



T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİSEL ÜRETİM VE TEKNOLOJİLERİ ANABİLİM DALI

PATATESTE PATATES Y VİRÜSÜ İRKLARININ TANILANMASI VE VİRÜS
MİKTARININ KANTİTATİF REAL TİME RT-PCR İLE BELİRLENMESİ

VİLDAN BOLAT

Ekim 2017

T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİSEL ÜRETİM VE TEKNOLOJİLERİ ANABİLİM DALI

PATATESTE PATATES Y VİRÜSÜ İRKLARININ TANILANMASI VE VİRÜS
MİKTARININ KANTİTATİF REAL TİME RT-PCR İLE BELİRLENMESİ

VİLDAN BOLAT

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Prof. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE

Ekim 2017

Vildan BOLAT tarafından **Prof.Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE** danışmanlığında hazırlanan **“Patateste Patates Y Virüsü Irklarının Tanılanması ve Virüs Miktarının Kantitatif Real Time RT-PCR ile Belirlenmesi”** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Bitkisel Üretim ve Teknolojileri** Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Mona GAZEL, Mustafa Kemal Üniversitesi



Üye : Yrd. Doç. Dr. Eminur ELÇİ, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından **17/10/2017** tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun/...../20.... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

Doç. Dr. Murat BARUT
MÜDÜR V.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Vildan Bolat

ÖZET

PATATESTE PATATES Y VİRÜSÜ IRKLARININ TANILANMASI VE VİRÜS MİKTARININ KANTİTATİF REAL TİME RT-PCR İLE BELİRLENMESİ

BOLAT, Vildan

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitkisel Üretim ve Teknolojileri Anabilim Dalı

Danışman

: Prof. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE

Ekim 2017, 81 sayfa

Patates bitkisi yumrularıyla vejetatif olarak üretildiği için virüsler gibi yumru ile taşınan hastalıklardan önemli ölçüde etkilenmektedir. Tohumluk yumru üretiminde en önemli virüs etmeni Potato virus Y (PVY)'dir. PVY ırklarına bağlı olarak, tohumlukların özelliklerini yitirmesine ve % 50–80 arasında verim kaybına neden olmaktadır. Virüs ile mücadelede virüsün ırklarının bilinmesi, özellikle tohumluk yumru üretiminde damızlıklıkların doğru, hassas ve hızlı teşhis yöntemleri ile test edilmesi oldukça önem taşımaktadır. Bu amaçla, PVY'nin ırklarını belirlemede Immunocapture- revers transcription- multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (IC-RT-multipleks PCR) sistemi Niğde ilinden temin edilen toplam 54 PVY izolatına uygulanmıştır. Analiz sonucunda 17 adet PVY^{NW} (B), 7 adet PVY^{NW} (B), 1 adet PVY^{NTN} (B) ırkları tespit edilmiştir. Ayrıca, 2 adet PVY^{NTN}+PVY^{NW} karışık ırk enfeksiyonu belirlenmiştir. İzolatların büyük bir çoğunluğunda (30 adet) 278 bp seviyesinde atipik amplikonlar elde edilmiştir. PVY'nin farklı ırklarında başarı ile uygulanabilen real-time PCR sistemi geliştirmek amacıyla IC-RT- SyberGreen (SYBR) real time PCR sistemi PVY F/R primerleri kullanılarak uygulanmıştır. IC-RT-SYBR real time PCR Niğde ilinden temin edilen farklı PVY ırklarına uygulandığında, tüm örneklerde PVY teşhisinde başarılı olmuştur. Ayrıca IC-RT-SYBR kantitatif real time PCR sistemi kurulmuştur. En düşük ve en yüksek ölçüm sonuçları alınmıştır. Desire ve Nectar çeşidi tohumluk yumrularında PVY taraması ve virüs miktarı tayini çalışmada kantitatif real time PCR başarılı bir şekilde kullanılabilmektedir.

Anahtar Sözcükler: Immunocapture, real time PCR, kantitatif PCR, patates yumrusu

SUMMARY

IDENTIFICATION OF POTATO Y VIRUS STRAINS AND MEASUREMENT OF VIRUS QUANTITY BY REAL TIME RT-PCR

BOLAT, Vildan

Niğde Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Plant Production and Technologies

Supervisor

: Prof. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE

October 2017, 81 pages

Since the potato plant is vegetatively produced by the tubers, it is significantly affected by tuber-borne diseases such as viruses. The most important virus in the production of seed tubers is Potato virus Y (PVY). According to PVY strains, it causes loss of seed characteristics and yield loss of 50-80%. In management of virus diseases, detection of virus strains and availability of accurate, sensitive and rapid diagnostic methods, has an important role in producing virus free seed tuber. For this purpose, Immunocapture-reverse transcription-multiplex polymerase chain reaction (IC-RT-multiplex PCR) system for determining strains of PVY has been applied to a total of 54 PVY isolates from Niğde. As a result, 17 PVY^{NW} (B), 7 PVY^{NW} (B) and 1 PVY^{NTN} (B) strains were detected. In addition, two PVY^{NTN} + PVY^{NW} mixed race infections were identified. In a large majority of isolates (30), 278 bp atypical amplicons were obtained. In order to develop a real-time PCR system that can be successfully applied in different strains of PVY, the IC-RT-SyberGreen (SYBR) real time PCR system was applied using PVY F / R primers. When IC-RT-SYBR real time PCR was applied to different PVY strains from Niğde province, PVY was successfully diagnosed in all cases. In addition, the IC-RT-SYBR quantitative real-time PCR system was established and the minimum and maximum titer quantities were measured. Quantitative real time PCR was successfully used in the detection of PVY screening and virus quantitation in seeds of Desire and Nectar species.

Keywords: Immunocapture, real time PCR, quantitative PCR, potato tuber

ÖN SÖZ

Yüksek lisans eğitimimin başından sonuna kadar tecrübe ve fikirlerinden yararlandığım, bu tezin konusunun belirlenmesinde, laboratuvar çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE'ye, klonlama çalışmalarında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Allah Bakhsh'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Her zaman benim yanımda olan maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen ve bugüne gelmemde de büyük payları olan, yaptığım her şeyin arkasında olan ve bana inanan babam Yücel BOLAT annem Münevver BOLAT'a ve kardeşim Sümeyye BOLAT'a, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özellikle laboratuvar ve sera çalışmalarında yardımcı olan, sevgili arkadaşlarım Mahmood Ayyaz, Müge Doğaner, Atayar Mazenov'a teşekkür ederim.

“Hayatta en hakiki mürşit ilimdir, fendir. İlim ve fenden başka yol gösterici aramak gaflettir, dalalettir, cehalettir” diyerek bilimi yücelten, gerek kişiliği ve fikirleri gerekse ilke ve inkılaplarıyla bizlere yol gösteren ulu önder Mustafa Kemal ATATÜRK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmaya TÜBİTAK-TOVAG 114O153 numaralı proje ile araziden PVY izolatlarının temini ve mutipleks PCR çalışmalarına finansal destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na, FEB 2015/31-YÜLTEB numaralı proje ile real-time PCR çalışmalarına finansal destek sağlayan Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine ve çalışanlarına katkılarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ÖN SÖZ	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR	xii
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II GENEL BİLGİLER	8
2.1 Patates Yetiştiriciliği	8
2.2 Patates ve Potato Virus Y	9
2.3 Bitki Virüslerinin Saptanma Yöntemleri	14
2.3.1 Biyolojik özellikleri temel alan teşhis metotları	15
2.3.1.1 Simptomatoloji	15
2.3.1.2 Biyolojik indeksleme	15
2.3.2 Elektron mikroskobu	15
2.3.3 Serolojik metotlar	16
2.3.3.1 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	16
2.3.3.2 Tissue blotting immunosorbent assay (TBIA)	17
2.4 Nükleik Asidi Temel Alan Teşhis Metotları	18
2.4.1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	19
2.4.2 Real-Time PCR sistemleri	21
2.4.3 Kantitatif real-time PCR	24
2.5 Bitki Virüslerini Teşhis Yöntemlerinin Kıyaslaması	25
2.6 PVY ve Irklarının Teşhisi	26
2.7 Patateste PVY Testlemesinde Karşılaşılan Sorunlar	27
BÖLÜM III MATERYAL METOD	30
3.1 Potato Virus Y İzolatlarının Temini	30
3.2 PVY İzolatlarının Irklarının Belirlenmesi (IC-RT-Multipleks PCR)	31
3.2.1 Immunocapture (IC)	31

3.2.2 Reverse transcription (RT)	32
3.2.3 Çoklu polimeraz zincir reaksiyonu (Multipleks PCR)	32
3.3 DAS-ELISA, IC-RT-PCR ve SYBR-Green Real-Time PCR'nin PVY Teşhisi Bakımından Karşılaştırılması	34
3.3.1 DAS-ELISA.....	34
3.3.2 IC-RT-PCR testi	34
3.3.3 IC-RT-Real-time PCR testi.....	35
3.4 Bitki Materyalinde PVY Miktarını Belirlemek Üzere IC-RT-Kantitatif Real-Time PCR Sistemi.....	36
BÖLÜM IV BULGULAR VE TARTIŞMA	38
4.1 PVY İzolatlarının Temin Edilmesi	38
4.2 IC-RT-Multipleks PCR ile PVY Irklarının Belirlenmesi	38
4.3 PVY Teşhisinde DAS-ELISA, IC-RT-PCR ve IC-RT-Real Time PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması	41
4.3.1 Yumru ve sürgün analizlerinin karşılaştırılması.....	41
4.3.2 Uygulanan test yöntemlerinin karşılaştırılması	49
4.4 Bitki Dokusunda Potato Virus Y Miktarının Belirlenmesi.....	49
BÖLÜM V SONUÇLAR	58
5.1 PVY Irkları	58
5.2 PVY Teşhisinde DAS-ELISA, IC-RT-PCR ve IC-RT-Real Time PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması.....	58
5.3 Bitki Dokusunda Potato virus Y Miktarının Belirlenmesi.....	59
KAYNAKLAR	60
ÖZ GEÇMİŞ	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. PVY ırkları, genel belirtileri ve dünyada yayılma alanları	5
Çizelge 2.1. Patatesin taksonomik sınıflandırması	9
Çizelge 2.2. PVY'nin ana ırklarının serolojik ve moleküler özelliklerine göre genetik sınıflandırılması	12
Çizelge 3.1. cDNA elde etmede kullanılan karışım.....	32
Çizelge 3.2. IC-RT-Multipleks PCR analizinde kullanılan primerler ve dizileri	33
Çizelge 3.3. Multipleks PCR reaksiyon karışımı.....	34
Çizelge 3.4. IC-RT-PCR reaksiyon karışımı	35
Çizelge 3.5. IC-RT-real time PCR reaksiyon karışımı	36
Çizelge 4.1. Patatesde <i>Potato virus Y</i> (PVY) izolatlarının ırklarının multipleks PCR ile belirlenmesinde ırklara göre oluşması beklenen fragmentler.....	39
Çizelge 4.2. IC-RT-multipleks PCR yöntemi ile patates <i>Potato virus Y</i> (PVY) izolatlarının belirlenen ırkları	41
Çizelge 4.3. Desire ve Nectar patates yumru ve sürgünlerinde <i>Potato virus Y</i> 'nin DAS-ELISA testi 405 nm okuma sonuçları	42
Çizelge 4.4. Desire ve Nectar yumru ve sürgünlerinde DAS_ELISA, IC-RT-PCR ve IC-RT-real time PCR sonuçları	48
Çizelge 4.5. Desire çeşidinde farklı yöntemlerin hatalı sonuç verme analizi (IC-RT-real time PCR yöntemine göre örnekler PVY enfektelidir)	49
Çizelge 4.6. Desire ve Nectar patates çeşitlerinin yumru ve sürgünlerinde <i>Potato virus Y</i> kantitasyonu verileri karşılaştırılması.....	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Türkiye’de patates üretilen illerin haritası.....	1
Şekil 2.1. <i>Potato virus Y</i> ‘nin genom yapısı	11
Şekil 2.2. Kuzey Amerika ve Avrupa’da bulunan PVY rekombinantların rekombinasyon noktalarının şematik ifadesi	13
Şekil 2.3. DAS-ELISA testi.....	17
Şekil 2.4. PCR çoğalmasının basamakları	20
Şekil 2.5. Asimetrik siyanin boya SYBR Green I’in kimyasal yapısı.....	22
Şekil 2.6. SYBR Green I yöntemi.....	23
Şekil 2.7. Taq Man prob yöntemi	24
Şekil 4.1. DAS-ELISA testi sonucu PVY enfekteli olduğu tespit edilen patates örneği ve yapraklarda damar açılması, mozaik simptomları	38
Şekil 4.2. PVY ırklarının genomik yapıları ve ırk tespitinde kullanılan primerlerin genom üzerindeki yerleri	39
Şekil 4.3. IC-RT-multipleks PCR yöntemi ile patates <i>Potato virus Y</i> izolatlarının ırklarının belirlenmesi, M DNA ladder (NEB 100 bp DNA ladder)	40
Şekil 4.4. <i>Potato virus Y</i> ’nin Desire (D) ve Nectar (N) yumrularında IC-RT-PCR testi agaroz jeli.....	44
Şekil 4.5. <i>Potato virus Y</i> ’nin Desire (D) ve Nectar (N) sürgünlerinde IC-RT-PCR testi agaroz jeli.....	45
Şekil 4.6. <i>Potato virus Y</i> ’nin Desire (D) ve Nectar (N) yumrularında IC-RT-real time PCR testi agaroz jeli	46
Şekil 4.7. <i>Potato virus Y</i> ’nin Desire (D) ve Nectar (N) sürgünlerinde IC-RT-real time PCR testi agaroz jeli.....	47
Şekil 4.8. Real-Time PCR analizlerinde standarttın oluşturulmasında kullanılacak plasmidin klonlama sonrası agaroz jelde test edilmesi (M 100 bp DNA ladder thermo scientific, P: plasmid, K su kontrol)	50
Şekil 4.9. Kantitatif Real-time PCR’da kullanılmak üzere hazırlanan plasmid standart; agaroz gelde band görüntüsü yerine, Real-time PCR makinasındaki yazılım ile elde edilen grafik sonuçları (a), Standart doğru (b), her bir örneğin eşik değeri ve DNA miktarı (pg/ul) (c)	51

Şekil 4.10. Virüs miktarı Kantitatif Real-time PCR ile belirlenen Nectar yumru örnekleri; agaroz gelde band görüntüsü yerine, Real-time PCR makinasındaki yazılım ile elde edilen grafik sonuçları (a), standart doğru (b), melting analizi (c) . 52

Şekil 4.11. Virüs miktarı Kantitatif Real-time PCR ile belirlenen Nectar yumru örnekleri; agaroz gelde band görüntüsü yerine, Real-time PCR makinasındaki yazılım ile elde edilen grafik sonuçları (a), standart doğru (b), melting analizi (c) . 53

Şekil 4.12. Virüs miktarı kantitatif Real-time PCR ile belirlenen Desire sürgün örnekleri; agaroz gelde band görüntüsü yerine, Real-time PCR makinasındaki yazılım ile elde edilen grafik sonuçları (a), standart doğru (b), melting analizi (c) . 54

Şekil 4.13. Virüs miktarı kantitatif Real-time PCR ile belirlenen Desire sürgün örnekleri; agaroz gelde band görüntüsü yerine, Real-time PCR makinasındaki yazılım ile elde edilen grafik sonuçları (a), standart doğru (b), melting analizi (c) . 55

SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler

kg	Kilogram
t	Ton
mm	Milimetre
g	Gram
mL	Mililitre
Min/dk	Dakika
°C	Santigrat Derece
mg	Miligram
µl	Mikrolitre
cm	Santimetre
Ha	Hektar
%	Yüzde
µm	Mikrometre

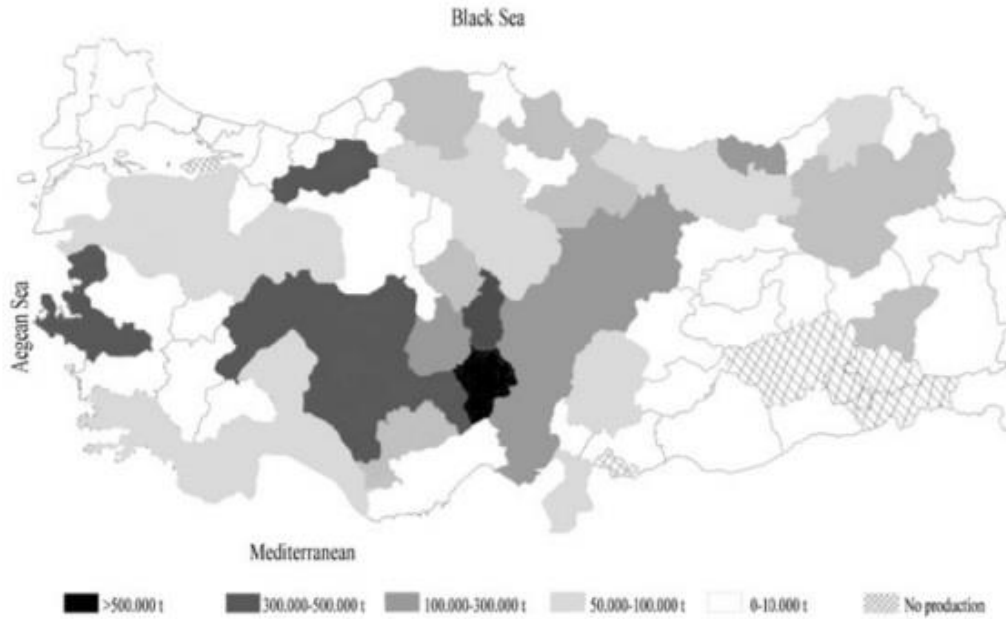
Kısaltmalar

PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNA	Deoksiribonükleik asit
NaN ₃	Sodyum Nitrat
NaCl	Sodyum Klorür
KCl	Potasyum Klorür
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
PVP	Polivinilpirolidon
BSA	Bovine Serum Albümin

BÖLÜM I

GİRİŞ

Patates (*Solanum tuberosum* L.) Solanaceae familyası içinde yer alan bir bitkidir ve insanların bitkisel kaynaklı beslenmesinde buğdaygillerden sonra gelen bir besin kaynağıdır (Gerlegiz vd., 2015). *S. tuberosum* Güney Amerika kökenli bir bitki olmakla beraber günümüzde deniz seviyesinden 4000 m yüksekliğe, 70. kuzey enleminden 50 güney enlemine kadar geniş bir alanda yer almaktadır (Anonim, 2012). Geniş alanda yetiştirilmesi, üretim imkânının geniş ve birim alandan kaldırılan ürünün yüksek olması, besin değerinin yüksek, fiyatının ucuz olması, ister sofralık ister endüstriyel olsun çok değişik kullanım alanlarının olması, farklı toprak ve iklim koşullarına kolayca uyum sağlayabilmesi nedeniyle patates, dünya üzerinde geniş bir üretim alanına sahiptir (Güner ve Yorgancı, 2006). Yumrularında nişasta halinde karbonhidrat, protein, vitaminler ve Fe gibi önemli besin maddelerini içeren patates, insanlar tarafından doğrudan mutfaklarda tüketildiği gibi, işlenerek değişik şekillerde (cips, parmak patates vs.) tüketilmektedir (Arioğlu vd., 2006). Dünyada 2014 yılı verilerine göre yaklaşık 19 milyon hektar alanda 368.096.362 ton civarında patates üretilmektedir (FAOSTAT, 2014). Türkiye’de toplam patates üretim alanı 1.448.572 dekar, patates üretimi ise 4.750.000 tondur (TÜİK, 2016). Türkiye’de patates üretilen iller ve ürün miktarları Şekil 1.1’de verilmektedir.



Şekil 1.1. Türkiye’de patates üretilen illerin haritası

S. tuberosum, 16.yüzyılın ikinci yarısında İspanyollar tarafından And Dağları Bölgesi'nden ülkelerine taşınmış, ardından da İrlanda, İskoçya ve İngiltere'ye ve daha sonrada bütün Avrupa ülkeleri ile Kuzey Amerika'ya yayılmıştır. 17.yüzyılın ilk yarısında Hindistan yarımadasında görülen patates tarımının, 18.yüzyılda Çin'e, Hollandalılar aracılığı ile Endonezya'ya ve oradan Japonya'ya, 19. Yüzyılda ise Doğu Afrika'ya ulaştırıldığı bildirilmiştir (İlisulu, 1957). Türkiye'ye ilk patatesin girişi 19.yüzyıl sonlarında Rusya üzerinden Doğu Karadeniz Bölgesi'ne ve bunu takiben batıdan Trakya Bölgesi'ne olduğu belirtilmiştir (Çalışkan vd., 2010). Ancak bu konuda birden fazla fikir bulunmaktadır (Şenol, 1971). Rus bilim adamı Zhukovski'nin aktardığı bilgiye göre patates ilk olarak 1850'lerde (muhtemelen 1853 yılında) Sakarya'da Akova'ya dikilmiştir. Buna karşılık İlisulu (1957) raporunda patates üretiminin başlangıcı olarak kuzeyden Rusya ve Kafkasya'dan gelen patateslerin Doğu Anadolu ve Karadeniz bölgelerinin yüksek arazilerinde yetiştirildiğini bildirmiştir (İlisulu, 1957). Bununla birlikte 1870'lerde Doğu Anadolu'da Erzurum ilinde patates üretimine ilişkin kayıtlar vardır. On sekizinci yüzyıl sonu ve on dokuzuncu yüzyılların başlarında bu bölgeye Kafkasya'dan birçok göç olmuştur. Göçmenlerin bu bölgeye patates getirmesi ihtimali yüksek olduğu düşünülmektedir. Hala Doğu Anadolu'da patates "kartol" kelimesi ile adlandırılmaktadır. Bu bilgilerden dolayı patatesin Rusya ve Kafkasya'dan getirilme ihtimali yükselmektedir (Arslanoğlu, 2015). Doğu Karadeniz bölgesinde hala birçok yerel genotip görmek mümkündür. Türkiye'ye patates girişi olduktan sonra ilk yıllarda patates yetiştiriciliğinde mali yardımlar ve vergi istisnalarına rağmen çok fazla ilgi görmemiştir. Anadolu'ya yüksek verimli patates çeşitlerinin girişinden sonra 1908-1910 yılları arasında patates üretiminde verimler artmıştır (Şenol, 1971). Türkiye Cumhuriyeti'nin kuruluşundan sonra, patates üretimi hızlı bir şekilde artış göstermiştir. 1925 yılında toplam patates üretimi yaklaşık 73.000 ton iken şimdi 4.5 milyon tona ulaşmıştır. Türkiye'de yaklaşık 150 yıllık geçmişi olan patates şuan üretim, sanayi, pazarlama ve tüketim sektöründe ülkenin en önemli tarımsal ürünlerinden biri haline gelmiştir. Ancak, mevcut durum hala tam potansiyeline ulaşmamıştır (Çalışkan vd., 2010).

Patates üretimi için Türkiye çok iyi coğrafi koşullara sahiptir. Bu nedenle patates, ülkemizdeki neredeyse tüm illerde (81'inin 75'inde) yetiştirilmektedir. Ülkenin orta, kuzey ve kuzeydoğu kısımları ılıman iklim olduğundan dolayı patates yaz aylarında ana ürün olarak yetiştirilmektedir. Akdeniz iklimi olan Akdeniz ve Ege bölgelerinde patates

kış ve bahar aylarında ilk ürün olarak, yaz ve sonbahar aylarında ise ikinci ürün olarak yetiştirilebilmektedir. Türkiye’de patates üretiminin %61’i Orta Anadolu Bölgesi’nde gerçekleştirilmektedir. Bu bölgede ise sadece Niğde ve Nevşehir illerinde Türkiye’nin toplam patates üretiminin %23’ü yapılmaktadır (Çalışkan vd., 2010). Niğde ilinde 237.851 dekar yetiştirme alanı ve 892.297 ton üretim yapılmaktadır (TÜİK, 2016).

Patates vejetatif olarak yumrularıyla üretilen bir kültür bitkisi olması nedeniyle fungus, bakteri, virüs ve benzeri bitki patojenleri tarafından enfekte olduklarında hastalığın ortaya çıkma potansiyeli artmakta, buna bağlı olarak da verim ve kalitede önemli düşüşler meydana gelmektedir. Bu hastalık etmenlerinden özellikle virüsler, sistemik enfeksiyonlara neden olarak bitkinin toprak üstü aksamından yumrulara geçmekte, bu enfekteli yumruların dikilmesi ile yıldan yıla taşınmakta ve sonuçta patatesten tohumluk dejenerasyonuna neden olmaktadır (Bostan ve Demirci, 2001). Virüs hastalıklarının direk kimyasal mücadele ile kontrolü çok zor olup, virüs hastalıklarının patates bitkisinde neden olduğu belirtileri görmek ve belirtilerine göre ayırt etmek çoğu zaman da yanıltıcı olabilmektedir. Zira patates bitkisinde virüslerin neden oldukları belirtilerin şiddeti ve tipi virüse, ırka, patates çeşidine, çevre şartlarına, enfeksiyon zamanına, virüslerin tek yada birlikte bulunma durumlarına göre farklılık göstermektedir (Bostan ve Demirci, 2001).

Patates üretiminde Patates Y virüsü (*Potato Y potyvirus*, PVY) tohumlukların özelliklerini yitirmesi ve % 50–80 arasında verim kaybına sebep olması açısından en önemli virüstür. Bu etmen, patates üretiminde %80 kadar ciddi verim kayıplarına neden olabilmektedir (De Bokx ve Huttinga, 1981). Bitkilerdeki virüs enfeksiyonunun ortaya çıkması ve üründe zarar kullanılan patates çeşitlerine göre değişebildiği gibi virüsün ırklarına göre de farklılık göstermektedir. PVY nin beş tip ırkı vardır: PVY^O, PVY^C, PVY^N PVY^Z ve PVY^E (Galvino-Costa vd., 2012; Jones, 1990; Kerlan vd., 2011; Kerlan vd., 1999; Singh vd., 2008; Sorri vd., 1999). Bu ırklar Ny, Nc, ve Nz dayanıklılık genlerini içeren patates çeşitleri ve tütündeki (*Nicotiana tabacum*) belirtilerine göre tanımlanmış ve gruplandırılmıştır (Tablo 1.1). Son zamanlarda, PVY^O ve PVY^N ırklarının rekombinasyonu ile ortaya çıkan PVY^{N:O} ırkı yeni rekombinant ırk olarak rapor edilmiştir (Ottoman vd., 2009). PVY^{N:O} tohumluk yumru ile ya da vektör olarak yaprak biti ile taşınabilmektedir. PVY^{N:O} yumrunun üzerinde dairesel batık nekrotik lezyon üretir, yaprak belirtileri hafiftir ya da bazı patates çeşitlerinde belirtiler görülmemektedir

(Piche vd., 2004; Sagredo vd., 2009). Yaprak aksamında kolayca fark edilememesinden dolayı PVY^{N:O}, Kuzey Amerika’da görülen en yaygın ırktır (Çizelge 1.1).

