16-17	+	-	-	-
PNY16-18	+	-	-	-
PNY16-19	+	-	-	-
PNY16-20	+	-	-	-

Çizelge 4.8. (devam) Tokat ili Niksar ilçesi çimlendirilen yumru örneklerinin RT-PCR sonuçları

Örnek Kodu	PVY	PVS	PVX	PLRV
PNY16-21	+	+	-	-
PNY16-22	+	-	-	-
PNY16-23	+	-	-	-
PNY-2	+	-	-	-
PNY-4	-	-	-	-
PNY-6	+	-	-	-
PNY-14	+	-	-	-

+: pozitif sonuç -: negatif sonuç

RT-PCR testlemeleri sonucunda Çizelge 4.8.'de belirtildiği üzere Tokat Niksar ilçesinden toplanan 59 adet yumru örneğinden 43 tanesi (%72.88) bir veya birden fazla virüs etmeni tarafından enfekteli olarak tespit edilmiştir. Enfekteli örneklerden 42 tanesi (%71.18) PVY, 5 tanesi (%8.47) PVS ve 1 tanesi (%1.69) PLRV ile enfekteli olarak bulunmuştur. Tokat Niksar için toplanan enfekteli yumru örneklerinden 4 tanesi PVY + PVS, 1 tanesi PVY + PLRV ile karışık enfeksiyon oluşturduğu belirlenmiştir. Virüsle bulaşık olduğu tespit edilen örneklerin içerisinde en yaygın olan etmen PVY olarak bulunmuştur (Çizelge 4.8.).

Çizelge 4.9. Tokat ili Erbaa ilçesi çimlendirilen yumru örneklerinin RT-PCR sonuçları

Örnek Kodu	PVY	PVS	PVX	PLRV
PEY1-5	+	-	-	-
PEY1-6	+	-	-	-
PEY1-11	-	-	-	-
PEY2-7	+	-	-	-
PEY3-3	-	-	-	-
PEY4-3	+	-	-	-
PEY4-4	-	-	-	-
PEY4-6	-	-	-	-
PEY4-7	-	-	-	-
PEY4-10	+	-	-	-
PEY5-3	+	-	-	-
PEY5-5	+	-	-	-
PEY5-7	+	-	-	-
PEY5-8	+	-	-	-
PEY5-11	+	-	-	-

Çizelge 4.9. (devam) Tokat ili Erbaa ilçesi çimlendirilen yumru örneklerinin RT-PCR sonuçları

Örnek Kodu	PVY	PVS	PVX	PLRV
PEY6-11	+	-	-	-
PEY7-5	+	-	-	-
PEY7-6	+	-	-	-
PEY8-6	+	-	-	-
PEY8-8	-	-	-	-
PEY8-10	+	-	-	-
PEY9-1	+	-	-	-
PEY9-3	+	-	-	-
PEY9-8	+	-	-	-
PEY9-9	+	-	-	-
PEY9-10	-	-	-	-

+: pozitif sonuç -: negatif sonuç

RT-PCR testlemeleri sonucunda Çizelge 4.9.'da belirtildiği üzere Tokat Erbaa ilçesinden toplanan 26 adet yumru örneğinden 19 tanesi (%73.07) PVY ile enfekteli olarak tespit edilmiştir. Tokat Erbaa ilçesi için toplanan örneklerde PVS, PVX ve PLRV ile enfekteli örnek tespit edilememiştir. Virüsle bulaşık olduğu tespit edilen örneklerin içerisinde en yaygın olan etmen PVY olarak bulunmuştur (Çizelge 4.9.).

Çizelge 4.10. Tokat ili Artova ilçesi çimlendirilen yumru örneklerinin RT-PCR sonuçları

Örnek Kodu	PVY	PVS	PVX	PLRV
PAY1-2	+	-	-	-
PAY3-5	+	-	-	-
PAY3-3	+	-	-	-
PAY3-9	+	-	-	-
PAY3-11	+	-	-	-
PAY3-12	+	+	-	-

+: pozitif sonuç -: negatif sonuç

Çizelge 4.10.'da belirtildiği üzere RT-PCR testlemeleri sonucunda Tokat Artova ilçesinden toplanan 6 adet yumru örneğinin hepsi bir veya birden fazla virüs etmeni tarafından enfekteli olarak tespit edilmiştir. Enfekteli örneklerden hepsinin PVY ile

enfekteli olduğu bulunmuştur. Örneklerden 1 tanesi (%16.66) PVS ile enfekteli olarak belirlenmiştir. Ayrıca örneklerin 1 tanesi PVY + PVS ile karışık enfekteli olarak tespit edilmiştir. Virüsle bulaşık olduğu tespit edilen örneklerin içerisinde en yaygın olan etmen PVY olarak bulunmuştur (Çizelge 4.10.).

Tokat Merkez ve ilçelerinden toplanan toplam 91 adet yumru örneği PVY, PVS, PVX ve PLRV virüslerinin varlığı açısından test edilmiştir. Testlenen 91 adet yumru örneğinin 68'inde pozitif sonuç elde edilmiştir. RT-PCR yöntemiyle testlenen 91 adet yumrunun 67 tanesi PVY (%73.62), 6 tanesi PVS (%6.59) ve 1 tanesi de PLRV (%1.09) ile enfekteli olarak tespit edilmiştir. Çizelge 4.11.'e göre Tokat patates üretim alanlarında bulunan virüslerin ilçelere göre dağılımı aşağıda gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. 2018 yılında yürütülen survey çalışmalarında Tokat iline ait Merkez, Niksar, Erbaa, Artova ve Başçiftlik ilçelerinin patates üretim alanlarından alınan yumru örneklerinde PVY, PVS, PVX ve PLRV'nin bulunma durumları

İlçe	Alınan örnek sayısı	Enfekteli örnek sayısı	Enfekteli örnek sayısı ve bulaşıklık oranı (%)					
			PVY	PVS	PVX	PLRV	PVY + PVS	PVY + PLRV
Merkez	-	-	-	-	-	-	-	-
Niksar	59	43	42 (71.18)	5 (8.47)	-	1 (1.69)	4(6.77)	1(1.69)
Erbaa	26	19	19 (73.07)	-	-	-	-	-
Başçiftlik	-	-	-	-	-	-	-	-
Artova	6	6	6 (100)	1 (16.66)	-	-	1(16.66)	-
Toplam	91	68	67 (73.62)	6 (6.59)	-	1 (1.09)	5(5.49)	1(1.09)

Patates örneklerinin testleme sonuçlarına bakıldığında örneklerin bazılarında tekli bazılarında ise çoklu enfeksiyonların (2'li, 3'lü, 4'lü) meydana geldiği görülmektedir. Oluşan bu çoklu enfeksiyonların kombinasyon şekilleri ve örnek sayıları Çizelge 4.12.'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Çoklu enfeksiyonların kombinasyon şekilleri ve örnek sayıları

Virüs Kombinasyonları	Örnek Sayısı
PVY	196
PVS	11
PVX	1
PLRV	3
PVY + PVS	34
PVY + PVX	9
PVY + PLRV	2
PVS + PVX	2
PVS + PLRV	5
PVY + PVS + PVX	10
PVY + PVS + PLRV	10
PVY + PVS + PVX + PLRV	3

