



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

KIRGIZİSTAN’DA YETİŞTİRİLEN PATATES YUMRULARINDA PATATES Y
VİRÜSÜ ENFEKSİYON DURUMU ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

NURDİNBEK TEMİRBEK UULU

Eylül 2019

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

KIRGIZİSTAN'DA YETİŞTİRİLEN PATATES YUMRULARINDA PATATES Y
VİRÜSÜ ENFEKSİYON DURUMU ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

NURDİNBEK TEMİRBEK UULU

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Prof. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE

Eylül 2019

Nurdinbek Temirbek UULU tarafından **Prof. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE** danışmanlığında hazırlanan “**Kırgızistan’da Yetiştirilen Patates Yumrularında Patates Y Virüsü Enfeksiyon Durumu Üzerine Araştırmalar**” 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 Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi |



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Eminur ELÇİ Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi |

ONAY:

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

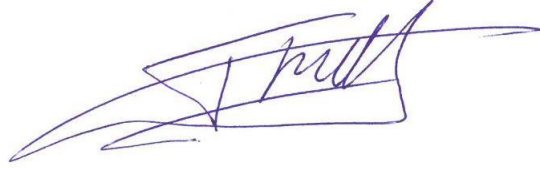
...../...../20...

Doç. Dr. Murat BARUT
MÜDÜR

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.

Nurdinbek TEMİRBEK UULU



ÖZET

KIRGIZİSTAN’DA YETİŞTİRİLEN PATATES YUMRULARINDA PATATES Y VİRÜSÜ ENFEKSİYON DURUMU ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

TEMİRBEK UULU, Nurdinbek
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitkisel Üretim ve Teknolojileri Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Çiğdem Ulubaş Serçe

Eylül 2019, 50 sayfa

Kırgızistan’da fitopatoloji ve özellikle viroloji alanında uzmanların az olması nedeniyle, ülkede bu alandaki çalışmalar yok denecek kadar az ve sınırlıdır. Bu nedenle çalışmanın amacı, Kırgızistan’da patates yetiştiriciliğinin en yaygın olduğu alanlardan temin edilecek tohumluk patates yumrularında, PVY virüsünün araştırılması ve ırklarının belirlenmesidir. PVY bitkinin tüm aksamında bulunabilmekte, arazide vektör yaprak bitleri ile taşınmaktadır. Virüsün özellikle nekrotik ırkları yumruda ciddi kayıplara veya pazar değerinin düşmesine neden olmaktadır. Kırgızistan’da Issık Göl ve Çüy bölgelerinden temin edilen Sante , Jelly ve Pikaso patates çeşitlerine ait toplam 141 patates yumrusu sürgünlerinden DAS-ELISA testi gerçekleştirilmiş ve yumruların % 48,9’unun PVY ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. PVY enfekteli örneklerdeki virüsün ırkını belirlemek için multiplex IC-RT-PCR gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak yumrulardaki PVY ırklarının nekrotik rekombinant ırlardan PVY-NW-A veya -B olduğu, bir yumruda ise PVY-NW:O ırklarının karışık bulunduğu belirlenmiştir. Virüsün araştırılan tohumluk yumruların yaklaşık yarısında bulunması ve en zararlı ırk olan nekrotik ırkları barındırması, ülkede tohumluk patates üretiminde tedbirlerin alınmasını gerektirmektedir. Bu çalışma ile Kırgızistan’da, PVY virüsü ve ırkları ilk kez tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: PVY, patates, yumru, IC-RT-PCR, DAS-ELISA

SUMMARY

RESEARCH ON THE POTATO VIRUS Y INFECTION IN POTATO TUBERS GROWN IN KYRGYZSTAN

TEMİRBЕК UULU, Nurdinbek
Niğde Ömer Halisdemir University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Production and Technologies

Supervisor : Prof. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE

September 2019, 50 pages

In Kyrgyzstan because of the small number of specialists in phytopathology and virology in particular, studies in this field are very limited. Therefore, the aim of this study is to investigate and determine the strains of PVY virus in seed potato tubers to be obtained from the areas where potato cultivation is the most common in Kyrgyzstan. PVY can be found on all parts of the plant and is transmitted in the field with vector aphids. Especially necrotic strains of the virus cause serious losses in the tuber or decrease in market value. DAS-ELISA tests were performed from 141 potato tuber shoots of Sante, Jelly and Pikaso potato varieties obtained from Issık Lake and Chui regions in Kyrgyzstan. Among them, 48.9% of tubers were found to be infected with PVY. Multiplex IC-RT-PCR was performed to determine the strain of the virus in PVY infected samples. As a result, it was determined that PVY strains in tubers were PVY-NW-A or B among necrotic recombinant races and PVY-NW: O mix strains were also found in a tuber. The fact that the virus is found in approximately half of the investigated seed tubers and that it contains the most harmful necrotic strains requires taking measures in the production of seed potatoes in the country. In this study, PVY virus and strains were the first records in Kyrgyzstan.

Key words: PVY, potato, tuber, IC-RT-PCR, DAS-ELISA

ÖN SÖZ

Yüksek lisans tez çalışmamın yürütülmesi esnasında çalışmalarına yön veren, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve bana her türlü desteği sağlayan danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE'ye sonsuz teşekkür ederim.

Özellikle laboratuvar ve sera çalışmalarında yardımcı olan, sevgili arkadaşlarım Muhammet EKEMEN, Seda AYDINLIK ve Salih YILMAZ'a çok teşekkür ederim.

Yüksek Lisans Eğitimim kapsamında, 2 yıl süre ile tarafıma karşılıksız burs sağlayan Ayhan Şahenk Vakfı'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ÖN SÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGE VE KISALTMALAR	xii
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II GENEL BİLGİLER	7
2.1 Patates Yetiştiriciliği	7
2.2 Patatesin Tarihi	8
2.3 Patates Y Virüsü	9
2.4 Kırgızistan’da Patates Y (PVY) Virüs Hastalıkları	15
BÖLÜM III MATERYAL VE METOD	16
3.1 Araştırma Materyali	16
3.2 PVY Enfeksiyonlarının Araştırılması	16
3.3 Immunocapture- Reverse Transcription – Multiplex Polymerase Chain Reaction (IC-RT-PCR) Analizi	19
3.3.1 Immuno-capture (IC) aşaması (Viral partiküllerin antiserum ile tüplerde yakalanması)	19
3.3.2 Reverse transcription aşaması (RNA moleküllerinin DNA’ya dönüştürülmesi complementer DNA elde edilmesi)	20
3.3.3 PVY ırk tayini belirlemek amacıyla multipleks PCR aşaması	20
3.4 Seçilen PVY Irklarının Tütün Bitkilerine İnokulasyonu ve ELISA Testi	23
BÖLÜM IV BULGULAR VE TARTIŞMA	25
BÖLÜM V SONUÇLAR	35
KAYNAKLAR	37
EKLER	46
EK 1: DAS-ELISA Testinde Kullanılan Buffer ve İçerikleri	45
EK 2: İnokulasyonda Kullanılan Fosfat Buffer	47

EK 3: Kırgızistan'dan Temin Edilen Patates Yumrularında Tespit Edilen PVY	
İrklarının Múltipleks PCR Sonrası Oluşturdukları Amplikonlar.....	48
ÖZ GEÇMİŞ.....	50



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Kırgızistan'nın bölgelerine göre patates üretimi	2
Çizelge 2.1. PVY'nin ana ırklarının serolojik ve moleküler özelliklerine göre genetik sınıflandırılması	11
Çizelge 3.1. Reverse transcription ile cDNA elde etmede kullanılan karışım	20
Çizelge 3.2. PCR reaksiyon karışımı	21
Çizelge 3.3. IC-RT-Multipleks PCR analizinde kullanılan primerler ve dizileri	23
Çizelge 3.4. Multipleks PCR reaksiyon karışımı.....	23
Çizelge 4.1. Kırgızistan'dan temin edilen tohumluk patateslerin çeşitleri ve sayısı	25
Çizelge 4.2. Kırgızistan'dan temin edilen patates yumrularının saksıda toprakta geliştirilen sürgünlerine <i>Potato virus Y</i> (PVY)'ye karşı gerçekleştirilen DAS-ELISA testinin örneklerin temin edildiği bölgeler ve çeşitlere göre sonucu	26
Çizelge 4.3. Kırgızistan'dan temin edilen patates yumrularının saksıda toprakta geliştirilen sürgünlerine <i>Potato virus Y</i> (PVY)'ye karşı gerçekleştirilen DAS-ELISA testi sonucu.....	27
Çizelge 4.4. Patateste <i>Potato virus Y</i> (PVY) izolatlarının ırklarının multipleks PCR ile belirlenmesinde ırklara göre oluşması beklenen fragmentler.....	32
Çizelge 4.5. Kırgızistan'dan temin edilen patates yumrularında belirlenen PVY ırkları ve oranları	32
Çizelge 4.6. Seçilen PVY ırklarının tütün bitkilerine inokulasyonu sonucu bitkilerin DAS – ELISA ile testi sonuçları.....	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kırgızistan haritası.....	1
Şekil 2.1. Potato virus Y ‘nin genom yapısı	11
Şekil 2.2. Kuzey Amerika ve Avrupa’da bulunan PVY rekombinantların rekombinasyon noktalarının şematik ifadesi	12
Şekil 3.1. Kırgızistan’da patates yumru örneği alınan bölgeler.....	16
Şekil 3.2. Kaplama aşaması, ELISA plakasına spesifik antibadi absorbe edilmesi	17
Şekil 3.3. Bilyalı ezme robotunda patates yapraklarının tampon çözelti ile ezilmesi	18
Şekil 3.4. Konjugat IgG 1:1000 oranında her kuyuya 100 µl eklenmesi.....	18
Şekil 3.5. ELISA testi sonucunda kuyucuklarda sarı renk reaksiyonu gelişimi	19
Şekil 3.6. PVY ırklarının genomik yapıları ve ırk tespitinde kullanılan primerlerin genom üzerindeki yerleri	21
Şekil 3.7. Multipleks PCR uygulaması	22
Şekil 3.8. PVY enfekteli patates örneklerinin tütün bitkilerine inokule edilmesi	24
Şekil 4.1. Araştırmada kullanılan patates yumruları.....	25
Şekil 4.2. Araştırmada kullanılan farklı patates çeşitlerine ait yumrulardan gelişen sürgünler	26
Şekil 4.3. DAS-ELISA testi sonucu PVY enfekteli olduğu tespit edilen Kerege – Taş köyünden temin edilen, cv. ‘Picasso’ patates çeşidi, 13 nolu patates örneğinin yapraklarında damar açılması ve mozayik belirtiler	29
Şekil 4.4. DAS-ELISA testi sonucu PVY enfekteli olduğu tespit edilen Tasma Köyünden temin edilen, cv. ‘Jelly’ patates çeşidi, 59 nolu patates örneğinin yapraklarında damar açılması ve mozayik belirtiler	29
Şekil 4.5. DAS-ELISA testi sonucu PVY enfekteli olduğu tespit edilen Madanyat Köyünden temin edilen, cv. ‘Sante’ patates çeşidi, 90 nolu patates örneğinin yapraklarında damar açılması ve mozayik belirtiler	30
Şekil 4.6. PVY izolatlarının Immunocapture ve Reverse Transkripsiyon sonrası PCR yöntemi ile kontrol edildiği agaroz jel. M: 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific), K su kontrol, rakamlar izolat numaralarıdır	31

Şekil 4.7. PVY izolatlarının Immunocapture ve Reverse Transkripsiyon sonrası multipleks PCR yöntemi ile ırklarının belirlendiği agaroz jel. M: 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific), K su kontrol, rakamlar izolat numaralarıdır.....	31
Şekil 4.8. <i>Nicotiana benthamiana</i> tütün çeşitlerine inokule edilen PVY ırklarının oluşturduğu simptomlar	33



SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrat Derece
g	Gram
ha	Hektar
kg	Kilogram
mg	Miligram
Min/dk	Dakika
ml	Mililitre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
ng	Nanogram
rpm	Santrifuj işleminde dakikadaki devir sayısı
t	Ton
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar

Kısaltmalar

cDNA	Tamamlayıcı DNA
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Dinükleotidtrifosfat
EtBr	Etidyum Bromür
EtOH	Etanol
NaN ₃	Sodyum Nitrat
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
NaCl	Sodyum Klorür
KCl	Potasyum Klorür
MgCl ₂	Magnezyum Klorür

PVP

Polivinilpirolidon

BSA

Bovine Serum Albümin



BÖLÜM I

GİRİŞ

Kırgızistan Orta Asya'da yer almaktadır. Yüzölçümü 198.500 km² olup, dünyada yüzölçümü bakımından 86. sırada yer almaktadır (Şekil 1.1). Komşuları kuzeyde Kazakistan, batıda Özbekistan, güneybatıda Tacikistan ve güneydoğuda Çin'dir. Tanrı Dağları ülkenin %65'ini kaplar ve ülke bu yüzden "Orta Asya'nın İsviçre'si" olarak adlandırılır. Tanrı Dağları'nın kuzey batısında bulunan ve ülkenin en büyük gölü olan Issık Gölü, Titikaka Gölü'nden sonra dünyanın en büyük dağ gölüdür. Kırgızistan topraklarının büyük kısmı dağlarla kaplıdır. 3000 metreye kadar olan dağlar toprakların yarısından fazlasını kaplar. Ülke ekonomisi tarım ve madencilığe dayalıdır. Daha çok hayvancılık kesimi ağırlıklı bir tarım ekonomisi hâkimdir. Başlıca tarım ürünleri buğday, arpa, patates, şekerpancarı, mısır, tütün, sebze ve meyvedir.