PVY^O ırkı bilinen en eski ırktır. PVY^O ırkı ingilizce “old” kelimesinden gelmektedir. Bu ırkla enfekte olan bitkilerde birincil olarak genellikle tepe yapraklar solar, kururlar. İkincil simptom olarak bitkide kırışıklıklar ve buruşukluklar meydana gelir. Kırışıklık ve buruşukluk büyümeyi engeller. Bitkiler bodur kalırlar. Ufak yapraklarda alacalık ve beneklenmeler gözlemlenir, şekilde bozukluklar meydana gelir. Bunun nedeni damarlar arasındaki dokunun hızlı olarak büyümemesidir. Buna genellikle nekrotik şeritler eşlik etmektedir. En alttan başlayarak yapraklar dökülmeye başlar. Patates çeşidine bağlı olarak bu simptomlar yumruda da görülebilirler. PVY^N ırkı ingilizce “new” yeni kelimesinden gelmektedir. Bu virüsün simptomları birçok patates çeşidinde simptomları hafif olarak gözlemlenir. Bu durum hastalıklı bitkileri tarladan çıkarma işlemini zorlaştırır ve çok kolay dağılmasına sebep olur. Tepe yapraklardaki buruşukluklar ve yeşilimsi soluk-sarı beneklenmeler bunu takibinde klorotik ve nekrotik lekelere sebep verir. Daha sonraki aşamalarda yapraklar normalden küçük olması durumu ve buruşma gözlemlenir. PVY^{NTN} ırkı yumruda yüzeysel nekrotik lekeler şeklinde simptomlara neden olur. Daha sonraki aşamalarında saplarda beneklenme ve buruşma gözlemlenir. PVY^C ırkı nekrotik beneklere ve yaprağın her iki tarafında da noktalar görülmesine sebep olur. Nekrotik şeritler genellikle yaprak damarları etrafında, bazen petiollerde ve gövde üzerinde benekli-şeritler şeklinde kendini gösterir. İlerideki aşamalarında bitkide mozikleşme görülebilmektedir. Bu ırk genellikle bitkide erken ölüme sebep verir. Bu enfeksiyonların yanında yumruda nekroza sebep olur. Bazen keskin kenarlı, tarçın-kahverengi noktalarla çevrilmiş gözler oluşturur. Hastalıktan etkilenmiş gözlerde, filizlenme olmaz; çünkü başlangıçları bu virüs ırkı tarafından öldürülmüştür.

Viral hastalığın ortaya çıkışı ve yayılmasının en önemli sebebi virüsten ari tohumluk patates yumrusunun kullanılmamasıdır. Türkiye’de Erzurum, Van, Bursa, Bolu, Niğde ve Nevşehir gibi patates üretilen bölgelerde depolanmış yumrularda PVY tespit edilmiştir (Güner ve Yorgancı, 2006).

Çizelge 1.1. PVY ırkları, genel simptomları ve dünyada yayılma alanları

İrk	Genel Adı	Yaygınlık durumu
PVY ^O	Genel ırk	Dünyada
PVY ^N	Tütün damar nekroz ırkı	Avrupa, SSCB, Afrika, Güney Amerika (1950 Güney Amerika), Kuzey Amerika (1990 Kanada), Japonya, Montana 1999, diğer devletler 2000
	Tütün nekrotik ırkı	
PVY ^{NTN}	Patates yumru halkalı leke hastalığı	Europe, Yunanistan, İtalya, Portekiz, Kuzey Amerika: Kaliforniya ve Pasifik Kuzeybatı 2000
	Yumru nekrotik ırkı	
	Yumru nekrotik halkalı leke hastalığı	
PVY ^C	Noktalı hat ırkı	Avustralya, Hindistan, İngiltere ve bazı parçaları, Avrupa

PVY virüsü diğer virüslere oranla tohumluk yumrulara daha yüksek oranda tespit edilmektedir (Güner ve Yorgancı, 2006). Bu virüs aynı zamanda tütün, domates, biber, yabancı otlar ve süs bitkileri gibi bitkilerde ekonomik zarar oluşturmaktadır. Virüsün ortaya çıktığı bölgede yayılmasında yaprak bitleri ile non-persitant taşınmaları en etkili yoldur (Jeffries, 1998; Khurana, 2004). PVY'nin vektörleri arasında 50'den fazla yaprak biti türü bulunmaktadır (Ragsdale vd., 2001). En önemli yaprak biti türleri *Myzus persicae*, *Aphis frangulae*, *Macrosiphum euhorbiae*, *Myzus certus*, *Aphis fabae*, *Rhopalosiphum padi* 'dir.

PVY etmeni ile mücadele hem direkt hem de dolaylı yöntemlerle yapılmaktadır. Enfekteli bitkilerin sökülerek yok edilmesi virüsün elemine edilmesi için kullanılan en temel direkt yöntemdir (Ottoman vd., 2009). Dolaylı kontrol yöntemi ise sağlıklı tohumluk patates yumruları kullanılarak ilk PVY enfeksiyon kaynaklarının azaltılmasıdır (DiFonzo vd., 1996). Tohumluk patates üretiminde, PVY inokulumu minimize edilir ve virüliferöz afitlerden ürünler korunarak diğer sağlıklı bitkilere taşınarak virüs enfeksiyonu engellenir. Etkili tohum sertifikasyon programları ve bitki koruma yöntemleri kullanarak PVY ile enfekte edilmemiş tohumlar elde edilir (Gray vd., 2010).

Virüs tespit etmek için kullanılan birkaç yöntem vardır. Çok önceleri sadece bitkideki simptomlara bakılarak virüs tespiti yapılmaktaydı. Ancak 1970’li yıllara gelindiğinde virüs tespiti yapmak için serolojik bir yöntem olan ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) yöntemi en uygun yöntem olarak ortaya çıkmıştır (Clark ve Adams, 1977). Bu yöntem kullanılarak özellikle virüsün kılıf proteini hedeflenerek tespiti gerçekleştirilmektedir ve bu yöntem çok sayıda örnek için en uygun yöntemler arasına girmiştir (Lequin, 2005). ELISA yöntemi PVY’nin varlığını tespit etmek için kullanılan en yaygın ve en ekonomik yöntemdir. Ancak 1990 yıllarından itibaren Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) da virüs tespit etmek kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemde virüs tespit etmek için hedef alınan bölge nükleik asittir. PCR yöntemi ELISA yöntemine göre daha düşük konsantrasyonda olan virüs tespitine olanak vermekte, kesin ve duyarlı sonuç vermektedir (Lorenzen vd., 2006; Nie ve Singh, 2002). Ancak PCR yöntemi ile sonuç alabilmek için uzun zaman alan jel-elektroforez yöntemi ile uğraşmak gereklidir (Jones, 1990).

Son 20 yılda nükleik asit araştırmalarında muazzam bir ilerleme kaydedilmiş ve bu da bitki virüslerini detaylı ve kolay bir şekilde teşhisini mümkün hale getirmiştir (Kumar vd., 2012). Hastalıklı patates yumrularında PVY ve ırklarını tespit etmek için, Multiplex Reverse Transkripsiyon PCR yöntemi kullanışlı bir yöntem olmuştur. Serolojik yöntem ve PCR tekniği birleştirilerek Immunocapture-PCR (IC-PCR) olarak adlandırılan teknik geliştirilmiştir. Bu yöntem; serolojik testlere göre daha duyarlı, geleneksel PCR’daki gibi viral RNA saflaştırılmasına gerek kalmadan kullanılan spesifik bir yöntemdir (Kumar vd., 2012). “Real-time PCR” teknolojisi DNA ya da RNA örneklerinin polimeraz zincir reaksiyonu prensibi ile çoğaltılması ve amplifiye olan ürünlerin miktarını amplifikasyonla eş zamanlı olarak belirleyebilen bir yöntemdir. PCR ürünlerinin gerçek zamanlı olarak saptanması, her reaksiyon kuyusunda bir floresan muhabir molekülünün eklenmesi ile sağlanır ve artan miktarda ürün DNA’sı ile artan floresan elde edilir. Çoğalan DNA’yı bir monitörde görünür hale getiren, floresan işaretli prob ve boyalar kullanılarak, floresanın çoğalan DNA ile doğru orantılı olarak artması nedeniyle “Gerçek Zamanlı – Polimer Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)”, “İzlenebilir Polimeraz Zincirleme Tepkimesi (PCT)” gibi farklı adlarla da isimlendirilmektedir (Kubista, 2008). “Real-time PCR” metodu ile çok az miktardaki bir DNA örneğinden istenilen özellik hızlı, güvenilir ve hassas bir şekilde ortaya koyulabilmektedir (Günel ve Aydın, 2009).

Tohumluk patates üretiminde PVY ırklarının doğru ve hassas bir şekilde belirlenmesi çok önemlidir. PVY testlerinde yaygın olarak kullanılan ELISA yönteminde dormant patates yumrularından filizlerin sürmesi gerekmekte, bu nedenle testin sonucunun alınabilmesi 6-8 haftayı gerektirmektedir. Yaygın olarak kullanılan RT-PCR sisteminde de PCR sonrası elektroforez işlemi zaman almaktadır. Real-time RT-PCR analizi dormant patates yumrularından PVY testi yapılmasını sağlayan ve tüm bu olumsuzlukları ortadan kaldıran hızlı, hassas ve büyük çapta testlere olanak veren alternatif bir teknik olmaktadır.

Diğer taraftan PVY'nin tanımlanan dokuz ırkı(5 tane rekombinant olmayan ve 4 tane rekombinant olan) bulunmaktadır. Bu ırkların hepsini tanımlayacak antiserumlar bulunmamaktadır. Her bir ırkı ayrı testlerle tanımlamak yerine aynı testte dokuz ırkın tanımlanmasına olanak veren multipleks RT-PCR sistemleri mevcuttur. Ayrıca bitki, yumrulara PVY miktarının belirlenmesi gereken durumlar olabilmektedir. Bu nedenle yapılan bu çalışmada aşağıdaki konular hedeflenmiştir:

- Immunocapture-multipleks RT-PCR sistemlerinin PVY ırk tayininde kullanılması,
- Real time RT-PCR ile PVY virüsünün saptanması ve bitki dokusundaki konsantrasyonlarının belirlenmesi

Test sistemi kurulan immunocapture-multipleks RT-PCR ve real time RT-PCR yöntemleri, gerek karantina ve gerekse tohumluk analizlerinde PVY testleri yapılması amacıyla kullanılabilir.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

2.1 Patates Yetiştiriciliği

Solanaceae ailesi, 90 tür ve yaklaşık 4000 türden oluşmuş olup dağılımı ve yaşam alanlarında büyük farklılıklar vardır (PBI Solanum Project, 2014). Bu aile, biber (*Capsicum spp*), patates (*Solanum tuberosum L.*), patlıcan (*S.melongena*) ve domates (*S. lycopersicum*) gibi önemli kültür bitkilerini içerir (Song vd., 2005). Ayrıca, pıtrak (*Datura stramonium*), güzel avrat otu (*Atropa belladonna*), karabiber (*Hyoscyamus niger*) ve adamotu (*Mandragora officinarum*) da dâhil olmak üzere dünyanın en ölümcül bitki türleri de bu ailenin üyesidir (Çizelge 2.1).

S. tuberosum, triploid, diploid ve tetraploid üyeli kompleks bir türdür. Tetraploid çeşitleri iki gruba ayrılır: 1. Grup Tuberosum ve 2. Andigena grubu (Cribb ve Hawkes, 1986). Tuberosum alttürü, Avrupa'da ve Kuzey Amerika'da yaygın olarak yetiştirilen patates mahsulüdür. Andigena alttürleri de ekili bir türdür, ancak yetiştiriciliği Güney ve Orta Amerika ile sınırlıdır (Hawkes, 1990; OECD, 1997).

Son üç yüzyılda patates, süt ve ete eşlik eden ana ve yan yemekler arasında yer almış ve milyonlarca insanın dünyada hayatta kalmasına yardımcı olmuştur (Thornton ve Sieczka, 1980). Patates yumrusu çok miktarda nişasta içermektedir, aynı zamanda proteinler ve C vitamini bakımından zengindir (Storey ve Davies, 1992). Drewnowski ve Rehm'e (2013) göre, patates sıklıkla tüketilen sebzeler arasında en yüksek potasyum değerine sahip, en ekonomik beslenme kaynağıdır (Drewnowski ve Rehm, 2013).

Yapılan çalışmalara göre, patates birim alan başına buğdaydan % 75 ve pirinçten % 58 daha fazla gıda enerjisine sahiptir. Patates, üretim alanları başına pirinçten % 78, buğdaydan % 54 daha fazla protein sağlar. Beslenme değeri olan gıda enerjisi, birim üretim ve gıda miktarı ile kıyaslandığında başka hiçbir ürün bulunmamaktadır ve dünyanın ılıman, tropikal ve subtropik iklim bölgelerinde yetişmektedir (Camire vd., 2009).

Çizelge 2.1. Patatesin taksonomik sınıflandırması

Alem	Plantae (Bitkiler)
Alt alem	Tracheobionta (iletim demetine sahip bitkiler)
Üst bölüm	Spermatophyta (tohumlu bitkiler)
Bölüm	Magnoliophyta (çiçekli bitkiler)
Sınıf	Magnoliopsida (dikotiledonlar)
Altsınıf	Asteridae
Takım	Solanales
Aile	Solanaceae
Alt aile	Solanoideae
Cins	<i>Solanum</i> L.
Oymak	<i>Petota</i>
Alt oymak	<i>Potatoe</i>
Seri	<i>Tuberosa</i>
Tür	<i>Solanum tuberosum</i> L.

Çin, Hindistan ve Rusya Federasyonu dünyanın en büyük patates üreticisi ülkelerindendir; Türkiye ise, 2014 yılında 4.1 milyon ton patates üretimiyle dünyada 20. sırada yer almıştır (TURKSTAT, 2016). Geliştirilmiş gübre ve sulama sistemi gibi bilim ve teknolojiye ilerlemeler, yetiştiricilerin sınırlı kaynakları kullanarak verimi artırmasına olanak sağlamıştır (Thornton ve Sieczka, 1980).

2.2 Patates ve Potato Virus Y

Patates bitkisi yumru kullanılarak vejetatif olarak çoğaltılır, bu nedenle virüs ve virüs benzeri hastalıklar gibi bitki patojenlerinin kurulması ve yayılımı yaygın bir durumdur (Khurana, 2004). Sistemik enfeksiyona neden olan virüs hastalıkları, patatesin kalitesini ve verimini düşürebilir (Gray vd., 2010). Patates üretimini olumsuz yönde etkileyen, viroid ve fitoplazma da içeren otuz altı bitki virüs ve benzeri etmen bildirilmiştir (Gopal ve Khurana, 2006; Khurana ve Singh, 1986). Patates Y virüsü (*Potato virus Y*; PVY), patates bitkisini enfekte eden en önemli viral patojendir (Kogovšek vd., 2008). PVY, patates dejenerasyonu ile ilişkili virüs hastalığı grubunun bir üyesi olarak 1931 sırasında ilk olarak patates bitkisinde tanınmıştır (Smith, 1931). Potyvirusler, bilinen bitki virüslerinin en büyüğü ve en fazla agronomik olarak en önemli grubunu oluşturur ve

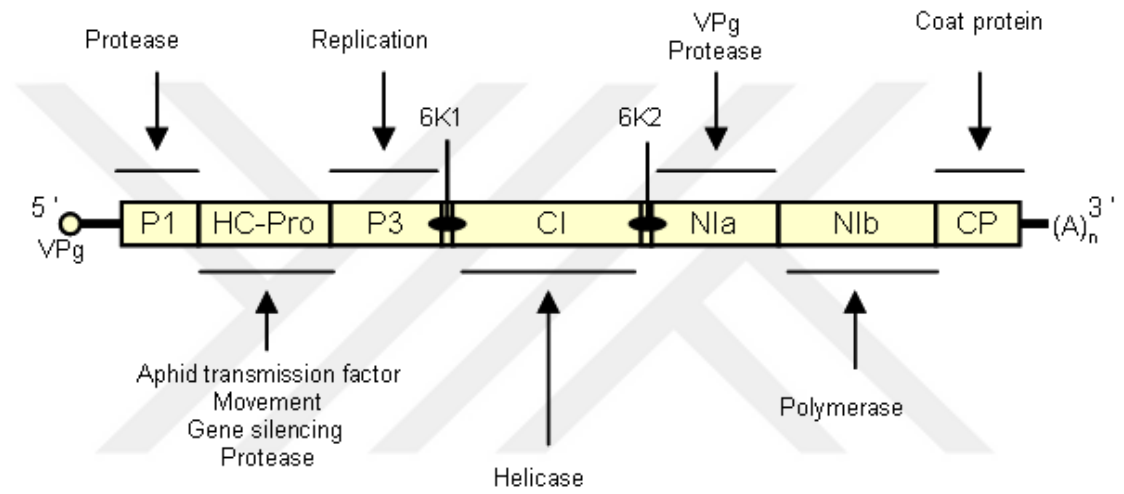
birçok kültür bitkisinde yıkıcı hastalıklara neden olurlar (Hollings ve Brunt, 1981). PVY, *Potyviriidae* familyasındaki altı cinsden biri olan *Potyvirus* cinsinin bir üyesidir (Shukla ve Ward, 1988). PVY *Potyviriidae* familyasının tip üyesidir ve ırkları tütün, patates, biber ve domateste de hafif derecede beneklenmelere neden olarak hastalıklara neden olur (De Bokx ve Huttinga, 1981). PVY çok geniş bir konukçu dizisine sahiptir ve dünya çapında yayılmıştır (Stevenson vd., 2001). Kerlan (2006), *Solanaceae*'nin 14 cinsi de dâhil olmak üzere yaklaşık dokuz ailesinin enfeksiyonunu bildirmiştir. Konukçuları arasında domates (*Lycopersicum esculentum*), biber (*Capsicum* spp.), patlıcan (*S. melongena*), tütün (*Nicotiana* spp) ve birçok otlar (*Physalis* spp., *Datura* spp., *S. dulcamara* ve *S. nigrum*) (Jeffries, 1998). Deneysel olarak bildirilen konukçu aralığı 31 aileden oluşan 72 cins ve 495 türden oluşur. *Solanaceae*'nin 14 cinsinde yaklaşık 287 tür, bunların arasında *Solanum* cinsinden 141 tür, *Nicotiana*'dan 70 tür, yaklaşık 28 *Amaranthaceae*, 25 *Leguminosae*, 20 *Chenopodiaceae* ve 11 *Compositae* türü PVY için konukçu olarak rapor edilmektedir (Binyam, 2015).

PVY günümüzde de patates yetiştiriciliğinde hala büyük riskleri olan bir virüsdür, çünkü çok kolay yayılır ve verimi büyük ölçüde düşürebilir. Diğer patates virüsleriyle birlikte enfeksiyon olduğunda daha da büyük zarar oluşur. PVY, sertifikasyon programlarında tohumların reddedilmesinin önde gelen nedenlerinden biridir (Ragsdale vd., 2001). Bu virüsten kaynaklanan kayıplar, ürün kalitesindeki çeşitliliğe ve kayıplara bağlı olarak % 10-80'dir (Warren vd., 2005). Bununla birlikte, bazı ırklar, patateste % 10-100 verim kaybına neden olabilir (De Bokx ve Huttinga, 1981).

PVY'nin virionları, filamentli, zarflanmamış, fleksibl çubuklardır (700-1200 nm uzunluğunda, 11-12 nm çapında). Parçacıklar 3.3 nm'lik bir sarmal yapıya sahiptir. Virion, 5.4-% 6.4 ribonükleik asit (Leiser ve Richter, 1978) ve % 93.6-94.6 protein içerir (Robaglia vd., 1989; Varma vd., 1968). RNA'nın 5 'ucunda bir genom bağlantılı protein (VPg) bulunur (Şekil 2.1). Fenol veya deterjanla deproteinize edildiğinde enfektif olma yeteneği korunur. Poli A bölgesi 3 'ucunda mevcut, ancak enfeksiyon için gerekli değildir. Potyvirus genomu, tek standart doğrusal RNA molekülüne sahip yaklaşık 10 kb boyundadır (Hull, 2009). Enfekte olmuş hücrenin sitoplazmasında fırladık ve silindirik şeklindeki viral protein inklüzyon cisimciklerinin oluşumu, potyviruslerle ilişkili özel bir karakterdir, ışık ve elektron mikroskobu ile tanımlanabilir (Stevenson vd., 2001). PVY'nin nükleik asidi, sedimentasyon katsayısı 25S (Makkouk ve Comeau, 1994) - 39S

olan ve tek molekül ağırlığı 3.1×10^6 olan (Makkouk ve Comeau, 1994) tek sarmallı bir lineer RNA'dır. Genomun 5' ucunda bir VPg ve 3' terminusunda bir poliA sekansı vardır. Subgenomik RNA üretilmez. Parçacıklardaki RNA yüzdesi % 5.4 - 6.4'tür (Leiser ve Richter, 1978; Makkouk ve Comeau, 1994).

PVY'nin protein parçacıktaki protein içeriği yaklaşık % 94'tür. Viral parçacıklarda sadece iki protein olan VPg ve kat proteini (CP) bulunur. CP moleküler ağırlığının 29.95 kDa olduğu hesaplanmıştır (Shukla ve Ward, 1988). Gen bankası veri tabanlarında 200 civarında CP dizisi bulunmaktadır.



Şekil 2.1. *Potato virus Y* 'nin genom yapısı (INRA, 2017)

PVY enfekte olmuş tohumluk yumruların yaralanması ve kesilmesi yoluyla vejetatif veya mekanik olarak bulaşabilir (Ragsdale vd., 2001). Bitkilerde PVY virüs hastalıklarında yaprak bitleri en önemli taşıyıcı vektörlerdir. Arazi koşullarında PVY non-persistent yolla *Myzus persicae* ve *Macrosiphum euphorbiae* gibi patatesten kolonize olan yaprakbitleri ile taşınırlar (Ragsdale vd., 2001). Patates bitkisinde kolonize olmayan bazı yaprak bitleri de PVY'nin düşük oranda taşınmasında etkili olabilmektedir. Patates bitkilerinde düşük oranda kolonize yaprak biti olmasına rağmen yüksek oranda virüs enfeksiyonu olabilmektedir (Singh vd., 1996). Bu durumda, kolonize yaprak bitlerinin olmaması halinde kolonize olmaya yaprak bitlerinin bitkilerden toplanması PVY'nin yayılımında bu türlerin rol oynamasından kaynaklanmaktadır (DiFonzo vd., 1996). PVY ırklarının taşınma kapasitesi yaprak bitleri vektörlerine göre farklılık gösterebilir (Basky ve Almási, 2005; Cervantes, 2008; Fereres vd., 1993). PVY'nin yaygın ırkı olan PVY⁰'nun *Myzus persicae* ve *Aphis nasturtii* türlerinde belirlenmek amacıyla yaptıkları çalışmada bu afet

türlerini PVY0 ile enfekteli patates bitkilerinde beslenmişler ve buradan toplanan afitlerde virüsün kapsül protein geninden düzenledikleri pirimerleri kullanarak virüsün bu ırkını tespit etmişlerdir (Boston ve Haliloğlu, 2010). Test edilen virüs iletimi kabiliyetli türleri arasında PVY^N için potansiyel vektör olarak *A. nasturtii*, *B. helichrysi*, *Cryptomyzus galeopsidis*, *C. ribis*, *Hyadaphis foeniculi*, *H. pruni*, *H. lactucae*, *S. avenae* ve *S. fragariae* rapor edilmiştir (Piron, 1986).

PVY dünyada patates üretim alanlarında yaygın olarak bulunmaktadır ve bazı ırkları sadece spesifik kıtalarla sınırlandırılmıştır (De Bokx ve Huttinga, 1981; Gibbs vd., 1970; Gray vd., 2010). PVY nin beş tip ırkı vardır: PVY^O, PVY^C, PVY^N PVY^Z ve PVY^E (Galvino-Costa vd., 2012; Jones, 1990; Kerlan vd., 1999; Singh vd., 2008; Sorri vd., 1999).

PVY kompleks ırklar veya ırk grupları halinde bulunurlar ve patatesteki bulunan bir dizi dayanıklılık genlerine hassasiyetlerine göre sınıflandırılırlar. Patatesteki bulunan *Ny* genine karşı hypersensitive reaksiyon (HR) geliştirenler PVY^O, *Nc* genine HR verenler PVY^C olarak gruplandırılır *Nz* genine HR oluşturanlar PVY^Z olarak adlandırılır (Singh vd., 2008) (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. PVY'nin ana ırklarının serolojik ve moleküler özelliklerine göre genetik sınıflandırılması

Örnek Patates çeşitleri	PVY ^O	PVY ^C	PVY ^Z	PVY ^N	PVY ^E
Desire, Petland Crown (<i>Ny</i> , <i>Nc</i> , <i>Nz</i>)	HR	s	s	s	s
King Edward (<i>Ny</i> , <i>Nc</i> , <i>Nz</i>)	s	HR	s	s	s
Maris Bard, Petland Ivory (<i>Ny</i> , <i>Nc</i> , <i>Nz</i>)	HR	HR	HR	s	s
Tütün	Mozaik	Mozaik	Mozaik	Damar nekrozu	Mozaik
Serotip	O	O	N	N	N
Genom tipi	NR	NR	R	NR	R

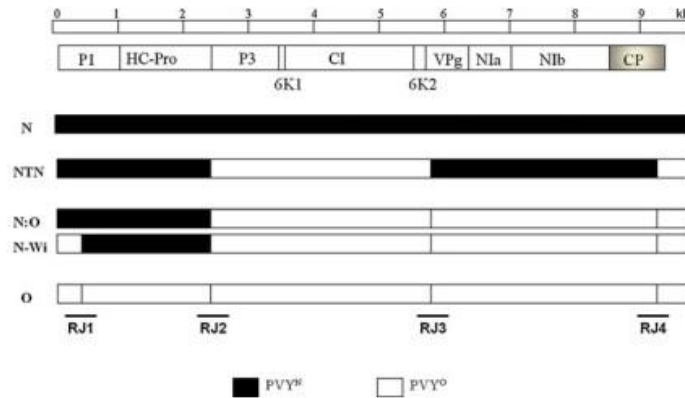
HR= hipersensitif reaksiyon, S= hassas, NR = non rekombinant, R= rekombinant

Bu genlere hiçbir HR geliştirmeyen izolatlar ise tütündeki reaksiyonlarına göre ayırt edilirler. Bunlardan tütünde damar nekrozu oluşturanlar PVY^N ırkı, (Jones, 1990; Singh vd., 2008) sadece mozaik oluşturanlar PVY^E ırkı (Kerlan vd., 1999; Singh vd., 2008) olarak sınıflandırılırlar. Bu üç orjinal ve geleneksel PVY ırkından PVY^N “nekrotik”

PVY^N ırkı olarak da adlandırılır (Boonham vd., 2002). Bu ırk gruplarından PVY^O ve PVY^N moleküler, seroloji, RT-PCR ve tüm genom sekansı ile iyi bir şekilde karakterize edilmiştir. Ancak diğer PVY^Z ve PVY^E ırklarının moleküler özellikleri çok iyi açıklanmamıştır (Chikh Ali vd., 2013).

Rekombinant olmayan ırk gruplarının PVY^O, PVY^N ve PVY^C'nin tüm genom sekansları bilinmektedir. Bu durum ebeveyn ırkların dışında, PVY^O ve PVY^N dizilerinin parçalarını çeşitli kombinasyonlarda taşıyan bazı çoklu rekombinant PVY genomları keşfedilmiştir. Günümüze kadar PVY^O ve PVY^N ebeveyn olan en az dokuz rekombinant oluşum tespit edilmiştir. Bu rekombinantlar 1 veya 4 rekombinasyon noktasına sahip olup, birçoğu PVY genomunun P1, HC-Pro ve VP-N1a bölgelerindedir (Chikh Ali vd., 2013) (Şekil 2.2).

PVY^{NTN}, PVY^{N:O} ve PVY^{N-Wi} en yaygın rekombinantlardır. Bu rekombinantları tek nükleotid polimorfizmleri kullanılarak tasarlanan primerlerle RT-PCR veya mütipleks RT-PCR ile tanılamak mümkündür (Boonham vd., 2002; Chikh Ali vd., 2010; Lorenzen vd., 2006; Nie ve Singh, 2002, 2003a; Rigotti ve Gugerli, 2007). Bunların dışında PVY^O ve PVY^N den farklı rekombinant olmayan PVY^{NA-N} (Nie ve Singh, 2003b) ve rekombinant NE-11 (Lorenzen vd., 2008) tanımlanmıştır. Hemen bütün PVY rekombinantlar tütünde damar nekrozu oluşturmuşlardır ve bu nedenle PVY^N grubuna girerler. Bu nedenle, PVY rekombinantların tütün reaksiyonu tiplenmesi mümkün değildir.



