



**TEKİRDAĞ İLİNDE *PLUM POX POTYVIRUS*
(PPV)'İN DOĞAL VE YABANI KONUKÇU
TÜRLERİNİN SAPTANMASI**

Buşra BAŞ

**Yüksek Lisans Tezi
Bitki Koruma Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Havva İLBAĞI**

2017

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TEKİRDAĞ İLİNDE *PLUM POX POTYVIRUS* (PPV)'İN DOĞAL VE
YABANI KONUKÇU TÜRLERİNİN SAPTANMASI**

Buşra BAŞ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Havva İLBAĞI

TEKİRDAĞ-2017

Her hakkı saklıdır.

Prof. Dr. Havva İLBAĞI danışmanlığında Buşra BAŞ tarafından hazırlanan “Tekirdağ İlinde *Plum Pox Potyvirus* (PPV)’ın Doğal ve Yabani Konukçu Türlerinin Saptanması” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Havva İLBAĞI

İmza:

Üye: Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Adnan KARA

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TEKİRDAĞ İLİNDE *PLUM POX POTYVIRUS* (PPV)'İN DOĞAL VE YABANI KONUKÇU TÜRLERİNİN SAPTANMASI

Buşra BAŞ

Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Havva İLBAĞI

Sert çekirdekli meyve türlerinin en önemli hastalığı olan *Plum pox virus* (PPV), Dünya'da ve Türkiye'de ekonomik açıdan önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Türkiye'nin iç ve dış karantina listesinde yer alan bu hastalığın epidemiyolojisi ve mücadelesinde rol oynayan PPV'nin doğal ve yabancı konukçu türlerinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Tekirdağ İli'nde sert çekirdekli meyve üretimini olumsuz yönde etkileyen PPV'nin bu ildeki doğal ve yabancı konukçu türlerinin saptanması bu çalışmanın amacını oluşturmuştur. 2016 yılı Haziran ayında gerçekleştirilen sürvey çalışmaları ile Tekirdağ İli'nin Merkez Süleymanpaşa, Muratlı, Çorlu ve Hayrabolu ilçelerinde gözlem ve incelemeler yapılarak yabancı formdaki sert çekirdekli ağaç ve çalı türlerinden simptomatik yaprak örnekleri toplanmıştır. Böylece PPV'nin karakteristik şekilde yapraklarda neden olduğu mozaik, damar arası bantlaşma, şekil bozukluğu, klorotik lokal lekeler ile sistemik renk değişiklikleri gösteren ve simptom göstermeyen sağlıklı bitkilerden yaprak örnekleri alınmıştır. Sürveyler sonucunda *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra'dan 31 adet, *Prunus ceracifera* Atropurpurea'dan 31, *Prunus serrulata* Lindl. "Kanzan"dan 6 ve *Prunus spinosa* L.'dan 36 adet olmak üzere toplam 104 yaprak örneği elde edilmiştir. Örneklerde PPV'nin varlığı Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) testi ile araştırılmıştır. Ancak DAS-ELISA testi sonucunda 104 yaprak örneğinin hiçbirinde PPV saptanmamıştır. Karakteristik virüs simptomu sergileyen 10 adet *Prunus ceracifera* Atropurpurea, 8 adet *P. ceracifera* Pissardi Nigra, 2 adet *P. serrulata* "Kanzan" ve 5 adet de *P. spinosa* L. yaprak örneklerinden oluşan toplam 25 adet örnek Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) testine tabi tutulmuştur. RT-PCR test sonuçlarına göre 5 adet *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra yaprak örneğinde *Plum pox virus* (PPV) saptanmıştır. Ancak *P. ceracifera* Atropurpurea, *P. serrulata* "Kanzan" ve *P. spinosa* L. yaprak örneklerinde tespit edilmemiştir. Elde edilen bu sonuçlar *Plum pox virus* (PPV)'in *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra'da bulunuşunun ilk kayıdır.