Şekil 1.1. Kırgızistan haritası

Ülkede buğday ve arpadan sonra en çok yetiştirilen ürün grubunu sebze ve patates oluşturmaktadır. Bu ürünlerin yetiştiriciliğinde önemli olan faktörlerden birisi de bitki hastalıkları olup, bunlar içerisinde virüs hastalıkları, tedavi edici yöntemlerinin çok sınırlı olması, bitki hastalandıktan sonra hastalığın önüne geçilmesinin mümkün olmaması nedeniyle önemli olmaktadır. Dünyada bitki koruma tedbirlerinin iyi uygulanmaması sonucu her yıl yaklaşık 129.188.000 ton ürün kaybı olmaktadır

(Cramer., vd 1967). Bu kaybın %32,3'nü hastalıklar, %9,7'sini zararlılar ve % 6,9'nu yabancı otlar oluşturmaktadır (Cramer, 1967).

Anavatanı Güney Amerika olan ve And Dağları eteklerindeki arazilerde yerli halk tarafından yüzyıllardır doğal olarak yetiştirilen *Solanaceae* familyasına ait olan patates (*Solanum tuberosum* L.), 16. yüzyılın ikinci yarısında Amerika kıtasının keşfinden sonra İspanyollar tarafından Avrupa'ya getirilmiştir (Brush, 1980). İlk olarak İngiltere, İrlanda ve İskoçya'ya, daha sonra diğer Avrupa ülkelerine yayıldığı bilinmektedir. Sömürgeleştirme ile Avrupa'dan diğer kıtalara yayılmıştır (Hawkes, 1993). Kırgızistan'a patates Ruslar tarafından 1917. yıllarda getirilmiştir. Ülkede yetiştirilen en önemli patates çeşitleri Sante, Pikaso, Jelly, Jelly2, Super Jelly, Super Ranniy, Nevskiy, Rokko, Rivera'dır. 2017 verilerine göre Kırgızistan'da 84,5 bin hektar alanından 1,5 milyon ton patates üretilmiştir (Çizelge 1.1). Bu üretilen patatesin 800-900 bin tonu ülke içinde tüketilmekte olup geri kalan 600 bin tonu dışarıya ihracat edilmiştir (Sputnik, 2017)

Çizelge 1.1. Kırgızistan'nın bölgelerine göre patates üretimi (Sputnik, 2017)

Bölge	Alan (bin/hektar)	Ortalama verim(t/ha)	Üretim (bin t)
Issık-Göl	27,5	18,75	527,9
Chüy	14,1	16,29	179,8
Osh	11,8	15,21	179
Talas	11,6	17,11	-
Djalal-Abad	8,6	14,13	115,5
Narın	6,0	14,13	-
Batken	2,4	14,07	33,7

Dünyada patates yetiştiriciliğinde karşılaşılan en önemli bakteriyel hastalıklardan solgunluk ve patates kahverengi çürüklüğü hastalığı (*Ralstonia solanacearum*), patates halka çürüklüğü hastalığı (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*), patateste bakteriyel yumuşak çürüklük karabacak hastalığı (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *E. chrysanthemi*), solanaceae familyası kültür bitkilerinde stolbur hastalığı, patateste adi uyuz hastalığı (*Streptomyces scabies*)'dir. En yaygın fungal hastalıklar ise patateste erken yanıklık hastalığı (*Alternaria solani*), patates siğil hastalığı (*Synchytrium endobioticum*), patates

mildiyösü (geç yanıklık) hastalığı (*Phytophthora infestans*), patates kuru çürüklük hastalığı (*Fusarium* spp.)'dır. Böcek zararlısı olarak patates böceği (*Leptinotarsa decemlineata*), patates güvesi (*Phthorimaea operculella*), telkurdu (*Agriotes* spp.), bozkurt (*Agrotis* spp.), yaprakbitleri (*Macrosiphum euphorbiae*), yaprak pireleri (*Empoasca decipiens*) ve *Asymmetrasca decedens* 'dir. Nematod problemleri patates kist nematodları (patates altın nematodu (*Globodera rostochiensis*) ve patates beyaz kist nematodu (*G. pallida*), kök-ur nematodları (*Meloidogyne* spp.), patates çürüklük nematodu (*Ditylenchus destructor*) ve soğan sak nematodu (*Ditylenchus dipsaci*) 'dur.

Patates bitkisinde en çok sorun olan virus ve benzeri hastalıklar ise patates Y virüsü (*Potato Y potyvirus*, PVY), patates yaprak kıvrılma virüsü (*Potato leafroll luteovirus*, PLRV), patates X virüsü (*Potato X potexvirus*, PVX) ve patates A virüsü (*Potato A potyvirus*, PVA)'dır.

Yukarıda değinilen hastalıkların dünyada yayılma alanları çok geniştir. Ancak, Kırgızistan'da bu hastalıkların hiçbirine ait kayıt bulunmamaktadır.

Virüs hastalıkları çok çeşitli yollarla yayılabildiklerinden ve enfeksiyon görüldükten sonra bitkilerin tedavisinin pratik ve ekonomik olmaması yüzünden bitki virüslerinin yayılmasını önlemek başlıca korunma yoludur; fakat bu da her hastalık için değişik olabilir. Virüs hastalıklarını önlemek için uygulanan metotlar; viral etmenlerin ülkeye girişine engel olmak (karantina tedbirleri), virüs enfeksiyonu kaynaklarının yok edilmesi, vektörlerden kaçınmak, doğrudan doğruya vektörlerle savaşmak, dayanıklı çeşitler yetiştirmek, özel üretim metotları ile virüsten arı bitki materyali elde etmektir.

Patates Y Virüsü (*Potato virus Y*; PVY) viral bir hastalık etmeni olup, patates, domates, biber, tütün, yabancı otlardan yıldız çiçeği ve boru çiçeği gibi bitkiler konukçuları arasındadır. Virüs şiddetli enfeksiyon durumlarında bitkiyi öldürür, fakat daha çok ürün kaybına neden olur. Virüs yaprak bitleri ile kalıcı olmadan (non-persistent) taşınır. Böcek beslenme esnasında virüsü alır ve kısa bir zaman içerisinde hemen sağlıklı bitkilere bulaştırır.

Patatesteki PVY'nin oluşturduğu hastalık belirtileri çeşitlerin hassasiyetine göre değişir. Yapraklar benekli, sarı olabilir ya da ölü dokulara sahiptir. Ölü alanlar yaprakçıklarda

çoğunlukla yama ya da halkalar şeklinde başlar ve tüm yaprağı kapsayacak şekilde etkilemesi devam eder. Yaprakçıkların tamamı hastalanır ve bitkiden kopabilir ya da bitkide asılı kalabilir. Yapraklarda beneklenmeye ilave olarak, şiddetli yaprak kıvrılması ortaya çıkabilir. Kahverengi şerit şeklinde çizgiler yaprak damarı, yaprak sapı ve gövdede ortaya çıkabilir. Enfekteli yumrulardan çıkan bitkiler çoğunlukla bodur ve benekli, kıvrık yapraklara sahiptir. Yapraklar genellikle sarı yeşil mozayik semptomlara sahiptir. Yapraklar ve gövde bazı durumlarda ölmektedir. Enfekteli bitkilerden alınan yumruların kabuğunda hafif kahverengi halka şeklinde lekeler görülebilir. Enfeksiyonun geç ortaya çıktığı durumlarda bitkilerde sadece yumru belirtisi ortaya çıkabilir.

PVY son yıllarda yeni ırklarının da gelişmesiyle, özellikle yumrularda çok etkili zararlar meydana getirmeye başlamıştır. Yumrularda kalitenin düşmesine ve tohumluk yumruların tamamen yok olmasına sebep olan ırklar ortaya çıkmıştır.

Patates üretiminde 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 Huttinger, 1981). PVY'nin beş tip ırkı vardır: PVY^O, PVY^C, PVY^N, PVY^Z ve PVY^E (Sorri vd., 1999; Galvino-Costa vd., 2012; Kerlan vd., 1999; Kerlan vd., 2011; , Singh vd., 2008). Bu ırklar Ny, Nc, ve Nz dayanıklılık genlerini içeren patates çeşitleri ve tütündeki (*Nicotiana tabacum*) semptomlara göre tanımlanmış ve gruplandırılmıştır. PVY ırkından PVY^N “nekrotik” PVY^N ırkı olarak da adlandırılır (Boonham vd., 2002). 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 semptomları hafiftir ya da bazı patates çeşitlerinde semptom görülmemektedir (Piche vd., 2004; Sagredo vd., 2009). Zarar doğrudan yumrularda olduğundan PVY'nin en tehlikeli ırkıdır. Bu ırkın farklı rekombinant grupları mevcuttur.

Bitki virüslerinin en yaygın teşhis yöntemi serolojik testlerden ELISA metodudur. ELISA uygulamasının kolay olması ve fazla teknik bilgi gerektirmemesinden dolayı kullanımı yaygındır. Ancak testin uygulama alanı etmene spesifik üretilen antiserum ile sınırlı olup, virüs konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda, özellikle yumru ve

dormant doku testlerinde yanlış negatif sonuçlar verebilmektedir. Virüsler dormant patates yumrularında ELISA yöntemi ile duyarlı ve güvenilir şekilde belirlenememekte ve dormansilerinin kırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Spiegel ve Martin, 1993; Russo vd., 1999; Singh ve Singh, 1996; Loebenstein vd., 1997; Singh vd., 1999). 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).

ELISA'ya göre PCR yöntemleri 100-10.000 kat daha duyarlı ve spesifiktir (Vunsh vd., 1990; Korschineck vd., 1991; Rowhani vd., 1995). Yukarıda sayılan 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 ELISA tekniğine göre daha fazla zamana ihtiyaç duyulduğu, özellikle fazla sayıda örnek testlemelerinde pratik ve ekonomik olmadığı, daha yoğun iş gücü gerektirdiği, ekonomik olmadığı, kalifiyeli elemana ihtiyaç duyulduğu bilinmektedir (Barker vd., 1993; Russo vd., 1999; Singh vd., 1999).

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 (Saiki vd., 1988; Langeveld vd., 1991; Mathews, 1993); odunsu dokularda (Korschineck vd., 1991; Rowhani vd., 1995); dormant yumrularda (Spiegel ve Martin, 1993; Russo vd., 1999) ve afitlerde (Spiegel ve Martin, 1993; Singh vd., 1996; Singh vd., 1997) düşük yoğunluklarının bile belirlenebilmesine imkan vermektedir. Bununla beraber, PCR çalışmalarında başarıyı etkileyen birçok faktör bulunup, patatesteki virüslerin *in vitro* koşullarda elde edilen mikro yumrularda, sertifikasyon programlarında, sürvey çalışmalarında ve virüslerin taşınmasında rol oynayan afitlerde belirlenmesinde diğer bir tanı tekniği olan ELISA'ya göre bazı avantaj ve dezavantajları vardır.

PVY ırklarının teşhisinde kullanılabilen bazı antiserumlar mevcuttur. PVY ırklarını ayıran antiserumlar geliştirilmiş olsa bile bazı izolatlarda çapraz reaksiyon vermektedir (Kogovsek vd., 2008). Tüm PVY ırklarına geliştirilmiş antiserumlar bulunmamaktadır.

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. 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. (2008a) 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).

Kırgızistan'da patates tarımında karşılaşılan hastalıklar konusunda sınırlı çalışmalar mevcut olup daha çok bakteriyel etmenler konusunda bulunmaktadır. Ülkede patates yetiştiriciliği yapılan alanlarında bakteriyel solgunluk hastalığı etmeni *Ralstonia solanacearum* tespit edilmiş, bu etmenle mücadelede antagonist *Streptomyces* bakterilerin kullanılabilirliği araştırılmıştır (Dööltekeldieva ve Bobuşeva, 2014; 2016). Ülkede patatesde yumuşak çürüklük yapan *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*'nın kontrolünde *Streptomyces* türlerinin etkinliği araştırılmıştır (Dööltekeldieva vd., 2016). Diğer patojenlerle ilgili kayıtlar bulunmamaktadır.