Şekil 2.2. Kuzey Amerika ve Avrupa’da bulunan PVY rekombinantların rekombinasyon noktalarının şematik ifadesi (Chikh Ali vd., 2013)

Patates bitkilerinde, PVY^O ırkı dünya genelinde görülür (Jeffries, 1998). PVY^N ırkı, Güney Amerika, Avrupa, Afrika ve Asya'da (Weidemann, 1988) ve Yeni Zelanda'da (Flecher, 1989) yaygın olup, Kanada'da karantina patojeni iken (Ellis vd., 1997), ABD'de bölgesel salgınlar kaydedilmiştir (Singh, 1992). Avrupa, Kuzey Amerika, Hindistan, Güney Afrika, Avustralya, Yeni Zelanda ve Ekvador'da (Jeffries, 1998) bilinen PVY^C ırkı bilinenden daha yaygın olması muhtemeldir. Bu yaygın ırklar dışında rekombinasyon ve farklı mekanizmalarla oluşan varyanlar da mevcuttur. PVY^{NTN} varyantı, ABD (McDonald ve Singh, 1996; Nie ve Singh, 2003b) ve Japonya (Ohshima vd., 2000) da dahil olmak üzere dünyanın birçok patates yetiştirilen ülkelerinde tanımlanmıştır. PVY^{N-W} varyantı Fransa ve İspanya da dâhil olmak üzere diğer birkaç ülkede bildirilmiştir (Blanco-Urgoiti vd., 1998). PVY^{N:O} Kanada'da (Manitoba) ve ABD'de (Minnesota, Montana, Kuzey Dakota) bildirilmiştir (Singh vd., 2008).

PVY ırkları hafif mozaikten nekroza kadar çeşitli yaprak deformasyonuna neden olur. PVY^O ırkı çoğu bitkide mozaik semptomlara neden olan ancak bazı patates çeşitlerinde yaprak nekrozuna da neden olan yaygın ırktır. PVY^O tipik olarak yumru nekrozuna neden olmaz fakat önemli miktarda verim azalmasına neden olur (Halterman vd., 2012). PVY^N ırkı Güney Amerika kökenli PVY'nin yumruda nekrotik hasar oluşturur, yapraklarda PVY^O'dan daha hafif mozaikler meydana getiren bir ırkıdır (Weidemann, 1988). Bu ırkın yumrulara oluşturduğu hastalığa patates yumru nekrotik leke hastalığı (PTNRD) adı verilir (Halterman vd., 2012). PVY^N tütün yapraklarında şiddetli nekroza neden olur ve enfekte olmuş bitkiyi öldürür (Jones, 1990).

2.3 Bitki Virüslerinin Saptanma Yöntemleri

Dünyada bitkilerde hastalığa neden olan patojenlerden biri olan virüsler, çok çeşitli ciddi hastalıklara neden olan geniş bir bitki türü yelpazesinde enfeksiyon yapabilir. Viral hastalıkların ürün kalite ve miktarı üzerine etkisi sonucu her yıl milyarlarca dolar kaybına neden olur (Thresh, 2006). Ne yazık ki, viral hastalıkların bakterisidler ve fungusitler gibi kimyasal maddelerle mücadelesi yoktur (Fakhrabad vd., 2012). Virüs teşhisi virüs hastalıkları ile mücadelede en önemli stratejilerinden biri olarak kabul edilir. Etkili bir kontrol elde etmek için, virüslerin doğru bir şekilde teşhisi mücadelenin ilk basamağı olarak tanımlanır. Bitki virüslerinin teşhis ve tanı teknikleri aşağıdaki kategorilere ayrılır.

2.3.1 Biyolojik özellikleri temel alan teşhis metotları

2.3.1.1 Simptomatoloji

Simptomatoloji hasta bitkide simptomların görsel incelemesine dayanır. Bitki virüsleri bitki üzerinde birçok simptoma neden olur. Mozaik, lekelenme, bodurlaşma, yaprak malformasyonu, nekroz, kloroz, verim azalması veya bu belirtilerin kombinasyonu. Bununla birlikte, birçok biyotik ve abiyotik faktörler bu simptomların görünümünü etkileyebilir. Ayrıca, bazı bitkiler farklı etkilerle (besin elementi noksanlığı, abiyotik stres faktörleri gibi) virüs benzeri simptomlar gösterebilir. Ancak bazı virüs bitkilerde simptomsuz (latent) enfeksiyona da neden olabilir. Bu nedenle, sadece simptomlara bakarak karar almak yanlıştır. Diğer test teknikleriyle doğrulama yapılmalıdır. Bu metot genellikle, diğer teyid edici testlerle birlikte virüs teşhisinin doğruluğunu artırmak amacıyla kullanılır (Naidu ve Hughes, 2003).

2.3.1.2 Biyolojik indeksleme

Bitki virüslerinin teşhisi için en eski yöntemlerden biridir. Geleneksel yöntem virüs teşhisi için birçok laboratuvar da halen önemli bir teşhis yöntemi olarak kullanılmaktadır (Hull, 2009). Biyolojik indekslemede mekanik, aşılama ve vektör aracılığı ile hassas otu indikatör bitkilere virüs taşımaları yapılmaktadır. Bu indikatör bitkiler üzerinde gözlemlenen semptomların karakterizasyonu birçok virüsün tespit edilmesine ve tanımlanmasına izin verir. Meyve ağaçlarında enfeksiyon yapan virüsler gibi Mekanik taşıma yoluyla inokule edilemeyen virüslerin taşınması, uygun indikatör bitkiler kullanılarak vektör veya aşılama yoluyla inokule edilebilir. Bu testler, genellikle virüslerin rutin teşhisi için kullanılsa da, bunlar virüs tespitini kesin olarak yapmamakta, ayrıca zaman ve kaynak tüketmektedirler (Naidu ve Hughes, 2003).

2.3.2 Elektronik mikroskopu

Elektron Mikroskopisi (EM) virüs morfolojisi hakkında yararlı bilgiler sağlar. Kararlı (stabil) virüslerin yanı sıra iplikçi ve çubuk şekilli virüslerin teşhisinde, negatif boyama tekniği ile hızlı sonuçlar elde edilebilir. Ancak, izometrik virüsleri tespit etmek kolay değildir. Ayrıca, bitki dokusunda düşük konsantrasyonda ortaya çıkan virüs parçacıkları,

bitki özsuğunda konsantre edilir veya antikor kaplı ızgaralar (grid) kullanılarak (Immunosorbent EM) yakalanır. EM genellikle gerekli olduğunda virüs taraması için kullanılır. Çok pahalı ve iş gücü gerektiren bir yöntem olduğü için çoklu numunelerin hızlı tespit için kullanılamaz. Potyvirus grubu bitki virüsleri, bitki hücrelerinde silindirik inklüzyon cisimcikleri oluştururlar. Enfekteli hücrelerde, virüs birikimi ile oluşın büyük kristal yapılar geliştirilir. Böylece, teşhisleri, bu parçacıkların EM veya ışık mikroskopisi ile görülebilmesi nedeniyle basit, hızlı ve nispeten ucuz olur (Danci vd., 2009; Naidu ve Hughes, 2003).

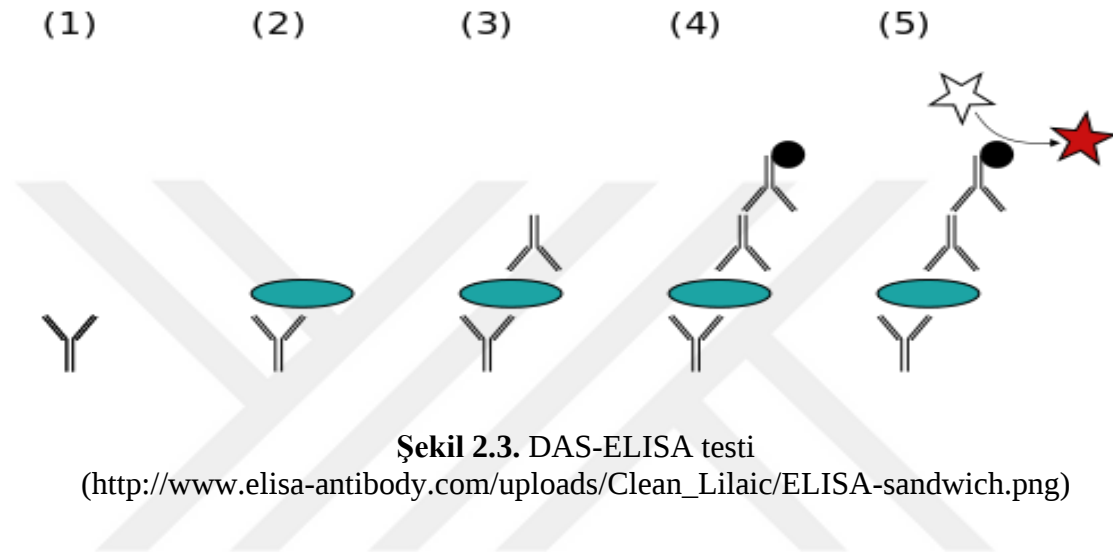
2.3.3 Serolojik metotlar

Seroloji, virüs teşhisi için en kolay ve spesifik yöntemlerden biridir. Bu yöntemler hızlı ve hassas çıktılar verir. Tüm serolojik testler, virüs kılıf proteini özelliklerine dayanır ve iki tipe ayrılır: katı fazlı deneyler (ELISA, western immuno blotlama) ve sıvı fazlı deneyler (presipitasyon ve aglutinasyon)'dir. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ve doku immüno-blotlama testini içeren serolojik yöntemler bitki virüslerinin teşhisi için güçlü araçlar olarak düşünülür. Bu teknikler virüs spesifik kılıf proteini (epitop) ve tavşan ile fare gibi memelilerin sistemlerinde oluşın antiviral antibadiler arasındaki antijen-antibadi reaksiyonuna dayanır ve böylece enzimle işaretlenmiş antibadiler gibi bazı teşhis yollarıyla sonuçları görsel hale getirilebilir (Hampton vd., 1990).

2.3.3.1 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Enzime bağılı immünosorbent test, özellikle virüs teşhisinde en önemli ve en popüler ilerleme kaydeden serolojik metottur (López vd., 2003). Clark ve Adams 1977'de ELISA yöntemini ilk kez bitki virolojisine tanıtmıştır. O zamandan beri bitki materyalinde bitki virüsü tespiti için çok yaygın olarak kullanılmaktadır (Clark ve Adams, 1977). ELISA ekonomik olması yanında, basitliğı, uyarlanabilirliğı, güvenilirliğı ve hassasiyeti nedeniyle bitki virüslerinin tespitinde yaygınlaşmış, çok sayıda örneğı nispeten kısa sürede testleme imkânı vermiştir (Batoöl vd., 2011; Naidu ve Hughes, 2003). ELISA'nın temel ilkesi antijenin katı bir yüzeye sabitlenmesine veya antijeni spesifik antikorlarla yakalamaya ve bir enzim iliştirilmiş spesifik immunoglobulinlerle işaretlemeye dayanır. Virüsün varlığının tespiti, enzimin substratı eknerek yapılmaktadır. Enzim substratı ürüne

dönüştürür ve gelişen renklerden dolayı test kolaylıkla görselleştirilebilir. ELISA yönteminin birçok versiyonu geliştirilmiştir (Şekil 4). Bu versiyonlar ELISA'nın "doğrudan" ve "dolaylı" formları şeklinde sınıflandırılmıştır. Her iki kategori aynı temel teoriye sahiptir ve aynı sonuçları verir, sadece antijen-antikor kompleksinin teşhisi bakımından farklıdır. ELISA'nın dezavantajı bitki ekstraksiyonunun zaman alması, mikrotiter plakalarda doku ve antibadi inkübasyonlarının bir kaç saat sürebilmesidir (Lima vd., 2012; Naidu ve Hughes, 2003).



2.3.3.2 Tissue blotting immunosorbent assay (TBIA)

TBIA, dot-blot immuno assay'ın (DBIA) bir varyasyonu olup, hem bitkilerde hem de vektörlerde virüs tespitine olanak sağlamaktadır. İlk kez 1990'da kullanılmış olup, virüs için basit ve güvenilir bir yöntem olarak yaygın bir şekilde uygulanmıştır (Lin vd., 1990). TBIA, ELISA ile nispeten aynı tekniğe sahiptir; bitki veya vektörün yeni kesilmiş bir kenarının kullanıldığı ve mikrotitrasyon plakası yerine bir membran kullanılmaktadır. Doku ekstraksiyonuna gerek olmaması ve membranların doğrudan arazide baskılanabilmesi, daha sonraki bir tarihte işlenebilmesi nedeniyle ELISA'ya kıyasla avantajları olmasına rağmen, TBIA'nın bir takım dezavantajları da vardır. Bu yöntemde, sonuçların niceliksel olmaktan çok kalitatif ve bunun yanında bitki özsuyu bileşenlerinin daha sonraki aşamalarda karışması nedeniyle zayıf pozitif reaksiyonlar gözlemlenebilir (Makkouk ve Comeau, 1994; Naidu ve Hughes, 2003).

2.4 Nükleik Asidi Temel Alan Teşhis Metotları

Nükleik asit esaslı teknikler yaygın olarak bitki virüslerinin özellikle polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) ortaya çıkmasından sonra tespit ve teşhisinde kullanılmaya başlanmıştır (Saiki vd., 1988). Serolojik teknikler yaygın olarak kullanılsa da virüs tespiti için nükleik asit yöntemleri ile karşılaştırıldığında bazı dezavantajları vardır. Bu serolojik testlerin dezavantajı kılıf protein temelli tekniklere dayanmasıdır. Viral proteinlere dayalı yöntemler virüsün sadece % 10'unu temsil eden antijenin özelliklerini temsil eder ve virüs genomunun (Gould ve Symons, 1983) geri kalanını ihmal eder. Nükleik asit temelli saptama yöntemlerinde virüs genomundaki herhangi bir bölge hedeflenip teşhis yapılabilir. Dahası bazı durumlarda serolojik yöntemler özellikle viroidlerin, uydu RNA'ların, parçacıklardan yoksun olan virüslerin (örneğin *Groundnut rozet virüsü* (GRV), son derece farklı serotipler halinde ortaya virüslerin (ör. Hint ve Afrika Yerfıstığı kümesi virüsü ve Tütün çingiraklı virüsü) teşhisinde kullanılamamaktadır (Naidu ve Hughes, 2003).

Bitkiler çok çeşitlidir ve bireysel türler, organlar veya bitkilerdeki dokular moleküler olarak kullanılmak üzere RNA (ve DNA) ekstraksiyon çalışmaları sırasında farklı davranırlar. Buna bağlı olarak, çeşitli ekstraksiyon yöntemleri de geliştirilmiştir. Karşılaşılan sorunlar şunlardır: büyük miktarlarda polisakaritlerin varlığı; yüksek RNaz seviyeleri; çeşitli tanenler de dâhil olmak üzere farklı fenolikler; düşük yoğunluklu nükleik asitler (yüksek su içeriği); Lignin (ahşap) gibi dokular için zor ayrışmasıdır. Genellikle, biyoteknolojik ürün pazarlayan şirketlerden satın alınan kitler nükleik asit izolasyonu için yeterlidir, ancak bazen, daha önce RNA izole edilmemiş yeni bir bitki veya doku kullanılacağına, bu malzemenin özelliklerine uyması için yöntemlerin değiştirilmesi gerekebilir. Bir dokudan RNA izolasyonunun zor olacağına dair basit bir işaret yoktur. Çıkarılan RNA'nın kullanımına bağlı olarak, haberci RNA'nın (mRNA) daha fazla saflaştırılması gerekebilir. Genel olarak, ticari kitler bu işi yeterince yapabilmektedir. RNA ekstraksiyonunda karşılaşılan en büyük problemler, genellikle ilk örnekleme ve ekstraksiyon yöntemleri, uygulamayı yapan kişinin tecrübesi ve ekstraksiyonu dikkatle yapma derecesidir.

PCR çalışmalarında başarıyı etkileyen faktörlerden birisi de nükleik asit ekstraksiyonunda kullanılan yöntem ve ekstraksiyon sonucunda elde edilen viral

RNA'nın kalitesidir (Boston ve Haliloğlu, 2010). PCR çalışmalarında başarı elde edebilmek için direkt ham bitki öz suyu yerine saflaştırılmış RNA'nın kullanılması daha etkili olup, özellikle dejenere pirimerlerin toplam nükleik asit materyallerinde rastgele bir bölgeye bağlanma olasılığını ortadan kaldırmak için saflaştırılmış RNA kullanılması gerekmektedir (Langeveld vd., 1991). Depoda +4°C'de muhafaza edilmiş "Shebody" çeşidine ait dormant yumrulara, PVY⁰ ırkının, (Spiegel ve Martin, 1993)'e göre ekstrakte edilmiş toplam RNA'ların RT-PCR tekniği ile analiz edildiğinde virüs belirlenemezken; toplam RNA Lopez-Moya vd., (1992) yöntemine göre elde edildiğinde başarılı sonuç alınmış, bu nedenle RNA izolasyon yönteminin teşhisde önemli rol oynadığını belirtilmiştir (Singh vd., 1996).

IC yöntemi; bitki virüsü ile antijen eşleşmesine dayalı bir teşhis metodudur. Genini çoğaltmak istediğimiz virüse ait, spesifik antiserumunun steril katı yüzeye sabitlenmesiyle gerçekleşen virüs teşhis metodudur. Bu aşamadan sonra RT-PCR basamakları uygulanır ve hedef gen bölgesi çoğaltılır. Bu yöntemin avantajı bitki dokusuna ekstraksiyon yöntemi uygulanmadan yapılan hızlı, masrafsız olmasıdır.

2.4.1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

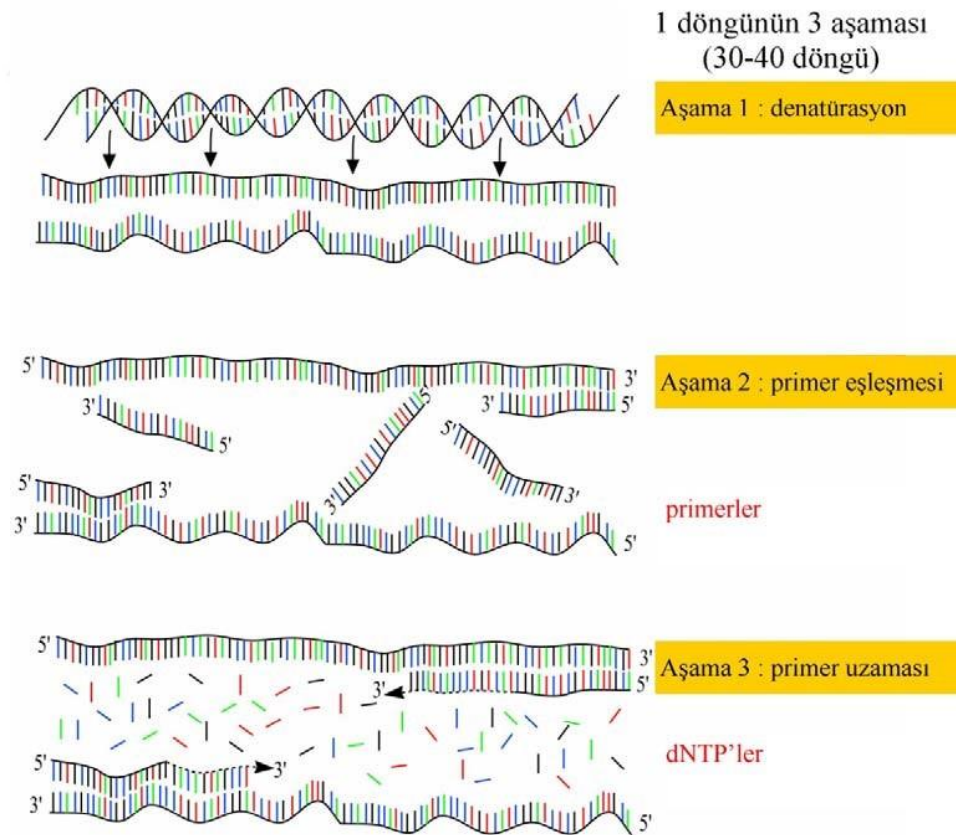
PCR son derece spesifik, hassas ve uyarlanabilir olup, çok az miktardaki hedef nükleik asidin çoğaltılmasında büyük bir potansiyele sahip çok yönlü *in vitro* yöntemdir. Bölgeye spesifik primerler kullanılarak çok az miktarda hedeflenen nükleik asid termostabil DNA polimeraz enzimi ile çoğaltılmaktadır (Gould ve Symons, 1983; López vd., 2003). Üç aşamalı döngü kullanılmaktadır. denatürasyon, primer eşleşmesi, primer uzamasıdır (Şekil 2.4).

Denatürasyon aşamasında, DNA yumağı, hift sarmal ve iki eş zincir artan sıcaklık sayesinde birbirinden ayrılmakta, tüm enzimatik reaksiyonlar durmaktadır. DNA denatürasyonu sağlamak için thermocycler sıcaklığı yaklaşık 93-96°C'ye çıkarılır. Yüksek sıcaklık etkisi ile kuvvetli hidrojen bağları kırılır, ortamdaki çift sarmal (ds) DNA, tek sarmal (ss) DNA formuna dönüşür. Mevcut dsDNA'nın yarısının tek kol haline dönüştüğü sıcaklık (T_m), erime sıcaklığıdır ve DNA hibridizasyonunda ve primer bağlanmasında önemli bir kriterdir. Düşük tuz konsantrasyonu, yüksek pH ve formaldehit gibi organik çözücülerin bulunması durumunda T_m düşer. DNA'nın içerdiği nükleotid

çiftlerinin oranı yani G/C ve T/A miktarları da T_m 'i etkiler. G/C miktarı yüksek olan DNA'nın T_m 'i, T/A miktarı yüksek olan DNA'ya göre daha yüksektir.

DNA zincirlerinin eşleşmesi veya yeniden bağlanması daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşmektedir (genellikle 55-65°C). Sıcaklık düşüncü, birbirine eş iki ssDNA zinciri arasında yeniden hidrojen bağları oluşarak dsDNA oluşturur. Tek zincir primerler ile tek zincir hedef DNA arasında hidrojen bağlar oluşur (annealing). Hedef DNA'ya tam olarak eşleşen primer ile ana zincir arasındaki bağlar daha sağlam ve uzun süreli olur. Meydana gelen bu küçük dsDNA parçası (primer-template) üzerine DNA polimeraz bağlanarak ana zinciri kopyalamaya başlar. Birkaç baz eklendikten sonra primer ve template arasındaki iyonik bağ kuvvetlenir ve kırılmaz.

Sıcaklığa dayanıklı DNA polimeraz (genellikle Taq DNA Polimeraz) ile dNTP'lerin varlığında primerler hedef zincir boyunca uzatılır. Bu reaksiyon başlangıçtaki hedef DNA materyalinin iki katına çıkar (birebir kopyalama). Taq Polimerazın en uygun çalışma sıcaklığı 72°C'dir.



Şekil 2.4. PCR çoğalmasının basamakları (Vierstraete,1999)

Primerlerin bir kaç baz uzamasından sonra, hedef alınan DNA'ya karşı daha yüksek iyonik çekime sahip olurlar. Bu durum yapılan işlemin geri dönüşünü engellemektedir. Tam olarak eşleşmeyen (uyuşmayan) primerler yüksek sıcaklıktan dolayı gevşer ve böylelikle reaksiyon DNA parçası uzamaz. Ana DNA'ya eş olan bazlar primere 3' üstünden bağlanır. Polimeraz ana zinciri 3'-5' üstü yönünden okunurken, 5'-3' üstünden de dNTP ekler. Primer uzama basamağı çoğaltılacak DNA'nın uzunluğuna göre arttırılabilir. Ama genellikle PCR testlerinde 1 dakikalık uzama zamanı tam sentez için yeterli olmaktadır.

2.4.2 Real-Time PCR sistemleri

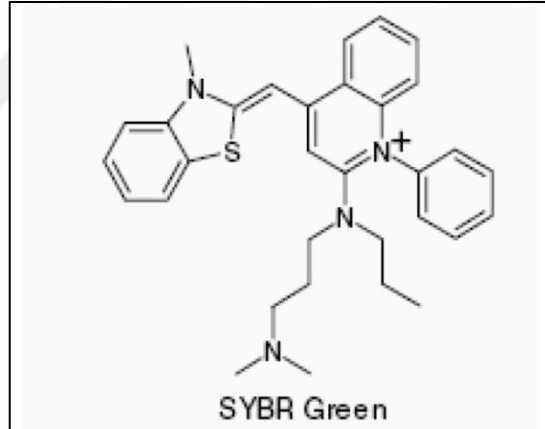
Real time-PCR yöntemi DNA'nın çoğaltımını ve eş zamanlı olarak ürünlerini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan bir metottur. Çoğaltılan DNA'nın teşhisi PCR reaksiyonu sonrasında değil de sırasında yapıldığından analiz süresi kısaltmakta, ethidium bromide gibi tehlikeli kimyasallar kullanılmamakta ve işlemde sonra tüplerin ağzı açılmadığından örneklerin karışma riski olmamaktadır. PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir.

Real-time PCR yöntemi çeşitli amaçlarla nükleik asitlerin kalitatif veya kantitatif olarak saptanabilmesi amacıyla kullanılabilir. Real-time PCR yöntemini, daha önceden geliştirilmiş olan standart PCR yönteminden ayıran iki önemli özellik vardır: Birincisi, real-time-PCR yönteminde termal döngü cihazıyla birleştirilmiş bir optik okuma sisteminin kullanılmasıdır. İkincisi ise, PCR işlemi sırasında amplifikasyonu bilgisayar ekranına yansıtacak bir probun veya problemlerin bulunması gereğidir. Bu nedenle özellikle uygun prob seçimi, real-time PCR işleminin verimliliğini etkileyen en önemli basamaklardan biridir. Probun işlevi, cihaz içerisinde gerçekleştirilmiş olan çoğaltma işleminin, gözle görülür hale getirilmesidir. Prob kullanılmadan da, PCR tüpü içerisinde uygun primerlerin, dNTP'lerin ve enzimin kullanımıyla PCR işlemi gerçekleşecektir. Ancak prob kullanılmadan sonucun real-time PCR cihazının bilgisayarında görüntülenmesi mümkün olmayacaktır.

Uygun teşhis sisteminin seçimi real time-PCR çalışmalarında en önemli noktalarından biridir. Spesifik olmayan çift zincirli DNA'ların çoğaltımında "SYBR Green I" yöntemi

kullanılmaktadır. SYBR Green I yönteminde kullanılmakta olan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa bağlı olarak “real-time” PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artmaktadır. Bu yöntem en fazla kullanılan boya çeşitidir ve 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir. Çift sarmal DNA'nın küçük oluşuna bağlanan boya, 30 amplifikasyon döngüsü sonrası aktivitesinin % 6'sını kaybetmektedir (Şekil 2.5).

Çoğaltımın başında reaksiyon da çift zincirli DNA molekülü, primerler ve “SYBR Green I” boyası yer almaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az miktarda floresan ışıma yapmaktadır. Primerler bağlanıp uzama başladığından itibaren boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Başlangıçtaki döngülerde sinyal zayıftır; ürün miktarı artmaya başladığından itibaren floresan miktarı hızlı bir şekilde artar ve bu artış “real-time” cihazının monitöründen izlenebilmektedir. Bu yöntem en uygun PCR şartlarında ve dizaynı iyi yapılmış primerler ile beraber çok fazla sayı da hedef genin çoğaltılmasına imkân vermektedir.