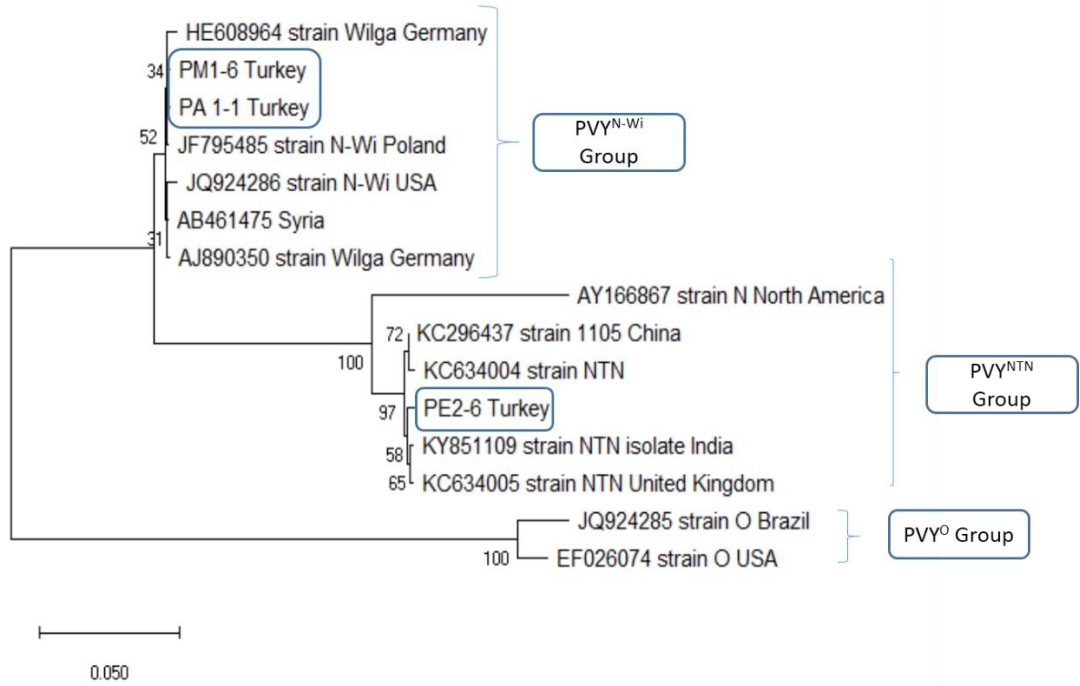
Çizelge 4.12’de belirtildiği gibi 196 adet örnek PVY, 11 örnek PVS, 3 örnek PLRV ve 1 örnek de PVX ile tekli olarak enfekteli bulunmuştur. En fazla görülen virüs kombinasyonu 34 adet ile PVY + PVS olmuştur. Ayrıca 10 adet PVY + PVS + PVX, 10 adet PVY + PVS + PLRV, 9 adet PVY + PVX, 5 adet PVS + PLRV, 2 adet PVY + PLRV, 2 adet PVS + PVX ve 3 adet PVY + PVS + PVX + PLRV kombinasyonu tespit edilmiştir.

4.3 Filogenetik Analiz Sonuçları

RT-PCR çalışmaları sonucunda elde edilen pozitif PCR ürünlerinden PVY için üç (PM1-6, PA1-1, PE2-6), PVS için sekiz (PA3-2, PA3-3, PN5-2, PN14-3, PN3-6, PB7-1, PB5-4, PB6-2), PLRV için yedi (PB2-1, PB5-9, PA4-10, PA4-4, PA3-4, PB4-2, PB5-1) ve PVX için üç örnek (PB7-6, PA3-3, PA1-5) seçilerek analizleri yapılmak üzere “Macrogen” firmasına gönderilmiştir. Sekans analizleri sonrasında Chromas 2.6.6 bilgisayar programı kullanılarak izolatlara ait ham sekans verileri hizalanmış ve konsensus diziler elde edilmiştir. Bu konsensus nükleotit dizilerinden izolatlara ait amino asit dizileri elde edilmiştir.

4.3.1 PVY izolatlarının P1 genine göre filogenetik analizi

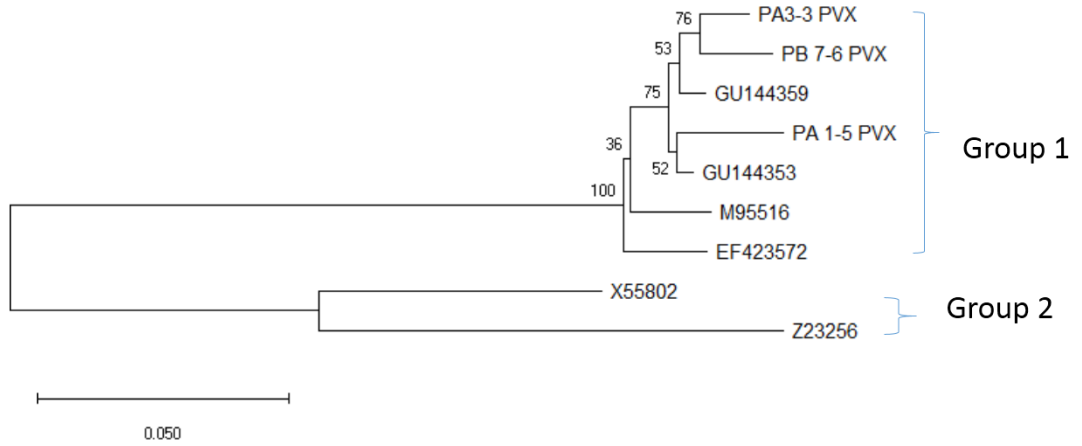
Üç PVY izolatının P1 protein bölgesine ait sekans analizi yapılan bölgenin uzunluğu yaklaşık 849 baz kadar olup P1 geninin kısmi olarak 751 baz uzunluğundaki bölgesinin sekans verileri elde edilmiştir. PM1-6 ve PA1-1 izolatlarının sekans verileri rekombinant izolatlar olan PVY^{N-Wi} strainlerine ait Polonya, Amerika ve Suriye izolatları ile %99 benzerlik göstermişlerdir. PE2-6 izolatına ait P1 bölgesinin sekansı ise referans izolatlarla karşılaştırıldığında PVY^{NTN} strainine ait Çin, Hindistan ve İngiltere izolatları ile %99 benzerlik göstermiştir. P1 protein bölgeleri ile yapılan filogenetik analiz sonucunda PE2-6 izolatı PVY^{NTN} izolatları ile aynı grupta dallanma gösterirken, PA1-1 ve PM1-6 izolatları PVY^{N-Wi} izolatları ile aynı dallanmayı göstermiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Çalışmada elde edilen PVY izolatlarının ve GenBank veri tabanında kayıtlı PVY izolatlarının P1 genine göre nükleotit dizileri esas alınarak oluşturulan filogenetik ağaç. Filogenetik analizde “neighbor-joining method” yöntemi ve 1000 bootstrap değeri kullanılmıştır.