Yürütülen bu çalışmada, Kırgızistan tarımı için önemli bir kültür bitkisi olan patates bitkisinde PVY virüsünün varlığı ve ırklarının belirlenmesi hakkında ilk çalışmalar yapılmıştır.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

2.1 Patates Yetiştiriciliği

Solanaceae familyası, bir veya çok yıllık otsu bitkilerden oluşur, ayrıca tırmanıcı, çalı ve ağaç formunda bitki türleri de vardır. Tropan alkoidleri taşıyan bu familya bitkileri eczane ilaçları yapımında kullanılırlar ve zehirlidirler. Ayrıca sebze bitkileri içeren geniş bir familyadır. *Solanaceae* ailesi, 90 tür ve yaklaşık 4000 türden oluşmuş olup, dağılımı ve yaşam alanlarında büyük farklılıklar vardır. Bu ailenin içinde biber (*Capsicum* spp), patates (*Solanum tuberosum* L.), patlıcan (*S. melongena*) ve domates (*S. lycopersicum*) gibi önemli kültür bitkileri vardır (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.

S. tuberosum, triploid, diploid ve tetraploid kromozom sayılarına sahip olabilirler. Tetraploid çeşitleri iki gruba ayrılır: 1. grup *Tuberosum* ve 2. grup *Andigena* grubudur (Cribb ve Hawkes, 1986). Birinci grup olan *tuberosum* alttürü, Avrupa'da ve Kuzey Amerika'da yaygın olarak yetiştirilen patates cinsidir. *Andigena* alttürleri de ekili bir türdür, ancak yetiştiriciliği Güney ve Orta Amerika ile sınırlıdır (Hawkes, 1990).

Patatesler küçük yumrulardan, yumru parçalarından ve ıslah amaçlı tohumlardan vejetatif olarak çoğaltılırlar. Patates 5-10 cm derinliğe dikilir. Yumruların toprakta çimlenmesi 5-8°C'de başlar (patates çimlenmesi için optimum sıcaklık 15-20°C'dir). Yaprakların büyümesi, çimlenmesi ve yaprakların fotosentez yapabilmeleri için gerekli sıcaklık 16-22°C dir. Yeni yumruların oluşabilmesi için gerekli olan gece hava sıcaklığı 10-13°C'dir. Yüksek sıcaklıklar (20°C ve üstü gece sıcaklıkları) termal dejenerasyona neden olur. Hava sıcaklığı -2°C olduğunda sürgünler ve genç bitkiler zarar görür ve don olayı olur. Patatesin terleme katsayısı ortalama 400–500 arasındadır. En fazla su tüketimi bitkide çiçeklenme ve yeni yumru oluşturma zamanında gözlenir. Aşırı nem patatesler için zararlıdır. Bitkinin gelişmesi için birçok besin maddesi gerekir. Örneğin bir hektar alandaki patatesler için toprakda 100-175 kg azot, 40-50 kg fosfor ve 140-230

kg potasyum olması gerekir. Patates her türlü toprak yapısında yetişir ama en iyi verim derin, süzek ve organik maddece zengin, kumsal yapılı topraklardan alınır. En iyi gübreler potas tuzları, daha sonra kemik unu, kireç tozu, çürümüş hayvan gübresidir. Patates bitkisi için toprakta fazla azot olması zararlıdır (Golovkin., vd 2007).

Patates çeşitlerinin çoğu, kromozom sayısı 48 olan tetraploidlerdir ($2n = 4x = 48$). Buna göre, haploid patates setinde 12 kromozom bulunur. Genom büyüklüğü yaklaşık 844 MB'dir. Ekili çeşitler, yüksek heterozigotluk ile karakterize edilir, çeşitli fitopatojen ve zararlılara karşı duyarlıdır, üreme problemlerinden kötü şekilde etkilenirler. Bu özellikler, tetraploidi ile birlikte, klasik patates seçimini önemli ölçüde zorlaştırmaktadır. Patates genomu, 2011 yılında Uluslararası Patates Sıralama Konsorsiyumu tarafından dizilenmiştir (FAOSTAT, 2017). Bu ekibin yapısı, Rusya dahil, farklı ülkelerden gelen 16 bilim grubunu içermiştir.

2.2 Patatesin Tarihi

Patatesin anavatanı Güney Amerika, Peru'dur. Güney Amerika'da hala yabani patates çeşitler bulunabilmektedir. Patates kültür bitkisi ve yemeklik olarak kullanılmaya yaklaşık 7-9 bin yıl önce Peru, Boliviya'da başlanmıştır. Avrupa'ya patates ilk olarak muhtemelen Cieza De Leon tarafından 1551'de İspanya'ya getirilmiştir. Daha sonra patates İtalya, Belçika, Almanya, Hollanda, Fransa, Büyük Britanya ve diğer Avrupa ülkelerine yayılmıştır. Patates Avrupa'da ilk önce zehirli süs bitkisi olarak kabul edilmiş, daha sonra yemek olarak kullanmaya başlanmıştır (Mamanov., vd 2001).

Kırgızistan Eski İpek Yolu boyunca, Asya'nın merkezinde yer alan bir ülkedir, Kırgızistan'a patates 19. Yüzyılın başında Ruslar tarafından getirilmiştir. Patates ilk olarak Kırgızistan'ın güney bölgesinde yetiştirilmeye başlanmıştır. Şu an patates insanların ikinci ekmeği olarak sayılmaktadır (FAOSTAT, 2008). 20. yüzyılın sonlarında patates üretimi hızlı şekilde yükselmeye başlamış, 1992'de bir yılda üretilen patates miktarı 360.000 ton iken 2007'de 1.36 milyona çıkarak dört kat artmıştır (FAOSTAT, 2008).

Kırgızistan'da üretilen patatesi kişi başına göre hesapladığımızda dünyada en çok patates üreten ülkeler arasında 10. sırada yer almaktadır ve yıllık kişi başı patates tüketimi ortalama 160 kilodur (FAO, 2017).

2.3 Patates Y Virüsü

Patates vejetatif olarak çoğaltılan bir bitkidir, bu sebepten dolayı virüs ve başka bitki hastalık patojenlerinin yayılımı yaygın bir durumdur (Khurana, 2004). Bitkilerde virüs hastalıkları dünya genelinde birçok bitki üzerinde önemli etkilere ve kayıplara neden olabilir. Bitkilere virüs hastalığının ulaşmasına birçok sebep olabilir, bu sebepler virüs türlerine, inokulum tipine, konukçu bitki özelliklerine, vektör basıncına, iklim koşullarına, ticarete, tarımsal alandaki değişikliklere ve yoğun üretim uygulamalarına bağlıdır. Virüsler, bitkilerde şekil değişikliği, pigmentasyon, nekroz gibi değişik semptomlara neden olarak bitki gelişimine etki gösterebilirler ve bitki veriminin ve kalitesinin düşmesine yol açabilirler (De Bokx., vd 1981) . Patatesi etkileyen çok sayıda virüs vardır; ancak bunlar arasında, PVY dünya çapındaki yayılımı ve ekonomik etkisi nedeniyle, bitkilerin en önemli patojen virüslerinden biri olarak kabul edilir (Scholthof 2011). PVY'nin bazı ırkları enfekte olmuş yumru köklerinde patates halka damarı nekrotik hastalığına neden olur ve ürünü pazarlanamaz hale getirir (Lacomme., vd 2017).

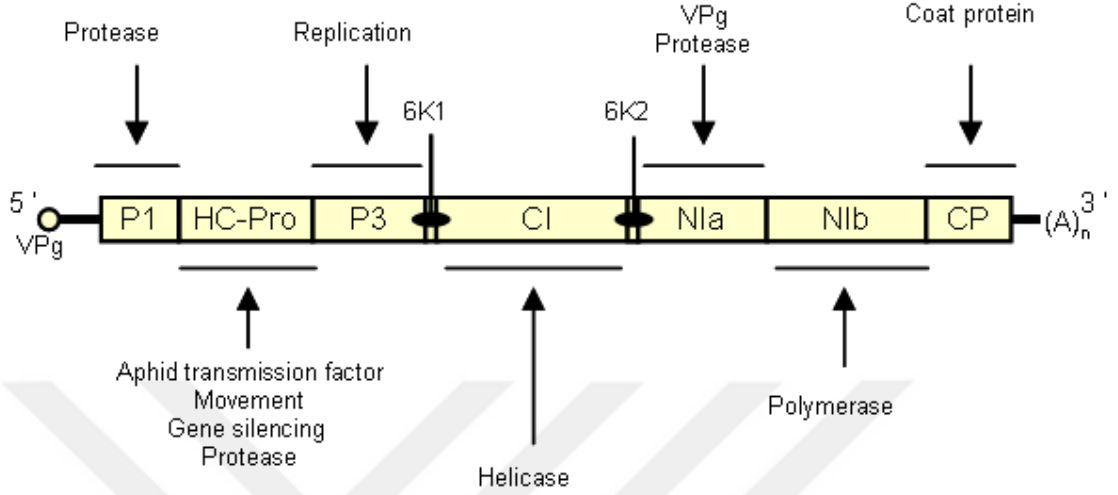
Virüsler dahil patojenlerle enfekte olan bitkiler, hastalığa uyumlu veya uyumsuz bir etkileşim gösterir. Uyumsuz bir etkileşimde, bitkiler hücre istilasını ve virüs replikasyonunu kısıtlayarak bir virüse karşı durabilirler (Cooper ve Jones, 1983). Uyumlu bir etkileşim gösteren bitkilerde virüsler bitkiye girip çoğalmaya başlarlar . Bu etkileşimler konakçı genotipine, virüs izolatının yapısına ve enfeksiyona karşı konakçı duyarlılığının derecesine bağlıdır (Hinrich-Berger., vd 1999). Bir bitkinin virüs enfeksiyonuna tepkisi, bitkinin çevresel koşullardan etkilenen çeşitli gelişimsel ve fizyolojik büyüme aşamaları boyunca değişebilir (Cooper ve Jones, 1983). Bir bitkiyi başarıyla istila etmek için, virüs bitkinin hücrelerine içeri girip sistemik olarak hareket eder. Tüm etkileşimlerde, PVY ile enfeksiyon, konakçı bitkinin hücrelerinin transkriptomun yeniden programlanmasına neden olur ve çok sayıda sitolojik, biyokimyasal ve fizyolojik değişikliklerle sonuçlanır.

Obligat parazit olan bitki virüslerinin hayatta kalabilmeleri için başka bitkilere aktarılması gerekir. Deneysel olarak yapılan çalışmalarda PVY yaralanma ve aşılama gibi mekanik yollarla bitkilere bulaşabilir. Vejetatif veya mekanik olarak enfekte olan PVY virüsleri, tohum yumrularının yaralanması ve kesilmesi yoluyla bulaşabilir (Ragsdale vd., 2001).

PVY'nin persistent olmayan bir şekilde birçok afid türü ile taşındığı rapor edilmiştir ve afidler ile bir çok *solanaceae* familyasında olan yada olmayan bitkilere ve ayrıca yabancı otlara, süs bitkilerine de taşındığı rapor edilmiştir. Yaprak bitleri, bitkilerde PVY virüsü hastalıkları için en önemli taşıyıcılardır. Arazi koşullarında PVY, *Myzus persicae* ve *Macrosiphum euphorbiae* gibi kolonize olan yaprak bitleri tarafından taşınır (Ragsdale vd., 2001). Patates bitkisindeki bazı kolonileşmemiş yaprak bitleri de PVY'nin düşük bir hızla taşınmasında etkili olabilir. Patates bitkilerinde yaprak biti sayısı düşük oranda kolonize olmasına rağmen, yüksek oranda virüs enfeksiyona neden olabilmektedirler (Singh vd., 1996). PVY ırklarının taşınma kapasitesi yaprak bitleri vektörlerine göre farklılık gösterebilir (Basky ve Almási, 2005; Fereres vd., 1993). Virüs, vektörü ve çevre arasındaki etkileşimler karmaşıktır. Bir çok çalışmada bu etkileşimlerin moleküler temeli ve hastalık gelişimi üzerindeki etkilerine odaklanılmıştır.

Zarfsız filamentli ve fleksibl yapısı olan PVY'nin virionları 700-1200 nm uzunluğunda, 11-12 nm çapındadırlar. 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 Vpg olarak adlandırılan genom bağlantılı bir protein bulunur (Şekil 2.1). Bu VPg'ler fenol veya deterjanla deproteinize edildiğinde enfektif olma yeteneğini korurlar. 3' ucunda mevcut olan poliA bölgesi bulunur, ancak enfeksiyon için gerekli değildir. Potyviruslerin genomu tek standart doğrusal RNA molekülüne sahip, yaklaşık 10 kb boyundadır (Hull, 2009). Enfekte olmuş hücrenin sitoplazmasında hareketli ve silindir şeklindeki viral protein 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. Subgenomik RNA üretilmez. PVY protein içeriği protein parçacıklarında yaklaşık %

94'tür. Viral parçacıklarda sadece iki protein olan VPg ve kılıf proteini (CP) bulunur. CP moleküllerinin ağırlığının yaklaşık 29.95 kDa olduğu hesaplanmıştır (Shukla ve Ward, 1988).



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

Dünyada patates üretim alanlarında PVY virüsleri yaygın olarak bulunmaktadır ve bazı ırkları sadece spesifik kıtalarla sınırlanmıştır (De Bokx ve Huttinga, 1981). 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 ırkları patatesde bulunan bir dizi direnç genine karşı reaksiyonlarına göre sınıflandırılır. Patatestte 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).