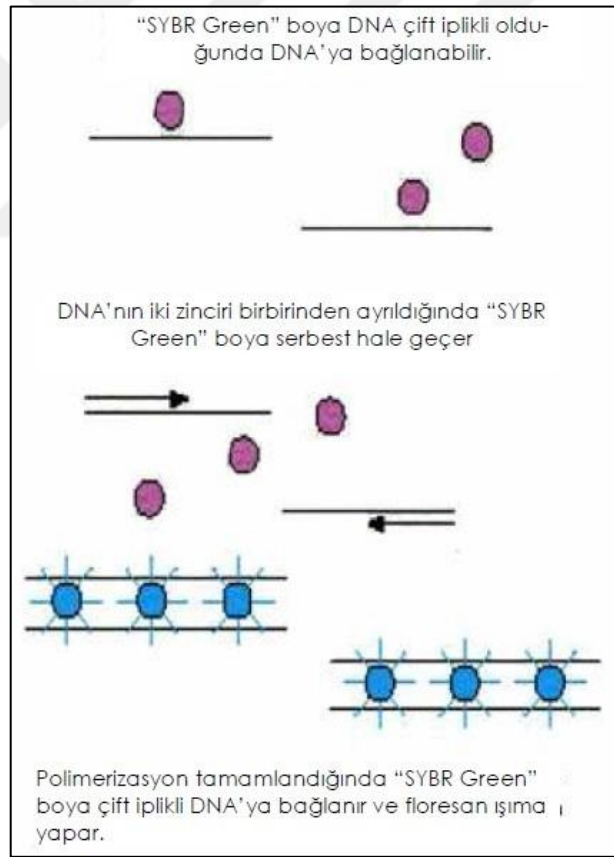


Şekil 2.5. Asimetrik siyanin boya SYBR Green I'in kimyasal yapısı (Günel, 2007)

Floresan boya ile işaretlenmiş problara ihtiyaç duymadığı için maliyeti çok ucuzdur. Bununla birlikte bu yöntemin dezavantajları da vardır. İstenmeyen PCR ürünlerin çoğalması olabilmektedir ve floresan açığa çıkacağından her zaman hedef aldığımız DNA'nın çoğaldığını işaret etmez. Bu durumda yanlış pozitif sonuç alınabilmektedir. Ortamda spesifik DNA dizisi olmadığında primerlerin birbiri ile bağlanmaları sonucunda “primer dimer”leri olarak adlandırılan ve çift zincirli DNA bölgelerinin çoğalımı ile floresan ışıma gözlenebilmektedir. Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını bilebilmemiz için DNA'ların erime eğrisi analizleri (“melting curve”,

“dissociation”) yapılması gerekmektedir. Erime eğrisi analizi için cihaz PCR tüplerini yavaş bir şekilde ısıtmaya başlar. Çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında floresan boya serbest kalır ve böylelikle okunan floresan miktarı da düşer. Spesifik olmayan ürünlerin çoğalmasında (primer dimer’lerinde) hedef aldığımız DNA parçasının Tm derecesi arasında farklılık gözlemlenecektir. Genellikle bu yöntemle bilinmeyen iki DNA dizisi karşılaştırılmak istendiğinde yöntem güvenilir bir şekilde kullanılabilir (Şekil 2.6).

Real Time PCR yönteminin başka bir çeşidi olan Taq Man yöntemi vardır. Taq Man yöntemi çoğaltılmak istenen DNA’ya komplementer olan ve floresan boya ile işaretlenmiş tek tek kollu bir prob içerir. Probun 5' ucunda “fluorophore” (6-karboksifloresin= 6-FAM) ve 3' ucunda “quencher” (6-karboksitetrametil-rodamin= TAMRA) bulunur.

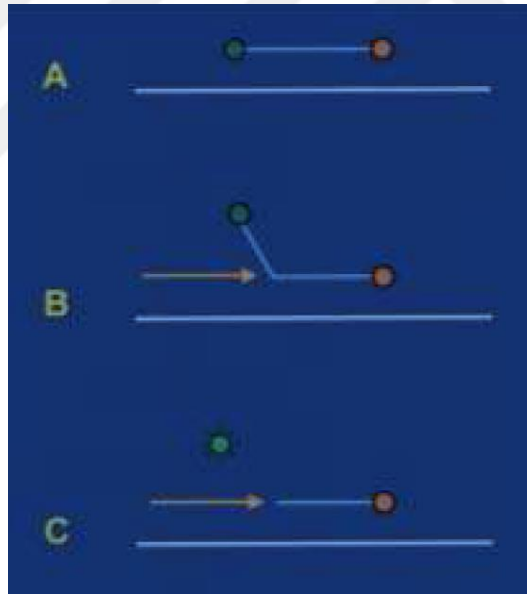


Şekil 2.6. SYBR Green I yöntemi (Günel, 2007)

3' ucundaki TAMRA boyası 5' ucundaki FAM boyasının sinyal oluşturmaya engel olur. Probun hedeflenen DNA’ya bağlanma oluşturmada bile floresan ölçümü çok

azdır. Çoğalma sırasında hedeflenen spesifik bölge üzerinde primerlerin bağlanma bölgeleri arasına prob lar bağlanır. Primerlerin bağlanmasından sonra yeni zincir çoğalmaya başlar. Probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan keser. Serbest hale gelen FAM sinyal verir. DNA zinciri sentez uzamasına devam eder (Günel, 2007) (Şekil 2.7).

Virüs teşhisinde fazla sayıda örnekle çalışan laboratuvarlarda bitki virüs hastalıklarının hızlı ve güvenilir tanısı çok büyük önem taşımaktadır. Real-time PCR yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesiyle özgüllüğü son derece yüksek olan bir PCR yöntemidir. Çok sayıda örneği, düşük konsantrasyonda bile çok kısa sürede doğru güvenilir sonuç alınabilmektedir. Real time PCR yöntemi; virüs varlığı ve miktarını belirlenmesi, patajon saptanması, DNA hasar tespiti, kromozomlardaki sayısal- yapısal bozuklukların analizinde, RNA çalışmalarında, protein belirleme çalışmalarında kullanılmaktadır.



Şekil 2.7. Taq Man prob yöntemi (Günel, 2007)

2.4.3 Kantitatif real-time PCR

PCR sırasında üç ayrı faz görülür. Birinci faz birkaç döngü süren ve saptanabilir oranda ürünün ortaya çıkmadığı arka plan fazıdır. İkinci faz üslü çoğalma (log) fazıdır. Ürün miktarının saptanabilir en alt düzeye gelmesiyle başlar. Bu fazda ürünler üslü şekilde çoğalırlar. Üçüncü faz ise plato fazıdır. Bunun nedeni reaksiyon ortamında enzim, primer

ve nükleotitlerin tükenmesi, ürünlerin birbiriyle eşleşerek yapışması, yüksek sıcaklıklar nedeniyle hidroliz ve egzonükleaz aktivitesi nedeniyle bir kısım ürünün kaybedilmesidir. Konvansiyonel PCR ile kantitasyonda plato fazında elde edilen ürün miktarı standartlarla karşılaştırılarak ilk baştaki kopya sayısı tahmin edilmeye çalışılır (“end-point” kantitasyon).

Kantitatif Real Time PCR yöntemi ile virüs konsantrasyonunu ölçme ihtiyacı duyabiliriz. Bu durumlar; virüs miktarının bitkide fazla olmazı zarar derecesi ile doğru orantılıdır, bu nedenle, virüs konsantrasyon miktarı ile bitkide ne kadar zarar var tespit edebilmektedir. Ayrıca, klonlama ile üretilen bitkilerde virüs konsantrasyonunun bilinmesi virüsten arı bitki üretiminde yol göstermektedir. Hücre kültürlerinde birden fazla virüs enfeksiyonu olduğu durumlarda, hücre kültürünün optimize edilmesinde yardımcı olmaktadır.

2.5 Bitki Virüslerini Teşhis Yöntemlerinin Kıyaslaması

Farklı amaçlarla farklı alanlarda yaygın bir kullanıma sahip olan PCR son derece duyarlı ve hassas bir teknik olup, bitki virüslerinin sınıflandırılmasında ve tanılanmasında, düzenlenecek primerlere göre bir gruba ait virüslerin, tek bir virüsün ya da ırklarının hatta izolatlarının (Langeveld vd., 1991; Mathews, 1993; Saiki vd., 1988); odunsu dokularda (Korschineck vd., 1991; Rowhani vd., 1995); dormant yumrulara (Barker vd., 1993; Robertson vd., 1991; Russo vd., 1999; Spiegel ve Martin, 1993) ve afitlerde (Singh ve Singh, 1997; Singh vd., 1996; Spiegel ve Martin, 1993) düşük yoğunluklarının bile belirlenebilmesine imkan vermektedir. Bununla beraber, PCR çalışmalarında başarıya etkileyen birçok faktör bulunup, patatesteki virüslerin *in vitro* koşullarda elde edilen mikro yumrulara, sertifikasyon programlarında, sürvey çalışmalarında ve virüslerin taşınmasında rol oynayan afitlerde belirlenmesinde diğer bir tanı tekniği olan ELISA’ya göre bazı avantaj ve dezavantajlarının vardır.

ELISA’ya göre PCR yöntemleri 100-10.000 kat daha duyarlı ve spesifiktir (Korschineck vd., 1991; Rowhani vd., 1995; Vunsh vd., 1990). Virüslerin dormant patates yumrularında ELISA yöntemi ile duyarlı ve güvenilir şekilde belirlenememekte ve dormansilerinin kırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Loebenstein vd., 1997; Russo vd., 1999; Singh, 1999; Singh vd., 1996; Spiegel ve Martin, 1993). Ayrıca, 30°C civarında sıcaklıkta yetiştirilen bitkilerde virüs yoğunluğunda meydana gelen düşüşten dolayı bu

bitkilerden alınan yaprak örneklerinde de virüslerin ELISA ile teşhisinin yapılamadığı gözlemlenmiştir (Loebenstein vd., 1997). Ancak tüm bu şartlardaki bitki örneklerinde PCR ile virüs teşhisi yapılabilmektedir. Fakat, PCR çalışmaları için donanımlı laboratuvarlara gereksinimin olduğu (Henson ve French, 1993); PCR'ın kontaminasyona karşı daha açık olduğu (Souza-Dias vd., 1999b); ELISA tekniğine göre daha fazla zamana ihtiyaç duyulduğu, özellikle fazla sayıda örnek testlemelerinde pratik ve ekonomik olmadığı, daha yoğun iş gücü gerektirdiği, ekonomik olmadığı, kalifiye elemana ihtiyaç duyulduğu bilinmektedir (Barker vd., 1993; Garner, 1994; Russo vd., 1999; Singh, 1999).

Sadece negatif ve pozitif olarak sonuç veren geleneksel PCR'da miktar tayini oldukça zor olmaktadır. Ancak Real Time PCR yöntemi ile aynı zamanda miktar tayini de yapılabilmektedir. PCR ile sonuç alınmayan çok düşük miktardaki virüs konsantrasyonlarında bile olumlu sonuç verebilmektedir. Ayrıca, reaksiyon ile eş zamanlı sonuçlar gözlenebilmekte, kontaminasyon riski daha az olup, nicel ve nitel olarak sonuç alınabilmektedir. Real time PCR analizleri çok sayıda örneğin aynı anda test edilmesinde ve örneklerin otomize bir şekilde analiz edilmesinde imkânlar sunmaktadır. Bu yöntemin dezavantajları da; uzmanlaşmış kişilere ihtiyaç duyulması, kullanılan malzemenin pahalı olması, sadece bilinen mutasyonları tanınması ve protokol oluşturmak için çok gelişmiş bir sisteme ihtiyaç duyulmasıdır.

2.6 PVY ve Irklarının Teşhisi

Günümüzde rutin PVY teşhisi amacıyla ELISA yöntemi başarı ile uygulanmakta ve çeşitli poliklonal ticari antiserumlar bulunmaktadır. Daha hassas PVY saptama amacıyla çok farklı PCR yöntemleri bulunmakla birlikte, geniş bir tanı aralığı olan ve en yaygın kullanılan metotlar (Nie ve Singh, 2002, 2003a) metodudur. Bu yöntemler bir adımlı (PCR reaksiyonu ile birlikte cDNA sentezi) veya iki adımlı (önce cDNA sentezi ve daha sonra PCR uygulama) şekilde uygulanabilmektedir (MacKenzie vd., 2015). Real-time RT-PCR yönteminde önerilen metotlardan birisi, (Singh vd., 2008) olup TaqMan probu ile yapılmaktadır.

PVY ırklarının teşhisinde kullanılabilen bazı antiserumlar mevcuttur. ELISA PVY^O ırkını PVY^{NTN} ve PVY^N'den ayırabilmekte fakat PVY^{NTN} ve PVY^N ırklarını ayıran antiserumlar geliştirilmiş olsa bile bazı izolatlarda çapraz reaksiyon vermektedir (Kogovšek vd.,

2008). Tüm PVY ırklarına geliştirilmiş antiserumlar da bulunmamaktadır. Genomların nükleotid dizilerinin farklılığından yararlanılarak geliştirilen moleküler metotlar PVY^{NTN} ve PVY^N ırklarını ayırmada kolaylık sağlasa da tüm ırkları ayırt eden bir metot oluşturmak zor olmaktadır (Lorenzen vd., 2006). PVY^{NTN} ve PVY^N ırklarını ayırmak için pek çok metot örneğin uniplex (Boonham vd., 2002) ve multiplex RT-PCR (Nie ve Singh, 2002, 2003a; Rigotti ve Gugerli, 2007), üç primer PCR (Moravec vd., 2003; Weilguny ve Singh, 1998), multiplex PCR (Schubert vd., 2007), PCR-RFLP (Glais vd., 1996; Rosner ve Maslenin, 2001), tagging of viral RNA transcripts (Rosner ve Maslenin, 2003) AmpliDet RNA assay (Szemes vd., 2002) ve son zamanlarda SNaPshot assay (Rolland vd., 2008) bildirilmiştir. Ancak bu metotlar çok sayıda örneğin hızlı testi için uygun olmayıp bazıları da daha geniş izolat grubuna uygulandığından tutarsız sonuçlar vermektedir (Boonham vd., 2002; Schubert vd., 2007).

PVY'nin bilinen ırklarının tespitinde yaygın olarak kullanılan yöntem (Lorenzen vd., 2006) tarafından geliştirilen, ırkların genom farklılıklarına göre tasarlanmış sekiz primer ile RNA örneklerinin multiplex PCR uygulamasıdır. Bu test ile PVY'nin N, NA-N, NTN, N:O/N-W-A, N:O/N-W-B ile O ırkları tespit edilebilmektedir.

Daha sonraları (Chikh Ali vd., 2010) tarafından (Lorenzen vd., 2006) metodu geliştirilmiş ve bilinen daha fazla ırkı tanıyabilen multipleks PCR yöntemi bildirilmiştir. Bu yöntemde (Lorenzen vd., 2006)'da bildirilen dört primer, (Schubert vd., 2007) ve (Chikh Ali vd., 2010) de bildirilen birer primer ile yeni tasarlanan altı primer kullanılarak, toplam 12 farklı primer ile RNA örneklerine multipleks PCR sistemi uygulanmıştır. Bu sistemde, PVY'nin O, N, NA-N, NE-11, E, N:O, N-Wi, NTN(A), NTN(B), NTN-NWi, SYR-III ırkları belirlenebilmektedir. Daha sonraları sistemin başarısını arttırmak için RNA ekstraksiyonu aşamasını elemine eden, immunocapture uygulanan bitki örnekleri ile multipleks PCR sistemi bildirilmiştir (Chikh Ali vd., 2013).

2.7 Patateste PVY Testlemesinde Karşılaşılan Sorunlar

Patateste meristem uç kültürü ile virüslerden temizlenmesi, virüsten ari bitkilerin çoğaltılması, *in vitro* koşullarda mikro yumru üretimi, uzun süreli muhafaza gibi alanlarda devamlı olarak kullanılmaktadır (Ahloowalia, 1994; Tovar, 1985). Sertifikalı tohumluk üretiminde doku kültürü uygulamaları önemli bir yeri vardır. *In vitro* koşullarda

yetiştirilen bitkiler ya da mikro yumruların toprağa dikilmesi ile mini yumru, mini yumruların toprağa dikilmesi ile de anaç kademede tohumluk üretimi olmaktadır (Ahloowalia, 1994). Bütün işlem adımlarında virüslerin duyarlı, güvenilir ve hassas bir şekilde teşhisinin yapılması gerekmektedir. Gerek *in vitro* koşullarda yetiştirilen bitkiciklerde gerekse mikro yumrulardaki virüsler hem ELISA hem de klasik PCR ile duyarlı ve güvenilir bir şekilde belirlenebilmektedir. Ancak tohumluk yumrularda çok düşük virüs konsantrasyon olduğunda gözden kaçmalar olabilmektedir.

Hastalıklardan arı temiz üretim materyalinin kullanılamaması, gelişmekte olan ülkelerde patates üretimini artırmada en önemli engellerden birisi olmaktadır. Diğer yönden tohumluk patates üretimi yavaş ve uzun bir süreçtir ve bu işlemler aşamasında enfeksiyon kaynağı mevcut olduğu taktirde hastalık oranları artış göstermektedir (Uyen ve Zaag, 1983). Bu sebepten, virüs hastalıklarının hasat sonrası yayılmasını engellenmesinin bir diğer yolu da dikimden önce tohumluklardaki virüslerin düşük konsantrasyonunda bile güvenilir bir şekilde tespit edilmesi büyük önem taşımaktadır ve bu sertifikalı tohumluk üretiminin bir parçasıdır (Loebenstein vd., 1997; Singh vd., 1999; Souza-Dias vd., 1999b; Spiegel ve Martin, 1993). Yapılan çalışmalarda ELISA yönteminin yeşil yaprak örneklerinde, sürgün vermiş yumrularda, *in vitro* koşullarda yetiştirilmiş bitkicikler ile mikro yumrularda virüsleri belirlemede RT-PCR kadar etkin olmasına karşın dormant yumrularda güvenilir olmadığı tespit edilmiştir. Bu yöntem kullanılacaksa mutlaka yumruların sürgünden alınması gerektiği (Barker, 1987; Hill ve Jackson, 1984; Loebenstein vd., 1997; Russo vd., 1999; Spiegel ve Martin, 1993); bununla birlikte de iş gücüne dolayısıyla da maliyetinin arttıracağı belirtilmiştir (Schoen vd., 1996). Diğer bir yönden de RT-PCR tekniği ile dormant yumrularda virüslerin belirlenebildiği ve dormansilerin kırılmasına gerek duyulmadığı belirlenmiştir (Singh ve Singh, 1997; Singh vd., 1996). Nitekim (Singh vd., 1999) tarafından tarladan hasat edilen 8 farklı patates çeşidine ait dormant patates yumrularında PVY'nin yaygın bir ırkı olan PVY⁰'ın belirlenmesinde RT-PCR ile ELISA yöntemi karşılaştırmışlardır. Bu karşılaştırma sonucunda, yapraklarda virüsün bu ırkının belirlenmesinde ELISA'nın RT-PCR tekniği kadar duyarlı olduğu ancak dormant yumrularda ELISA'nın güvenilir sonuca ulaşamadığı belirlenmiştir. Bunun sonucunda yeşil aksamdan yapılacak testlerde ELISA'nın; afitlerde, dormant yumrularda ve örnek sayısının az olduğu ve duyarlılık gerektiren dokularda virüs teşhisinde PCR'ın tercihi daha uygun olmaktadır. Bununla beraber bu yöntemin başarısı virüs yoğunluğu, inhibitör maddelerin etkileri, nükleik asit

ekstraksiyon yöntemi, primer düzenlenmesi ve genom diziliminin belirlenmesi gibi faktörlere bağlıdır (Henson ve French, 1993).

Enfekteli bitkilerde virüslerin yoğunlukları bitki türüne, çeşidine, bitki aksamına, örneklerin alındığı zamana, enfeksiyon zamanına, virüse ve virüs ırkına bağlı olarak farklılık göstermektedir. (Singh vd., 1996) tarafından yapılan, farklı patates çeşitlerinin sürgün, göz ve yumrularında PVY⁰'ın konsantrasyonları arasında farkın bulunup bulunmadığını belirlemek için yaptıkları çalışmada çeşitlere ait yumrularda virüs yoğunlukları arasında 128 kat farklılığın olduğunu sonucuna varmışlardır. Dormant patates yumrularında depolama süresinin virüslerin RT-PCR ile belirlenmesi üzerine etkisini incelemiştir. PVY'nin RT-PCR ile belirlenmesinde 2-3 haftalık depolamalarda farklılığın olmadığını, 20 haftalık depolamalardan sonra ise duyarlılığın azaldığını saptamışlardır (Barker vd., 1993).

BÖLÜM III

MATERYAL METOD

3.1 Potato Virus Y İzolatlarının Temini

Potato virus Y (PVY) izolatlarının temini amacıyla, Niğde ilinde patates yetiştiriciliğinin en yüksek olduğu Ovacık, Konaklı, Edikli, Orhanlı ve Alay ilçelerinde 2015 yılı üretim döneminde arazi çıkışları düzenlenmiş ve virüs semptomları gözlenen patates bitkilerinden örnekler toplanmıştır. Virüs semptomları olarak bitkinin yapraklarında sarı / açık yeşil / koyu yeşil mozaik oluşumlar, noktalardan oluşmuş çizgiler, bozulmalar, damarlar veya sürgünler üzerinde sık sık çizgili desenler halinde nekrozlar, kloroz, bodur büyüme, büyüme noktalarının ölmesi, yumrularda nekrozlar gibi semptomlar aranmıştır. Toplanan örnekler sıvı azot ile ezilerek toz haline getirildikten sonra analizler yapılincaya kadar -80°C’de muhafaza edilmiştir.

PVY enfekteli patates örneklerini belirlemek amacıyla poliklonal PVY ELISA kit (Potato virus Y-monoclonal cocktail - Bioreba, İsviçre ile örnekler Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) testine tabi tutulmuştur.

Test firmanın önerilerine göre aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

- a. Kaplama: ELISA plakasına (NUNC F-96 Maxisorb microtiter plate) spesifik antibadi absorbe edilmiştir. Bu amaçla IgG 1:1000 oranında kaplama tamponu (50 mM carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6, %0.02 NaN₃) ile sulandırılmış ve 100 µl her plaka kuyusuna eklenmiştir. Plakalar nem çemberinde 30°C’de 4 saat süreyle inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu işlemten sonra plakalar plaka yıkama makinasında (Biotek ELx50) yıkama tamponu (10 mM phosphate buffer, pH: 7.4, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, %0.05 tween 20) ile üç kez yıkanmıştır.
- b. Antijen: Bitki ekstraktları plakalara eklenmiştir. Bu amaçla, test edilecek patates örnekleri 1:20 oranında ezme tamponu ile ezme poşetlerine yerleştirilmiş ve bilyalı ezme robotunda dokular ezilmiştir. Ezilen dokular ezme poşetinin filtresinden süzülerek iki tekerrürlü olacak şekilde her kuyuya 100 µl bitki ekstraktı eklenmiştir. Plakalar nem çemberinde 4-6°C’de tüm gece inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu

işlemden sonra plakalar plaka yıkama makinasında yıkama tamponu ile beş kez yıkanmıştır.

- c. Konjugat: Enzimle işaretlenmiş antibadi ile inkübasyon. Bu amaçla, konjugat IgG 1:1000 oranında konjugat tamponunda (20 mM Tris Buffer, pH: 7.4, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM MgCl₂, %2 PVP 24 kD, 0.05 tween 20, %0.2 BSA, %0.02 NaN₃) sulandırılmış her kuyuya 100 µl eklenmiştir. Plakalar nem çemberinde 30°C’de 5 saat süreyle inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu işlemden sonra plakalar plaka yıkama makinasında yıkama tamponu ile üç kez yıkanmıştır.
- d. Substrat: Renk reaksiyonu enfekteli örneği gösterir. Bu amaçla, pNPP (para-nitrophenyl-phosphate) substrat tamponunda 1 mg/ml olacak şekilde kullanımdan hemen önce çözülmüş ve her kuyuya 100 µl eklenmiştir. Plakalar nem çemberinde oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyona tabi tutulmuştur. Renk reaksiyonu gelişimi her 30 dakikada kontrol edilmiş ve yaklaşık iki saat sonra ELISA plakası okuyucusunda (Biotek ELx800) plakalardaki kuyuların 405 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Negatif kontrolde belirlenen absorbans değerlerinin iki katı değer ve üstünü veren örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2 PVY İzolatlarının Irklarının Belirlenmesi (IC-RT-Multipleks PCR)

PVY ırklarının belirlenmesi amacıyla Immunocapture-Reverse transcription-multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (IC-RT-multipleks PCR) yöntemi Chikh-Ali vd. (2010, 2013)’e göre kullanılmıştır (Chikh Ali vd., 2013; Chikh Ali vd., 2010).

3.2.1 Immunocapture (IC)

Tespit edilen PVY izolatlarının ırkları belirlenmek üzere IC-RT-multipleks PCR yöntemi ile analizler yapılmıştır (Chikh Ali vd., 2013). Bu amaçla, 100 µl PVY IgG (Bioreba) ile kaplanan PCR tüplerine (4 saat 37°C inkubasyon ve ELISA yıkama tampon ile 3 kez yıkama) 100 µl PVY enfekteli bitki ekstraktları (ELISA ekstraksiyon tampon ile ezilmiş) eklenmiş ve tüm gece +4°C’de inkübe edilmiştir. ELISA yıkama tampon ile beş kez, %1 TritonX-100 ile bir kez yıkanan tüplerde immünolojik olarak yakalanan (IC) PVY partikülleri RT ve PCR aşamalarında kullanılmıştır.

3.2.2 Reverse transcription (RT)

IC uygulanan tüplerdeki tutunabilen PVY vironlarındaki RNA'nın komplementer DNA (cDNA)'ya çevrilmesi için reverse transcription işlemi gerçekleştirilmiştir (Chikh Ali vd., 2013). Bu amaçla, MMLVreverse transcriptase enzimi, dNTPs, RNase inhibitör, oligo dT ve random hexamer, primerlerini içeren reverse transcription karışımı hazırlanmış (Çizelge 3.1) ve her bir tüpe eklenmiştir. cDNA sentezi için reaksiyon 25°C ile başlatılmış, işlem her 1 dakikada 1°C artışla 42°C'ye kadar yükseltilmiş, 42°C'de 45 dakika tutulmuş ve daha sonra 60°C'ye her 2 dakikada 1°C arttırılmıştır. Son aşamada enzim 70°'de 10 dakika tutularak in-aktive edilmiştir.

Çizelge 3.1. cDNA elde etmede kullanılan karışım

Malzemeler	1 reaksiyon karışımı
RNase ari su (d ₂ H ₂ O)	11,5 µl
Random Hexamer	1,0 µl
dNTPs(10 mM)	1,0 µl
Oligo dT ₁₈	1,0 µl
65 °C	5 dakika bekle
Buz	5 dakika bekle
5X RTBuffer	4 µl
RNase inhibitör	0,5 µl
Reverse Transcriptase	1µl
Toplam	20µl

3.2.3 Çoklu polimeraz zincir reaksiyonu (Multipleks PCR)

Multipleks PCR işlemi için, PVY ırklarının rekombinasyon bağlantılarının konumlarına göre tasarlanmış 12 primer kullanılmıştır (Chikh Ali vd., 2010) (Şekil 1.1) (Çizelge 3.2). PCR karışımın hacim 20 µl olacak şekilde cDNA (3 µl), 2 µl 10xreaksiyon buffer, 0,5 µl dNTP'ler (10 mM), 0,5 µl 10 adet primer (S5585m ve o6400 1 µl) (10 µM), 0,2 µl Dream Taq DNA polimeraz içermiştir (Çizelge 3.3). Amplifikasyon koşulları 30 döngü 94°C'de 30 saniye denatürasyon, primer annealing 30 saniye ve primer extention 72°C'de 90 saniye, son extention 72°C'de 10 dakikadır. Annealing sıcaklıkları ilk 10 döngüde 64°C, ikinci 10 döngüde 62°C, üçüncü 10 döngüde 60°C olarak uygulanmıştır. PCR ürünlerinin %2 Jel elektroforezi yapılmıştır. PVY ırklarının belirlenmesi ırklara spesifik fragment oluşumlarının değerlendirilmesi ile yapılmıştır (Chikh Ali vd., 2013; Chikh Ali vd., 2010).