Anahtar kelimeler: PPV, *Prunus ceracifera*, *Prunus serrulata*, *Prunus spinosa*

2017, 42 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

DETERMINATION OF NATURAL AND WILD HOST SPECIES OF *PLUM POX POTYVIRUS* (PPV) IN TEKİRDAĞ PROVINCE OF TURKEY

Buşra BAŞ

Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Havva İLBAĞI

Plum pox virus (PPV) on stone fruit trees inflicts important economical fruit yield losses in the World and as well as in Turkey. That is why it takes place external and internal quarantine list of Turkey. So it is important to determine natural and wild host of this virus for the epidemiological and the disease control purposes. The aim of this study is to determine perennial natural wild host species of PPV in the Tekirdağ Province of Turkey. During the June of 2016 survey visits were implemented in the Tekirdağ districts of Süleymanpaşa, Muratlı, Çorlu and Hayrabolu for the observation of wild *Prunus* trees and shrubs and leaf samples were taken. Those leaf samples were collected from plants exhibiting characteristic PPV disease symptoms like mosaic, vein banding, mottling, distortion, yellowing, local chlorotic spots and discolorations as well as from symptomless healthy plants. As a results of survey studies, 31 samples from *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra, 31 samples from *Prunus ceracifera* Atropurpurea, 6 samples from *Prunus serrulata* Lindl. “Kanzan” and 36 samples from *Prunus spinosa* L. totally 104 leaf samples were obtained. In order to search the presence of PPV, Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) tests were implemented. As a result of DAS-ELISA tests none of those 104 leaf samples had PPV. Among the leaf samples 10 *Prunus ceracifera* Atropurpurea, 8 *P. ceracifera* Pissardi Nigra, 2 *P. serrulata* “Kanzan” and 5 *P. spinosa* L. making totally 25 samples exhibiting characteristic severe PPV symptoms were subjected to Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) tests. As a results of RT-PCR tests 5 *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra leaf samples revealed the presence of *Plum pox virus* (PPV). But *P. ceracifera* Atropurpurea, *P. serrulata* “Kanzan” *P. spinosa* L. leaf samples were found free from PPV. According to our best knowledge and our results this is the first report of *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra was identified as a new host of *Plum pox virus* (PPV).

Key words: PPV, *Prunus ceracifera*, *Prunus serrulata*, *Prunus spinosa*

2017, 42 pages

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

2-ME	:2-Merkaptoetanol
cDNA	:Komplementer Deoksiribonükleik asid
DAS-ELISA	:Double Antibody Sandwich-ELISA
dNTP	:Deoksinükleotidtrifosfat
dATP	:Deoksiadenozintrifosfat
dCTP	:Deoksisitidintrifosfat
dGTP	:Deoksiguanozintrifosfat
EDTA	:Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	:Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	:Ethanol
g	:Gram
HCl	:Hidroklorik asit
Kb	:kilobaz
kDa	:Kilodalton
KH ₂ PO ₄	:Potasyum dihidrojen Fosfat
KCl	:Potasyum klorür
L	:Litre
M	:Molarite
mg	:Miligram
MgCl ₂	:Magnezyum Klorür
µl	:Mikrolitre
ml	:Mililitre
nm	:Nanometre
NaCl	:Sodyum Klorür
Na ₂ CO ₃	:Sodyum Karbonat
NaHCO ₃	:Sodyum bikarbonat
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	:Disodyum hidrojen fosfat
NaN ₃	:Sodyum azid
PCR	:Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PBST	:Fosfat Tampon Çözeltisi
PPV	: <i>Plum Pox Virus</i>

PVP	:Polyvinylpyrrolidone
PNRSV	: <i>Prunus Necrotic Ringspot Virus</i>
PDV	: <i>Prune Dwarf Virus</i>
RNA	:Ribonükleikasit
RT-PCR	:Reverse Trancriptase Polymerase Chain Reaction
Taq	:Taq polimeraz (<i>Taq</i> Polymerase)
U	:Ünite
UV	:Ultroviyole
V	:Volt