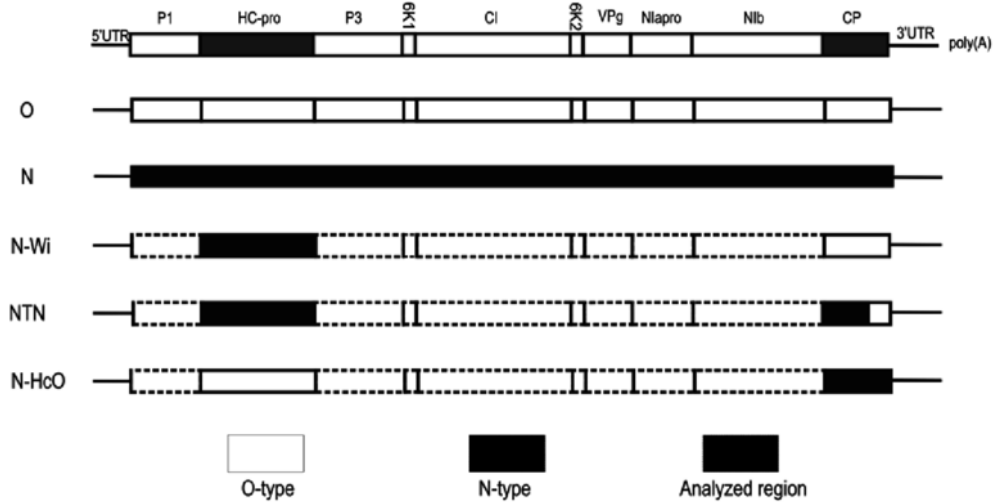
Çizelge 2.1. PVY'nin ana ırklarının serolojik ve moleküler özelliklerine göre genetik sınıflandırılması (Singh vd., 2008)

Örnek Patates çeşitleri	PVYO	PVYC	PVYZ	PVYN	PVYE
Desire, Petland Crown (Ny, Nc, Nz)	HR	S	S	S	S
King Edward (Ny, Nc, Nz)	S	HR	S	S	S
Maris Bard, Petland Ivory (Ny, Nc, Nz)	HR	HR	HR	S	S
Tütün	Mozayik	Mozayik	Mozayik	Damar nekrozu	Mozayik
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” ırk 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).



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

PVY^{NTN}, PVY^{N:O} ve PVY^{N-Wi} en yaygın rekombinantlardır. Bu rekombinantları tek nükleotid polimorfizmleri kullanılarak tasarlanan primerlerle RT-PCR veya multipleks RT-PCR ile tanılamak mümkündür (Boonham vd., 2002; Chikh Ali vd., 2010; Lorenzen vd., 2006; Rigotti ve Gugerli, 2007). Bunların dışında PVY^O ve PVY^N den farklı

rekombinant olmayan PVY^{NA-N} (Nie ve Singh, 2003b) ve rekombinant PVY^{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.

Patates bitkilerinde, PVY^O ırkı dünya genelinde görülür (Jeffries., vd 1998). PVY^N ırkı, Güney Amerika, Avrupa, Afrika ve Asya'da (Weidemann., vd 1988) ve Yeni Zelanda'da (Flecher., vd 1989) yaygın olup, Kanada'da karantina patojeni iken (Ellis vd., 1997), ABD'de bölgesel salgınlar kaydedilmiştir (Singh., vd 1992). Avrupa, Kuzey Amerika, Hindistan, Güney Afrika, Avustralya, Yeni Zelanda ve Ekvador'da (Jeffries., vd 1998) bilinen PVY^C ırkı bilinenden daha yaygın olması muhtemeldir. Bu yaygın ırklar dışında rekombinasyon ve farklı mekanizmalarla oluşan varyantlar 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-Wi} 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. PVY^N ırkı Güney Amerika kökenli PVY'nin yumruda nekrotik hasar oluşturur, yapraklarda PVY^O'dan daha hafif mozaikler meydana getiren bir ırkıdır (Weidemann., vd 1988). Bu ırkın yumrulara oluşturduğu hastalığa patates yumru nekrotik leke hastalığı (PTNRD) adı verilir. PVY^N tütün yapraklarında şiddetli nekroza neden olur ve enfekte olmuş bitkiyi öldürür (Jones, 1990).

PVY ırklarının oluşumu ve ırkların seçilme mekanizmaları hala belirsizdir. Düzeltilmemiş replikasyon hatası ile oluşturulan spontan mutasyonlar ve bitki hücrelerinin birlikte enfeksiyonu sırasında viral izolatlar arasındaki rekombinasyon olayları genetik çeşitliliğin muhtemel ana kaynağıdır (Scholthof., vd 2011). PVY^N ırkları ve PTNRD neden olan rekombinant PVY^{N-Wi} ve PVY^{NTN} ırkları, dünyanın yoğun patates yetiştiren bölgelerindeki rekombinant olmayan ırkların yerine geçmiştir. PVY

genomunun kısmi sekanslanması (P1, HC-Pro, CP, rekombinant bağlantılar) ve bütün genomun sekanslanması ile rekombinant olmayan ve rekombinant ırklarının patateslerde ve diğer bitki konaklarında mevcut olduğu saptanmıştır. Aslında filogenetik analizler rekombinant analiz için değil de, dallanma filogenlerini belirlemek için geliştirilmiştir. PVY karakterizasyonu üzerine devam eden dünya çapındaki çalışmalar, belirgin biyolojik özelliklere sahip yeni ırkların gelecekte ortaya çıkabileceğini göstermektedir. Yeni ortaya çıkan teknolojiler örneğin yeni nesil dizileme gelecekte PVY popülasyonunun dinamikleri ve evrimi hakkında değerli bilgiler sağlayacaktır.

PVY'nin dünya çapında yayılması, verimli patates üretimi için sürekli bir zorluk teşkil etmektedir. Virüslerin doğru teşhisi örneğin PVY virüs türlerinin geniş biyolojik ve genetik çeşitliliğinden dolayı zorluklar vardır ve bu da patates çeşitlerinde ve solanaceae familyası ile ilişkili türlerde farklı semptomlar ve hastalıkların meydana gelmesini teşkil eder. PVY'nin teşhisi için 50 yıllık bir süre zarfında çok çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Geniş oranda örneklerle uygulanabilme kapasitesi olduğundan ve uygun maliyeti nedeniyle, poliklonal ve özellikle monoklonal antikorları kullanılan serolojik method olan ELISA çoğu teşhis laboratuvarları tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda, PCR tabanlı analizler hassas, spesifik ve otomatikleşmiş kapasitelerinden dolayı yüksek verimli testler için kullanılmaya başlanmıştır. (C. Lacomme., vd 2017)

Rekombinant yapıları olan (örneğin, PVY^{NTN-NW} ve SYR-III) PVY izolatlarını tanımlamak ve diğer PVY ırklarını ayırmak için bir multipleks ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) geliştirilmiştir (Moury vd., 2010). Bu çalışmada, daha önce test edilmemiş 5 PVY ırkı ve ırk grubu bilinen izolatlar multipleks RT-PCR testine tabi tutulmuş ve test yönteminin etkinliği belirlenmiştir. Multiplex RT-PCR'ın rutin virüs testine daha kullanışlı ve uygun olması için, geleneksel RNA ekstraksiyon aşaması immünokaptur (IC) prosedürüne değiştirilmiştir. Referans izolatlar kullanılarak uygulanan multipleks RT-PCR testi, PVY^O (PVY^O ve PVY^{O-O5}), PVY^N, PVY^{NA}- dahil olmak üzere bugüne kadar rapor edilen dokuz PVY türünü tanımlamak ve ayırt etmek için doğru ve güvenilir bir yöntem olmuştur. N, PVY^{NTN}, PVY^Z, PVY^E, PVY^{NE11}, PVY^{N-Wi} ve PVY^{N:O} ırklarını tanımlamak, daha önce bildirilen herhangi bir RT-PCR prosedürü ile mümkün değildir. IC-RT-PCR protokolü, araziden toplanan patates yaprağı dokusunda PVY izolatlarının tiplendirilmesine başarıyla uygulanmıştır (Lacomme, vd., 2017).

Patates yetiştiriciliğinde PVY ile mücadele, virüsün persistent olmayan yayılım şekli ve tohumluk patateslerin tarladaki birkaç kuşak boyunca çoğaltılmasından dolayı önemli bir zorluk teşkil etmektedir. PVY'ye karşı dayanıklı çeşitler, patates bitkilerini PVY'ye karşı korumanın en etkili yolu olarak bilinse de, yetiştirilen çeşitlerin büyük çoğunluğu PVY'ye karşı önemli direnç gösteremez. İnsektisitler bu virüsün vektörleri olan yaprak bitlerini kontrol etmede etkili bir yöntemdir fakat PVY'lerin kolonileşmeyen yaprak biti ile kısa zamanda yayılması nedeniyle ve alandaki yaprak bitleri'nin yoğunluğunun sürekli değişebilirliğinden dolayı böcek ilaçları da kesin çözüm olmayabilir. İnsektisitlere alternatif olarak ekin anızı malçlama ve mineral yağ püskürtme gibi yöntemlerinde olduğu bilinmektedir. Ayrıca ön çalışmalar araya ekim ile PVY ile mücadele edilebileceğini göstermiştir. İsviçre'de yürütülen dört yıllık çalışmada, mineral yağ püskürtme ve anız ile malçlama tekniklerinin kombinasyonu ile PVY'ne karşı bitkinin direnci araştırılmıştır ve bu çalışmalarda bu iki yöntemin kombinasyonu ile PVY'ne karşı yıldan yıla bitki direncinin arttığı görülmüştür. Genel olarak, bu çalışma kontrol stratejilerini ekin anızı malçlama, mineral yağ püskürtme ve araya ekim gibi birbirini tamamlayan farklı etki modlarıyla birleştirerek patates alanlarının PVY yayılmasına karşı korumasını arttırmanın mümkün olduğunu göstermektedir (Dupuis vd., 2017).

2.4 Kırgızistan'da Patates Y (PVY) Virüs Hastalıkları

Kırgızistan'da bilgimiz dahilinde patates bitkilerinde PVY enfeksiyonu ile ilgili kayıt bulunmamaktadır. Mazenov ve Ulubaş-Serçe (2019) Kırgızistan'dan temin edilen solanaceae bitkilerinde cucumber mosaic virus bildirmişlerdir. Tarımsal ürünlerde bu kayıttan başka bilgiye ulaşamamıştır.

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOD

3.1 Araştırma Materyali

Patates bitkilerinde patates Y virüsü (*Potato virus Y*; PVY) enfeksiyonunu araştırmak amacıyla Kırgızistan'ın 2 farklı bölgesinden (Şekil 3.1), 4 farklı tarladan, tohumluk olarak da kullanılan patates yumruları temin edilmiştir. Her bölgeden en az 70 yumru temin edilmiş ve yumrular 3:1 torf: perlit içeren saksılara tek tek dikilerek, kontrollü koşullarda muhafaza edilmiş ve sürgünlerin sürmeleri sağlanmıştır.



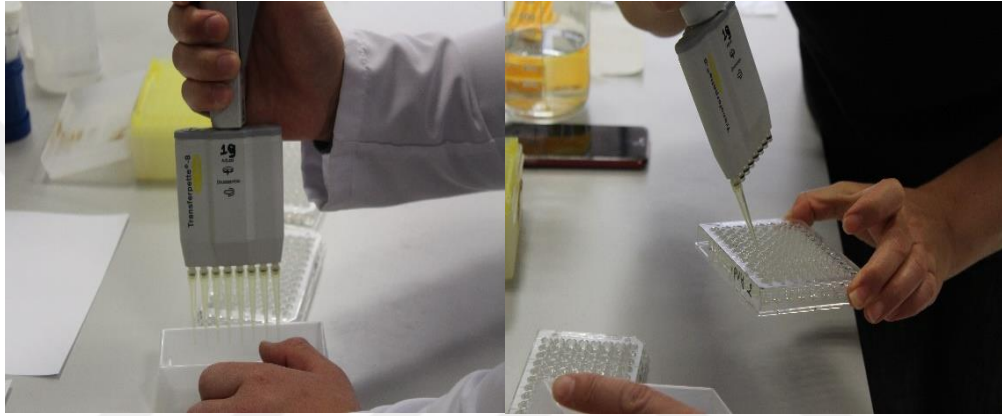
Şekil 3.1. Kırgızistan'da patates yumru örneği alınan bölgeler

3.2 PVY Enfeksiyonlarının Araştırılması

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.