Çizelge 3.2. IC-RT-Multipleks PCR analizinde kullanılan primerler ve dizileri (Chikh Ali vd., 2010)

Primer Adı	Özelliği	Primer Dizisi (5'–3')	Bölge	Literatür	Teshis Edilen Irk
n156	forward	GGGCAAACTCTCTCGTAAATTGCAG	160–179 ^a	Chikh-Ali vd., 2010	PVY ^N ve PVY ^{NTN}
o514	forward	GATCCTCCATCAAAAGTCTGAGC	515–536 ^b	Chikh-Ali vd., 2010	PVY ^O ve PVY ^{NW}
n787	reverse	GTCCACTCTCTTTTCGTAAACCTC	770–792 ^a	Chikh-Ali vd., 2010	PVY ^N ve PVY ^{NTN}
n2258	forward	GTCGATCACGAAACGCAGACAT	2260–2281 ^a	Lorenzen vd., 2006	PVY ^N ve PVY ^{NTN}
o2172	forward	CAACTATGATGGATTGGCGACC	2169–2191 ^b	Lorenzen vd., 2006	PVY ^O ve PVY ^{NW}
n2650c	reverse	TGATCCACAACCTTACCGCTAACT	2627–2650 ^a	Lorenzen vd., 2006	PVY ^N ve PVY ^{NTN}
o2700	reverse	CGTAGGGCTAAAGCTGATAGTAG	2678–2700 ^b	Chikh-Ali vd., 2010	PVY ^O ve PVY ^{NW}
S5585m	forward	GGATCTCAAGTTGAAGGGGAC	5578–5598 ^b	Lorenzen vd., 2006	PVY ^O ve PVY ^{NW}
o6400	reverse	GTAACTCCTAAACAAATGGTGGTTCCG	6405–6430 ^b	Chikh-Ali vd., 2010	PVY ^O ve PVY ^{NW}
n7577	forward	ACTGCTGCACCTTTAGATACTCTA	7582–7605 ^a	Chikh-Ali vd., 2010	PVY ^N , PVY ^{NTN} , NA-PVY ^N
YO3-8648	reverse	CTTTTCCTTTGTTCGGGTTTGAC	8635–8657 ^b	Schubert vd., 2007	PVY ^O ve PVY ^{NW}
SeroN	reverse	GTTTCTCCTATGTCGTATGCAAGTT	8864–8888 ^a	Chikh-Ali vd., 2008	PVY ^N , PVY ^{NTN} , NA-PVY ^N

a. N-605 izolatına göre numaralandırılmıştır (Genbank Kayıt no: X97895)

b. PVY^O izolatına göre numaralandırılmıştır (Genbank Kayıt no: U09509)

Çizelge 3.3. Multipleks PCR reaksiyon karışımı

Malzemeler	1 reaksiyon karışımı
RNase ari su (d ₂ H ₂ O)	7,3 µl
10 X ReaksiyonBuffer	2 µl
dNTPs (10 mM)	0,5µl
Primerler (10 µM)	0,5 µl (Çizelge 3.3, 10 adet) 1 µl (Çizelge 3.3, S5585 ve O6400)
Taq DNA polimeraz	0,2 µl
cDNA	3 µl
Toplam	20 µl

3.3 DAS-ELISA, IC-RT-PCR ve SYBR-Green Real-Time PCR'nin PVY Teşhisi Bakımından Karşılaştırılması

Bu çalışmada bitki materyali olarak ticari olarak satılan Nectar ve Desire patates çeşitlerinin ellişer adet yumruları kullanılmıştır. PVY testleri yumrular ve aynı yumrudan gelişen sürgünlerde yapılmıştır. DAS-ELISA, IC-RT-PCR ve SYBR-Green real time PCR yöntemleri tüm örneklerle ayrı ayrı uygulanmıştır. Yumru örnekleri için patates yumrusunun üzerindeki üç göz alınmış, sürgün örnekleri ise aynı yumrudan gelişen 2-3 sürgünden yapraklar alınarak elde edilmiştir. Örneklemeden hemen sonra testler gerçekleştirilmiştir. Bitki dokuları ELISA poşetlerinde ELISA tamponu ile 1:10 oranında ezilmiş, bu ekstraktlar kullanılarak DAS-ELISA, IC-RT-PCR ve SYBR-Green real time PCR gerçekleştirilmiştir.

3.3.1 DAS-ELISA

Birinci bölümde anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

3.3.2 IC-RT-PCR testi

PCR için aynı ekstraktlar kullanılarak 2.1 ve 2.2 bölümlerinde anlatıldığı gibi IC ve RT işlemleri yapılmıştır. Elde edilen cDNA PVY-F 5'-ACG TCC AAA ATG AGA ATG CC-3' ve PVY-R 5'-TGG TGT TCG TGA TGT GAC CT-3' (Nie ve Singh, 2002) primerleri kullanılarak PCR işlemine tabi tutulmuştur. PCR karışımı 2 µl 10X PCR buffer (Invitrogen), 1 µl MgCl₂ (50 mM), 1 µl dNTP'ler (herbiri 10 mM), 1 µl primerler (PVY

F/R, 10 mM), 0,125 µl Taq DNA polimeraz (Invitrogen) içermiştir (Çizelge 3.4).Amplifikasyon koşulları 94 °C’de 10 dak. ön denatürasyon, 35 döngü 94 °C’de 30 san, 55°C’de 30 san. ve 72 °C’de 45 saniye, son adımda 72°C’de 10 dak. uygulanmıştır. PCR ürünleri %1,5 agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulmuş ve ethidium bromide ile boyandıktan sonra UV transilluminatörde incelenmiştir.

Çizelge 3.4. IC-RT-PCR reaksiyon karışımı

Malzemeler	1 reaksiyon karışımı
RNase ari su (d ₂ H ₂ O)	11,875 µl
10x ReaksiyonBuffer	2 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl
dNTPs(10 mM)	1 µl
PVY F (10 µM)	1 µl
PVY R (10 µM)	1 µl
Taq DNA polimeraz	0,125
cDNA	2 µl
Toplam	20 µl

3.3.3 IC-RT-Real-time PCR testi

Yumru ve sürgünlerin real time PCR testi Sybr-Green (SYBR) Real Time PCR metodu ile yapılmıştır. İkinci bölümde anlatıldığı şekilde hazırlanan cDNA’lar kullanılarak real time PCR karışımı hazırlanmıştır. SYBR-Green Real-time PCR, 20 µl son konsantrasyonunda hazırlanmış olup, 10 µl 2XFastStart SYBR Green Master mix (Roche), 0,3 µl 10 mM PVY-F ve 0,3 µl 10 mM PVY-R primerlerini içermiştir. (Çizelge 3.5). Amplifikasyon Rotor-Gene real time PCR cihazında, 95°C’de 10 dak., 40 döngü 95°C’de 20 saniye, 55°C’de 20 saniye ve 72 °C’de 30 saniye olarak yapılmış, son aşamadan sonra 60-90°C arasında her 4 saniyede bir 5 derece artış ile melting analizi uygulanmıştır. Aynı örnekten her üç yöntemle de elde edilen pozitif ve negatif olma durumları karşılaştırılmıştır.

Çizelge 3.5. IC-RT-real time PCR reaksiyon karışımı

Malzemeler	1 reaksiyon karışımı
RNase ari su (dH ₂ O)	5,6 µl
2XFastStart SYBR Green Master mix	10 µl
PVY F (10 µM)	1,2 µl
PVY R (10 µM)	1,2 µl
cDNA	2 µl
Toplam	20 µl

3.4 Bitki Materyalinde PVY Miktarını Belirlemek Üzere IC-RT-Kantitatif Real-Time PCR Sistemi

Bu çalışmada, 4. Bölümde anlatıldığı gibi, bitki materyali olarak ticari olarak satılan Nectar ve Desire patates çeşitlerinin ellişer adet yumruları ve aynı yumrudan gelişen sürgünleri kullanılmış, IC ve RT işleminden sonra SYBR-Green real time PCR ile virüs miktarları belirlenmiştir.

Ölçümde standart olarak kullanılacak plasmidlerin hazırlanması için pozitif bir patates bitkisinde PVY F/R primerleri ile IC-RT-PCR gerçekleştirilmiştir. PCR ürünü daha sonra pGEM -T Easy Vektör Sistemi (Promega) kullanılarak plasmidde klonlanmıştır. Klonlama, vektör sisteminin alındığı firmanın önerdiği yöntemle göre yapılmıştır. Bu amaçla, 480 bp PVY CP bölgesi, bir noktadan açık plasmide ligasyon ile birleştirilmiş, daha sonra transformasyon ile JM109 *Echerichia coli* bakterisine aktarılmıştır. Ampicillin içeren sıvı LB (5,0 g/l Yeast extract, 10 g/l Peptone, 10 g/l NaCl, agar) ortamında 2 saat kültür işleminden sonra, 100 µl sıvı bakteri, Ampicillin, IPTG ve X-Gal içeren katı LB ortamına yayılmıştır. Tüm gece 37 °C’de inkübasyondan sonra gelişen mavi ve beyaz kolonilerden beyaz olanlara PVY F/R primerleri ile koloni PCR yapılmıştır. Koloni PCR sonucunda beklenen seviyede ürün veren kolonilerden plasmid GeneJET plasmid Miniprep Kit (ThermoScience) ile saflaştırılarak virüs sayımlarında standart olarak kullanılmıştır.

Ölçümde kullanılacak standart plasmid konsantrasyonu 10 ng/µl olacak şekilde spektrofotometrede ölçülerek ayarlanmış, bunun 10 kat sulandırma serileri yapılarak

100.000, 10.000, 1000, 100, 10 pg/ μ l konsantrasyonlarına ayarlandıktan sonra standart hazırlanarak kantitasyonda kullanılmıştır.

Örneklerde virüs miktarı ölçümü için, standart en az iki tekerrürlü olacak şekilde cDNA örnekleri ile birlikte real-time PCR için hazırlanmıştır. SYBR-Green Real-time PCR, 20 μ l son konsantrasyonunda hazırlanmış olup, 10 μ l 2XFastStart SYBR-Green Master mix (Roche), 0,3 μ l PVY-F (10 mM) ve 0,3 μ l PVY-R (10 mM) primerlerini içermiştir. Amplifikasyon Rotor-Gene real time PCR cihazında, 95°C'de 10 dak., 40 döngü 95°C'de 20 saniye, 55°C'de 20 saniye ve 72 °C'de 30 saniye olarak yapılmış, son aşamadan sonra 60-90°C arasında her 4 saniyede bir 5 derece artış ile melting analizi uygulanmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra standart eğri oluşturulmuş ve buna göre konsantrasyonlar pg/ μ l olarak belirlenmiştir. Standart plasmid konsantrasyonlarına göre örneklerdeki virüs miktarı Rotor Gene real time PCR yazılımı (Qiagen) ile gerçekleştirilmiştir.

BÖLÜM IV

BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 PVY İzolatlarının Temin Edilmesi

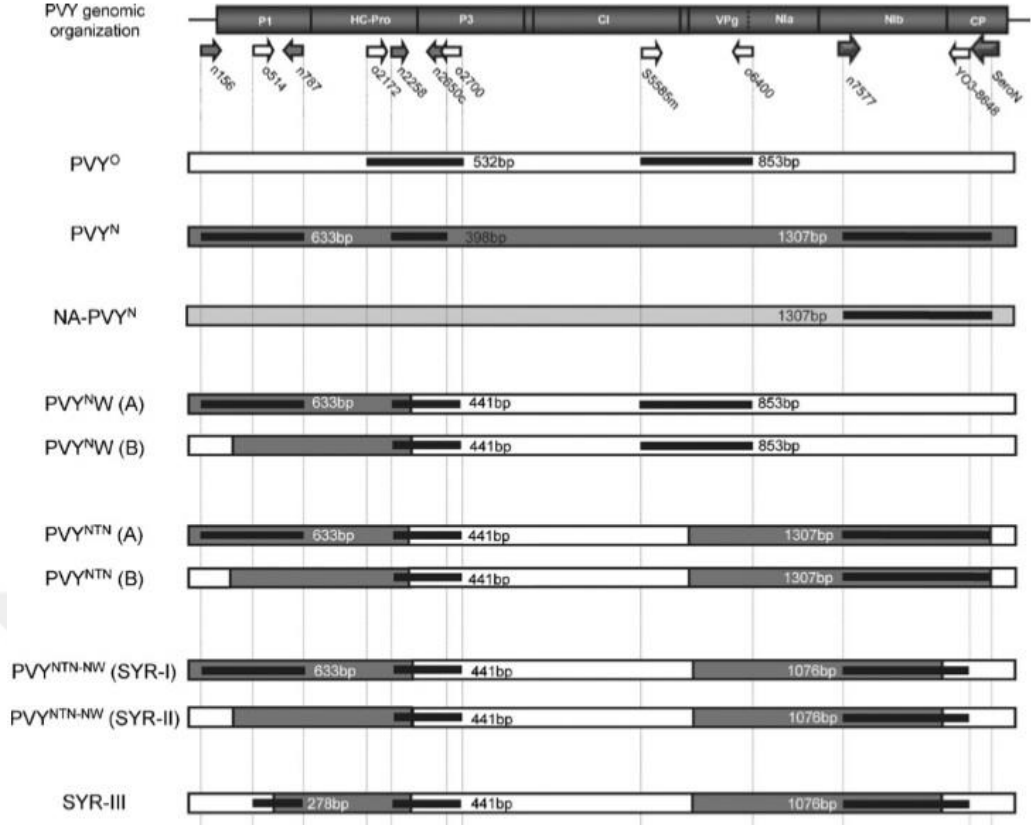
Niğde ili patates yetiştiriciliğinin yüksek olduğu Ovacık, Konaklı, Edikli, Orhanlı ve Alay'dan toplam 138 semptomatik patates örneği temin edilmiş, DAS-ELISA testi sonucunda bunların 62 adedi PVY ile enfekteli olarak tespit edilmiştir (Şekil 9). Belirlenen PVY izolatları IC-RT-multipleks PCR çalışmalarında ırk belirlemek amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 4.1. DAS-ELISA testi sonucu PVY enfekteli olduğu tespit edilen patates örneği ve yapraklarda damar açılması, mozaik semptomları

4.2 IC-RT-Multipleks PCR ile PVY İrklarının Belirlenmesi

En yaygın PVY ırkları içerisinde olan PVY^O, PVY^N ve PVY^C ırklarından PVY^O ve PVY^N ırkları arasındaki rekombinasyonlar sonucu PVY^{NTN} ve PVY^{NW_i} rekombinant ırklar oluşmuştur. Bu rekombinasyonların oluşumunda dört adet rekombinasyon noktası söz konusudur (Şekil 4.2). PVY ırklarını tespit etmek için bu rekombinasyon noktalarına göre primerler tasarlanmış ve belli uzunlukta ve sayıda fragment oluşumuna göre PVY ırk tiplmesi gerçekleştirilmektedir (Chikh Ali vd., 2013; Chikh Ali vd., 2010) (Çizelge 4.1).

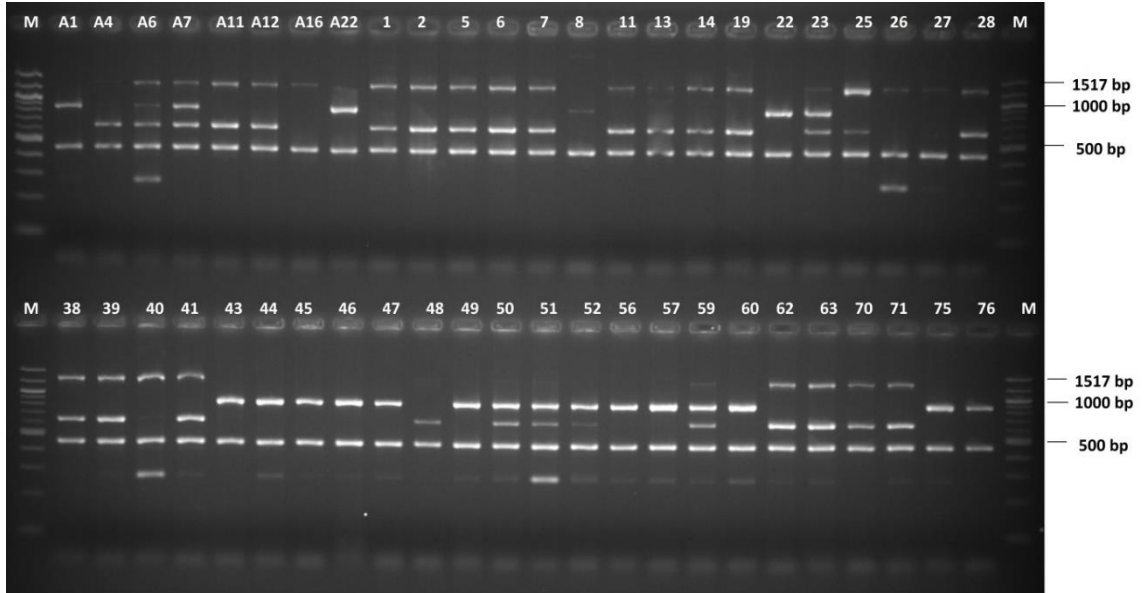


Şekil 4.2. PVY ırklarının genomik yapıları ve ırk tespitinde kullanılan primerlerin genom üzerindeki yerleri (Chikh Ali vd., 2010)

Çizelge 4.1. Patatesde *Potato virus Y* (PVY) izolatlarının ırklarının multipleks PCR ile belirlenmesinde ırklara göre oluşması beklenen fragmentler (Chikh-Ali vd., 2010, 2013'den uyarlanmıştır)

Fragment büyüklüğü	PVY ^O	PVY ^N	PVY ^{NA-N}	PVY-NE11	PVY ^E	PVY ^{Nwi} (A)	PVY ^{N-wi} (B)	PVY ^{NTN} (A)	PVY ^{NTN} (B)	PVY ^{NTN-NW} (SYR I)	PVY ^{NTN-NW} (SYR II)	SYR III
1307 bp												
1076 bp												
853 bp												
633 bp												
532 bp												
441 bp												
398 bp												
278 bp												

Elde edilen toplam 60 PVY izolatının yapılan IC-RT-multipleks PCR analizi sonucunda 58 izolatın ırk tiplmesi yapılmış dört adedi yeterli amplifikasyon sağlanamadığı için tipleme yapılamamıştır (Şekil 4.3). Bu izolatlar içerisinde 17 adet PVY^{NW} (B), 7 adet PVY^{NW} (B), 1 adet PVY^{NTN} (B) ırkları tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Ayrıca, 2 adet PVY^{NTN}+PVY^{NW} karışık ırk enfeksiyonu belirlenmiştir. İzolatların büyük bir çoğunluğunda (30 adet) 278 bp seviyesinde ampliconlar elde edilmiştir. Bu ampliconlar Chikh-Ali vd., (2010)'da, 441 ve 1076 bp ampliconlarla birlikte Syr-III ırkında bulunmaktadır. Ancak, bu çalışmada araştırılan izolatlarda Syr III ırkında bulunan 1076 bp fragment hiçbir izolatta görülmemiştir. Ortaya çıkan profiller 278 bp ampliconu dışında değerlendirildiğinde 10 adet PVY^{NTN} (A)* (*278 bp ampliconu temsil etmektedir), 9 adet PVY^{NW} (B)*, 2 adet PVY^{NW} (A)*, 2 adet PVY^{NTN} (B)*, 1 adet PVY^{E*} ve 7 adet PVY^{NTN}+PVY^{NW*} karışık enfeksiyonudur. Niğde ilinden elde edilen PVY izolatlarında en yaygın ırk %29,31 oranla PVY^{NTN} (A) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Bunu %17,24 oranıyla PVY^{NTN} (A)*, %15,52 PVY^{NW} (B)*, %12,07 oranıyla PVY^{NW} (B), %3,45 oranıyla PVY^{NTN} (B)* ve PVY^{NW} (A)*, %1,72 oranıyla PVY^{NTN} (B) ve PVY^{E*} ırkları olmuştur. Tüm PVY izolatlarında görülebilen tek karışık enfeksiyon olan PVY^{NTN}+PVY^{NW} %3,45 oranında olmuş PVY^{NTN}+PVY^{NW*} ise %12,07 oranında bulunmuştur.



Şekil 4.3. IC-RT-multipleks PCR yöntemi ile patates *Potato virus Y* izolatlarının ırklarının belirlenmesi, M DNA ladder (NEB 100 bp DNA ladder)

Çizelge 4.2. IC-RT-multipleks PCR yöntemi ile patates *Potato virus Y* (PVY) izolatlarının belirlenen ırkları

İzolat adı	Toplam izolat sayısı	Multipleks PCR ürün büyüklükleri (bp)	Multipleks PCR ırk tipi	% oran
A1, A22, 8, 22, 43, 76, 91	7	853+441	PVY ^{NW} (B)	12,07
A4, A11, A12, 1, 2, 5, 6, 7, 11, 13, 14, 19, 25, 28, 38, 39, 70	17	1307+633+441	PVY ^{NTN} (A)	29,31
A16	1	1307+441	PVY ^{NTN} (B)	1,72
A7, 23	2	1307+853+633+441	PVY ^{NTN} +PVY ^{NW}	3,45
A6, 50, 51, 59, 84, 88, 92	7	1307+853+633+441+278	PVY ^{NTN} +PVY ^{NW*}	12,07
26, 27	2	1307+441+278	PVY ^{NTN} (B)*	3,45
40, 41, 62, 63, 71, 83, 87, 90, 103, 105	10	1307+633+441+278	PVY ^{NTN} (A)*	17,24
44, 45, 46, 47, 49, 56, 57, 60, 75	9	853+441+278	PVY ^{NW} (B)*	15,52
52, 100	2	853+633+441+278	PVY ^{NW} (A)*	3,45
48	1	633+441+278	PVY ^{E*}	1,72

4.3 PVY Teşhisinde DAS-ELISA, IC-RT-PCR ve IC-RT-Real Time PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Üç farklı yöntemin karşılaştırılması için ticari olarak satılan Desire ve Nectar tohumluk yumruların testleri bu yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Her üç analiz yöntemi aynı yumrularda yapılmıştır.

4.3.1 Yumru ve sürgün analizlerinin karşılaştırılması

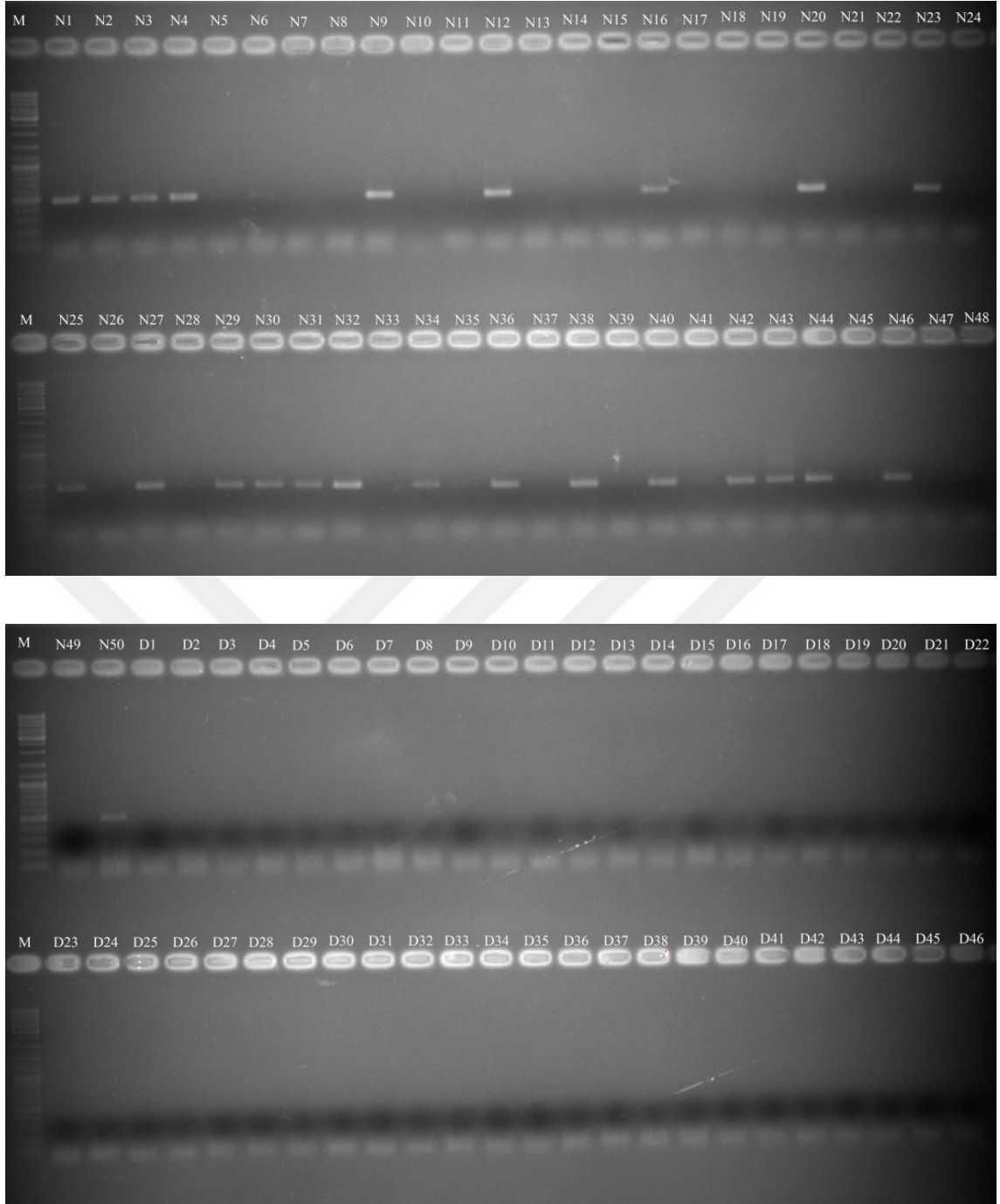
DAS-ELISA analizi sonucunda Desire çeşidinde yumrularda PVY enfeksiyonu tespit edilemezden aynı yumrulardan gelişen sürgünlerde 1 adet PVY enfeksiyonu belirlenmiştir (Çizelge 4.4).Nectar çeşidinde ise, yumrularda 1 PVY enfeksiyonu tespit edilirken sürgünlerde 23 adet gibi yüksek oranda PVY enfeksiyonu tespit edilmiştir. Bu durum, tohumluk yumru testlerinde DAS-ELISA yöntemi ile yumruların doğrudan testinin uygun olmaması ve yumrularda sürgünlerin geliştirilmesi sebebinin açıklamaktadır. Yumrulardan elde edilen sürgünlerde analiz yapılması ile PVY enfeksiyonunun daha yüksek oranda tespit edilebilmesinin nedeni, gelişen sürgünlerde viral replikasyonun başlaması ve bu aktif gelişen sürgünlerde virüsün belirlenebilir konsantrasyona ulaşmasıdır.