4.3.2 PVX izolatlarının kılıf protein genine göre filogenetik analizi

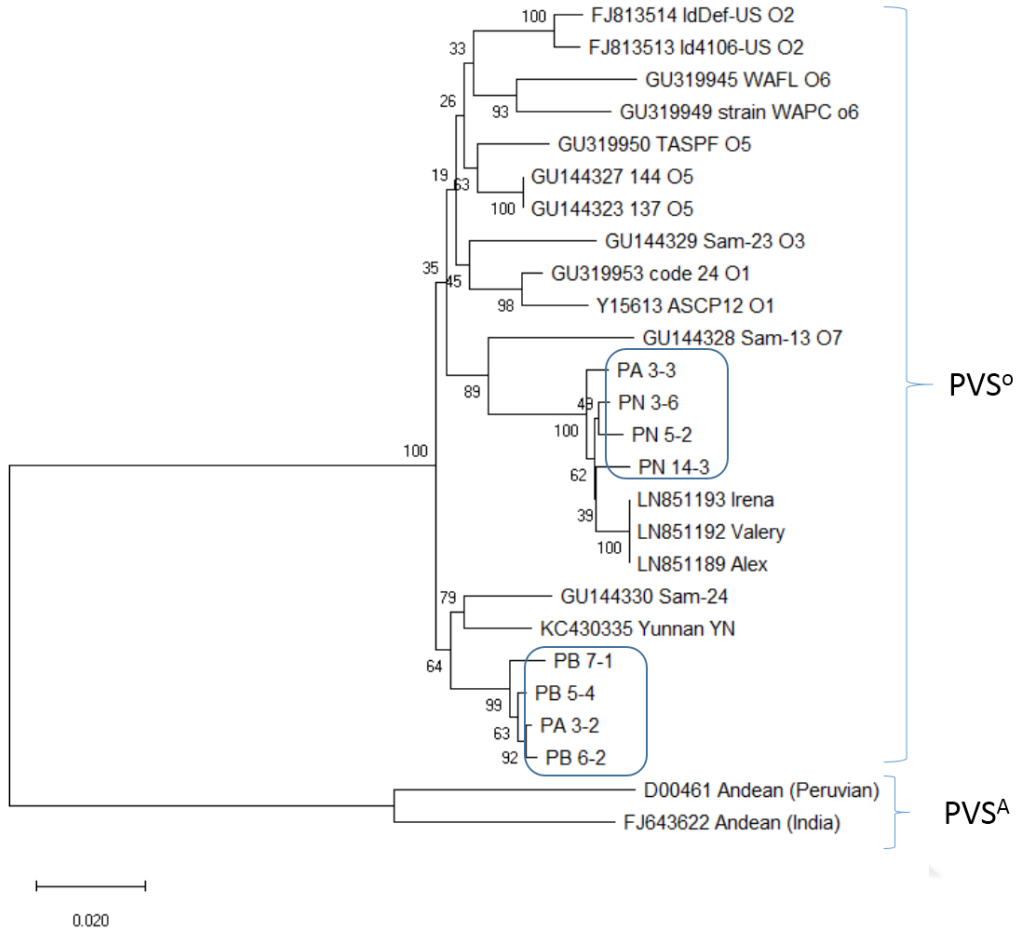
PVX izolatlarına ait kılıf protein bölgesinin sekans verileri ile elde edilen filogenetik ağaç oluşturulduğunda, referans izolatlarla yapılan analiz sonucunda, izolatlar 2 ayrı gruba ayrılmıştır. Grup 1 de Avrupa izolatları yer alırken, Grup 2 Amerikan izolatlarından oluşmuştur. Çalışmamızda elde ettiğimiz PA3-3, PB7-6 ve PA1-5 izolatları filogenetik ağaçta Avrupa izolatları ile Grup 1’ de yer almıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Çalışmada elde edilen PVX izolatlarının ve GenBank veri tabanında kayıtlı PVX izolatlarının kılıf protein genine göre nükleotid dizileri esas alınarak oluşturulan filogenetik ağaç. Filogenetik analizde “neighbor-joining method” yöntemi ve 1000 bootstrap değeri kullanılmıştır.

4.3.3 PVS izolatlarının kılıf protein genine göre filogenetik analizi

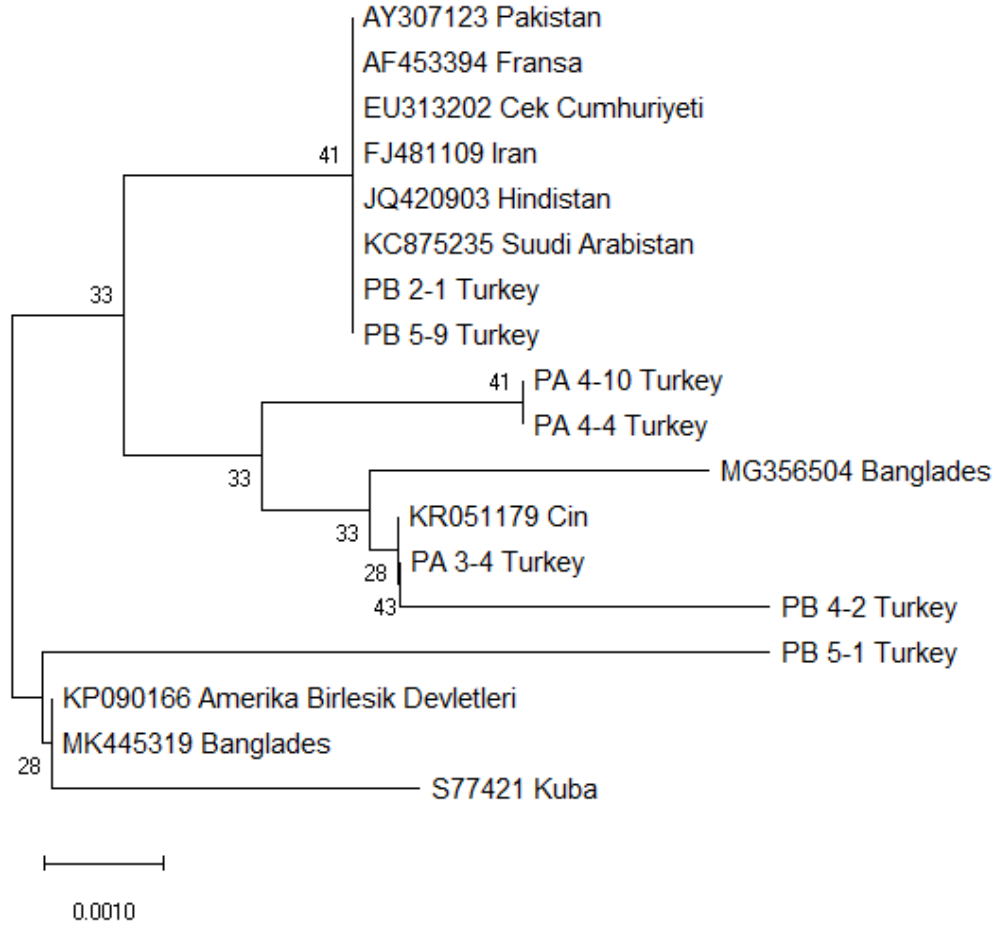
Çalışmamızda PVS için elde ettiğimiz izolatların kılıf protein bölgelerinin sekans verileri referans izolatlarla karşılaştırıldığında PVS ordinary strain (PVS^o) ve PVS Andean strain (PVS^A) strainlerine ait iki farklı dallanma görülmüştür. Analiz sonucunda filogenetik ağaçta görüldüğü gibi izolatların hepsi PVS^o straini ile benzerlik gösterirken PVS^A strainine benzerlik gösteren izolat tespit edilmemiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Çalışmada elde edilen PVS izolatlarının ve GenBank veri tabanında kayıtlı PVS izolatlarının kılıf protein genine göre nükleotid dizileri esas alınarak oluşturulan filogenetik ağaç. Filogenetik analizde “neighbor-joining method” yöntemi ve 1000 bootstrap değeri kullanılmıştır.

4.3.4 PLRV izolatlarının kılıf protein genine göre filogenetik analizi

PLRV kılıf protein bölgesinin 325 nükleotidlik 108 amino asitlik kısmı ile oluşturulan filogenetik ağaca bakıldığında PB2-1 ve PB5-9 izolatlarının Pakistan, Fransa, Çek Cumhuriyeti, İran, Hindistan ve Suudi Arabistan izolatları ile aynı grupta yer aldıkları görülmüştür. PA4-10, PA4-4, PA3-4 ve PB4-2 izolatları Çin ve Bangladeş izolatları ile benzerlik göstermişlerdir. PB5-1 izolatı ise ABD, Bangladeş ve Küba izolatları ile benzerlik göstermiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Çalışmada elde edilen PLRV izolatlarının ve GenBank veri tabanında kayıtlı PLRV izolatlarının kılıf protein genine göre nükleotit dizileri esas alınarak oluşturulan filogenetik ağaç. Filogenetik analizde “neighbor-joining method” yöntemi ve 1000 bootstrap değeri kullanılmıştır.