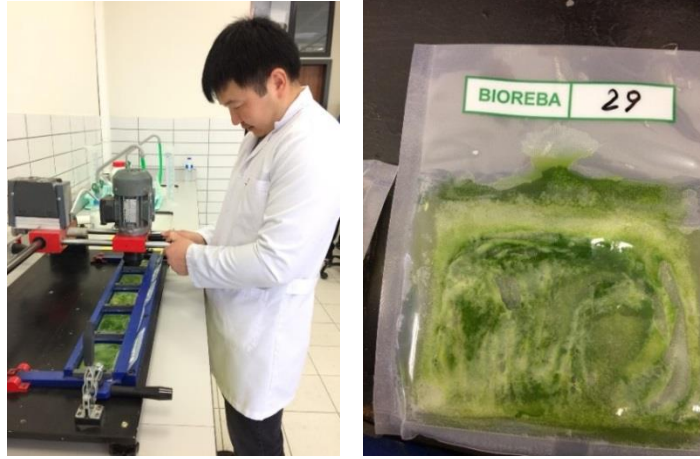
Test aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

a. Kaplama: ELISA plakasına (NUNC F-96 Maxisorb microtiter plate) spesifik antibadi absorbe edilmiştir (şekil 3.2.). Bu amaçla IgG 1:1000 oranında kaplama tamponu (Bkz Ek1) ile sulandırılmış ve plakanın her kuyusuna 100 µl eklenmiştir. Plakalar nem emberinde 30°C’de 4 saat sureyle inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu işlemden sonra plakalar plaka yıkama makinasında (Biotek ELx50) yıkama tamponu (Bkz Ek1) ile üç kez yıkanmıştır.



şekil 3.2. Kaplama aşaması, ELISA plakasına spesifik antibadi absorbe edilmesi

b. Antijen: Bitki ekstraktları plakalara eklenmiştir. Bu amaçla, test edilecek patates örneklerinden toplanan yaprak örnekleri 1:10 oranında ezme tamponu (Bkz. Ek1) ile ezme poşetlerine (Bioreba) yerleştirilmiş ve bilyalı ezme robotunda dokular ezilmiştir (şekil 3.3). Ezilen dokular ezme poşetinin filtresinden süzülerek iki tekerrürlü olacak şekilde her kuyuya 100 µl bitki ekstraktı eklenmiştir. Plakalar nem emberinde 4-6°C’de tüm gece inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu işlemden sonra plakalar plaka yıkama makinasında yıkama tamponu ile beş kez yıkanmıştır.



Şekil 3.3. Bilyalı ezme robotunda patates yapraklarının tampon çözelti ile ezilmesi

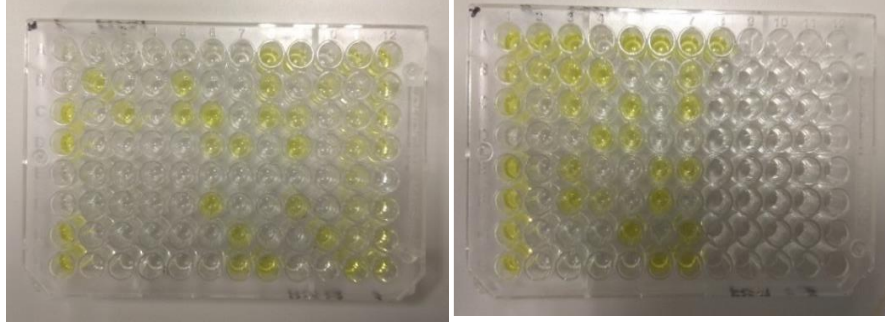
c. Konjugat: Enzimle işaretlenmiş antibadi ile inkübasyon. Bu amaçla, konjugat IgG 1:1000 oranında konjugat tamponunda (bkz. Ek1) sulandırılmış, her kuyuya 100 µl eklenmiştir (Şekil 3.4). Plakalar nem çemberinde 30°C’de 5 saat süreyle inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu işlemden sonra plakalar plaka yıkama makinasında yıkama tamponu ile üç kez yıkanmıştır.



Şekil 3.4. Konjugat IgG 1:1000 oranında her kuyuya 100 µl eklenmesi

d. Substrat: Renk reaksiyonu enfekteli örneği gösterir. Bu amaçla, pNPP (paranitrophenyl-phosphate) substrat tamponunda (Bkz. Ek1) 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 ölçölmüştür. Negatif kontrolde belirlenen absorbans değerlerinin iki katı değer ve üstünü veren örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. ELISA testi sonucunda kuyucuklarda sarı renk reaksiyonu gelişimi

ELISA testi sonucunda tespit edilen PVY izolatlarının ırk türünü belirlemek amacıyla belirlenen PVY izolatlarına Immunocapture- reverse transcription – multiplex polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) analizi uygulanmıştır.

3.3 Immunocapture- Reverse Transcription – Multiplex Polymerase Chain Reaction (IC-RT-PCR) Analizi

3.3.1 Immuno-capture (IC) aşaması (Viral partiküllerin antiserum ile tüplerde yakalanması)

Bu amaçla, IgG poliklonal PVY antiserumu (Potato virus Y-monoclonal cocktail - Bioreba, İsviçre) kaplama tamponu ile 1:1000 oranında sulandırılmış, bu karışım PCR yapılacak tüplere 30 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Tüpler nem çemberinde 30°C’de 4 saat süreyle inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu işlemde sonra tüpler yıkama tamponu ile üç kez yıkanmıştır.

İnkübasyon sırasında diğer taraftan, PVY enfekteli tespit edilen patates sürgünlerinden taze yapraklar toplanmış ve bu dokular ELISA ezme tamponu içerisinde ezilmiştir. IgG ile kaplanmış her bir tüpe çıkarılan bu bitki özsuından 30 µl eklenmiştir. Tüm gece +4°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Bu aşamada, bitki özsuularında viral partiküllerin IgG tarafından yakalanması beklenmiştir.

Tüm gece inkübasyondan sonra tüpler yıkama tamponu ile beş kez pipet yardımıyla yıkanmıştır. Daha sonra %1 TritonX-100 ile bir kez yıkanan tüplerde immünolojik olarak yakalanan viral partiküllere reverse transcription ve PCR işlemleri uygulanmıştır.

3.3.2 Reverse transcription aşaması (RNA moleküllerinin DNA'ya dönüştürülmesi-complementer DNA elde edilmesi)

IC uygulanan tüplerde tutunabilen PVY partiküllerindeki RNA'nın komplementer DNA (cDNA)'ya çevrilmesi için reverse transcription işlemi bazı değişikliklerle Chikh-Ali vd., (2013)'e göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, MMLV reverse 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. Reverse transcription ile cDNA elde etmede kullanılan karışım

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

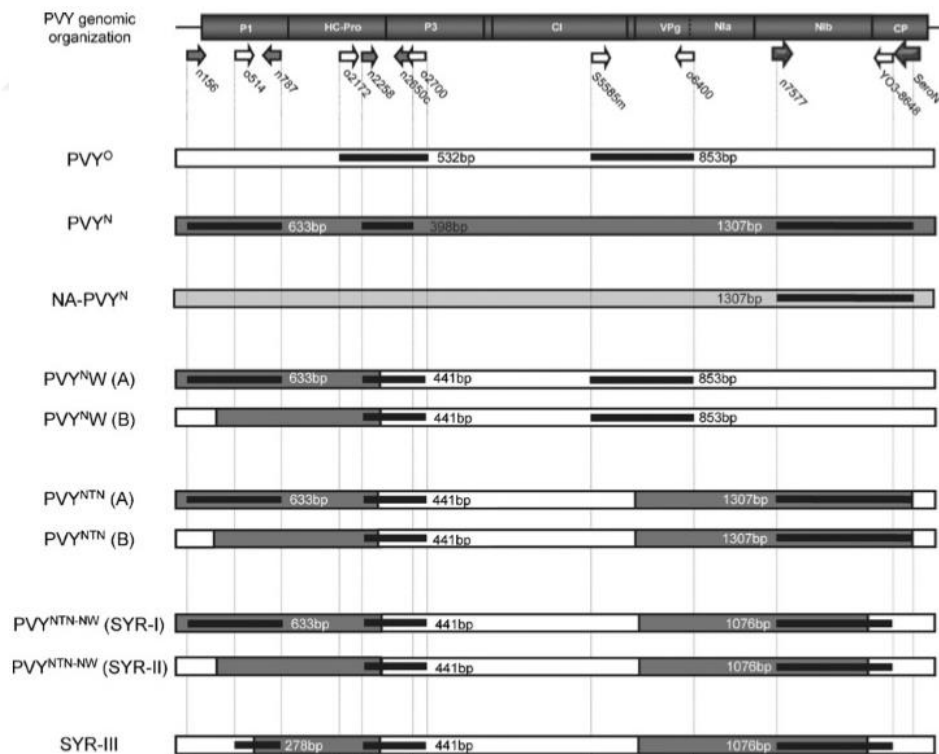
3.3.3 PVY ırk tayini belirlemek amacıyla multipleks PCR aşaması

Multipleks PCR'den önce elde edilen cDNA kullanılarak, 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, 2001) primerleri ile PCR işlemine gerçekleştirilerek IC ve cDNA aşamaları kontrol edilmiştir. Bu amaçla, 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) ve 2 µl cDNA içermiştir (Çizelge 3.2). Amplifikasyon koşulları 94 °C’de 10 dak. ön denatürasyon, 35 döngü 94 °C’de 30 saniye, 55°C’de 30 saniye, ve 72 °C’de 45 saniye, son adımda 72°C’de 10 dak. olarak uygulanmıştır. PCR ürünleri %1,5 agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulmuş ve ethidium bromide ile boyandıktan sonra UV transilluminatörde incelenmiştir.

Çizelge 3.2. PCR reaksiyon karışımı

Malzemeler	1 reaksiyon karışımı
RNase ari su (d ₂ H ₂ O)	11,875 µl
10x Reaksiyon Buffer	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	20µl



Şekil 3.6. PVY ırklarının genomik yapıları ve ırk tespitinde kullanılan primerlerin genom üzerindeki yerleri (Chikh-Ali vd., 2010)

Multipleks PCR işlemi için, PVY ırklarının rekombinasyon bağlantılarının konumlarına göre tasarlanmış 12 primer (Chikh-Ali vd., 2010) kullanılmıştır (Şekil 3.6) (Çizelge 3.3). PCR karışımı son 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 Taq DNA polimeraz içermiştir (Çizelge 3.4) (Şekil 3.7). 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., 2010; 2013).



Şekil 3.7. Multipleks PCR uygulaması

Çizelge 3.3. IC-RT-Multipleks PCR analizinde kullanılan primerler ve dizileri (Chikh-Ali vd., 2010)

Primer Adı	Özelliği	Primer Dizisi (5'-3')	Bölge	Literatür
n156	forward	GGGCAAACCTCTCGTAAATTGCAG	160-179 ^a	Chikh-Ali vd., 2010
o514	forward	GATCCTCCATCAAAGTCTGAGC	515-536 ^b	Chikh-Ali vd., 2010
n787	reverse	GTCCACTCTCTTTCGTAAACCTC	770-792 ^a	Chikh-Ali vd., 2010
n2258	forward	GTCGATCACGAAACGCAGACAT	2260-2281 ^a	Lorenzen vd. 2006
o2172	forward	CAACTATGATGGATTTGGCGACC	2169-2191 ^b	Lorenzen vd. 2006
n2650c	reverse	TGATCCACAACCTTCACCGCTAACT	2627-2650 ^a	Lorenzen vd. 2006
o2700	reverse	CGTAGGGCTAAAGCTGATAGTAG	2678-2700 ^b	Chikh-Ali vd., 2010
S5585m	forward	GGATCTCAAGTTGAAGGGGAC	5578-5598 ^b	Lorenzen vd. 2006
o6400	reverse	GTAACCTCCTAAACAAATGGTGGTTCG	6405-6430 ^b	Chikh-Ali vd., 2010
n7577	forward	ACTGCTGCACCTTTAGATACTCTA	7582-7605 ^a	Chikh-Ali vd., 2010
YO3-8648	reverse	CTTTCCTTTGTTCTGGGTTTGAC	8635-8657 ^b	Schubert vd., 2007
SeroN	reverse	GTTTCTCCTATGTCGTATGCAAGTT	8864-8888 ^a	Chikh-Ali vd., 2008a

Çizelge 3.4. Multipleks PCR reaksiyon karışımı

Malzemeler	1 reaksiyon karışımı
RNase ari su (d ₂ H ₂ O)	7,3 µl
10 XReaksiyon Buffer	2 µl
dNTPs (10 mM)	0,5µl
Primerler (10 µM)	0,5 µl (Çizelge 3.3, 10 adet) 1,0 µl (Çizelge 3.3, S5585 _m ve o6400)
Taq DNA polimeraz	0,2 µl
cDNA	3 µl
Toplam	20 µl

3.4 Seçilen PVY Irklarının Tütün Bitkilerine İnokulasyonu ve ELISA Testi

IC-RT-multipleks PCR sonrası ırk durumları belirlenen PVY izolatları *Nicotiana glutinosa* ve *N. benthamiana* tütün bitkilerine inokule edilmiştir (Şekil 3.8). İnokulasyon öncesi tütün bitkileri en az 2 saat karanlıkta tutulmuştur. İnokulasyonda 1X fosfat buffer (Bkz Ek2) içerisine kullanımdan hemen önce %1 Polyvinyl pyrrolidone-40.000 MW ve %1 Sodium sulphite eklenmiştir. Enfekteli bitki materyali bu buffer

içerisinde 1/1 oranında ezme poşetinde ezilmiş, poşetin filtreli kısmından alınan bitki özsuğu, üzerine karborandum tozu serpilmiş tütün yapraklarına, ucu pamuklu çubuk yardımı ile sürülmüştür. 5 dakika bekledikten sonra yapraklar temiz su ile yıkanarak bitkiler kontrollü koşullarda muhafaza edilmiştir. İnokulasyondan 15 gün sonra simptom değeriendirmesi yapılmış ve DAS-ELISA yöntemi ile test edilmiştir.