Çizelge 4.3. Desire ve Nectar patates yumru ve sürgünlerinde *Potato virus Y*'nin DAS-ELISA testi 405 nm okuma sonuçları

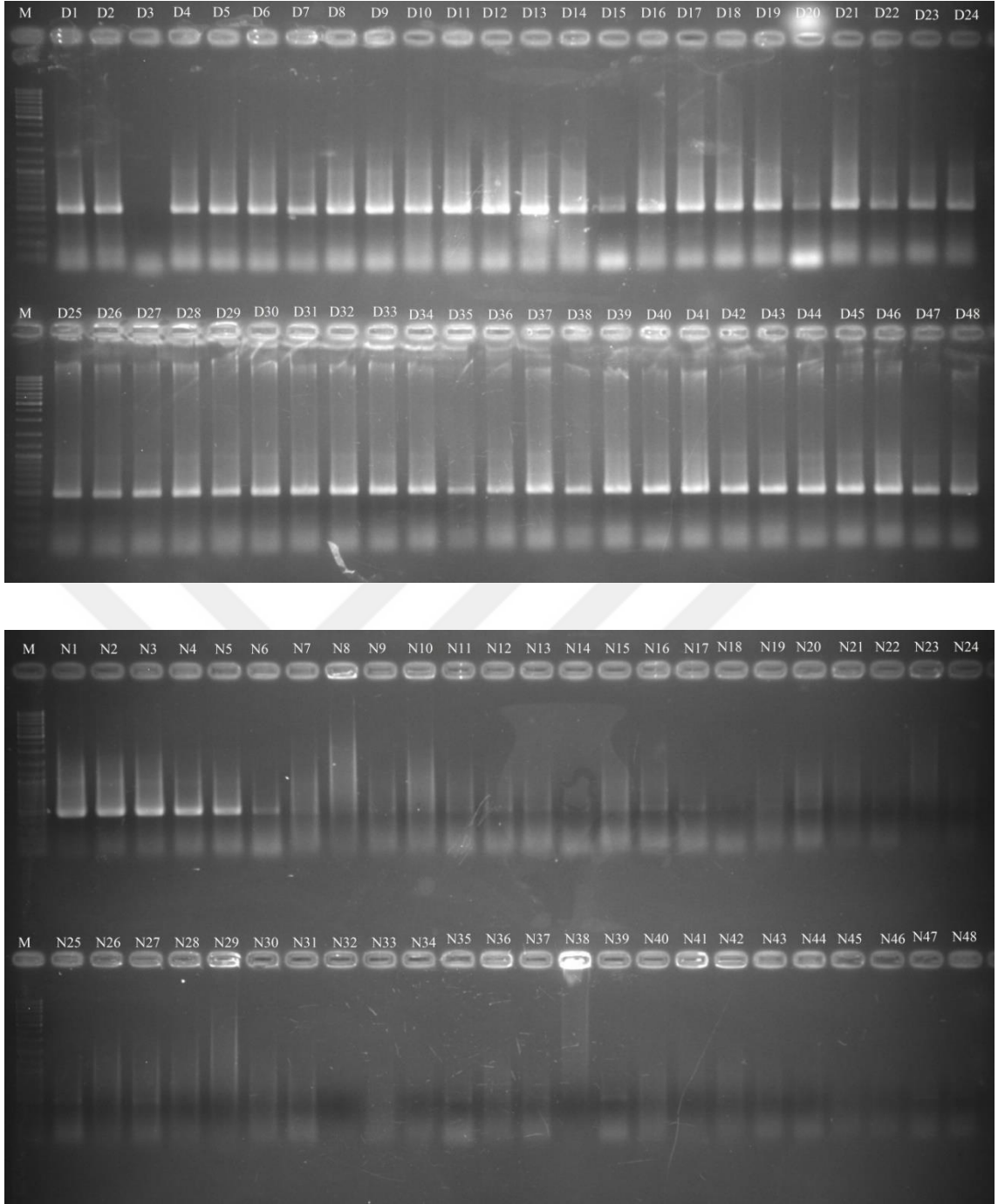
Örnek numarası	Desire		Nectar	
	Yumru 0,246>pozitif	Sürgün 0,238>pozitif	Yumru 0,244>pozitif	Sürgün 0,390>pozitif
Buffer kontrol	0,121	0,114	0,124	0,185
Negatif kontrol	0,123	0,119	0,122	0,195
Pozitif kontrol	1,517	1,356	1,257	1,608
1	0,125	0,203	0,191	0,388
2	0,120	0,212	0,127	0,608
3	0,123	0,197	0,140	0,475
4	0,129	0,236	0,128	0,571
5	0,126	0,206	0,124	0,181
6	0,121	0,200	0,206	0,472
7	0,124	0,210	0,123	0,201
8	0,127	0,183	0,122	0,205
9	0,123	0,198	0,122	0,674
10	0,119	0,210	0,124	0,768
11	0,121	0,201	0,121	0,203
12	0,129	0,183	0,126	0,525
13	0,124	0,209	0,124	0,183
14	0,126	0,218	0,124	0,186
15	0,123	0,213	0,120	0,191
16	0,124	0,187	0,121	0,417
17	0,125	0,201	0,134	0,171
18	0,121	0,199	0,126	0,187
19	0,123	0,199	0,118	0,194
20	0,126	0,185	0,433	0,485
21	0,128	0,198	0,125	0,179
22	0,126	0,212	0,123	0,184
23	0,120	0,209	0,124	0,508
24	0,126	0,189	0,123	0,194
25	0,125	0,230	0,128	0,477
26	0,135	0,240	0,125	0,193
27	0,129	0,230	0,120	0,533
28	0,125	0,208	0,129	0,194
29	0,125	0,198	0,123	0,445
30	0,124	0,207	0,134	0,465
31	0,124	0,202	0,124	0,355
32	0,126	0,199	0,124	0,442
33	0,130	0,198	0,126	0,539
34	0,123	0,202	0,132	0,331
35	0,124	0,206	0,121	0,197
36	0,125	0,185	0,125	0,392
37	0,130	0,195	0,129	0,176
38	0,133	0,213	0,137	0,299
39	0,140	0,212	0,126	0,203
40	0,132	0,197	0,131	0,424
41	0,145	0,112	0,130	0,168
42	0,152	0,126	0,124	0,614
43	0,167	0,131	0,128	0,699
44	0,209	0,133	0,126	0,507
45	0,134	0,119	0,123	0,172
46	0,146	0,114	0,133	0,683
47	0,150	0,124	0,125	0,217
48	0,155	0,121	0,127	0,212
49	0,182	0,124	0,126	0,195
50	0,138	0,113	0,125	0,259

IC-RT-PCR analizi sonucunda Desire çeşidinde yumrularda PVY enfeksiyonu 2 adet tespit edilirken, aynı yumrulardan gelişen sürgünlerde PVY enfeksiyonu tespit edilememiştir (Şekil 4.4, 4.5, 4.6, 4.7). Desire sürgün analizleri cDNA'dan tekrar edilmiş ancak bu analizde de negatif sonuçlar alınmıştır. IC-RT-PCR yapıldığından, dondurularak saklanan bitki ekstraktları ile çalışılması gerekeceğinden bu durumun yöntemler arasındaki optimizasyonu bozacağı düşünülmüş ve IC tekrar edilmemiştir. Bu tür taramalarda uygulanan analiz yöntemlerinde yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuç verme olasılıkları mevcuttur. Desire çeşidinde IC-RT-PCR yumru ve sürgün sonuçları kıyaslandığında şu sonuç ortaya çıkabilir: IC-RT-PCR 2 yumruda yanlış pozitif sonuç vermiş olabilir veya IC-RT-PCR 2 adet sürgünde yanlış negatif sonuç vermiş olabilir. Nectar çeşidinde ise, IC-RT-PCR ile yumrularda 12 PVY enfeksiyonu tespit edilirken sürgünlerde 30 adet gibi yüksek oranda PVY enfeksiyonu tespit edilmiştir. Nectar çeşidinde DAS-ELISA analizinde olduğu gibi sürgünlerde daha yüksek miktarda örnek PVY enfekteli olarak belirlenmiştir.

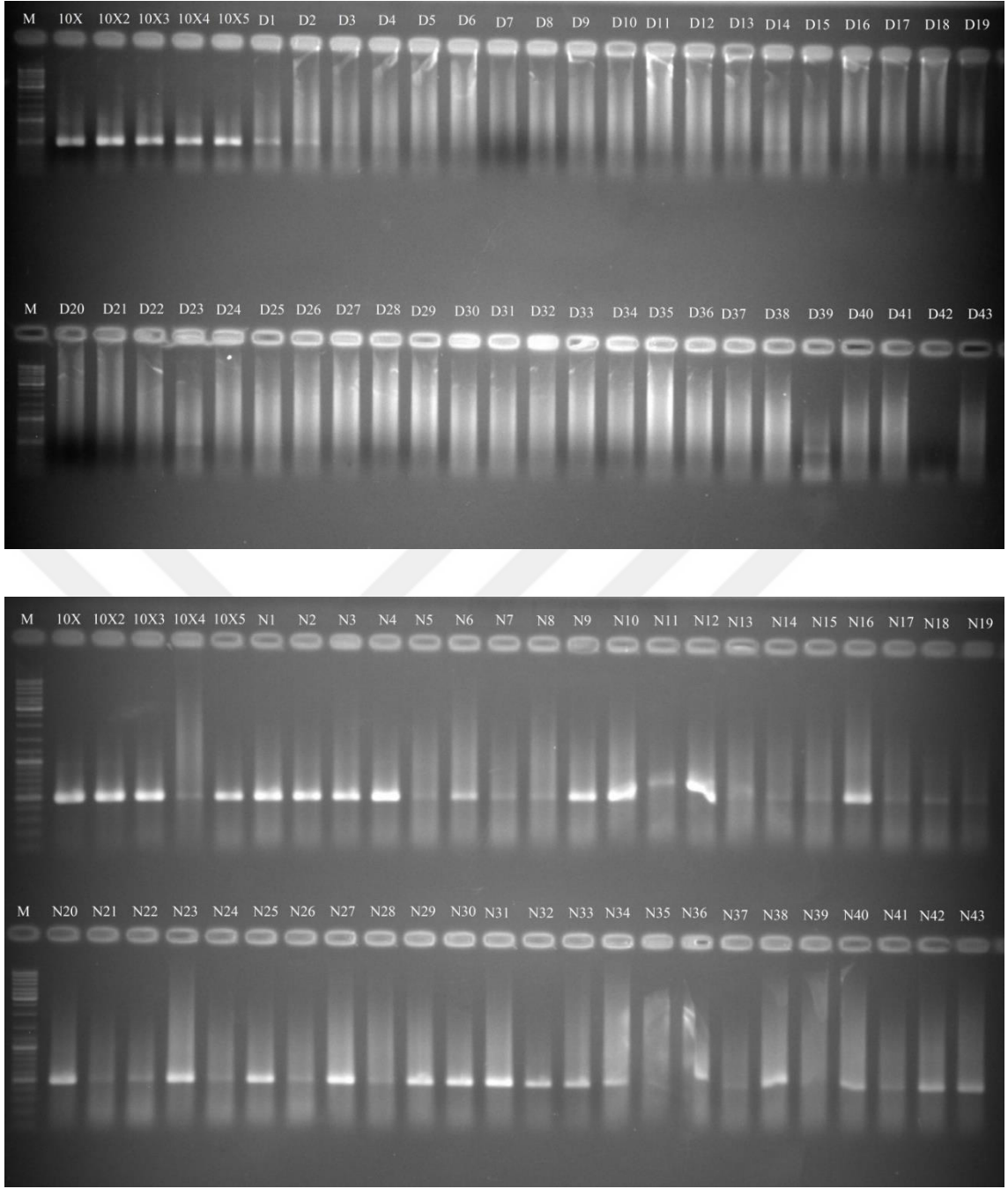
IC-RT-real time PCR analizi sonucunda araştırma konusu her iki çeşitten, Desire 3 nolu yumru dışında, tüm yumru ve sürgünlerinin tamamında PVY enfeksiyonu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, IC-RT-real time PCR yönteminde, tohumluk yumruların PVY enfeksiyonu bakımından analizlerinde kullanılan bitki materyalinin yumru ve ya sürgün olması sonuçları değiştirmemiştir.



Şekil 4.5. *Potato virus Y*'nin Desire (D) ve Nectar (N) sürgünlerinde IC-RT-PCR testi agaroz jeli



Şekil 4.6. *Potato virus Y* nin Desire (D) ve Nectar (N) yumrularında IC-RT-real time PCR testi agaroz jeli



Şekil 4.7. *Potato virus Y* nin Desire (D) ve Nectar (N) sürgünlerinde IC-RT-real time PCR testi agaroz jeli

Çizelge 4.4. Desire ve Nectar yumru ve sürgünlerinde DAS_ELISA, IC-RT-PCR ve IC-RT-real time PCR sonuçları

Örnek numarası	Desire						Nectar					
	Yumru			Sürgün			Yumru			Sürgün		
	DAS-ELISA	IC-RT-PCR	IC-RT-real time PCR	DAS-ELISA	IC-RT-PCR	IC-RT-real time PCR	DAS-ELISA	IC-RT-PCR	IC-RT-real time PCR	DAS-ELISA	IC-RT-PCR	IC-RT-real time PCR
1	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
2	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
3	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
4	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
5	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
6	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
7	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
8	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
9	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
12	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
13	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
14	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
15	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
16	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
17	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
18	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
19	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
20	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
21	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
22	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
23	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
24	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
25	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
26	-	-	+	+sin.	-	+	-	+	+	-	-	+
27	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
28	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
29	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
30	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
31	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
32	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
33	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
34	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
35	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
36	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
37	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
38	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
39	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
40	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
41	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
42	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
43	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
44	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
45	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
46	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
47	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
48	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
49	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
50	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
Toplam	0	2	49	1	0	50	1 (%2)	12 (%24)	50 (%100)	23 (%46)	30 (%60)	50 (%100)

*+PVY pozitif, - PVY negatif anlamındadır

4.3.2 Uygulanan test yöntemlerinin karşılaştırılması

DAS-ELISA analizi sonucunda Desire çeşidinde yumrulara PVY enfeksiyonu tespit edilemezden IC-RT-PCR yönteminde 2 yumru, IC-RT-real time PCR yönteminde 3 nolu yumru dışında tamamı (49 adet) PVY enfekteli olarak tespit edilmiştir. Aynı çeşidin sürgünlerinde DAS-ELISA ile 1 adet PVY enfeksiyonu tespit edilirken, IC-RT-PCR yöntemiyle PVY enfeksiyonu tespit edilememiş, IC-RT-real time PCR yönteminde yumruların tamamı (50 adet) PVY enfekteli olarak belirlenmiştir. IC-RT-real time PCR analizine göre tüm yumrular PVY ile enfekteli olduğuna göre, DAS-ELISA ve IC-RT-PCR karşılaştırıldığında, IC-RT-PCR yönteminde yumru analizlerinde 1 yanlış pozitif, sürgün analizlerinde 1 yanlış negatif sonuç alınmıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.5. Desire çeşidinde farklı yöntemlerin hatalı sonuç verme analizi (IC-RT-real time PCR yöntemine göre örnekler PVY enfektelidir)

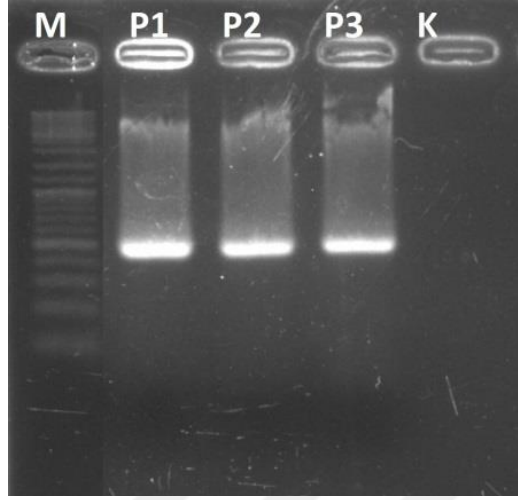
	DAS- ELISA	IC-RT-PCR	IC-RT-PCR yönteminin PVY enfeksiyon analizi
Yumru	0	2	1 yanlış pozitif
Sürgün	1	0	1 yanlış negatif

DAS-ELISA analizi sonucunda Nectar çeşidinde yumrulara PVY enfeksiyonu 1 adet tespit edilirken IC-RT-PCR yönteminde 12 yumru, IC-RT-real time PCR yönteminde yumruların tamamı (50 adet) PVY enfekteli olarak tespit edilmiştir. Aynı çeşidin sürgünlerinde DAS-ELISA ile 23 adet, IC-RT-PCR yöntemiyle 30 adet PVY enfeksiyonu tespit edilirken, IC-RT-real time PCR yönteminde yumruların tamamı (50 adet) PVY enfekteli olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, yumru ve sürgünlerde PVY enfeksiyonunun tespit edilmesinde uygulanan yöntemlerin hassasiyetleri açık olarak görülmektedir. ELISA'ya göre PCR yöntemleri 100-10.000 kat daha duyarlı ve spesifiktir (Korschineck vd., 1991; Rowhani vd., 1995; Vunsh vd., 1990).

4.4 Bitki Dokusunda Potato Virus Y Miktarının Belirlenmesi

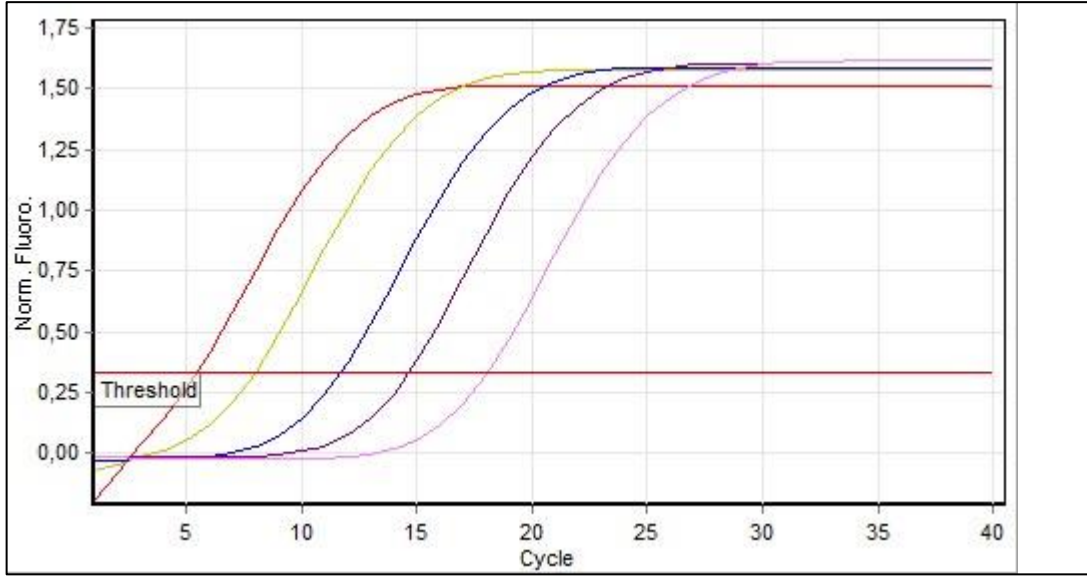
Ölçümde standart olarak kullanılacak plasmidler için elde edilen 480 bp uzunluğundaki PCR ürünleri klonlanmış ve daha sonra tekrar PCR ile klonlar kontrol edilmiştir (Şekil 16). Ölçümde kullanılacak standart plasmid konsantrasyonu 10 ng/µl olacak şekilde

ayarlandıktan 10 kat sulandırma serileri ile (100.000, 10.000, 1000, 100, 10 pg/μl) real-time PCR analizinde standart olarak ayarlanmıştır (Şekil 4.8).

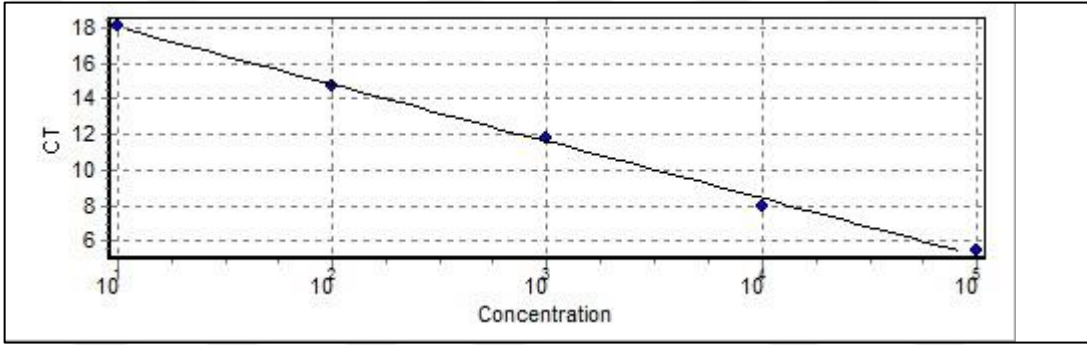


Şekil 4.8. Real-Time PCR analizlerinde standarttın oluşturulmasında kullanılacak plasmidin klonlama sonrası agaroz jelde test edilmesi (M 100 bp DNA ladder thermo scientific, P: plasmid, K su kontrol)

Desire patates çeşidinin yumrularında virüs miktarı 0,0035-0,1156 pg/μl aralığında tespit edilmiştir. Aynı çeşidin sürgünlerinde ise 1,8607-310,7821 pg/μl aralığında olmuştur. Nectar çeşidinin yumrularında ise virüs miktarı 0,0046-20,0683 pg/μl aralığında iken, sürgünlerinde bu miktar 1,1951-189,0056 pg/μl aralığındadır. Bu sonuçlara göre, virüs miktarı sürgünlerde yumrulara göre daha fazladır. Desire çeşidi genel olarak Nectar çeşidinden daha az konsantrasyonlarda virüs içermektedir. Bu durum, aynı örneklerin DAS-ELISA ve IC-RT-PCR analizlerinde sürgünlerde yumrulardan daha fazla ve ayrıca Nectar çeşidinde Desire çeşidine göre daha fazla PVY enfekteli örnek belirlenebilmesini açıklamaktadır.



a

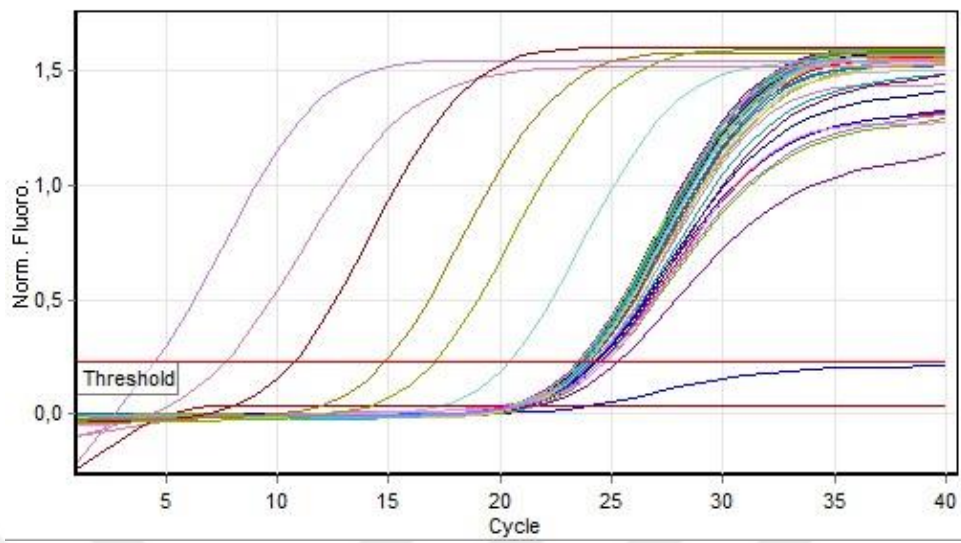


b

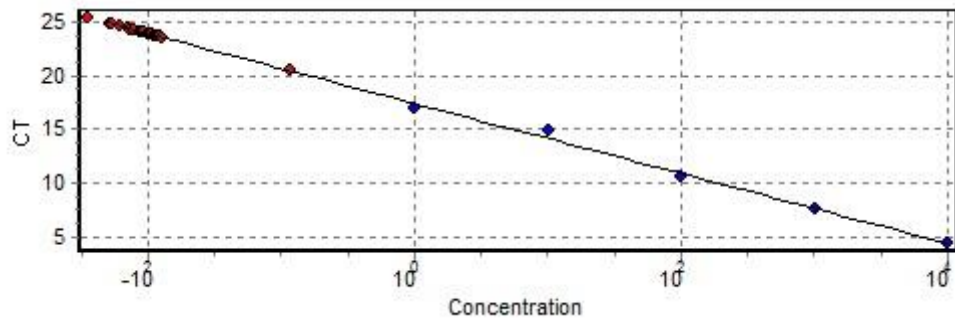
No.	Renk	Tip	Ct (eşik)	Verilen konsanrasyon (pg/ul)	Ölçülen konsantrasyon (pg/ul)
1	■	Standard	5,47	100.000	82.856
2	■	Standard	8,00	10.000	13.437
3	■	Standard	11,75	1.000	902
4	■	Standard	14,71	100	107
5	■	Standard	18,11	10	9

c

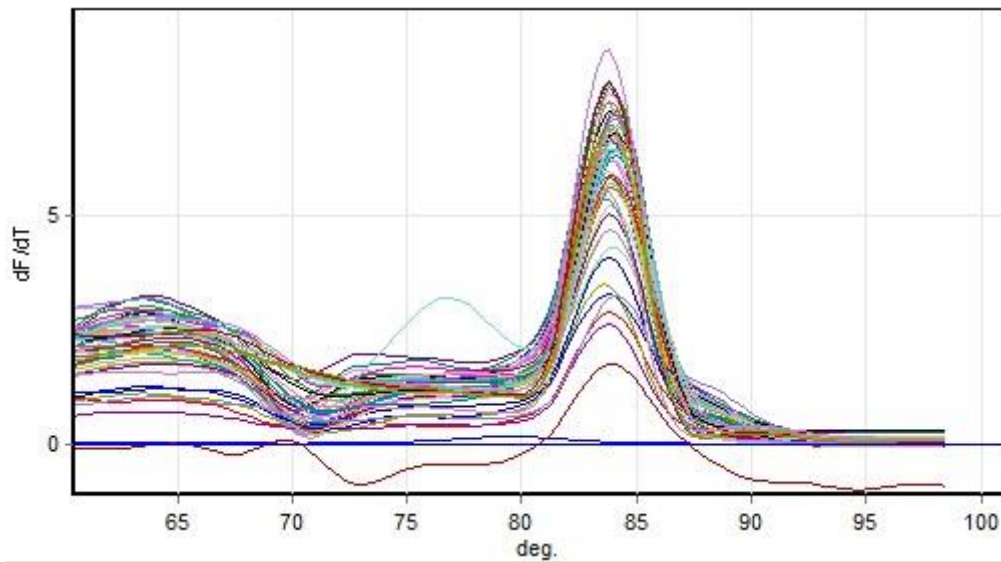
Şekil 4.9. Kantitatif Real-time PCR’da kullanılmak üzere hazırlanan plasmid standart; agaroz gelde band görüntüsü yerine, Real-time PCR makinasındaki yazılım ile elde edilen grafik sonuçları (a), standart doğru (b), her bir örneğin eşik değeri ve DNA miktarı (pg/ul) (c)



a



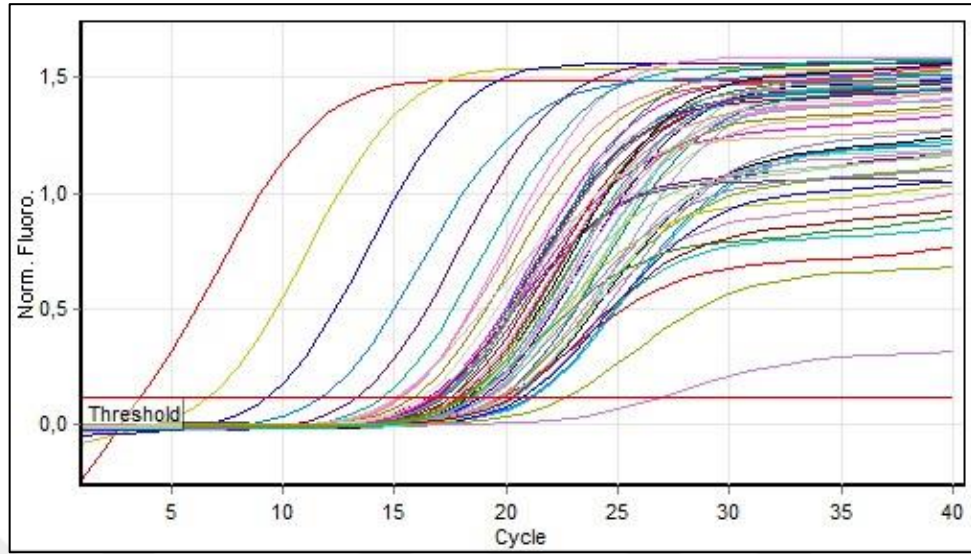
b



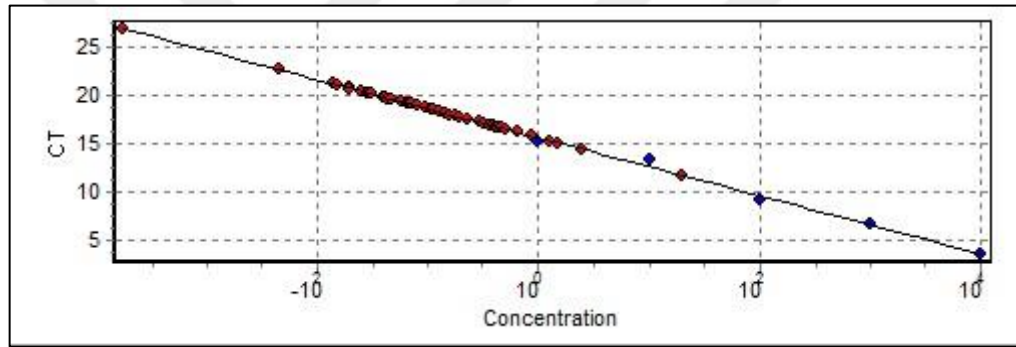
c

Şekil 4.10. Virüs miktarı Kantitatif Real-time PCR ile belirlenen Nectar yumru örnekleri; agaroz gelde band görüntüsü yerine, Real-time PCR makinasındaki yazılım ile elde edilen grafik sonuçları (a), standart doğru (b), melting analizi (c)