4.4 Biyolojik İndeksleme Çalışmaları

Patates üretim alanlarından toplanan yaprak örnekleri içerisinde RT-PCR çalışmaları sonucunda virüslerle enfekteli olduğu belirlenen örneklerden PVY, PVS, PVX ve PLRV için farklı izolatlar seçilerek çeşitli test bitkilerine mekanik olarak inokule edilmiştir. PVY ile enfekteli bulunan PA1-1 izolatıyla 4 adet sirken (*Chenopodium spp.*), 3 adet tütün (*Nicotiana spp.*) ve 1 adet horozibiği (*Amaranthus spp.*)’ne mekanik inokulasyon uygulaması yapılmıştır. Uygulama sonucunda test bitkilerinin hepsinde PVY’nin belirtileri olan klorotik lekeler ve sararmalar görülmüştür. PVS ile enfekteli bulunan

PN13-1 izolatıyla 1 adet sirken (*Chenopodium spp.*), 2 adet horozibiği (*Amaranthus spp.*) ve 3 adet tütün (*Nicotiana spp.*)'e mekanik inokulasyon uygulaması yapılmıştır. Test bitkilerinin hepsinde PVS'e ait olan klorotik lokal lekeler ve sararma belirtileri tespit edilmiştir. PVX ile enfekteli bulunan PA1-6 izolatıyla 6 adet tütün (*Nicotiana spp.*), 2 adet sirken (*Chenopodium spp.*)'e mekanik inokulasyon uygulaması yapılmıştır. Uygulama sonucunda test bitkilerinde PVX'e ait belirtiler olan damarlar arası mozaik görülmüştür. PLRV ile enfekteli bulunan PN6-5 izolatıyla 2 adet tütün (*Nicotiana spp.*) bitkisine mekanik inokulasyon yapılmıştır. Fakat afitlerle persistent olarak taşınan PLRV, mekanik olarak taşınmadığı için test bitkilerinde PLRV' nin tipik belirtisi olan yapraklardaki kıvrılmalar tespit edilmemiştir.

PVY pozitif yaprak örneği ile yapılan mekanik inokulasyon sonucu oluşan belirtiler Şekil 4.16'da, PVS pozitif yaprak örneği ile yapılan mekanik inokulasyon sonucu oluşan belirtiler Şekil 4.17'de, PVX pozitif yaprak örneği ile yapılan mekanik inokulasyon sonucu oluşan belirtiler Şekil 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.16. PVY pozitif yaprak örneği ile yapılan mekanik inokulasyon sonucunda a) *Chenopodium album* b) *Nicotiana tabacum* test bitkilerinde inokulasyon yapılan yapraklarda oluşan klorotik lekeler ve sararmalar



Şekil 4.17. PVS pozitif yaprak örneği ile yapılan mekanik inokulasyon sonucunda, inokulasyon yapılan yapraklarda; a) *Chenopodium album* test bitkisinde klorotik lokal lekeler b) *Nicotiana tabacum* test bitkisinde oluşan sararma



Şekil 4.18. PVX pozitif yaprak örneği ile yapılan mekanik inokulasyon sonucunda Xhanti 81 test bitkisinde inokulasyon yapılan yapraklarda oluşan damarlar arası mozaik

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünya’da fazla sayıda kültür bitkisinde ürün kayıplarına yol açan virüslerle diğer patojenlerde olduğu gibi direkt olarak mücadele edilememektedir. Virüs hastalıklarında patojenin tanısı güvenilir olmalı ve duyarlı teknikler uygulanmalıdır. Çünkü virüs hastalıklarında tedaviden çok koruma amaçlı mücadele yöntemleri kullanılmaktadır. Bu amaçla serolojik ve moleküler teknikler kullanılmaktadır. Tanılamada daha güvenilir sonuçlar elde etmek için çok yönlü olan bu yöntemler uygulanmaktadır (Erkan ve ark., 2011).

Patatesten görülen virüs etmenleri bitkide sararma, yaprakların küçük kalması, bitkilerde bodurlaşma, tepe yapraklarında kıvrılma, yapraklarda şekil bozukluğu, mozaik, damarlarda sararmalar, sarı nekrotik lekeler, damarlarda bantlaşma, damarlarda kıvrılma, yumrularda şekil bozukluğu, çatlamlar ve yumru gözlerinde hilal şeklinde oyuklar meydana getirmektedir. Tokat ilinde yaptığımız sürveyler sonucunda da bitkilerde benzer şekilde belirtiler kaydedilmiştir.

Tokat ilinde üreticilerden elde edilen patates yumru ve yaprak örneklerinin RT-PCR yöntemiyle testlemelerinin sonucunda; Tokat’ta incelenen örneklerin önemli ölçüde virüslerle enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Buna neden olarak kullanılan anaçların virüs etmenleriyle bulaşık olması ve bu etmenlerin yıldan yıla tohumluk kullanımda bir döngü içerisinde olması gösterilebilir. Çıtır (1982) ve Özbayram (1982), virüslerin Türkiye’ye ithal olarak elde edilen tohumluk yumrularla girdiğini ve üreticilerin kullandığı tohumluk yumruların ortalama % 95’nin en fazla bir virüsle enfekteli olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca Bostan ve Haliloğlu (2004), tarafından patates üretiminin yaygın olarak yapıldığı illerde üreticilerin firmalardan aldığı tohumluk yumrular için de aynı durum kaydedilmiştir. Bu durumun asıl nedeni olarak ithal edilirken veya tohumluk amaçla kullanılmadan önce yumrulara virüs etmenleri için testleme yapılmaması gösterilebilir. Yumrularıyla üretilen patatesten enfeksiyon oluşturan virüsler yumrular ile yıldan yıla, yıl içerisinde de vektörlerle ya da mekaniksel yollarla taşınarak hızlı bir şekilde yayılım gösterir (Bostan ve ark., 2006).

Bu çalışmada RT-PCR tekniğiyle moleküler olarak Tokat Merkez, Niksar, Erbaa, Başçiftlik ve Artova ilçelerinde patates üretimi yapılan alanlarda PVY, PVS, PVX ve PLRV viral etmenlerinin varlığı araştırılmıştır. Bu testlemeler sonucunda; patates üretim alanlarından alınan 418 yaprak örneğinin 220 tanesinde (%52.63) bir veya birden fazla viral etmenin varlığı tespit edilmiştir. Testlenen 91 adet yumru örneğinde ise 68 adet (%74.72) örnekte pozitif sonuç elde edilmiştir. Tokat Merkez ve ilçelerinden toplanan bitki ve yumru örneklerinde en yaygın görülen virüs tekli ve çoklu enfeksiyonlarıyla birlikte PVY olarak bulunmuştur. PVY'nin bulunma oranları ise toplanan örnek sayısına göre Merkez'de %54.31, Niksar'da %37.62, Erbaa'da %15.21, Başçiftlik'te %80, Artova'da %68.18 olarak saptanmıştır. Tokat Merkez ve ilçelerinden en yaygın görülen virüsün PVY olduğu ve bunu PVS'in izlediği belirlenmiştir. PVX ve PLRV virüs etmenlerinin ise az sayıda bulunduğu saptanmıştır. En yaygın görülen virüs kombinasyonu PVY + PVS olarak bulunmuştur. Niksar ilçesinden elde edilen örneklerde ise PVX enfeksiyonunun rastlanılmamıştır. Erbaa ilçesinde ise incelenen örneklerde PVX, PVS ve PLRV enfeksiyonları saptanamamıştır.