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	iii
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGE DİZİNİ	viii
ŞEKİL DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
3. MATERYAL ve YÖNTEM	11
3.1. Materyal	11
3.1.1. Sürvey Çalışmaları	11
3.1.2. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması	12
3.1.3. Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) Testinde Kullanılan Materyaller.....	12
3.1.4. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Testinde Kullanılan materyaller	12
3.2. Yöntem	14
3.2.1. Arazi Gözlemleri ve Enfekteli Bitki Materyallerinin Elde Edilmesi	14
3.2.2. Serolojik Test Yöntemi (DAS-ELISA Testi)	15
3.2.3. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Test Yöntemi.....	16
3.2.3.1. Total Nükleik asit Ekstraksiyonu	17
3.2.3.2. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....	17
3.2.3.2.1. Complementer DNA (cDNA) Sentezi	17
3.2.3.3. Polymerase Chain Reaction (PCR) Testi.....	18
3.2.3.4. % 2'lik Agaroz Jelin Hazırlanması.....	18
3.2.3.5. DNA'yı Boyama ve Görüntüleme	19
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	20
4.1. Arazi Çalışmalarına İlişkin Bulgular	20
4.2.1. DAS-ELISA Test Sonuçları	25
4.2.2. RT-PCR Test sonuçları.....	25
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	27

6. KAYNAKLAR	31
EK 1.....	35
EK 2.....	37
EK 3.....	39
TEŞEKKÜR.....	40
ÖZGEÇMİŞ.....	41



ÇİZELGE DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1: Tekirdağ ilindeki sert çekirdekli meyve üretim alanları ve üretim miktarları...1	
Çizelge 3.1: Tekirdağ ili ve ilçelerinden toplanan doğal ve yabancı konukçu türlerininine ait örneklerin ilçelere göre dağılımı.....14	
Çizelge 3.2: PPV hastalığının PCR ile çoğaltımında uygulanan sıcaklık aralıkları.....18	



ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1: Trakya Bölgesi'nin Tekirdağ ili'nde sürvey çalışmasının gerçekleştirildiği alanlar.....	11
Şekil 3.2: DAS-ELISA testinde ELISA platelerinin yıkanması işlemi.....	16
Şekil 4.1: NKÜ, Ziraat Fakültesi kampüs alanı içerisindeki yol kenarlarında bulunan <i>Prunus ceracifera</i> 'nın görünümü.....	20
Şekil 4.2: NKÜ kampüs alanındaki <i>Prunus ceracifera</i> Atropurpurea yapraklarında damarlar arası bantlaşmanın en tipik belirtileri.....	21
Şekil 4.3: <i>Prunus ceracifera</i> Atropurpurea yapraklarında damar arası renk değişiklikleri ve mozayik simptomlarının görünümü.....	22
Şekil 4.4: <i>Prunus ceracifera</i> Atropurpurea yapraklarının alt kısımlarında damar bantlaşması ve renk değişikliklerinin görünümü.....	22
Şekil 4.5: Tekirdağ ilinin Çorlu ilçesindeki dağlık bir alanda <i>Prunus spinosa</i> L.'nin görünümü.....	23
Şekil 4.6: <i>Prunus spinosa</i> L. yapraklarında mozayik simptomları ve yapraklarda kaşık şeklinde kıvrılmaların görünümü.....	24
Şekil 4.7: <i>Prunus spinosa</i> L. yapraklarında klorotik lokal lekelerin görünümü.....	24
Şekil 4.8: PPV virüsünün RT-PCR testi sonucu elde edilen PCR ürünleri (M: 100 bp DNA marker; 1,2,3,4,5 no'lu PPV ile enfekteli <i>Prunus ceracifera</i> Pissardi Nigra yaprak örnekleri).....	26