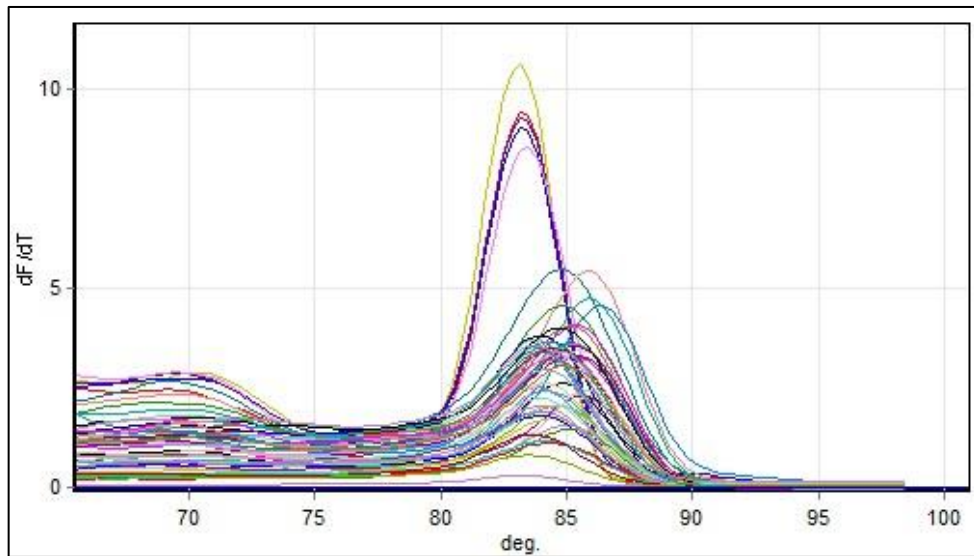
Nectar yumru



a



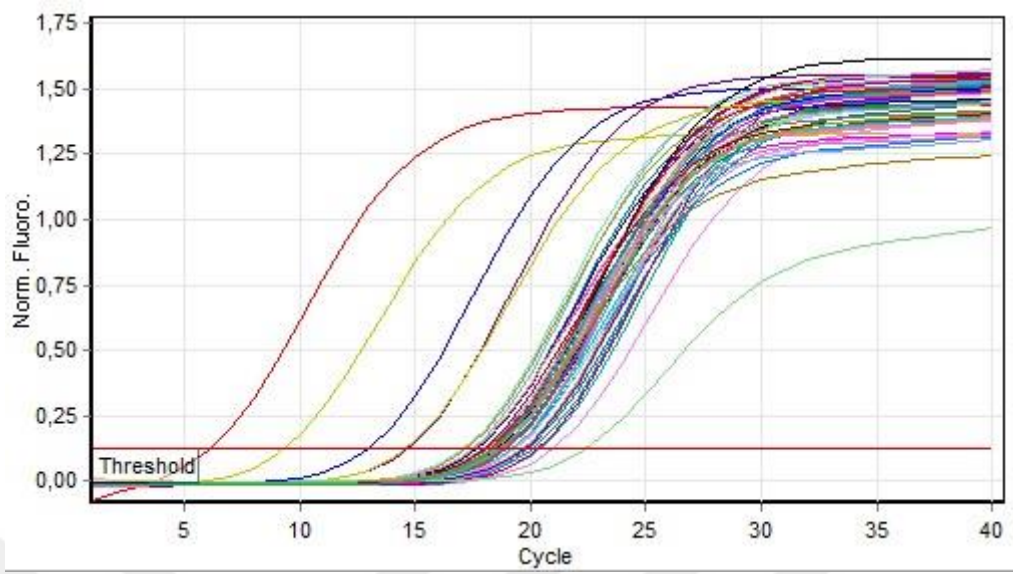
b



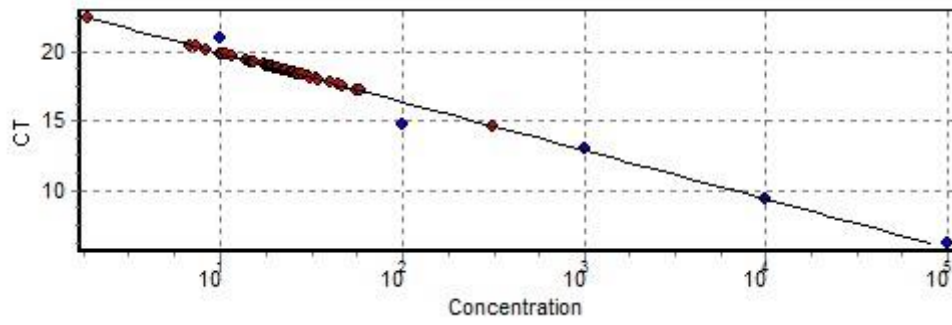
c

Şekil 4.11. Virüs miktarı Kantitatif Real-time PCR ile belirlenen Nectar yumru örnekleri; agaroz gelde band görüntüsü yerine, Real-time PCR makinasındaki yazılım ile elde edilen grafik sonuçları (a), standart doğru (b), melting analizi (c)

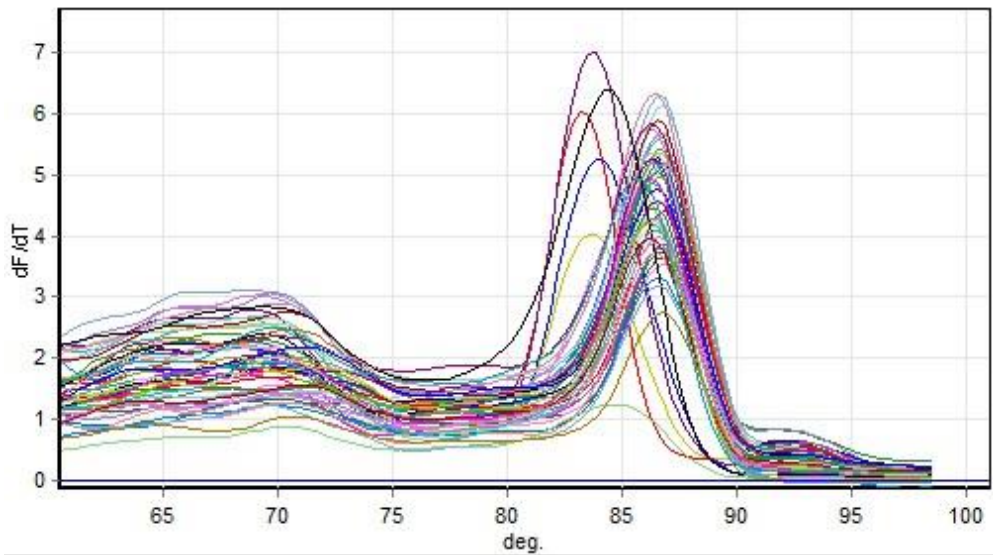
Desire sürgün



a



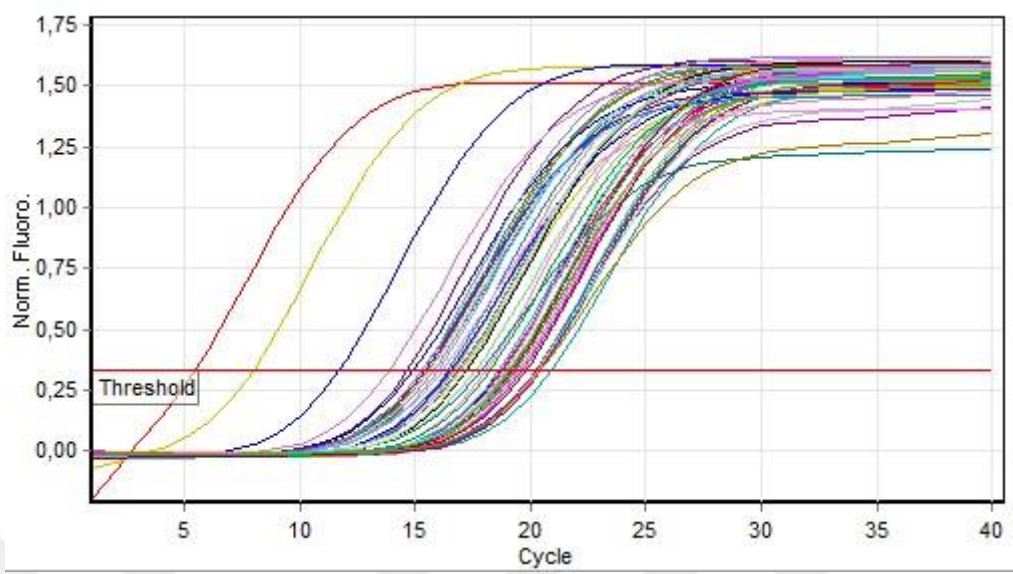
b



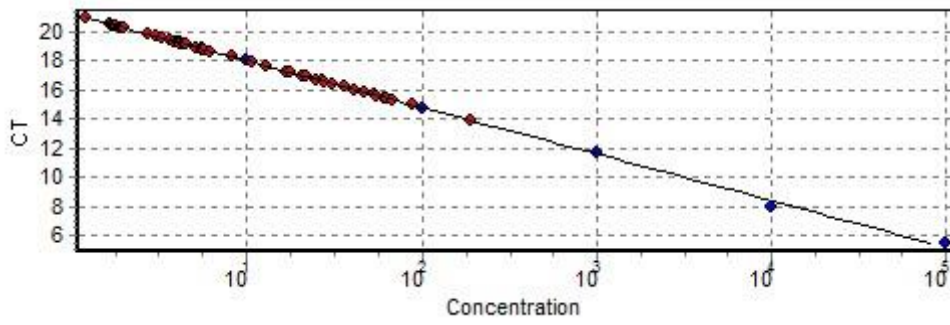
c

Şekil 4.12. Virüs miktarı kantitatif Real-time PCR ile belirlenen Desire sürgün örnekleri; agaroz gelde band görüntüsü yerine, Real-time PCR makinasındaki yazılım ile elde edilen grafik sonuçları (a), standart doğru (b), melting analizi (c)

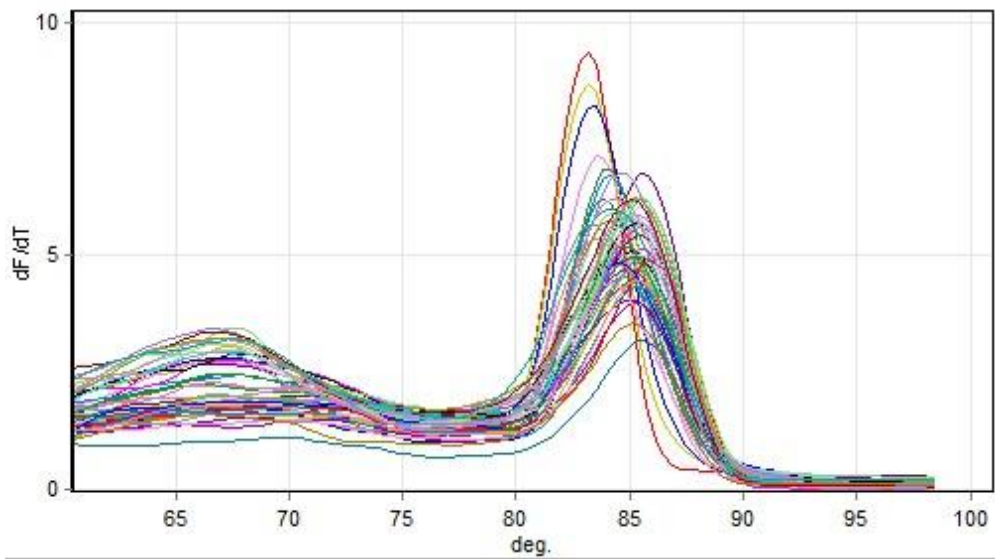
Nectar sürgün



a



b



c

Şekil 4.13. Virüs miktarı kantitatif Real-time PCR ile belirlenen Desire sürgün örnekleri; agaroz gelde band görüntüsü yerine, Real-time PCR makinasındaki yazılım ile elde edilen grafik sonuçları (a), standart doğru (b), melting analizi (c)

Çizelge 4.6. Desire ve Nectar patates çeşitlerinin yumru ve sürgünlerinde *Potato virus Y* kantitasyonu verileri karşılaştırılması (En düşük ve yüksek değerler koyu renkle gösterilmiştir)

Örnek numarası	Desire PVY (pg/μl)		Nectar PVY (pg/μl)	
	Yumru	Sürgün	Yumru	Sürgün
1	0,0062	8,4076	0,0153	30,8447
2	0,0116	9,9924	0,2908	47,1800
3		11,4962	1,2539	25,0260
4	0,0126	24,8376	0,1582	61,3769
5	0,0124	43,9603	0,4133	2,9922
6	0,0112	17,6133	0,0287	5,6592
7	0,0114	15,1193	0,0139	1,6532
8	0,0114	20,3751	0,0592	1,7805
9	0,0116	10,2932	0,0401	12,8366
10	0,0124	58,9249	0,0657	47,0161
11	0,0122	46,3745	0,0254	1,9513
12	0,0092	20,7826	0,0195	47,3673
13	0,0092	10,7825	0,0002	4,1902
14	0,0106	14,8221	0,0477	4,1250
15	0,1156	26,0806	0,2268	2,7039
16	0,0124	17,7886	0,8572	55,3639
17	0,0111	55,5204	0,0417	1,9323
18	0,0071	6,8561	2,4754	1,1951
19	0,0079	40,2768	0,4273	1,9307
20		40,2022	0,0813	89,3797
21	0,0109	25,3716	0,5010	1,9535
22	0,0052	7,3827	0,1765	1,7143
23	0,0071	30,5327	0,6431	53,7950
24	0,0109	18,6259	1,5007	1,8756
25	0,0074	21,6794	0,3266	26,6951
26	0,0035	28,0700	0,3672	3,6473
27	0,0116	31,1252	0,2272	21,7801
28	0,0090	28,0618	0,0400	5,4666

Çizelge 4.6. (Devam) Desire ve Nectar patates çeşitlerinin yumru ve sürgünlerinde *Potato virus Y* kantitasyonu verileri karşılaştırılması (En düşük ve yüksek değerler koyu renkle gösterilmiştir)

Örnek numarası	Desire PVY (pg/μl)		Nectar PVY (pg/μl)	
	Yumru	Sürgün	Yumru	Sürgün
29	0,0092	310,7821	0,1087	20,4863
30	0,0090	19,0728	0,0202	27,5428
31	0,0115	10,6882	0,3980	62,1773
32	0,0108	14,4755	0,0948	36,2708
33	0,0094	14,9579	20,0683	67,3725
34	0,0088	19,7507	0,0440	10,6410
35	0,0071	44,2832	0,1931	4,5042
36	0,0061	18,3607	0,1281	8,1312
37	0,0053	17,3388	0,4337	5,5966
38	0,0099	22,9392	0,1277	16,8971
39	0,0086	15,3526	0,0318	6,2284
40	0,0104	20,9761	0,4648	17,7872
41	0,0118	1,8607	0,1467	5,1251
42	0,0129	13,7904	0,0311	20,9330
43	0,0112	33,2310	0,0708	41,3053
44	0,0109	20,6674	0,0680	68,6320
45	0,0092	24,0097	0,0954	3,2450
46	0,0125	25,2949	0,0422	189,0056
47	0,0101	34,2815	0,0298	3,9865
48	0,0103	27,0300	0,1447	1,6941
49	0,0061	22,1930	0,0046	3,7797
50	0,0075	24,9737	0,1115	4,3383

BÖLÜM V

SONUÇLAR

5.1 PVY İrkları

Niğde ilinde tespit edilen PVY ırkları: PVY^{NW} (B), PVY^{NW} (B), PVY^{NTN} (B)

Niğde ilinden elde edilen PVY izolatlarında en yaygın ırk %29,31 oranla PVY^{NTN} (A) olup, bunu %12,07 oranıyla PVY^{NW} (B), %1,72 oranıyla PVY^{NTN} (B) takip etmiştir.

IC-RT-multipleks PCR ile PVY ırklarının tiplemesinde, PVY izolatlarının büyük çoğunluğunda (24 adet izolat) 278 bp seviyesinde tanımlanamayan ekstra band profili mevcuttur.

Ortaya çıkan profiller 278 bp amplikonu dışında değerlendirildiğinde, 10 adet PVY^{NTN} (A)* (*278 bp amplikonu temsil etmektedir), 9 adet PVY^{NW} (B)*, 2 adet PVY^{NW} (A)*, 2 adet PVY^{NTN} (B)*, 1 adet PVY^{E*} ve 7 adet PVY^{NTN}+PVY^{NW*} karışık enfeksiyonudur.

Karışık enfeksiyon oranları %3,45 PVY^{NTN}+PVY^{NW} ve %12,07 PVY^{NTN}+PVY^{NW*}

5.2 PVY Teşhisinde DAS-ELISA, IC-RT-PCR ve IC-RT-Real Time PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Sürgünlerde yumrulara göre daha fazla miktarda virüs ile enfekteli yumru tespit edilebilmektedir.

Kullanılan yöntemler içerisinde PVY enfekteli bitki dokusu tespit etmede IC-RT-real time PCR en başarılı yöntem olmuş bunu IC- RT-PCR ve DAS-ELISA takip etmiştir.

Kullanılan çeşit ve enfeksiyon yapan virüs konsantrasyonuna göre yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir.

Tohumluk patates üretiminde kullanılan damızlık bitki materyallerinin test edilmesinde mutlaka real-time PCR sistemleri kullanılmalıdır.

5.3 Bitki Dokusunda Potato virus Y Miktarının Belirlenmesi

Geliştirilen kantitatif IC-RT-real-time PCR sistemi kullanılarak damızlıklarda veya ıslah materyallerinde virüs konsantrasyonları belirlenerek, düşük konsantrasyonda virüs içerenlerden virüs arındırma çalışmaları yapılabilir.



KAYNAKLAR

Ahloowalia, B. S., "Production and performance of potato mini-tubers", *Euphytica* 75(3), 163-172, 1994.

Anonim, Patates Tohumluğu Sertifikasyonu ve Pazarlaması Yönetmeliği, *Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü*, Ankara, 2012.

Arioğlu, H., Çalışkan, M. E. and Onaran, H., Türkiyede patates üretimi, sorunları ve çözüm önerileri, *Niğde Patates Araştırma Enstitüsü*, Niğde, 2006.

Arslanoğlu, F., "Three agronomical traits of the local potato (*Solanum tuberosum* L.) ecotypes grown in the farmer fields in highlands of the Eastern Black Sea Region", *Turkish Journal of Field Crops* 13(2), 70-76, 2015.

Barker, H., "Multiple components of the resistance of potatoes to potato leafroll virus", *Annals of Applied Biology* 111(3), 641-648, 1987.

Barker, H., Webster, K. D. and Reavy, B., "Detection of potato virus Y in potato tubers: a comparison of polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay", *Potato Research* 36(1), 13-20, 1993.

Basky, Z. and Almási, A., "Differences in aphid transmissibility and translocation between PVYN and PVYO isolates", *Journal of Pest Science* 78(2), 67-75, 2005.

Batool, A., Khan, M. A., Farooq, J., Mughal, S. M. and Iftikhar, Y., "Elisa-based screening of potato germplasm against potato leaf roll virus", *Journal of Agricultural Research* 49(1), 57-63, 2011.

Binyam, T., "A review paper on Potato virus Y (PVY) biology, economic importance and its managements", *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* 5(9), 110-126, 2015.

Blanco-Urgoiti, B., Dopazo, J. and Ponz, F., "Potato virus Y group C isolates are a homogeneous pathotype but two different genetic strains", *Journal of General Virology* 79(8), 2037-2042, 1998.

Boonham, N., Walsh, K., Preston, S., North, J., Smith, P. and Barker, I., "The detection of tuber necrotic isolates of Potato virus Y, and the accurate discrimination of PVY O, PVY N and PVY C strains using RT-PCR", *Journal of Virological Methods* 102(1), 103-112, 2002.

Bostan, H. and Demirci, E., "Patates X ve Y virüslerinin bazı patates çeşitlerinde neden olduğu simptomlar", *Journal of the Faculty of Agriculture* 32(1), 1-4, 2001.

Boston, H. and Haliloğlu, K., "Patateste Virüslerin PCR ve ELISA Teknikleri İle Belirlenmesi ve Başarıyı Etkileyen Faktörler/Identification of Potato Viruses By PCR and ELISA and Factors Effecting the Success", *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 34(1), 17-23, 2010.

Camire, M. E., Kubow, S. and Donnelly, D. J., "Potatoes and human health", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49(10), 823-840, 2009.

Cervantes, F., Role of hairy nightshade *Solanum sarrachoides* (Sendtner) in the transmission of Potato virus Y (PVY) strains by aphids and characterization of the PVY strain reactions on *Solanum tuberosum* (L.), Master Thesis, *Institute of Science*, USA, 2008.

Chikh Ali, M., Gray, S. M. and Karasev, A. V., "An improved multiplex IC-RT-PCR assay distinguishes nine strains of Potato virus Y", *Plant Disease* 97(10), 1370-1374, 2013.

Chikh Ali, M., Maoka, T., Natsuaki, T. and Natsuaki, K. T., "PVYNTN-NW, a novel recombinant strain of Potato virus Y predominating in potato fields in Syria", *Plant Pathology* 59(1), 31-41, 2010.

Clark, M. F. and Adams, A. N., "Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses", *Journal of General Virology* 34(3), 475-483, 1977.

Cribb, P. J. and Hawkes, J. G., Experimental evidence for the origin of *Solanum tuberosum* subspecies *andigena*, *Columbia University Press*, New York, 1986.

Çalışkan, M. E., Onaran, H. and Arıoğlu, H., "Overview of the Turkish potato sector: Challenges, achievements and expectations", *Potato Research* 53(4), 255-266, 2010.

Danci, O., Ziegler, A., Torrance, L., Gasemi, S. and Danci, M., "Potyviridae family-short review", *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology* 13(2), 410-420, 2009.

De Bokx, J. A. and Huttinga, H., Potato virus Y. Descriptions of plant viruses, no. 242, *Commonwealth Mycological Institute and the Association of Applied Biologists*, England, 1981.

DiFonzo, C. D., Ragsdale, D. W., Radcliffe, E. B., Gudmestad, N. C. and Secor, G. A., "Crop borders reduce potato virus Y incidence in seed potato", *Annals of Applied Biology* 129(2), 289-302, 1996.

Drewnowski, A. and Rehm, C. D., "Vegetable cost metrics show that potatoes and beans provide most nutrients per penny", *PLoS One* 8(5), e63277, 2013.

Fakhrabad, F., Ahmadikhah, A. and Nasrollahnejad, S., "Identification and detection of Potato virus Y strains by molecular methods in tobacco fields of North Iran", *International Research Journal of Applied and Basic Sciences* 3(7), 1422-1428, 2012.

FAOSTAT, <http://www.potatopro.com/world/potato-statistics>, 01 Ağustos 2017.

Fereres, A., Perez, P., Gemenio, C. and Ponz, F., "Transmission of Spanish pepper-and potato-PVY isolates by aphid (Homoptera: Aphididae) vectors: epidemiological implications", *Environmental Entomology* 22(6), 1260-1265, 1993.

Galvino-Costa, S. B. F., dos Reis Figueira, A., Camargos, V. V., Geraldino, P. S., Hu, X. J., Nikolaeva, O. V., Kerlan, C. and Karasev, A. V., "A novel type of Potato virus Y recombinant genome, determined for the genetic strain PVYE", *Plant Pathology* 61(2), 388-398, 2012.

Garner, H. R., Automating the PCR Process: The Polymerase Chain Reaction, *Springer*, Boston, 1994.

Gerlegiz, E. T., Karakaya, A., Oguz, A. C., Mert, Z., Sayim, İ., Ergun, N. and Aydogan, S., "Assessment of the seedling reactions of some hulless barley genotypes to *Drechslera teres* f. *maculata*", *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi* 28(2), 63-68, 2015.

Gibbs, A. J., Harrison, B. D. and Murrant, A. F., CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, *Commonwealth Mycological Institute and the Association of Applied Biologists*, England, 1970.

Glaes, L., Kerlan, C., Tribodet, M., Tordo, V. M. J., Robaglia, C. and Astier-Manifacier, S., "Molecular characterization of potato virus YN isolates by PCR-RFLP", *European Journal of Plant Pathology* 102(7), 655-662, 1996.

Gopal, J. and Khurana, S. M., Handbook of potato production, improvement, and postharvest management, *Food Products Press*, New York, 2006.

Gould, A. R. and Symons, R. H., "A molecular biological approach to relationships among viruses", *Annual Review of Phytopathology* 21(1), 179-200, 1983.

Gray, S., De Boer, S., Lorenzen, J., Karasev, A., Whitworth, J., Nolte, P., Singh, R., Boucher, A. and Xu, H., "Potato virus Y: an evolving concern for potato crops in the United States and Canada", *Plant Disease* 94(12), 1384-1397, 2010.

Günel, T., "Gen Anlatımının Kantitatif Analizi", *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 27(5), 763-767, 2007.

Günel, T. and Aydın, K., "Real-Time PCR' ve Uygulama Alanları", *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2(2), 43-45, 2009.

Güner, Ü. and Yorgancı, Ü., "Niğde ve Nevşehir İlleri patates ekiliş alanlarında saptanan viral etmenler", *Bitki Koruma Bülteni* 46(2), 1-4, 2006.

Hampton, R., Ball, E. and De Boer, S., Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: A Laboratory Manual, *APS press*, United States of America, 1990.

Hawkes, J. G., The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources, *Belhaven Press*, London, 1990.

Henson, J. M. and French, R., "The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis", *Annual Review of Phytopathology* 31(1), 81-109, 1993.