RT-PCR çalışmaları sonucunda elde edilen pozitif PCR ürünlerinden PVY için üç (PM1-6, PA1-1, PE2-6), PVS için sekiz (PA3-2, PA3-3, PN5-2, PN14-3, PN3-6, PB7-1, PB5-4, PB6-2), PLRV için yedi (PB2-1, PB5-9, PA4-10, PA4-4, PA3-4, PB4-2, PB5-1) ve PVX için üç örnek (PB7-6, PA3-3, PA1-5) seçilerek analizleri yapılmak üzere sekansa gönderilmiştir. PVY'ye ait PM1-6 ve PA1-1 izolatlarının sekans verileri rekombinant izolatlar olan PVY^{N-Wi} strainlerine ait Polonya, Amerika ve Suriye izolatları ile %99 benzerlik göstermişlerdir. PE2-6 izolatına ait P1 bölgesinin sekansı ise referans izolatlarla karşılaştırıldığında PVY^{NTN} strainine ait Çin, Hindistan ve İngiltere izolatları ile %99 benzerlik göstermiştir. PVX izolatlarına ait kılıf protein bölgesinin sekans verileri ile elde edilen filogenetik ağaç oluşturulduğunda, referans izolatlarla yapılan analiz sonucunda, izolatlar 2 ayrı gruba ayrılmıştır. Grup 1 de Avrupa izolatları yer alırken, Grup 2 Amerikan izolatlarından oluşmuştur. Çalışmamızda elde ettiğimiz PA3-3, PB7-6 ve PA1-5 izolatları filogenetik ağaçta Avrupa izolatları ile Grup 1'de yer almıştır. Çalışmamızda PVS için elde ettiğimiz izolatların kılıf protein bölgelerinin sekans verileri referans izolatlarla karşılaştırıldığında PVS ordinary strain (PVS^o) ve PVS Andean strain (PVS^A) strainlerine ait iki farklı dallanma görülmüştür. Analiz sonucunda PA3-3, PN3-6,

PN5-2, PN14-3, PB5-4, PA3-2, PB6-2 ve PB7-1 izolatlarının hepsi PVS^o straini ile benzerlik gösterirken PVS^A strainine benzerlik gösteren izolat tespit edilmemiştir. PLRV'ye ait izolatlarla oluşturulan filogenetik ağaçta, PB2-1 ve PB5-9 izolatlarının Pakistan, Fransa, Çek Cumhuriyeti, İran, Hindistan ve Suudi Arabistan izolatları ile aynı grupta yer aldıkları görülmüştür. PA4-10, PA4-4, PA3-4 ve PB4-2 izolatları Çin ve Bangladeş izolatları ile benzerlik göstermişlerdir. PB5-1 izolatı ise ABD, Bangladeş ve Küba izolatları ile benzerlik göstermiştir.

Patates üretim alanlarından toplanan yaprak örnekleri içerisinde RT-PCR çalışmaları sonucunda virüslerle enfekteli olduğu belirlenen örneklerden PVY, PVS, PVX ve PLRV için farklı izolatlar seçilerek çeşitli test bitkilerine mekanik olarak inokule edilmiştir. PVY ile enfekteli bulunan PA1-1 izolatıyla 4 adet sirken (*Chenopodium spp.*), 3 adet tütün (*Nicotiana spp.*) ve 1 adet horozibiği (*Amaranthus spp.*)'ne mekanik inokulasyon uygulaması yapılmıştır. Uygulama sonucunda test bitkilerinin hepsinin, inokulasyon yapılan yapraklarında PVY'nin belirtileri olan klorotik lekeler ve sararmalar görülmüştür. PVS ile enfekteli bulunan PN31-1 izolatıyla 1 adet sirken (*Chenopodium spp.*), 2 adet horozibiği (*Amaranthus spp.*) ve 3 adet tütün (*Nicotiana spp.*)'e mekanik inokulasyon uygulaması yapılmıştır. Test bitkilerinin hepsinin uygulama yapılan yapraklarında PVS'e ait olan klorotik lokal lekeler ve sararma belirtileri tespit edilmiştir. PVX ile enfekteli bulunan PA1-6 izolatıyla 6 adet tütün (*Nicotiana spp.*), 2 adet sirken (*Chenopodium spp.*)'e mekanik inokulasyon uygulaması yapılmıştır. Uygulama sonucunda test bitkilerinin inokulasyon yapılan yapraklarında PVX'e ait belirtiler olan damarlar arası mozaik görülmüştür. PLRV ile enfekteli bulunan PN6-5 izolatıyla 2 adet tütün (*Nicotiana spp.*) bitkisine mekanik inokulasyon yapılmıştır. Fakat afitlerle persistent olarak taşınan PLRV, mekanik olarak taşınmadığı için test bitkilerinde PLRV'nin tipik belirtisi olan yapraklardaki kıvrılmalar tespit edilmemiştir.

2003 ve 2004 yıllarında, Niğde ve Nevşehir illerinde patates üretim alanlarındaki virüsleri DAS-ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. 2003 yılında en yaygın virüsleri sırasıyla PVY+PVS (%22.22), PVY (%18.18), PVS (%11.36), PLRV (%2.27), PVX+PVY (%2.27) olarak, 2004 yılında ise PVY (%51.6), PVY+PVS (%36.6) ve PVS (%1.6) olarak bulunmuştur (Güner ve Yorgancı, 2006). Yaptığımız çalışmada da bu çalışma ile benzer

şekilde en yüksek hastalık oranının PVY'ye ait olduğu ve onu PVS'nin takip ettiği görülmüştür. Ayrıca belirlenen bu virüs etmenlerinin bizim çalışmamızdaki gibi birbiriyle karışık enfeksiyon oluşturdıkları tespit edilmiştir.

Afyonkarahisar, Bolu, Nevşehir ve Niğde ili patates üretim alanlarında virüs hastalıklarının bulunma oranları ve tanılanması Güner (2007) tarafından DAS-ELISA testi ile araştırılmıştır. Araştırmacı PVY ve PVS viral etmenlerini diğer etmenlere göre daha yoğun olarak bulmuştur. RT-PCR tekniğiyle yaptığımız bu çalışmada da en yoğun bulunan virüs etmenleri PVY ve PVS olmuştur.

Güner ve Yorgancı (2009), 2003-2004 yıllarında Afyonkarahisar ve Bolu illeri patates üretim alanlarında yaptıkları surveyler sonucunda, bu alanlardaki virüsleri DAS-ELISA ve PCR yöntemleri kullanarak araştırmışlardır. PVY'nin, Afyonkarahisar ilinde %20.46 ve Bolu ilinde ise %13.06 oranında yaygın olduğunu belirtmişlerdir. Yine bu illerde yapılan çalışmalarda da PVY'nin önemli oranda enfeksiyona neden olduğu görülmüştür.

İzmir'in Ödemiş bölgesinde RT-PCR yöntemi ile patates yumrularında PVY, PVX, PVS ve PLRV virüslerinin varlığı araştırılmıştır. Beş patates çeşidinde dört viral etmenin varlığı tespit edilmiştir. Hiçbir yumruda dört viral etmen bir arada bulunmamıştır. Ancak ikili ve üçlü enfeksiyonların bir arada bulunduğu belirlenmiştir. Yürüttüğümüz çalışmada bu çalışmadan farklı olarak bu virüs etmenlerinin 4'lü karışık enfeksiyonları görülmüştür (Kökten, 2007).

Demir (2011), Afyonkarahisar ve Sandıklı'da farklı patates çeşitlerindeki yaygın olarak görülen viral etmenleri biyolojik ve serolojik yöntemlerle belirlemek için yaptığı çalışmada PVY ile enfekteli olduğu belirlenen örnekleri çeşitli test bitkilerine inokule etmiştir. İnokulasyon sonucunda çalışmamızla benzer şekilde test bitkilerinde uygulama yapılan yapraklarda nekrotik klorotik lekeler görüldüğünü bildirmiştir.

Yardımcı ve Bostan (1999), Erzurum'da yürüttükleri bir çalışmada patateslerde en yaygın olarak sırasıyla PLRV (%42.2), PVX (%38.3), PVY (%7) oranlarında bu virüslerin varlığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca PVX+PLRV (%6.29), PVX+PVY (%2.96) ve

PLRV+PVY'nün karışık enfeksiyonlarını da saptamışlardır. Virüs belirtisi görülmeyen örneklerde ise DAS ELISA yöntemiyle PVY, PLRV ve PVY+PVS enfeksiyonları belirlenmiştir. Bizim çalışmamızdan farklı olarak Erzurum'da yapılan bu çalışmada en yaygın oranın PLRV'ye, en düşük oranın ise PVY'ye ait olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada da söz konusu virüs etmenlerinin karışık enfeksiyonları saptanmıştır.