Şekil 3.8. PVY enfekteli patates örneklerinin tütün bitkilerine inokule edilmesi

BÖLÜM IV

BULGULAR VE TARTIŞMA

Kırgızistan’ın Çüy bölgesinin Tokmok ili Madanyat Köyünden ve Issık-Göl bölgesinin Ak-Suu ili Kerege-Taş köyü, Tüp ili Ken-Suu, Tasma köylerinden *Solanum tuberosum* L. cv. ‘Picasso’, cv. ‘Jelly’ ve cv. ‘Sante’ çeşitlerine ait toplam 141 patates yumrusu temin edilmiştir (Çizelge 4.1; Şekil 4.1). Bu yumruların toprağa dikilmesi ile tamamından sürgünler gelişmiştir (Şekil 4.2).

Çizelge 4.1. Kırgızistan’dan temin edilen tohumluk patateslerin çeşitleri ve sayısı

Bölge	İl / Köy	Patates çeşidi	Yumru numaraları	Toplam
ISSIK GÖL	Ak - Suu ili / Kerege - Taş köyü	‘Picasso’	1 – 15	15
	Tüp ili / Ken - Suu köyü	‘Jelly’	16- 26	11
	Tüp ili / Tasma köyü		27 - 70	44
ÇÜY	Tokmok ili / Madanyat köyü	‘Sante’	71 - 141	71



Şekil 4.1. Araştırmada kullanılan patates yumruları



Şekil 4.2. Araştırmada kullanılan farklı patates çeşitlerine ait yumruların gelişen sürgünler

Tüm yumruların gelişen sürgünlerine uygulanan DAS-ELISA testi sonucu, yumruların 69 adedi PVY ile enfekteli olarak tespit edilmiş, enfeksiyon oranı %48,94 olmuştur (Çizelge 4.2 ve 4.3). Issık-Göl Bölgesi'nde yeralan Ak-Suu ili Kerege-Taş köyünden temin edilen 15 örneğin 6 adedi, Tüp ili Tasma köyünden temin edilen 44 örneğin 17 adedi PVY ile enfekteli bulunmuştur. Aynı bölgede yer alan Ken-Suu köyünden temin edilen 11 örnekte PVY enfeksiyonu tespit edilmemiş olup, Issık Göl'den temin edilen toplam 70 örneğin 23 adedi PVY ile enfektelidir. Çüy Bölgesi'nde yer alan Tokmok ili Madanyat köyünden temin edilen 71 örneğin 46 adedi PVY ile enfekteli tespit edilmiştir

Çizelge 4.2. Kırgızistan'dan temin edilen patates yumrularının saksıda toprakta geliştirilen sürgünlerine *Potato virus Y* (PVY)'ye karşı gerçekleştirilen DAS-ELISA testinin örneklerin temin edildiği bölgeler ve çeşitlere göre sonucu

Bölge	Köy	Patates çeşidi	Toplam	PVY enfekteli bitki sayısı	Çeşit bazında PVY enfekteli yumru oranı (%)	Bölgelere göre PVY enfeksiyon oranı (%)
ISSIK GÖL	Ak - Suu ili / Kerege - Taş köyü	‘Picasso’	15	6	40,00	32,86
	Tüp ili / Ken - Suu köyü	‘Jelly’	11	0	30,91	
	Tüp ili / Tasma köyü		44	17		
ÇÜY	Tokmok ili / Madanyat köyü	‘Sante’	71	46	64,79	64,79
Toplam	4	3	141	69	48,94	48,94

Çizelge 4.3. Kırgızistan'dan temin edilen patates yumrularının saksıda toprakta geliştirilen sürgünlerine *Potato virus Y (PVY)*'ye karşı gerçekleştirilen DAS-ELISA testi sonucu

Örnek numarası	DAS ELISA Sonucu		Örnek numarası	DAS ELISA Sonucu		Örnek numarası	DAS ELISA Sonucu	
1	0.133	-	44	0.085	-	93	1.525	+
2	0.104	-	45	0.096	-	94	0.110	-
3	2.426	+	46	0.843	+	95	2.873	+
4	2.285	+	47	0.085	-	96	2.236	+
5	0.115	-	48	0.088	-	97	2.315	+
6	0.114	-	49	1.310	+	98	2.112	+
7	1.907	+	50	0.846	+	99	1.658	+
8	2.151	+	51	0.941	+	100	0.802	+
9	0.091	-	52	0.866	+	101	1.809	+
10	1.534	+	53	0.962	+	102	1.889	+
B	0.112	-	54	0.085	-	103	0.989	+
B	0.108	-	55	0.106	-	104	0.094	+
Negatif kontrol 1	0.103	-	56	0.104	-	105	1.130	+
Negatif kontrol 2	0.106	-	57	0.088	-	106	2.688	+
Pozitif kontrol 1	1.092	-	58	2.210	+	107	0.094	-
Pozitif kontrol 2	1.104	-	59	0.666	+	108	0.089	-
11	0.086	-	60	0.087	-	109	0.097	-
12	0.095	-	61	0.662	+	110	2.125	+
13	1.066	+	62	1.611	+	111	0.090	-
14	0.083	-	63	0.086	-	112	1.614	+
15	0.095	-	64	0.082	-	113	0.085	-
16	0.118	-	65	0.087	-	114	0.490	+
17	0.093	-	66	0.111	-	115	0.091	-
18	0.107	-	67	0.090	-	116	0.088	-
19	0.090	-	68	0.479	+	117	2.058	+
20	0.096	-	69	0.086	-	118	0.090	-
21	0.092	-	70	0.090	-	119	1.574	+
22	0.089	-	71	0.084	-	120	0.929	+
23	0.084	-	72	0.087	-	121	0.087	-
24	0.091	-	73	1.423	+	122	0.094	-
25	0.088	-	74	0.095	-	123	0.058	-
26	0.101	-	75	0.601	+	124	0.108	-
27	0.096	-	76	0.085	-	125	1.630	+
28	1.222	+	77	0.358	+	126	0.090	-
29	1.104	+	78	0.535	+	127	0.088	-
30	0.090	-	79	0.424	+	128	0.087	-
31	0.086	-	80	0.466	+	129	1.249	+
32	0.092	-	81	0.445	+	130	2.708	+
33	0.089	-	82	1.461	+	131	0.094	-
34	0.100	-	83	0.830	+	132	2.253	+
35	0.115	-	84	0.605	+	133	1.461	+
36	0.088	-	85	0.688	+	134	0.795	+
37	2.170	+	86	0.561	+	135	1.713	+
38	0.560	+	87	0.088	-	136	0.088	-
39	0.086	-	88	0.385	+	137	1.272	+
40	1.559	+	89	0.580	+	138	0.091	-
41	0.088	-	90	0.871	+	139	1.280	+
42	0.108	-	91	2.135	+	140	1.369	+
43	0.097	-	92	0.853	+	141	1.027	+
Genel Toplam	69 PVY enfekteli pozitif örnek							

+ PVY ile enfekteli, - PVY enfeksiyonu açısından negatif anlamındadır

Patates örneklerinin DAS-ELISA sonuçlarına göre PVY enfeksiyon oranı Çüy Bölgesi'nde Issık Göl Bölgesi'nden daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır. Bu bölgelerin coğrafik yapılarına bakıldığında, Issık Göl Bölgesi deniz seviyesinden 1,609 m yüksekliktedir, Çüy Bölgesi ise 816 m yukarıda olup Temmuz ayı sıcaklık ortalaması 22-25 °C arasında değişmektedir. Çüy bölgesinin coğrafik ve iklimsel yapısı, bu bölgede yaprak bitlerinin daha aktif olmasını sonuçlayabilir ve virüsün daha fazla yayılmasına neden olabilir. Ülkede yaprak biti türleri ve yaygınlığı hakkında bilgiye ulaşılamamışsa da, bazı yaprak bitlerinin ve özellikle PVY'nin yayılımında önemi rol oynayan *Myzus persicae* (yeşil şeftali yaprak biti) bulunduğu bildirilmektedir (Gabrid, 1989). PVY'nin yayılmasında kolonize olan yaprak bitlerinin dışında ziyaretçi yaprak bitlerinin de önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bu ziyaretçi yaprak bitlerinin bulundukları bitkinin besin olarak uygunluğunu test etmek amacıyla yaptıkları emgi faaliyetleri virüsün non-persistent olarak taşınmasına neden olmaktadır. Bu şekilde yayılımı azaltmak için mineral yağ uygulaması tavsiye edilmektedir. Diğer taraftan, virüsün yayılmasında etkili diğer faktörleri (temiz yumru kullanılmaması, kültürel işlemlerin uygun olmaması vb) de göz ardı etmemek gereklidir.

Kırgızistan'ın patates tarımının en yaygın olduğu iki bölgede toplam dört köyde yaygın olarak yetiştirilen patates çeşitlerinde farklı PVY enfeksiyon oranları belirlenmiştir. Patates çeşitlerinden 'Picasso' yumrularında PVY enfeksiyon oranı %40, 'Jelly' çeşidinde %30,91 ve 'Sante' çeşidinde ise %64,79 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). PVY enfeksiyonunun bölgelere göre dağılımı ise Issık Göl Bölgesi'nde %32,86 ve Çüy Bölgesi'nde %64,79 olmuştur. Bu sonuçlara göre PVY enfeksiyonu en çok Çüy Bölgesi ve 'Sante' çeşidinde belirlenmiştir. PVY enfeksiyonu tespit edilen tüm çeşitlerde gözlenen semptomlar patates bitkisi yapraklarında damar açılması ve mozayik belirtiler şeklinde olmuştur (Şekil 4.3, 4.4, 4.5).

DAS-ELISA yöntemi ile PVY enfekteli tespit edilen yumrulardaki PVY izolatlarının ırkını belirlemek amacıyla, bölge ve çeşit bazında 32 izolat seçilerek IC-RT-multipleks PCR çalışmalarında ırk belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Seçilen izolatlar IC-RT aşamasında ve PCR testi ile PVY partiküllerini içerdikleri kontrol edilmiştir (Şekil 4.6). Daha sonra seçilen izolatların cDNA'larına multipleks PCR işlemi uygulanarak PVY ırkları belirlenmiştir (Şekil 4.7 ve Çizelge 4.4).



Şekil 4.3. DAS-ELISA testi sonucu PVY enfekteli olduğu tespit edilen Kerege - Taş köyünden temin edilen, cv. ‘Picasso’ patates çeşidi, 13 nolu patates örneğinin yapraklarında damar açılması ve mozayik belirtiler

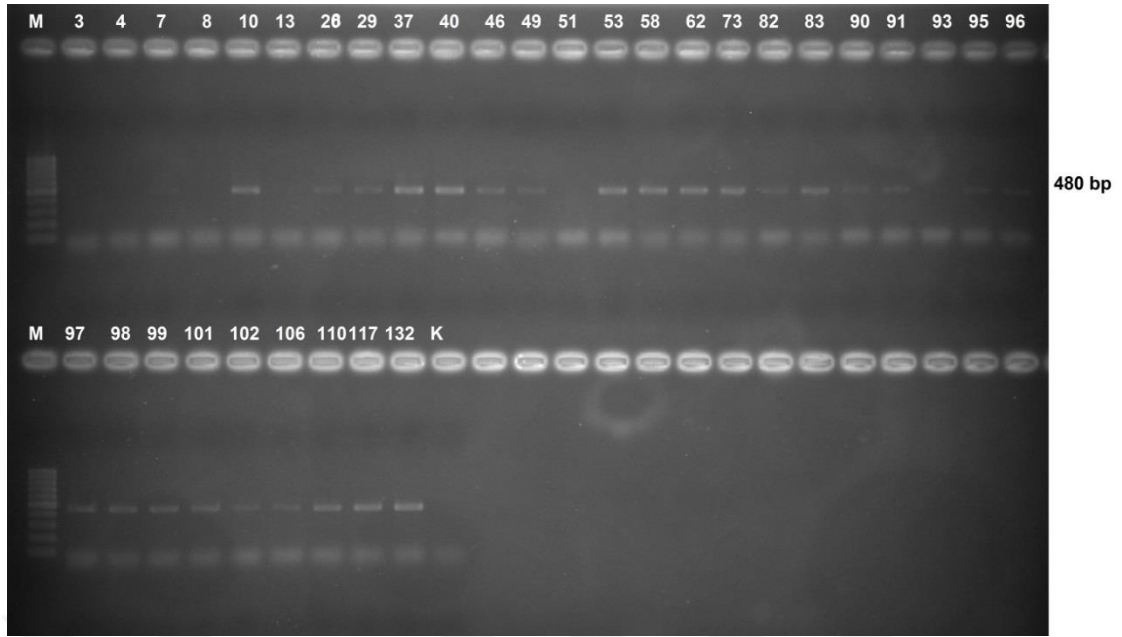


Şekil 4.4. DAS-ELISA testi sonucu PVY enfekteli olduğu tespit edilen Tasma Köyünden temin edilen, cv. ‘Jelly’ patates çeşidi, 59 nolu patates örneğinin yapraklarında damar açılması ve mozayik belirtiler