1. GİRİŞ

Meyve yetiştiriciliğinde erik, şeftali, nektarin, kiraz, vişne ve kayısının içinde bulunduğu sert çekirdekli, diğer bir deyişle taş çekirdekli meyveler dünyada önemli bir ürün grubunu oluşturmaktadır. Sert çekirdekli meyveler, botanikte *Rosales* takımı, *Rosaceae* familyası, *Prunoidae* alt familyasının yaklaşık 400 kadar bitki türünü kapsayan *Prunus* cinsinin üyeleridir. Ekolojik ve ekonomik koşulların uygunluğu ülkemizde sert çekirdekli meyve yetiştiriciliğinin önemli boyutlara ulaşmasına neden olmakta ve son yıllarda özellikle erkenci ve soğuklama isteği az çeşitler, yaygın sert çekirdekli meyve yetiştiriciliğinin yapıldığı alanların dışına taşmaktadır. Ülkemiz sert çekirdekli meyve türleri üretimi konusunda dünyada beşinci sırada yer almak olup önemli bir yere sahiptir (Anonim 2014). Sert çekirdekli meyve türleri ülkemizin değişik bölgelerinde değişen yoğunlukta yetiştirilmektedir. 2015 yılı verilerine göre ülkemizde sert çekirdekli meyvelerde 2.353.210 ton üretim yapılmıştır. Sert çekirdekli meyveler arasında kayısı üretimi 680.000 ton, şeftali üretimi 642.727 ton, kiraz üretimi 535.600 ton, erik üretimi 279.761 ton, vişne üretimi 183.500 ton, zerdali üretimi 16.100 ton, kıızılcık üretimi 10.950 ton, ığde üretimi 4.270 ton hünnap üretimi 302 ton'dur. Tekirdağ ilinin verilerine göre toplam 6.200 ton sert çekirdekli meyve üretiminin yapıldığı görülmektedir (Anonim 2015).

Çizelge 1.1. Tekirdağ İli'ndeki sert çekirdekli meyve üretim alanları ve üretim miktarları (Anonim 2015)

Ürün Adı	Toplu Meyveliklerin Alanı (da)	Toplam Ağaç Sayısı	Üretim (ton)
Kayısı	71	17.202	405
Şeftali	468	202.928	1.817
Kiraz	2.343	112.029	2.308
Erik	159	49.355	1.359
Vişne	8	15.204	250
Zerdali	0	1.850	21
Kızılcık	0	2.020	11
İğde	0	3.070	29
Hünnap	0	0	0
Toplam	3.049	403.658	6.200

Türkiye’de mevcut ekolojik koşulların uygunluğu sert çekirdekli ve sert kabuklu meyve yetiştiriciliğinin önemini gittikçe artırmakta buna bağlı olarak üretim miktarları ile bu meyvelerin dış satımı sürekli artış göstermektedir. Böylece söz konusu meyve türleri Türkiye’nin farklı bölgelerinde değişen yoğunlukta yetiştirilmektedir. Önemli bir üretim potansiyeline sahip olan meyvelerdeki zararlanmalara ve ürün kayıplarına neden olan birçok biyotik ve abiyotik faktör bulunmaktadır. Biyotik faktörler arasında yer alan hastalıklar sert çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan her alanda verimi sınırlayan en önemli faktörlerdendir. Söz konusu bu patojenler arasında yer alan virüs ve virüs benzeri hastalık etmenlerinin sert çekirdekli meyve ağaçlarında neden olduğu verim ve kalite kayıpları büyük önem taşımaktadır. Bu etmenlerin taşınma ve yayılmalarının; aşı, polen, böcek vektörleri ve hastalıklı üretim materyalleri ile kolay olması, bu hastalıklara karşı doğrudan etkili kimyasal mücadele yönteminin bulunmayışı nedeniyle diğer hastalık ve zararlılara göre önemlerini bir kat daha artırmaktadır.