Çıtır ve ark. (1999), Tokat ilinin Kazova ve Niksar ovalarında üretimi yapılan tohumluk patates yumrularında yaptıkları çalışmada PVX, PVY ve PLRV virüslerini biyolojik ve serolojik yöntemler kullanılarak tespit etmişlerdir. Ayrıca Tokat ilinde patates yaprak ve yumrularında enfeksiyon yapan virüsler, Kutluk Yılmaz ve ark. (2003) tarafından ELISA yöntemiyle araştırılmıştır. 168 yaprak örneğinde PVY'yi diğer virüslerle karışık enfekteli olarak bulmuşlardır. PVY, PLRV ile karışık olarak %2.98, PVX ve PVS ile karışık olarak ise yine %2.98 oranında tespit edilmiştir. Ayrıca 159 adet yumru örneğinde PVY enfeksiyonu %10 oranında belirtilmiştir. PVY ve PVS en yaygın karışık enfeksiyon (%23.64) olarak bulunmuştur. Tokat ilinde yapılan bu çalışmalardan farklı olarak RT-PCR tekniği ve biyolojik indeksleme yöntemi kullanılarak PVY, PVS, PVX ve PLRV virüs etmenlerinin varlığı ve hastalık oranları belirlenmiştir. Kutluk Yılmaz ve ark. (2003)'nin yaptığı çalışmaya göre yine karışık virüs kombinasyonlarının yanı sıra PVY en yüksek orandaki virüs etmeni olarak bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda olduğu gibi en fazla görülen karışık enfeksiyon PVY + PVS olarak saptanmıştır. Yaptığımız çalışmada daha fazla sayıda örnek kullanılmıştır ve PVY haricindeki diğer virüs etmenlerinin tekli enfeksiyonları da tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre; Tokat ili patates üretim alanlarında afit vektörler tarafından non-persistent olarak taşınan PVY ve PVS virüs etmenleri daha yoğun olarak bulunmuştur. PVX yalnızca mekanik yollarla taşındığı için daha az bulunduğu düşünülmektedir. PVY'nin PVS ve PLRV'den daha yoğun olarak bulunmasının sebebi ise, bu virüsleri taşıyan afitlerin mevcut olması, popülasyon yoğunlukları ve taşınma şekillerinin farklı olması olarak gösterilebilir. Ayrıca PVY'nin hem elliden fazla afit türüyle non-persistent olarak, hem de enfekteli bitkilerden sağlıklı olanlara mekanik olarak taşındığı tespit edilmiştir (MacGillivray, 1981; DiFonzo et al., 1996; Ragsdale et al., 2001; Alyokhin et al., 2002). Bunun aksine, PLRV'nin 10'dan fazla afit türüyle

persistent olarak taşındığı ve virüsün en önemli vektörünün *M. persicae* afiti olduğu belirtilmiştir (MacGillivray, 1981; Slack, 1995; Salazar, 1996; Singh and Kurz, 1997; Gildow et al., 2000). PVS'nin PLRV'den daha fazla olması ise aynı şekilde taşınma yollarının farklı olmasına bağlanabilir. Afitlerle persistent olarak taşınan PLRV'ye oranla, virüslerle non-persistent ve mekanik olarak da yumruyla taşınan PVY ve PVS'nin daha hızlı yayıldığı belirlenmiştir (Bostan et al., 2006).

Tüm Dünya'da olduğu gibi ülkemizde de patates önemli bir besin kaynağıdır. Patates üretim alanlarında görülen bu virüsler yeşil aksam enfeksiyonlarıyla birlikte, yumrulara önemli verim kaybına neden olmasının yanı sıra gelecekte kullanılacak tohumluklarla da sürekliliğini devam ettirmektedir. Diğer hastalık etmenleri ve zararlı böceklerle yapıldığı gibi virüslerle kimyasal yollarla mücadele edilememektedir. Bu nedenle tohumluk olarak kullanılacak olan yumruların sertifikalı ve viral etmenlerden ari olmasına özellikle önem verilmelidir. Ülkemizde patates üretimi yapan çiftçiler bu konuda eğitime tabi tutularak bilinçlendirilmelidir. PLRV gibi afitlerle persistent olarak taşınabilen virüs etmenlerinin kontrolü için bu hastalıkları taşıyan afitlerle ve diğer vektör böceklerle mücadele edilmelidir. Ayrıca, mekanik yollarla taşınan PVY, PVS ve PVX'e karşı önlem almak için hasat sırasında kullanılan alet ekipmanların temizliğine dikkat edilmeli ve yeşil dönemde bitkileri yaralamamaya özen gösterilmelidir.