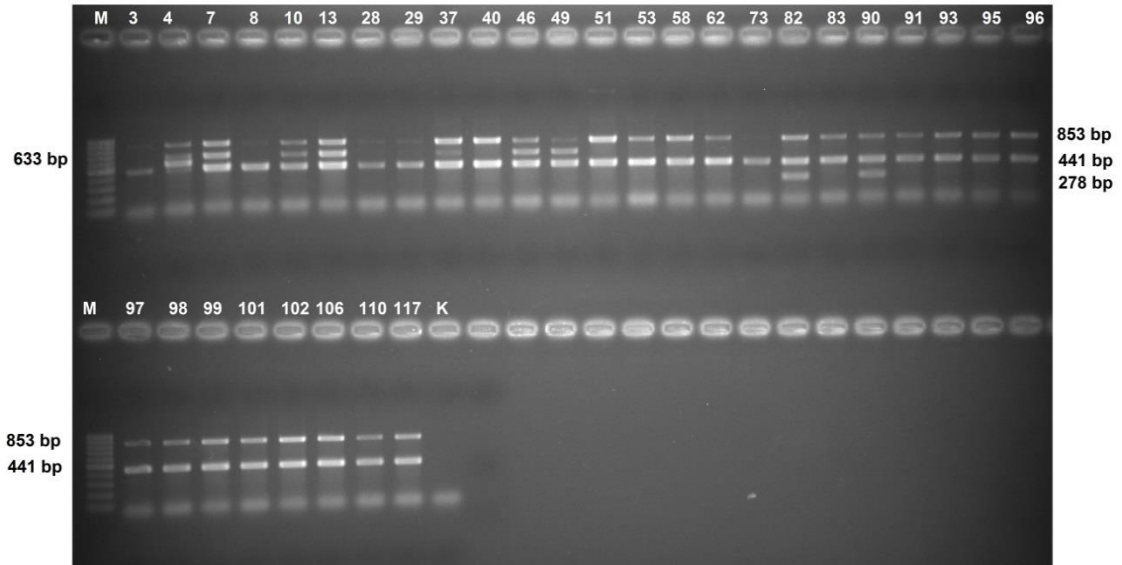


Şekil 4.5. DAS-ELISA testi sonucu PVY enfekteli olduğu tespit edilen Madanyat Köyünden temin edilen, cv. ‘Sante’ patates çeşidi, 90 nolu patates örneğinin yapraklarında damar açılması ve mozayik belirtiler

Araştırılan izolatların çoğunluğunun PVY^{NW} karakterli olduğu, %28,15’i (9 adedi) PVY^{O-NW} (A), %62,5’i (20 adedi) ise PVY^{NW} (B) olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.5). İzolatlar arasında 1 adet PVY^{O-NW}(A) ırklarının karışık enfeksiyonu, 2 adet de 278 bp seviyesinde ekstra amplifikasyon sonuçlayan PVY^{NW} (B) karakterli izolat belirlenmiştir. İzolatların karakterlerinin bölgelere göre farklılık gösterdiği de tespit edilmiştir. Issık-Göl Bölgesi’nde yaygın PVY ırkı PVY^{NW} (A) iken, Çüy Bölgesi’nde yaygın ırk PVY^{NW} (B) olup, PVY^{NW} (A) bu bölgede araştırılan örneklerde tespit edilmemiştir. Patates çeşitlerinden cv. ‘Picasso’ çeşidinde %66,66 oranıyla PVY^{NW} (A) ırkı en fazla ortaya çıkarken, cv ‘Jelly’ ve ‘Sante’ çeşitlerinde sırasıyla %60 ve % 87,5 oranlarıyla PVY^{NW} (B) ırkı tespit edilmiştir. Bu farklılıkların nedeni olarak, bölgelere gelen tohumluk yumruların orijinlerinin farklı olabilmesi gerekçe gösterilebilir.



Şekil 4.6. PVY izolatlarının Immunocapture ve Reverse Transkripsiyon sonrası PCR yöntemi ile kontrol edildiği agaroz jel. M: 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific), K su kontrol, rakamlar izolat numaralarıdır



Şekil 4.7. PVY izolatlarının Immunocapture ve Reverse Transkripsiyon sonrası multipleks PCR yöntemi ile ırklarının belirlendiği agaroz jel. M: 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific), K su kontrol, rakamlar izolat numaralarıdır

Çizelge 4.4. Patateste *Potato virus Y* (PVY) izolatlarının ırklarının multipleks PCR ile belirlenmesinde ırlara göre oluşması beklenen fragmentler (Chikh-Ali et. al., 2010, 2013'den uyarlanmıştır) (Bolat, 2017)

Fragment büyüklüğü	PVY ^O	PVY ^N	PVY ^{NA-N}	PVY-NE11	PVY ^F	PVY ^{Nwi} (A)	PVY ^{Nwi} (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												

Çizelge 4.5. Kırgızistan'dan temin edilen patates yumrularında belirlenen PVY ırkları ve oranları

Bölge	İl / Köy	Patates çeşidi	Yumru numaraları	Toplam	PVY ırkı		
					İrk adı	Sayısı	Oran (%)
ISSIK GÖL	Ak - Suu ili/ Kerege-Taş köyü	'Picasso'	3, 4, 7, 8, 10, 13	6	PVY ^{NW} (A)	4	66,66
					PVY ^{NW} (B)	1	16,66
					PVY ^{ONW} (A)	1	16,66
	Tüp ili/ Tasma köyü	'Jelly'	28, 29, 37, 40, 46, 49, 51, 53, 58, 62	10	PVY ^{NW} (A)	4	40
					PVY ^{NW} (B)	6	60
ÇÜY	Tokmok ili/ Madanyat köyü	'Sante'	73, 82, 83, 90, 91, 93, 95, 96, 97, 98, 99, 101, 102, 106, 110, 117	16	PVY ^{NW} (A)	0	0
					PVY ^{NW} (B)	14	87,5
					PVY ^{NW} (B)+278	2	12,5

'Picasso' patates çeşidi PVY^O ırkına karşı yüksek derecede (0-9 hassas-dayanıklı skalasına göre 8) dayanıklıdır (URL1). 'Jelly' patates çeşidi PVY'ye hassasiyeti yüksek - çok yüksek olarak bildirilmiştir. (URL2). 'Sante' patates çeşidi PVY^O ırkına karşı yüksek derecede (skala 8) dayanıklıdır (URL3). Kırgızistan'da tespit edilen yaygın PVY ırkı nekrotik ırk grubunda yer alan rekombinant ırklardır. Bu çeşitler genellikle virüsün

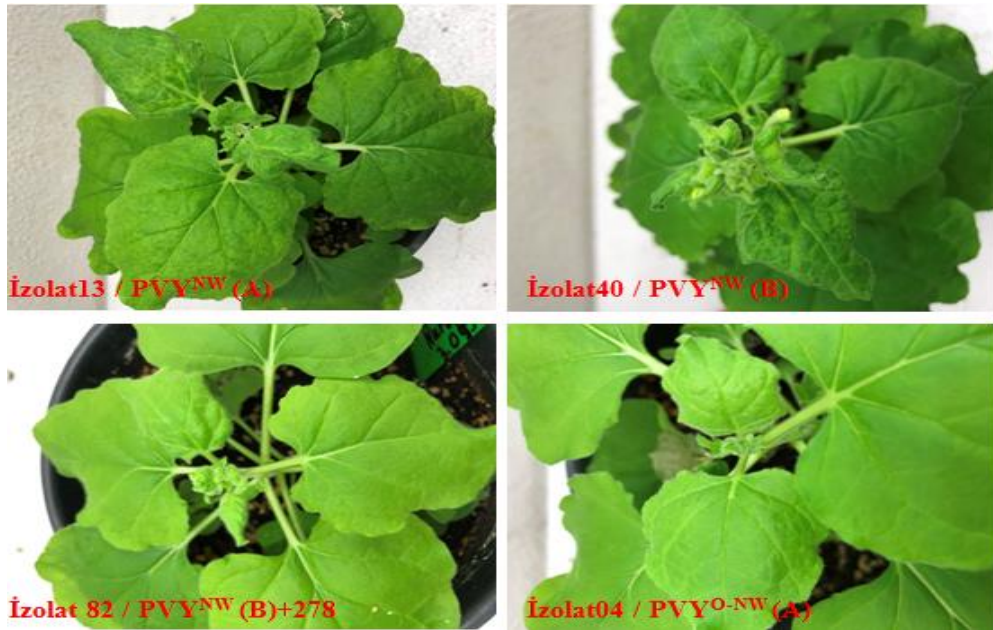
-O ırkına dayanıklı olduklarından tohumluk yumruların enfeksiyon oranı yüksek olmaktadır.

Araştırmada kullanılan PVY izolatlarının ırkları belirlendikten sonra farklı ırklardan seçilen izolatların tütün bitkilerine inokulasyonları sonucu, *N. glutinosa* bitkilerinde enfeksiyon gerçekleşmemiş, *N. benthamiana*'da PVY enfeksiyonu belirlenmiş olup tipik damar açılmaları, mozayik oluşumlar tespit edilmiştir (Çizelge 4.6) (Şekil 4.8).

Çizelge 4.6. Seçilen PVY ırklarının tütün bitkilerine inokulasyonu sonucu bitkilerin DAS – ELISA ile testi sonuçları

İzolat no – PVY ırkı	Inokulasyon yapılan tütün türleri	DAS-ELISA okuma değeri	DAS-ELISA sonucu
4 PVY ^{O-NW} (A)	<i>Nicotiana glutinosa</i>	0.343	-
4 PVY ^{O-NW} (A)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0.802	+
13 PVY ^{NW} (A)	<i>Nicotiana glutinosa</i>	0.412	-
13 PVY ^{NW} (A)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0.812	+
82 PVY ^{NW} (B)+278	<i>Nicotiana benthamiana</i>	1.034	+
40 PVY ^{NW} (B)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	1.259	+
Negatif kontrol	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0.402	-
Pozitif kontrol	<i>Solanum tuberosum</i>	1.456	+
Buffer kontrol	Ezme buffer	0.291	-

+ PVY ile enfekteli, - PVY enfeksiyonu açısından negatif anlamındadır



Şekil 4.8. *Nicotiana benthamiana* tütün çeşitlerine inokule edilen PVY ırklarının oluşturduğu belirtiler

PVY^O ırkı genellikle mozayik simptomlara neden olmaktadır. Araştırmada tütün bitkilerine inokule edilen İzolat 04 PVY^{O-NW}(A) ırkı olarak tanımlanmıştır. Bu ırk cv. 'Picasso' patates çeşidinde belirgin simptomlar oluşturmamış gibi inokule edilen *N. benthamiana* tütün bitkilerinde de şiddetli mozayik simptomları oluşturmamıştır (Şekil 4.8). Benzer şekilde multipleks PCR sonucunda İzolat 82 PVY^{NW} (B)+278 olarak tanımlanmış gerek cv 'Sante' patates çeşidinde gerekse *N. benthamiana* tütün bitkilerinde belirgin simptomlar oluşturmamıştır. Bu durum bu ırkların şiddetli mozayik simptomlar oluşturmamış olduğunu göstermektedir. PVY^N ırkı PVY'nin yumruda nekrotik hasar oluşturan, yapraklarda PVY^O'dan daha hafif mozayikler meydana getiren bir ırkıdır (Weidemann vd., 1988). Bu ırkın yumrulara oluşturduğu hastalık patates yumru nekrotik leke hastalığı (PTNRD) araştırılan yumrulara gözlenmemiştir (Şekil 4.1). Ancak inokulasyon sonrası tütün yapraklarında şiddetli mozayik ve damar nekrozu gelişmiştir (Şekil 4.8).

BÖLÜM V

SONUÇLAR

Patates bitkisi yumru verimi ve kalitesini azaltan birçok farklı virüs tarafından enfekte edilebilir. Virüs hastalıkları bitkilerin yaprakları üzerinde gözlenebilen mozaik renk oluşumları, bitkinin bodurluğu, yaprak şekilleri ve yumru şekilleri ile teşhis edilebilir. Ancak, virüs ve patates bitkisi arasındaki etkileşimler, bitkinin büyüme dönemleri, yaşı ve iklimsel etkiler gibi nedenlerle belirtiler her zaman ifade edilmez. Seroloji ve nükleik asit tespit teknikleri sıklıkla şüpheli virüs hastalıklarını teşhis etmek ve karakterize etmek için kullanılır.