Sert çekirdekli meyvelerde epidemilere neden olan PPV’nün etmeni olduğu Şarka hastalığı bu grubun en önemli hastalıklarından biri olup, ekonomik açıdan oldukça büyük öneme sahiptir. PPV’nün neden olduğu Şarka hastalığı sert çekirdekli meyve türlerinden başta erik (*Prunus domestica* L.) olmak üzere kayısı (*Prunus armeniaca* L.), şeftali (*Prunus persica* L. Batsch), nektarin (*Prunus persica* var. *nucipersica* (Bork) C.K. Schneider), kiraz (*Prunus avium* L.), vişne (*Prunus cerasus* L.) ve badem (*Prunus dulcis* L.)’de enfeksiyonlara neden olmaktadır. Ayrıca Slovakya’da enfekteli ceviz (*Juglans regia* L.) ağaçlarında ve *Euonymus europae* L. (*Celastraceae* R. Br.) ve *Ligustrum vulgare* L.’de PPV’nün varlığı ELISA, ISEM ve biyolojik testlerle saptanmıştır (Baumgartnerova 1996, Polak 2006). Sekiz familyaya ait yaklaşık 60 bitki türü deneysel olarak PPV’nün konukçu çevresine giren bitki türleri olarak tanılanmıştır. Sert çekirdekli meyvelerin en önemli hastalığı olan PPV’nin bazı ırkları, doğal ve yabani *Prunus* spp. türlerini de enfekte etmektedir. Bu durum virüsün epidemiyolojisi açısından büyük önem taşımaktadır. PPV’nün doğal konukçuları arasında yabani türler ve bazı süs bitkileri yer almaktadır. Ülkemizde PPV’nün doğal konukçu türleri olarak bazı bitkiler, peyzaj çalışmalarında süs bitkisi olarak kullanılmaktadır. Süs bitkilerinde virüs hastalıklarının görülmesi, bitki görselini bozmakta ve böylece pazar değerini düşürmektedir. Sert çekirdekli meyve türlerinin önemli bir hastalığı olan ve iç ve dış karantina listesinde yer alan *Plum pox virus* (PPV)’ün neden olduğu Şarka hastalığı ilk kez 1910 yılında Makedonya’da erik ağaçlarında daha sonra 1915 yılında Bulgaristan’da yine erik ağaçlarında gözlenmiştir. Ancak Şarka hastalık etmeninin bir virüs türü olduğu, 1932 yılında Atanasoff

tarafından rapor edilmiştir. Yaprak bitleriyle yayılabilen PPV, epidemi yapabilme veya yaygın hale gelebilmesi nedeniyle ekonomik açıdan büyük zararlar verebilecek bir hastalıktır.