Hill, S. A. and Jackson, E. A., "An investigation of the reliability of ELISA as a practical test for detecting potato leaf roll virus and potato virus Y in tubers", *Plant Pathology* 33(1), 21-26, 1984.

Hollings, M. and Brunt, A. A., "Potyviruses", *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*, 731-807, 1981.

Hull, R., Comparative Plant Virology, *Elsevier Academic press*, United Kingdom (UK), 2009.

Ilisulu, K., "Türkiye'de yetiştirilen Patates Çeşitlerinin Başlıca Vasıfları Uzerinde Araştırmalar", *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakultesi Yayınları* 118, 248, 1957.

INRA, https://www6.inra.fr/pvy_organization_eng/Potato-virus-Y/Genome, 25 Haziran 2017.

Jeffries, C. J., Potato, *Bioversity International*, Rome, Italy, 1998.

Jones, R. A. C., "Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars", *Annals of Applied Biology* 117(1), 93-105, 1990.

Kerlan, C., Nikolaeva, O. V., Hu, X., Meacham, T., Gray, S. M. and Karasev, A. V., "Identification of the molecular make-up of the Potato virus Y strain PVYZ: Genetic typing of PVYZ-NTN", *Phytopathology* 101(9), 1052-1060, 2011.

Kerlan, C., Tribodet, M., Glais, L. and Guillet, M., "Variability of potato virus Y in potato crops in France", *Journal of Phytopathology* 147(11), 643-651, 1999.

Khurana, S., "Potato viruses and their management", *Diseases of Fruits and Vegetables* 2, 389-440, 2004.

Khurana, S. M. P. and Singh, M. N., "Viral and mycoplasmal disease of potato", *Review of Tropical Plant Pathology* 3, 132-184, 1986.

Kogovšek, P., Gow, L., Pompe-Novak, M., Gruden, K., Foster, G. D., Boonham, N. and Ravnikar, M., "Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of Potato virus Y isolates", *Journal of Virological Methods* 149(1), 1-11, 2008.

Korschineck, I., Himmler, G., Sagl, R., Steinkellner, H. and Katinger, H. W. D., "A PCR membrane spot assay for the detection of plum pox virus RNA in bark of infected trees", *Journal of Virological Methods* 31(2-3), 139-145, 1991.

Kubista, M., "Emerging real-time PCR applications", *Drug Discovery World Summer* 1, 57-58, 2008.

Kumar, D., Kumar, N. and Garg, I. D., "A review paper on diagnostics of potato viruses", *International Journal of Current Research* 4(12), 430-437, 2012.

Langeveld, S. A., Dore, J.-M., Memelink, J., Derks, A. F. L. M., van der Vlugt, C. I. M., Asjes, C. J. and Bol, J. F., "Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers", *Journal of General Virology* 72(7), 1531-1541, 1991.

Leiser, R. M. and Richter, J., "Purification and some characteristics of potato virus Y", *Archiv fur Phytopathologie und Pflanzenschutz* 14(6), 337-350, 1978.

Lequin, R. M., "Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)", *Clinical Chemistry* 51(12), 2415-2418, 2005.

Lima, J. A. A., Nascimento, A. K. Q., Radaelli, P. and Purcifull, D. E., Serology applied to plant virology: Serological diagnosis of certain human, animal and plant diseases, *InTech*, United States of America, 2012.

Lin, N. S., Hsu, Y. H. and Hsu, H. T., "Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes", *Phytopathology* 80(9), 824-828, 1990.

Loebenstein, G., Akad, F., Filatov, V., Sadvakasova, G., Manadilova, A., Bakelman, H., Teverovsky, E., Lachmann, O. and David, A., "Improved detection of potato leafroll luteovirus in leaves and tubers with a digoxigenin-labeled cRNA probe", *Plant Disease* 81(5), 489-491, 1997.

López, M. M., Bertolini, E., Olmos, A., Caruso, P., Gorris, M. T., Llop, P., Penyalver, R. and Cambra, M., "Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria", *International Microbiology* 6(4), 233-243, 2003.

Lorenzen, J., Nolte, P., Martin, D., Pasche, J. S. and Gudmestad, N. C., "NE-11 represents a new strain variant class of Potato virus Y", *Archives of Virology* 153(3), 517-525, 2008.

Lorenzen, J. H., Piche, L. M., Gudmestad, N. C., Meacham, T. and Shiel, P., "A multiplex PCR assay to characterize Potato virus Y isolates and identify strain mixtures", *Plant Disease* 90(7), 935-940, 2006.

Makkouk, K. M. and Comeau, A., "Evaluation of various methods for the detection of barley yellow dwarf virus by the tissue-blot immunoassay and its use for virus detection in cereals inoculated at different growth stages", *European Journal of Plant Pathology* 100(1), 71-80, 1994.

Mathews, R. E. F., Diagnosis of Plant Virus Diseases, **CRS Press N.W**, Florida, 1993.

McDonald, J. G. and Singh, R. P., "Host range, symptomology, and serology of isolates of potato virus Y (PVY) that share properties with both the PVY N and PVY O strain groups", **American Journal of Potato Research** 73(7), 309-315, 1996.

Moravec, T., Cerovska, N. and Boonham, N., "The detection of recombinant, tuber necrosing isolates of Potato virus Y (PVY NTN) using a three-primer PCR based in the coat protein gene", **Journal of Virological Methods** 109(1), 63-68, 2003.

Naidu, R. A. and Hughes, J. D. A., "Methods for the detection of plant virus diseases", **Plant Virology in Sub Saharan Africa**, 233-253, 2003.

Nie, X. and Singh, R. P., "A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of Potato virus Y by uniplex and multiplex RT-PCR", **Journal of Virological Methods** 104(1), 41-54, 2002.

Nie, X. and Singh, R. P., "Evolution of North American PVYNTN strain Tu 660 from local PVYN by mutation rather than recombination", **Virus Genes** 26(1), 39-47, 2003a.

Nie, X. and Singh, R. P., "Specific differentiation of recombinant PVY N: O and PVY NTN isolates by multiplex RT-PCR", **Journal of Virological Methods** 113(2), 69-77, 2003b.

OECD, Consensus document on the biology of *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* (potato), **Organisation for Economic Co-operation and Development**, Paris, 1997.

Ottoman, R. J., Hane, D. C., Brown, C. R., Yilma, S., James, S. R., Mosley, A. R., Crosslin, J. M. and Vales, M. I., "Validation and implementation of marker-assisted selection (MAS) for PVY resistance (Ryadg gene) in a tetraploid potato breeding program", **American Journal of Potato Research** 86(4), 304-314, 2009.

Piche, L. M., Singh, R. P., Nie, X. and Gudmestad, N. C., "Diversity among Potato virus Y isolates obtained from potatoes grown in the United States", *Phytopathology* 94(12), 1368-1375, 2004.

Ragsdale, D. W., Radcliffe, E. B. and DiFonzo, C. D., Epidemiology and field control of PVY and PLRV: Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes, *Springer*, United States of America, 2001.

Rigotti, S. and Gugerli, P., "Rapid identification of potato virus Y strains by one-step triplex RT-PCR", *Journal of Virological Methods* 140(1), 90-94, 2007.

Robaglia, C., Durand-Tardif, M., Tronchet, M., Boudazin, G., Astier-Manifacier, S. and Casse-Delbart, F., "Nucleotide sequence of potato virus Y (N strain) genomic RNA", *Journal of General Virology* 70(4), 935-947, 1989.

Robertson, N. L., French, R. and Gray, S. M., "Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses", *Journal of General Virology* 72(6), 1473-1477, 1991.

Rolland, M., Glais, L., Kerlan, C. and Jacquot, E., "A multiple single nucleotide polymorphisms interrogation assay for reliable Potato virus Y group and variant characterization", *Journal of Virological Methods* 147(1), 108-117, 2008.

Rosner, A. and Maslenin, L., "Differentiating PVY NTN from PVY N by annealing to reference RNA transcripts", *Journal of Virological Methods* 97(1), 125-131, 2001.

Rosner, A. and Maslenin, L., "Tagging of viral RNA transcripts with strain-specific oligonucleotides: characterization and application", *Journal of Virological Methods* 110(1), 105-109, 2003.

Rowhani, A., Maningas, M. A., Lile, L. S., Daubert, S. D. and Golino, D. A., "Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions", *Phytopathology* 85(3), 347-352, 1995.

Russo, P., Miller, L., Singh, R. P. and Slack, S. A., "Comparison of PLRV and PVY detection in potato seed samples tested by Florida winter field inspection and RT-PCR", *American Journal of Potato Research* 76(5), 313-316, 1999.

Sagredo, B., Mathias, M., Barrientos, C., Acuña, I., Kalazich, J. and Rojas, J., "Evaluation of a SCAR RYSC3 marker of the Ryadg gene to select resistant genotypes to Potato virus Y (PVY) in the INIA Potato Breeding Program", *Chilean Journal of Agricultural Research* 69(3), 305-315, 2009.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A., "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase", *Science* 239(4839), 487-491, 1988.

Schoen, C. D., Knorr, D. and Leone, G., "Detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers by immunocapture and a fluorogenic 5' nuclease RT-PCR assay", *Phytopathology* 86, 993-999, 1996.

Schubert, J., Fomitcheva, V. and Sztangret-Wisniewska, J., "Differentiation of Potato virus Y strains using improved sets of diagnostic PCR-primers", *Journal of Virological Methods* 140(1), 66-74, 2007.

Shukla, D. D. and Ward, C. W., "Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group", *Journal of General Virology* 69(11), 2703-2710, 1988.

Singh, M. and Singh, R. P., "Potato virus Y detection: sensitivity of RT-PCR depends on the size of fragment amplified", *Canadian Journal of Plant Pathology* 19(2), 149-155, 1997.

Singh, M., Singh, R. P. and Moore, L., "Evaluation of NASH and RT-PCR for the detection of PVY in dormant tubers and its comparison with visual symptoms and ELISA in plants", *American Journal of Potato Research* 76(2), 61-66, 1999.

Singh, R. P., "Incidence of the tobacco veinal necrotic strain of potato virus Y (PVYN) in Canada in 1990 and 1991 and scientific basis for eradication of the disease", ***Canadian Plant Disease Survey*** 72, 113-119, 1992.

Singh, R. P., "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", ***Journal of Virological methods*** 83(1), 27-33, 1999.

Singh, R. P., Kurz, J. and Boiteau, G., "Detection of stylet-borne and circulative potato viruses in aphids by duplex reverse transcription polymerase chain reaction", ***Journal of virological methods*** 59(2), 189-196, 1996.

Singh, R. P., Valkonen, J. P. T., Gray, S. M., Boonham, N., Jones, R., Kerlan, C. and Schubert, J., "Discussion paper: The naming of Potato virus Y strains infecting potato", ***Archives of Virology*** 153(1), 1-13, 2008.

Smith, K. M., "On the composite nature of certain potato virus diseases of the mosaic group as revealed by the use of plant indicators and selective methods of transmission", ***Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*** 109(762), 251-267, 1931.

Song, Y. S., Hepting, L., Schweizer, G., Hartl, L., Wenzel, G. and Schwarzfischer, A., "Mapping of extreme resistance to PVY (Rysto) on chromosome XII using anther-culture-derived primary dihaploid potato lines", ***Theoretical and applied genetics*** 111(5), 879-887, 2005.

Sorri, V. A., Watanabe, K. N. and Valkonen, J. P. T., "Predicted kinase-3a motif of a resistance gene analogue as a unique marker for virus resistance", ***TAG Theoretical and Applied Genetics*** 99(1), 164-170, 1999.

Souza-Dias, J. A. C., Russo, P., Miller, L. and Slack, S. A., "Comparison of nucleotide sequences from three potato leafroll virus (PLRV) isolates collected in Brazil", ***American Journal of Potato Research*** 76(1), 17-24, 1999b.

Spiegel, S. and Martin, R., "Improved detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers and microtubers by the polymerase chain reaction and ELISA", *Annals of Applied Biology* 122(3), 493-500, 1993.

Stevenson, W. R., Loria, R., Franc, G. D. and Weingartner, D. P., Compendium of Potato Diseases, *American Phytopathological Society*, United States of America, 2001.

Storey, R. M. J. and Davies, H. V., The Potato Crop, *Springer*, London, 1992.

Szemes, M., Klerks, M. M., Van den Heuvel, J. F. J. M. and Schoen, C. D., "Development of a multiplex AmpliDet RNA assay for simultaneous detection and typing of potato virus Y isolates", *Journal of Virological Methods* 100(1), 83-96, 2002.

Şenol, S., Erzurum ekolojik şartları altında yerli ve yabancı önemli bazı patates çeşitleri üzerinde araştırmalar, *Ziraat Fakültesi Yayınları*, Erzurum, 1971.

Thornton, R. E. and Sieczka, J. B., "Commercial potato production in North-America-potato-association handbook", *American Potato Journal* 57, 1-36, 1980.

Thresh, J. M., "Crop viruses and virus diseases: a global perspective", *Virus Diseases and Crop Biosecurity* 1, 9-32, 2006.

Tovar, P., "Induction and use of *in vitro* potato tubers", *CIP Circular* 13(1), 1-5, 1985.

TURKSTAT, <http://www.turkstat.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=21664>, 20 Eylül 2017.

TÜİK, Türkiye İstatistik Kurumu, 2016.

Varma, A., Gibbs, A. J., Woods, R. D. and Finch, J. T., "Some observations on the structure of the filamentous particles of several plant viruses", *Journal of General Virology* 2(1), 107-114, 1968.

Vunsh, R., Rosner, A. and Stein, A., "The use of the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of bean yellow mosaic virus in gladiolus", *Annals of Applied Biology* 117(3), 561-569, 1990.

Warren, M., Krüger, K. and Schoeman, A. S., Potato virus Y (PVY) and potato leaf roll virus (PLRV): Literature review for potatoes South Africa, *Department of Zoology and Entomology, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Pretoria*, South Africa, 2005.

Weidemann, H. L., "Importance and control of potato virus YN (PVYN) in seed potato production", *Potato Research* 31(1), 85-94, 1988.

Weilguny, H. and Singh, R. P., "Separation of Slovenian isolates of PVY NTN from the North American isolates of PVY N by a 3-primer PCR", *Journal of Virological Methods* 71(1), 57-68, 1998.

Ek-A Desire yumrularının kantitatif IC-RT-real-time PCR sonuçları

No.	Renk	Örnek no	Tip	Ct	Verilen konsanrasyon (pg/ul)	Ölçülen konsantrasyon (pg/ul)
1		1	Desire yumru	24,51		0,0062
2		2	Desire yumru	23,63		0,0116
3		3	Desire yumru			
4		4	Desire yumru	23,52		0,0126
5		5	Desire yumru	23,54		0,0124
6		6	Desire yumru	23,68		0,0112
7		7	Desire yumru	23,65		0,0114
8		8	Desire yumru	23,66		0,0114
9		9	Desire yumru	23,63		0,0116
10		10	Desire yumru	23,53		0,0124
11		11	Desire yumru	23,56		0,0122
12		12	Desire yumru	23,95		0,0092
13		13	Desire yumru	23,95		0,0092
14		14	Desire yumru	23,75		0,0106
15		15	Desire yumru	20,41		0,1156
16		16	Desire yumru	23,54		0,0124
17		17	Desire yumru	23,69		0,0111
18		18	Desire yumru	24,31		0,0071
19		19	Desire yumru	24,17		0,0079
20		20	Desire yumru			
21		21	Desire yumru	23,71		0,0109
22		22	Desire yumru	24,75		0,0052
23		23	Desire yumru	24,32		0,0071
24		24	Desire yumru	23,72		0,0109
25		25	Desire yumru	24,26		0,0074
26		26	Desire yumru	25,29		0,0035
27		27	Desire yumru	23,62		0,0116

Ek-A (Devam) Desire yumrularının kantitatif IC-RT-real-time PCR sonuçları

No	Renk	Örnek no	Tip	Ct	Verilen konsanrasyon (pg/ul)	Ölçülen konsantrasyon (pg/ul)
28		28	Desire yumru	23,99		0,0090
29		29	Desire yumru	23,96		0,0092
30		30	Desire yumru	23,98		0,0090
31		31	Desire yumru	23,65		0,0115
32		32	Desire yumru	23,72		0,0108
33		33	Desire yumru	23,92		0,0094
34		34	Desire yumru	24,01		0,0088
35		35	Desire yumru	24,32		0,0071
36		36	Desire yumru	24,53		0,0061
37		37	Desire yumru	24,73		0,0053
38		38	Desire yumru	23,86		0,0099
39		39	Desire yumru	24,05		0,0086
40		40	Desire yumru	23,79		0,0104
41		41	Desire yumru	23,61		0,0118
42		42	Desire yumru	23,48		0,0129
43		43	Desire yumru	23,68		0,0112
44		44	Desire yumru	23,71		0,0109
45		45	Desire yumru	23,95		0,0092
46		46	Desire yumru	23,52		0,0125
47		47	Desire yumru	23,82		0,0101
48		48	Desire yumru	23,79		0,0103
49		49	Desire yumru	24,54		0,0061
50		50	Desire yumru	24,75		0,0075
51		10x	Standard	4,52	10.000,0000	9.961,1460
52		10x2	Standard	7,66	1.000,0000	1.056,5085
53		10x3	Standard	10,72	100,0000	117,7819
54		10x4	Standard	14,84	10,0000	6,2085
55		10x5	Standard	17,03	1,0000	1,2994

Ek-B Nectar yumrularının kantitatif IC-RT-real-time PCR sonuçları

No.	Renk	Örnek no	Tip	Ct	Verilen konsantrasyon (pg/ul)	Ölçülen konsantrasyon (pg/ul)
1		10X	Standard	3,60	10.000,0000	10.223,6658
2		10X2	Standard	6,65	1.000,0000	977,3064
3		10X3	Standard	9,29	100,0000	128,8499
4		10X4	Standard	13,30	10,0000	5,9063
5		10X5	Standard	15,25	1,0000	1,3151
6		N1	Nectar yumru	21,05		0,0153
7		N2	Nectar yumru	17,21		0,2908
8		N3	Nectar yumru	15,31		1,2539
9		N4	Nectar yumru	18,00		0,1582
10		N5	Nectar yumru	16,75		0,4133
11		N6	Nectar yumru	20,22		0,0287
12		N7	Nectar yumru	21,16		0,0139
13		N8	Nectar yumru	19,28		0,0592
14		N9	Nectar yumru	19,79		0,0401
15		N10	Nectar yumru	19,15		0,0657
16		N11	Nectar yumru	20,38		0,0254
17		N12	Nectar yumru	20,73		0,0195
18		N13	Nectar yumru	26,83		0,0002
19		N14	Nectar yumru	19,56		0,0477
20		N15	Nectar yumru	17,54		0,2268
21		N16	Nectar yumru	15,81		0,8572
22		N17	Nectar yumru	19,74		0,0417
23		N18	Nectar yumru	14,43		2,4754
24		N19	Nectar yumru	16,71		0,4273
25		N20	Nectar yumru	18,87		0,0813
26		N21	Nectar yumru	16,50		0,5010
27		N22	Nectar yumru	17,86		0,1765
28		N23	Nectar yumru	16,18		0,6431
29		N24	Nectar yumru	15,08		1,5007
30		N25	Nectar yumru	17,06		0,3266

Ek-B (Devam) Nectar yumrularının kantitatif IC-RT-real-time PCR sonuçları

No.	Renk	Örnek no	Tip	Ct	Verilen konsanrasyon (pg/ul)	Ölçülen konsantrasyon (pg/ul)
31		N26	Nectar yumru	16,91		0,3672
32		N27	Nectar yumru	17,53		0,2272
33		N28	Nectar yumru	19,79		0,0400
34		N29	Nectar yumru	18,49		0,1087
35		N30	Nectar yumru	20,68		0,0202
36		N31	Nectar yumru	16,80		0,3980
37		N32	Nectar yumru	18,67		0,0948
38		N33	Nectar yumru	11,70		20,0683
39		N34	Nectar yumru	19,67		0,0440
40		N35	Nectar yumru	17,74		0,1931
41		N36	Nectar yumru	18,28		0,1281
42		N37	Nectar yumru	16,69		0,4337
43		N38	Nectar yumru	18,28		0,1277
44		N39	Nectar yumru	20,09		0,0318
45		N40	Nectar yumru	16,60		0,4648
46		N41	Nectar yumru	18,10		0,1467
47		N42	Nectar yumru	20,12		0,0311
48		N43	Nectar yumru	19,05		0,0708
49		N44	Nectar yumru	19,10		0,0680
50		N45	Nectar yumru	18,66		0,0954
51		N46	Nectar yumru	19,72		0,0422
52		N47	Nectar yumru	20,18		0,0298
53		N48	Nectar yumru	18,12		0,1447
54		N49	Nectar yumru	22,61		0,0046
55		N50	Nectar yumru	18,46		0,1115

Ek-C Nectar sürgünkantitatif IC-RT-real-time PCR sonuçları

No.	Renk	Örnek no	Tip	Ct	Verilen konsanrasyon (pg/ul)	Ölçülen konsantrasyon (pg/ul)
1		10X	Standard	5,47	100.000,0000	82.856,1842
2		10X2	Standard	8,00	10.000,0000	13.437,2687
3		10X3	Standard	11,75	1.000,0000	902,2633
4		10X4	Standard	14,71	100,0000	107,4238
5		10X5	Standard	18,11	10,0000	9,2668
6		1	Nectar sürgün	16,44		30,8447
7		2	Nectar sürgün	15,85		47,1800
8		3	Nectar sürgün	16,73		25,0260
9		4	Nectar sürgün	15,49		61,3769
10		5	Nectar sürgün	19,68		2,9922
11		6	Nectar sürgün	18,80		5,6592
12		7	Nectar sürgün	20,51		1,6532
13		8	Nectar sürgün	20,41		1,7805
14		9	Nectar sürgün	17,66		12,8366
15		10	Nectar sürgün	15,86		47,0161
16		11	Nectar sürgün	20,28		1,9513
17		12	Nectar sürgün	15,85		47,3673
18		13	Nectar sürgün	19,22		4,1902
19		14	Nectar sürgün	19,24		4,1250
20		15	Nectar sürgün	19,82		2,7039
21		16	Nectar sürgün	15,63		55,3639
22		17	Nectar sürgün	20,29		1,9323
23		18	Nectar sürgün	20,96		1,1951
24		19	Nectar sürgün	20,29		1,9307
25		20	Nectar sürgün	14,96		89,3797
26		21	Nectar sürgün	20,28		1,9535
27		22	Nectar sürgün	20,46		1,7143
28		23	Nectar sürgün	15,67		53,7950
29		24	Nectar sürgün	20,33		1,8756
30		25	Nectar sürgün	16,64		26,6951

Ek-C (Devam) Nectar sürgünkantitatif IC-RT-real-time PCR sonuçları

No.	Renk	Örnek no	Tip	Ct	Verilen konsanrasyon (pg/ul)	Ölçülen konsantrasyon (pg/ul)
31		26	Nectar sürgün	19,41		3,6473
32		27	Nectar sürgün	16,93		21,7801
33		28	Nectar sürgün	18,85		5,4666
34		29	Nectar sürgün	17,01		20,4863
35		30	Nectar sürgün	16,60		27,5428
36		31	Nectar sürgün	15,47		62,1773
37		32	Nectar sürgün	16,22		36,2708
38		33	Nectar sürgün	15,36		67,3725
39		34	Nectar sürgün	17,92		10,6410
40		35	Nectar sürgün	19,12		4,5042
41		36	Nectar sürgün	18,29		8,1312
42		37	Nectar sürgün	18,81		5,5966
43		38	Nectar sürgün	17,28		16,8971
44		39	Nectar sürgün	18,67		6,2284
45		40	Nectar sürgün	17,21		17,7872
46		41	Nectar sürgün	18,94		5,1251
47		42	Nectar sürgün	16,98		20,9330
48		43	Nectar sürgün	16,04		41,3053
49		44	Nectar sürgün	15,33		68,6320
50		45	Nectar sürgün	19,57		3,2450
51		46	Nectar sürgün	13,92		189,0056
52		47	Nectar sürgün	19,29		3,9865
53		48	Nectar sürgün	20,47		1,6941
54		49	Nectar sürgün	19,36		3,7797
55		50	Nectar sürgün	19,17		4,3383

Ek-D Desire sürgünkantitatif IC-RT-real-time PCR sonuçları

No.	Renk	Örnek no	Tip	Ct	Verilen konsanrasyon (pg/ul)	Ölçülen konsantrasyon (pg/ul)
1		10x	Standard	6,17	100.000,0000	80.905,9431
2		10x2	Standard	9,37	10.000,0000	9.946,1941
3		10x3	Standard	13,03	1.000,0000	900,6276
4		10x4	Standard	14,75	100,0000	292,4267
5		10x5	Standard	21,04	10,0000	4,7185
6		1	Desire sürgün	20,16		8,4076
7		2	Desire sürgün	19,90		9,9924
8		3	Desire sürgün	19,68		11,4962
9		4	Desire sürgün	18,51		24,8376
10		5	Desire sürgün	17,64		43,9603
11		6	Desire sürgün	19,03		17,6133
12		7	Desire sürgün	19,27		15,1193
13		8	Desire sürgün	18,81		20,3751
14		9	Desire sürgün	19,85		10,2932
15		10	Desire sürgün	17,19		58,9249
16		11	Desire sürgün	17,56		46,3745
17		12	Desire sürgün	18,78		20,7826
18		13	Desire sürgün	19,78		10,7825
19		14	Desire sürgün	19,30		14,8221
20		15	Desire sürgün	18,43		26,0806
21		16	Desire sürgün	19,02		17,7886
22		17	Desire sürgün	17,28		55,5204
23		18	Desire sürgün	20,47		6,8561
24		19	Desire sürgün	17,77		40,2768
25		20	Desire sürgün	17,77		40,2022
26		21	Desire sürgün	18,48		25,3716
27		22	Desire sürgün	20,36		7,3827
28		23	Desire sürgün	18,19		30,5327
29		24	Desire sürgün	18,95		18,6259
30		25	Desire sürgün	18,72		21,6794

Ek-D (Devam) Desire sürgünkantitatif IC-RT-real-time PCR sonuçları

No.	Renk	Örnek no	Tip	Ct	Verilen konsanrasyon (pg/ul)	Ölçülen konsantrasyon (pg/ul)
31		26	Desire sürgün	18,32		28,0700
32		27	Desire sürgün	18,16		31,1252
33		28	Desire sürgün	18,32		28,0618
34		29	Desire sürgün	14,66		310,7821
35		30	Desire sürgün	18,91		19,0728
36		31	Desire sürgün	19,79		10,6882
37		32	Desire sürgün	19,33		14,4755
38		33	Desire sürgün	19,28		14,9579
39		34	Desire sürgün	18,86		19,7507
40		35	Desire sürgün	17,63		44,2832
41		36	Desire sürgün	18,97		18,3607
42		37	Desire sürgün	19,06		17,3388
43		38	Desire sürgün	18,63		22,9392
44		39	Desire sürgün	19,24		15,3526
45		40	Desire sürgün	18,77		20,9761
46		41	Desire sürgün	22,46		1,8607
47		42	Desire sürgün	19,41		13,7904
48		43	Desire sürgün	18,06		33,2310
49		44	Desire sürgün	18,79		20,6674
50		45	Desire sürgün	18,56		24,0097
51		46	Desire sürgün	18,48		25,2949
52		47	Desire sürgün	18,02		34,2815
53		48	Desire sürgün	18,38		27,0300
54		49	Desire sürgün	18,68		22,1930
55		50	Desire sürgün	18,50		24,9737

ÖZ GEÇMİŞ

Vildan BOLAT 18.02.1991 yılında Mersin’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Mersin’de tamamladı. 2013 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünden mezun oldu. Yükseköğreniminin bir sene sonra Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi Bitkisel Üretim ve Teknolojileri Bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı.