6. KAYNAKLAR

- Ali, A., Hassan, S. ve Asad, A., 2002. Incidence of six potato viruses in spring, summer and autumn potato crops of the North West Frontier Province of Pakistan. *Australasian Plant Pathology*, 31: 2, 143-146.
- Ali, M.C., Maoka, T. ve Natsuaki, K.T. 2008. The Occurrence of Potato Viruses in Syria and Molecular Detection and Characterization of Syrian Potato Virus S Isolates. *Potato Research*, 51: 151-161.
- Alyokhin, A., Gary, S. ve Eleanor, G., 2002. Aphid abundance and potato virus Y transmission in imidacloprid-treated Potatoes. *Amer. J. of potato*. 79: 225-262.
- Anonim, 2019. National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Arioğlu, H.H., 1997. Nişasta ve şeker Bitkileri. .Ü. Ziraat Fak. Genel Yayın No: 188, Ders Kitapları No:57, s.3- 230, Adana.
- Arlı-Sökmen, M., Ayan, A.K. ve şevik, M.A., 2005. Trabzon ve Bayburt illerinde tohumluk patates (*Solanum tuberosum* L.) yumrularında belirlenen virüsler. *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*. 20 (3), 23–26.
- Astruc, N., Marcos, J.F., Macquaire, G., Candresse, T. ve Pallas, V. 1996. Studies on the diagnosis of hop stunt viroid in fruit trees : identification of new hosts and application of nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents. *European Journal of Plant Pathology*, 102 (9); 837-846.
- Barker, H., Webster, K.D. ve Reavy, B., 1993. Detection of Potato virus Y in potato tubers : A comparison of polymerase chain reaction and enzyme linked- immunosorbent assay. *Potato Research*. 36, 13-20.
- Barriana, H.S., Shannon, A.L., Chu, W.G. ve Waterhouse, P.M. 1994. Detection of five seed borne legume viruses in one sensitive multiplex polymerase chain reaction test. *Phytopathology*, 84: 1201-1205.
- Beemster, A.B.R. ve Rozendaal, A.,1972, Potato viruses: properties and symptoms. *Viruses of Potatoes and Seed-Potato Production*, (ed) by, J.A. Baks, PUDUC, Wageningen, p115-142.
- Bercks, R., 1970. Potato Virus X. CMI/AAB. Descriptions of Plant Viruses No:4.
- Bertolini, E., Olmos, A., Martinez, M.C., Gorris, M.T., Cambra, M., 2001. Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *J. Virol.Methods*, 96: 33-41.
- Bertolini, E., Olmos, A., Martinez, M.C., Gorris, M.T. ve Cambra, M., 2001. Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *J. Virol.Methods*, 96: 33-41.
- 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. ve Açıkgöz, S., 2000. Determination of PVX and PVS symptoms on some test plants and identification of these viruses using dsRNA analysis. *The Journal of Turkish Phytopathology*, 29(1): 41:47.
- Bostan, H. ve 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. ve Haliloğlu K., 2004. Distribution of PLRV, PVS, PVX, and PVY (PVYN, PVY⁰ and PVY^c) in the seed potato tubers in Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(7): 1140-1143.
- Bostan, H. ve Demirci, E., 2004. Obtaining PVX, PVY and PLRV-Free Micro Tuber From Granola, Pasinler 92 and Caspar Potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivars. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(7):1135-1139.
- Bostan, H., Xianzhou, N. ve Singh, R.P., 2004. An RT-PCR Primer Pair for the Detection and its Application in Surveying Ornamental Plants for Viroids. *J. Virol. Methods*, 116, 189-193.
- Bostan, H. ve Dumlupınar, R., 2006. Determination of the incidence rate of geographical sub-groups of PVYN/NTN in seed potato tubers in Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, (in press).
- Bostan, H., Guclu, C., Ozturk, E., I, Ozdemir. ve Ilbagi, H., 2006. Influence of aphids on the epidemiology of potato virus diseases (PVY, PVS and PLRV) in the high altitude areas of Turkey, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, (in press).
- Brunt, A. A., 2001. The main viruses infecting potato crops, In: Loeben-stein, G., P.H. Berger, A.A. Brunt, R.H. Lawson (eds), virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 65-67.
- Chamberlain, J.S. ve Chamberlain, J.R., 1994. Optimization of multiplex PCRs. In: Mullis, K.B., Ferre, F., Gibbs, R.A. (Eds.), *The Polymerase Chain Reaction*. Burkhauser, Boston, MA, pp. 38-46.
- Croslin, J.M., Hamm, P.B., Hane, D.C., Jaeger, J., Brown, C.R., Shiel, P.J., Berger, P.H. ve Thornton, R.E., 2006. The occurrence of PVY⁰, PVY^N and PVY^{N:0} strains of potato virus Y in certified potato seed lot trials in Washington and Oregon. *Plant Disease* 90:8 1102-1105.
- Çarpar, 2016. Hatay ili patates üretiminde önemli bazı viral sorunların belirlenmesi.
- Çıtır, A., 1982. Erzurum ve çevresinde tohumluk patateslerdeki virus hastalıkları ve bunların tanılanması üzerinde bazı araştırmalar. *Doğa Bilim Dergisi* 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.
- Delgado-Sanchez, S. ve Grogan , R.G., 1970. Potato Virus Y. C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses. No: 37.
- DiFonzo, C.D., Ragsdale, D.W., Radcliffe, E.B., Gudmestad, N.C. ve Secor, G.A., 1996. Crop borders reduce potato virus Y incidence in seed potato. *Ann Appl Biol.*, 129: 289-302.
- Erkan, S., Yıldırım, Z., Gümüş, M., Öztürk, G., Şimşek, Y. ve Özdemir, A., 2007, Ege Bölgesi'nde Üretilen Patates Çeşitlerinin Yumrularındaki Viral Etmenlerin Bulunma Durumlarının Belirlenmesi ve Enfekteli Yumruların Meristem Kültürü Yoluyla Virüslerden Arındırılması Üzerinde Araştırmalar, E.Ü.Araştırma Fonu 2003-ZRF-035 no'lu Proje Kesin Raporu, Bornova, 38 s.
- Erkan, S., Gümüş, M., Paylan, İ. C. ve Sipahioğlu, H. M., 2011. Bitki Virüslerinin Tanılanmasında Kullanılan Serolojik Yöntemler. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 9 (2) 35-49.
- Esendal, E., 1990. Nişasta Şeker Bitkileri ve Islahı I Patates. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları, No: 49,220s.

- FAOStat, 2017. Dünya Patates Üretimi. (23.12.19)
- Fox, A., Evans, F. ve Browning, I., 2005. Direct tuber testing for potato Y potyvirus by real-time RT-PCR and ELISA: reliable options for pst harvest testing. *EPPO Bulletin*, 35: 93-97.
- Gavran, M., 1997. Distribution of potato viruses in Yugoslavia. *Acta Hort.* 462:929-934.
- Gildow, F. E., Reavy, B., Mayo, M.A., Duncan, G.H., Woodford, J.A.T., Lamb, W.J. ve Hay, R.T., 2000. Aphid acquisition and cellular transport of Potato leafroll virus-like particles lacking P5 read through protein. *The American Phytopathological Society*, 90: 1153-1159.
- Gümüş, M. ve Erkan, S. 1998. Ayvalık ve Altınova yörelerinde üretilen patates çeşitlerinin yumrularında bulunan virüslerin belirlenmesi üzerinde araştırmalar. VIII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, Ankara, 348–350.
- Gündoğan, 2008. Patateslerde PVY, PVX ve PVS virüs hastalıklarının ELISA ve RT-PCR yöntemiyle tanınması. Hatay.
- Güner, Ü. ve Yorgancı, Ü., 2006. Niğde ve Nevşehir İlleri patates ekiliş alanlarında saptanan viral etmenler, *Bitki Koruma Bülteni*, 46 (1-4), 35-49.
- Güner, Ü. ve Yorgancı, Ü., 2009. Afyon ve Bolu İllerinde patateslerdeki Virüs Hastalıklarının Tanınması ve Hastalık Oranları. Türkiye 3. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 231 s., 15-18 Temmuz, Van.
- Grzela, R., Szolajska, E., Ebel, C., Madern, D., Favier, A., Wojtal, I., Zagorski, W. ve Chroboczek, J., 2008. Virulence factor of Potato virus Y, genome-attached terminal protein VPg, is a highly disordered protein, *Journal of Biological Chemistry*, 283(1), 213-21.
- Halbert, S.E., Connelly, J. ve Sandvol, L.E., 1993. Suction trapping of aphids in western North America (emphasis on Idaho). *Acta Phytopathol Entomol Hungarica*, 25: 411-422.
- Hane, D.C. ve Hamm, P.B., 1999. Effects of seedborne potato virus Y infection in two potato cultivars expressing mild disease symptoms. *Plant Dis.* 83:43-45.
- Hauser, S., Weber, C., Vetter, G., Stevens, M., Monique Beuve ve Lemaire, O., 2000. Improved detection and differentiation of poleroviruses infecting beet or rape by multiplex RT-PCR. *J. Virol. Methods*, 89: 11-21.
- Heimbach, U., Thieme, T., Weidemann, H.L. ve Thieme, R., 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.
- Hooker, W.J., 1986. *Compendium of Potato Diseases*. American Phytopathological Society Press., St. Paul, Minnesota, 125p.
- Ismail, M.H., 1997. The use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitative detection of potato virus Y in potato and other test plants. *Microbiological Research*. 152 : 3, 307-313.
- Ito, T., Teki, H., ve Ozaki, K., 2002. Simultaneous detection of six citrus viroids and *apple stem grooving virus* from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction . *J. Virol. Methods*. 106: 235 -239.
- İlisulu, K. 1957. Potato industry in Turkey. *American Potato J.* 34, 97 – 105.
- Jacobi, V., Bachand, G.D., Hamelin, R.C. ve Castello, J.D., 1998. Development of multiplex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation of tomato and tobacco mosaic tobamoviruses. *J. Virol. Methods*, 74: 167-178.