PVY ırkları PVX ve PVA gibi diğer patates virüsleriyle etkileşime girebilir ve daha ağır kayıplara neden olabilir. Yumrulardaki nekrotik belirtiler genellikle depolanmadan sonra artar. Bazı çeşitler nadiren belirtiler gösterir, ancak virüsü taşıyabilir ve yaprak biti aracılığı ile transfer için rezervuar görevi görebilir.

PVY ırkları içerisinde yıllar içerisinde nekrotik ırk ve bunun rekombinant varyantları daha baskın hale gelmiştir. Bu ırklar yumrulara lokalize olduklarından, enfekteli yumruların tohumluk olarak kullanılması ile bir nesilden diğerine ve diğer yetiştirme dönemlerine aktarılmaktadır. Yapılan bu çalışmada da Kırgızistan'da yaygın PVY ırklarının nekrotik ırk ve bunun varyantları olduğu görülmüştür. Bu durum, tohumluk transferi ve arazide yaprak bitleri ile yayılma sonucu ürünün büyük çoğunluğunda virüsün ortaya çıkmasına neden olmuştur. Çalışmada, tohumluk yumruların yaklaşık yarısı PVY ile enfekteli bulunmuştur. Enfekteli yumruların tohumluk olarak kullanılmasına devam edilmesi halinde bu oran her geçen yıl %100'lere yaklaşacaktır. Üreticilerin hasat ettikleri ürünün bir kısmını depolayarak gelecek yıl tohumluk olarak kullanmaları her geçen yıl PVY ve nekrotik ırkların yayılımı ve ortaya çıkış sıklığını arttırmaktadır. Pekçok üretici, tohumluk maliyetini azaltmak için 3-5 yılda bir tohumluk yumrularını tohum üreticisi firmalardan almayı tercih etmektedir. Ancak, çevredeki viral enfeksiyonun yüksek olduğu patates üretim alanları, yeni tohumluk kullanan bu üreticilerin ürünleri için ciddi inokulum kaynaklarını oluşturmaktadır.

PVY, non-persistent bir virus olduğundan ve yaprak bitleri tarafından hızlı bir şekilde taşındığından, yayılmayı kontrol etmek için pestisit kullanımı genellikle etkili değildir. PVY'yi kontrol etmek için en iyi strateji, düşük virüs içeriğine sahip olduğu onaylanan tohumluk patates kullanmaktır. Yaprak bitlerinin yayılmasını azaltmak için mineral yağlar kullanılabilir, ancak etkili olması için sık aralıklarla tekrar uygulanmalıdır. Enfekte olan bitkiler, alanın geri kalanı için bir inokulum kaynağı olarak hizmet edebilir, bu yüzden simptomatik bitkileri yok etmek virüsün çok yaygın görülmediği durumlarda etkili olabilir. Domates, biber gibi solanaceae bitkileri virüsü barındırabilir ve inokulum kaynağı olarak işlev görebilir. Patates tarımı yapılan arazide ve çevresinde iyi bir yabancı ot kontrolü uygulanmalıdır. Bölgede yaygın yaprak bitleri popülasyonları incelenerek türler belirlenmeli, aktif oldukları dönemler saptanarak bu doğrultuda oluşturulan yaprak biti mücadele programı uygulanmalıdır. Virüsden ari tohumluk patates kullanımı teşvik edilmeli ve yaygınlaştırılmalıdır. PVY'ye karşı direnç veya toleransı olan patates çeşitleri kullanımı ise en etkili çözüm yoludur. Virüsün özellikle nekrotik ırklarına dayanıklı patates çeşitlerinin ıslahının yapılması ve bu çeşitlerin kullanılması soruna en iyi çözüm olacaktır.

KAYNAKLAR

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.

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.

Bolat, V. Patateste Patates Y Virüsü Irklarının Tanılanması Ve Virüs Miktarının Kantitatif Real Time Rt-Pcr İle Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Niğde, 81, 2017

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), 103112, 2002

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.

Brush, S., Potato taxonomies in Andean agriculture. In."Indigenous knowledge systems and development", Eds, D.W., Brokensha, D.M., Warren and Werner, O., *Univ Press of America*, New York, pp. 37-47, 1980.

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.

Cooper, J. I. and Jones, A. T., Responses of plants to viruses: proposals for the use of terms. *Phytopathology* 73:127–128, 1983.

Cramer, H. H., "Pflanzenschutz und Welternste" *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer* Leverkusen, 20, 1-523, 1967.

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

De Bokx, J. A., Huttinga H Potato virus Y. CMI/AAB Descr, *Plant Viruses*, 242:6, 1981.

De Bokx, J. A. and van der Want, J. P. H., Viruses of potatoes and seed potato production. *Centre for Agricultural Publishing and Documentation (Pudoc)*, Wageningen, pp 1–259, 1987.

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.

Doolotkeldieva, T., Bobusheva, S. and Suleymankisi, A. Biological Control of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* by *Streptomyces* Species. *Advances in Microbiology* 6(02), p.104, 2016.

Doolotkeldieva, T. and Bobusheva, S., Identification of *Ralstonia solanacearum* in Kyrgyzstan's potato fields and the possibility of using biocontrol agents against this

pathogen. *International Journal of Environmental y Agriculture Research* 2(5), pp.146-155, 2016.

Döölötkeldieva, T. and Bobusheva, S., Identification and prevalence of *Ralstonia solanacearum* from potato fields of *Kyrgyzstan*. *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences* 4(1), pp.1-9, 2014.

Dupuis, B., Cadby, J., Goy, G., Tallant, M., Derron, J., Schwaerzel, R., and Steinger, T. Control of potato virus Y (PVY) in seed potatoes by oil spraying, straw mulching and intercropping. *Plant pathology* 66(6), 960-969, 2017.

FAOSTAT, <http://www.potatopro.com/world/potato-statistics>, 01 Mays 2019.

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.

Gabrid, N. V., "Aphids of Trees and Shrubs of the Issyk-Kul' Region". Frunze, Ilim, SSR, *Institut Biologii, Akademiya Nauk Kirgizskoi SSR*. 1989.

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.

Hawkes, J., "The Potato Evolution, biodiversity, and genetic resources", *Smithsonian Institution Press*, London, England, 299-300, 1993.

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

Hinrichs-Berger, J, Harford, M, Berger, S. and Buchenauer, H., Cytological responses of susceptible and extremely resistant potato plants to inoculation with potato virus Y. *Physiol Mol Plant Pathol* 55:143–150, 1999.

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

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.

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.

Lacomme, C., Glais, L., Dirk, U. B., B. Dupuis, A. V. Karasev and E. Jacquot. Potato virus Y: biodiversity, pathogenicity, epidemiology and management. **Springer International Publishing**, 2017.

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.

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.

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.

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.

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.

Mamonov E.V. Varietal katalogu. Sebze bitkileri, *Eksmo-Press*, Moskova, 430-486. - 493 s. - ISBN 5-04-006780-1, 2001.

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.

Hermosa, M. C., Lost Crops of the Incas: *Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation*, 1980.

Mazenov, A. and Ulubaş Serçe, Ç. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0190-z>, 2019.

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.

Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., Caranta, C., Palloix, A. and Jacquemond, M., Mutations in Potato virus Y genome-linked protein determine virulence towards recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. **Mol Plant-Microbe Interact** 17:322–329, 2004.

Moury, B. A., new lineage sheds light on the evolutionary history of Potato virus Y. **Mol Plant Pathol**, 11:161–168, 2010.

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 seedpotatoes, 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.

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.

Scholthof, K. B., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C. and Foster, G. D. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 12:938–954, 2011.

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, 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.

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 antherculture-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.

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.

SPUTNIK, <https://sputnik.kg/>, 5 Mays 2017.

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

URL1: <http://varieties.ahdb.org.uk/varieties/view/Picasso>, 2017.

URL2: https://www.europlant.biz/fileadmin/user_upload/Brosch%C3%BCren/Europlant_A6_Varieties_E.pdf, 2018-2019.

URL3: <http://varieties.ahdb.org.uk/varieties/view/Sante>, 2018.

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.

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



EKLER

EK 1: DAS-ELISA Testinde Kullanılan Buffer ve İçerikleri

Kaplama buffer :

Na₂ CO₃ : 1.59 g

NaHCO₃ : 2.93 g

NaN₃ : 0.20 g

iyice çözüldükten sonra son hacim 1000 ml olacak şekilde d₂H₂O ile tamamlanır.
pH 9.6

10xPBS (Phosphate buffer) :

NaCl : 80 g

KCl : 2 g

Na₂HPO₄ : 11.5 g

KH₂PO₄ : 2.4 g

NaN₃ : 2 g

iyice çözüldükten sonra son hacim 1000 ml olacak şekilde d₂H₂O ile tamamlanır.
pH to 7.4

1xYıkama buffer :

10X PBS : 100 ml

ddH₂O : 900 ml

Tween-20 : 50 µl

Ezme buffer

TRIS : 2.40 g

NaCl : 8.00 g

PVP K25 (MW 24000) :20.00 g

Tween 20 : 0.50 g

KCl : 0.20 g

NaN₃ : 0.20 g

iyice çözüldükten sonra son hacim 1000 ml olacak şekilde d₂H₂O ile tamamlanır.
pH 7.4 (pH HCl ile ayarlanmalıdır)

Konjugat buffer:

TRIS : 2.40 g
NaCl : 8.00 g
PVP K25 (MW 24000): 20.00 g
Tween 20 : 0.50 g
BSA (bovine serum albumin) : 2.00 g
MgCl₂ · 6 H₂O : 0.20 g
KCl : 0.20 g
NaN₃ : 0.20 g

iyice çözüldükten sonra son hacim 1000 ml olacak şekilde d₂H₂O ile tamamlanır.
pH 7.4 (pH HCl ile ayarlanmalıdır)

Substrat buffer:

Diethanolamine : 97.00 ml
NaN₃ : 0.20 g

iyice çözüldükten sonra son hacim 1000 ml olacak şekilde d₂H₂O ile tamamlanır.
pH 9.8 (pH HCl ile ayarlanmalıdır)

EK 2: Inokulasyonda Kullanılan Fosfat Buffer

10X için:

KH_2PO_4 : 1,99 g

Na_2HPO_4 : 11,49 g

iyice çözüldükten sonra son hacim 1000 ml olacak şekilde $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ ile tamamlanır.

pH 7.4 (NaOH ile ayarlanmalıdır)



EK 3: Kırgızistan'dan Temin Edilen Patates Yumrularında Tespit Edilen PVY Irklarının Mültipleks PCR Sonrası Oluşturdukları Amplikonlar

İzolat adı	Multipleks PCR ürün büyüklükleri (bp)	Multipleks PCR ırk tipi
3	853+441	PVY ^{NW} (B)
4	853+633+532+441	PVY ^{O-NW} (A)
7	853+633+441	PVY ^{NW} (A)
8	853+441	PVY ^{NW} (A)
10	853+633+441	PVY ^{NW} (A)
13	853++633+441	PVY ^{NW} (A)
28	853+441	PVY ^{NW} (B)
29	853+633+441	PVY ^{NW} (A)
37	853+633+441	PVY ^{NW} (A)
40	853+441	PVY ^{NW} (B)
46	853+633+441	PVY ^{NW} (A)
49	853+633+441	PVY ^{NW} (A)
51	853+441	PVY ^{NW} (B)
53	853+441	PVY ^{NW} (B)
58	853+441	PVY ^{NW} (B)
62	853+441	PVY ^{NW} (B)
73	853+441	PVY ^{NW} (B)
82	853+441+278	PVY ^{NW} (B)+278
83	853+441	PVY ^{NW} (B)
90	853+441+278	PVY ^{NW} (B)+278
91	853+441	PVY ^{NW} (B)
93	853+441	PVY ^{NW} (B)
95	853+441	PVY ^{NW} (B)
96	853+441	PVY ^{NW} (B)
97	853+441	PVY ^{NW} (B)
98	853+441	PVY ^{NW} (B)
99	853+441	PVY ^{NW} (B)
101	853+441	PVY ^{NW} (B)
102	853+441	PVY ^{NW} (B)
106	853+441	PVY ^{NW} (B)
110	853+441	PVY ^{NW} (B)
117	853+441	PVY ^{NW} (B)

ÖZ GEÇMİŞ

Nurdinbek TEMİRBİK UULU 22.06.1993 tarihinde Kırgızistan'ın İSSİK-GÖL bölgesinde dünyaya geldi. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini Issık-Göl'de 19'uncu ortaokulunda tamamladı. Lisenin ardından 2011 yılında Kırgızistan-Türkiye Manas Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nü kazandı. 2015 yılında TSÜAB programı ile Ankara'da 55 günlük stajın tamamladı. 2015 ve 2016 yılları arasında uluslararası staj programını kazanarak, Almanya'da yer alan LOGO Ev'de 12 ay içerisinde tamamladı. 2017 yılında okulunu bitirip ardından aynı sene içerisinde Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitkisel Üretim ve Teknolojileri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.