- 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. ve 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 Virosten, Bacteriosen und der parasitischen pilze der Türkei. Atatürk Üniversitesi Yıllığı, Erzurum.
- Koerschneck, I., G. Himmler, R. Sagl, H. Steinkellner ve 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.
- Kostiw, M., 2002. The spread of PVY, PVM, PVS and PLRV at Bonin conditions during 1996-1999. *Journal of Plant Protection Research*. 42: 2, 165-171.
- Kökten, 2007. Ödemiş bölgesinde üretimi yapılan patates yumrularında PVY, PVX, PVS ve PLRV virüslerinin RT-PCR yöntemiyle saptanması.
- Love, J.M. ve Tauer, L.W., 1988, Biotechnology and the economics of reducing viral disease losses in U.S. potato and tomato production. *Applied Agricultural Research*, 3: 187-194.
- Lozoya-Saldana, H., Sanchez-Lopez, V., Roman-Vazquez, R. ve Hernandez-Vilchis, A., 2002. Viruses in international potato clones (*Solanum tuberosum* L.) in the Toluca Valley, Mexico. *Agrociencia Montecillo*. 36: 1, 93-102.
- MacGillivray, M.E. 1981. Aphids. In: Hooker, W.J. (ed), *Compendium of Potato Diseases*. American Phytopathological Society, St. Paul. pp' 101-103.
- Mathews, R. E. F., 1993. *Diagnosis of Plant Virus Diseases*. CRS Press, N.W., Boca Raton, Florida. 374 p.
- McDonald, J. G., 1984. Viruses associated with mosaic symptoms in Russet Burbank potato. *Can. J. of Plant Path.* 6: 224-226.
- Menzel, W., Jelkmann, W. ve Maiss, E., 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *J. Virol. Methods*, 99: 81-92.
- Nault, L.R., 1997. Arthropod transmission of plant viruses: A new synthesis. *Ann. Entomol.. Soc. Am.* 90: 521-541.
- Nie, X. ve Singh, R.P., 2001. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves and tubers. *J. Virol. Methods*, 91: 37-49.
- Nie, X. ve Singh, R.P., 2002. Probably geographical grouping of PVY^N and PVY^{NTN} based on sequence variation in P1 and 5'-UTR of PVY genome and methods for differentiating North American PVY^{NTN}. *J. Virol. Meth.*, 103: 145-156.
- Özalp, O., 1964. Patates Virüs Hastalıkları. Tarım Bakanlığı, Bornova Ziraai Mücadele Enstitüsü, Teknik Bül., 13, III, 35s.
- Özbayram, Ç., 1982, Türkiye'de yetiştirici elinde bulunan patates tohumluğunun virüs hastalıklarıyla bulaşıklık oranının saptanması üzerine araştırmalar, EBZAE, Menemen, İzmir.
- Özaydın, K., 2010. Çukurova Bölgesi'nde yetiştirilen patateslerdeki virolojik sorunlar. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 75.
- Özdemir, S., 2006. Afyon ili Sandıklı ilçesinde yetiştirilen patates yumrularında görülen virütik etmenlerin belirtilerinin saptanması, IV. Ulusal Patates Kongresi, 5-8 Eylül, 2006, Niğde.

- Peters, D., 1970, Potato Leafroll Virus. C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses. No:36.
- Pietrak, J., 1981. Effect of the presence of viruses M and S in potato plants . On tuber infection by viruses X and Y. *Biuletyn Instytutu Ziemiaka*, 26: 25-31.
- Radcliffe, E. ve Ragsdale, D.W., 2002. Aphid-transmitted Potato Viruses: The Importance of Understanding Vector Biology. *Amer. J. of Potato Res.*, 79: 353-386.
- Ragsdale, D. W., Radcliffe, E.B. ve DiFonzo, CD., 2001. Epidemiology and field control of PVY and PLRV. In: Loebenstein, G., P. Berger, A. A Brunt, and R. Lawson (eds), *Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seed-Potatoes*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 237-270.
- Riechmann, J.L., Lain, S. ve Garcia, J.A., 1992. Review Article: Highlights and prospects of Potyvirus molecular biology, *Journal of General Virology*, 73, 116.
- Rowhani, A., M.A. Maningas, L.S. Lile, S.D. Daubert. ve 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.
- Ryazantsev, D., Yu. ve Zavriev S.K., 2009. An Efficient Diagnostic Method for the Identification of Potato Viral Pathogens. *Applied molecular biolog*, Volume 43, number 3, 515-523.
- Salazar, L.F. 1996. *Potato Viruses and Their Control*. CIP, Lima. 214 pp.
- Shalaby, A.A., Nakhla, M.K., Soliman, A.M., Mazyad, H.M., Hadidi. A. ve Maxwell, D.P., 2002. Development of a highly sensitive multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (m-RT-PCR) method for detection of three potato viruses in a single reaction and nested PCR. *Arab Journal of Biotech.*, Vol. 5, No.(2): 275-286.
- Sharman, M., Thomas, E. ve Dietzgen, R.G., 2000. Development of a multiplex immunocapture PCR with colouimetric detection for viruses of banan. *J. Virol.Methods*, 89: 75-88.
- Shukla, D.D., Ward, C.W. ve Brunt, A.A., 1994. *The Potyviridae*. Cambridge Universty Press. Cambridge.
- Singh, R.P. ve 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.
- Singh, R.P., Kurz, J. ve Boiteau, G., 1996. Detection of stylet-borne and circulative potato virus in aphids by duplex reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. *J. Virol Methods*, 59: 189-196.
- Singh, M. ve Sing, R.P., 1996. Factors affecting detection of PVY in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction and nucleic acid spot hybridization. *Journal of Virol. Methods*, 60: 47-57.
- Singh, R.P., Kurz, J., Boiteau, G. ve Moore, L.M., 1997. Potato leafroll virus detection by RT-PCR in field-collected aphids. *American Potato Journal*, 74: 305-313.
- Singh, R.P., 1999. A solvent-free, rapid and simple virus RNA-release method for potato leafroll virus detection in aphids and plants by reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, 83: 27-33.
- Singh, S., Barker, H. ve Kumar, S., 2000. Impact of ELISA testing on health improvement of nucleus seed potato. *Proceedings of the Global Conference on Potato*, New Delhi-India. 6-11 December, 1999. Volume: 1, 426-429.

- Slack, S.A., 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. ve 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.
- TÜİK, 2018. İllere Göre Patates Üretimimiz. (23.12.19)
- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A.L. ve Bernardi, F., 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions, *Virus Research*, 74, 157-175.
- Vercruyse, P., Gibbs, M., Tirry, L. ve Höfte, M., 2000. RT-PCR using redundant primers to detect the three viruses associated with carrot motley dwarf diseases. *J. Virol. Methods*, 88:153-161.
- Verma, Y., Sood, S., Ahlawat, Y.S., Khurana, S.M.P., Nie, X. ve Singh, R.P., 2003. Evaluation of multiplex reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for simultaneous detection of potato viruses and strains. *Indian J. Biotech.* 2 : 587-590.
- Vunsh, R.A., A. Roster ve 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.
- Yardımcı, N. ve 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, Ş. ve Erkan, S. 2004. Tokat ilinde patates üretim alanlarında görülen virüs hastalıkları. Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, Samsun, 214.
- Walkey, D.G.A., 1991. *Applied Plant Virology*. St. Edmundsbury Press, Bury St. Edmunds, Suffolk, USA, 338p.
- Whirdworth, J.L., Samson, R.G., Allen ,T.C ve Mosley, A.R., 1993, Deduction of potato leafroll virus by visual inspection, direct tissue blotting and ELISA techniques. *Am. Potato J.*, 6: 497-503.
- Woodford, J.A.T., Jolly, C.A. ve Aveyard, C.S., 1995. Biological factors influencing the transmission of potato leafroll virus by different aphid species. *Potato Res.*, 38: 133-141.
- Wright, N.S. 1970. Combined effects of potato viruses X and S on yield of Netted Gem and White Rose potatoes. *Am. Potato J.*, 47: 475-478.

7. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Afide Merve ENGÜR

Doğum Yeri: Erbaa/TOKAT

Doğum Tarihi: 15.06.1994

Medeni Hali: Bekâr

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu/ Mezuniyet Tarihi

Lise: Erzincan Ertuğrul Gazi Anadolu Lisesi (2012)

Lisans: Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü (2016)

Yüksek Lisans: Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma

Anabilim Dalı (2017/2020)