Potyviriidae familyası, Potyvirus cinsinin bir mensubu olan PPV, 750x15 nm boyutlarında esnek ipliksi formda virionlara sahiptir. Tek parçalı (+) sens yaklaşık 9800 nükleotid içeren RNA genomu, VPg genomla ilişkili 5' nükleotid kısmına kovalent bağlı bir viral protein ve 3' ucunda poly (A) kuyruğu içermektedir. PPV genomu üzerinde farklı fonksiyon ve işlem yeteneğine sahip proteinleri şifreleyen alt bölgeler bulunmaktadır. Genom bisistronik olup büyük bir açık okuma çerçevesinden (ORF) oluşur ve yaklaşık 355 kDa ağırlığında bir tek poliproteini kodlamaktadır. Bu proteinler P1, HCPro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa-VPg, NIaPro, NIB ve CP'dir (Lain ve ark. 1989, Maiss ve ark. 1989, García ve ark. 1994). PPV; meyve ağaçlarında, yaprak ve meyvelerde gözlenen çarpıcı belirtilere neden olduğu gibi aynı zamanda ağaçları zayıf düşürerek ömrünü de kısaltmaktadır. Simptomlar çeşit, yaş ve sıcaklığa göre çok değişkenlik göstermektedir. Farklı PPV ırk ve izolatları, hastalık şiddeti ve belirti oluşumunda değişiklikler göstermektedir. PPV, deneysel olarak birçok tür ve çeşitten yabancı bitkiye mekanik olarak taşınmasına rağmen bahçe içerisindeki yayılımı veya taşınması tam olarak belirlenmemiştir Ancak bahçe koşullarında bazı yaprak biti türleri *Brachycaudus hellicrysii*, *Brachycaudus cardui*, *Myzus persicae*, *Phorodon humuli* tarafından etkin bir şekilde non-persistent bir davranışla taşınmaktadır. Ancak duyarlı *Prunus* türlerine aşı yoluyla taşındığı gibi mekanik yolla taşınmanın gerçekleştirildiği çok geniş bir konukçu çevresi bulunmaktadır. Şarka hastalığının belirtileri, duyarlı konukçu bitkiye, çevre şartlarına ve özellikle iklim koşullarına ve ağacın yaşına bağlı olarak değişebilmektedir (Gildow ve ark. 2000, Manachini ve ark. 2004). Serolojik reaksiyonları, moleküler ve biyolojik özelliklerine göre ırklara ayrılmaktadır. Buna göre PPV'nün Dünya'da (D) Dideron (Kerlan ve Dunez, 1979), (M) Marcus (Kerlan ve Dunez, 1979), El Amar (Wetzel ve ark. 1991), (C) Cherry (Nemchinov ve Hadidi 1998), (Rec) Recombinant (Glasa ve ark. 2004), (W) Winona (James ve Varga, 2005) ve (T) Turkey (Serçe ve ark. 2009) olarak saptanmış ve tanılanmış 7 ayrı ırkı bulunmaktadır. Son zamanlarda Cherry Russian (Glasa ve ark. 2012) ve Ancestor Marcus (Palmisano ve ark. 2012) olmak üzere iki ayrı ırkı daha tanılanmıştır. PPV hastalığı yayıldıktan sonra kontrolü oldukça zor bir hastalıktır. Hastalığın kontrolü ve önlenmesi için bahçe sürveylerinin yapılması, sertifikalı üretim materyali, yaprak bitleri ile mücadele, bahçe ve fidanlıklarda enfekteli ağaçların imha edilmesine yönelik mücadele yöntemlerini içermektedir. PPV kontrolü için en iyi metot, sıkı karantina önlemleri yanında sert çekirdekli meyve türleri bakımından izoleli bölgelerde yeni kurulmakta olan fidanlık ve tesislere virüsün girişinin önlenmesi şeklindedir.

Sert çekirdekli meyve üretimini tehdit eden PPV hastalığının epidemik hale gelmesinde doğal ve yabancı konukçu türlerinin önemi büyüktür. Nitekim Dünyada yapılan çalışmalarda Macaristan'da *Persica x davidipersica* cv. *Atropurpurea*, *Prunus cerasifera* cv. *Nigra*, *P. cerasifera* cv. *Pendula*, *P.cerasifera* cv. *Pissardii*, *P. cerasifera* cv. *Woodii*, *P. glandulosa*, *P. glandulosa* cv. *Alba Plena*, *P. japonica*, *Prunus x blireana*, *Prunus x blireana* cv. *Moseri* türlerinin PPV'nin konukçusu olduğu bildirilmiştir. Latent enfeksiyon gösteren kırmızı yapraklı bu kùltivarların Macaristan'da PPV'nin dağılımında önemli bir rol oynadığı Sebestyen ve ark. (2008) tarafından rapor edilmiştir. Kamenova (2008) ise Sofya ve çevresindeki yollarda, küçük yerleşim alanlarında, özel bahçelerde ve park alanlarında yetişen myrobalan ağacı (*Prunus cerasifera* Ehrh.)'nda *P. cerasifera* var. *rubrum* ve *P. cerasifera* cv. *Pissardi*'nin PPV'nin doğal yabancı konukçusu olduğunu, bunların tek veya karışık enfeksiyonlar halinde M, D ve Rec ırkları ile bulaşık olduğunu saptamıştır. Türkiye'de ise PPV'nin sert çekirdekli meyve türlerinin dışındaki diğer doğal ve yabancı prunus türlerinde yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. 2000-2004 yıllarında Ankara ilinde yapılan çalışmada beş ayrı ornamental süs bitkisi ve 24 çeşit yabancı otta PPV araştırılmıştır. Ancak mor kiraz erik çeşidi (*Prunus cerasifera* Pissardii)'de PPV ilk kayıt olarak rapor edilmiş ancak yabancı ot türlerinde bulunmadığı bildirilmiştir. 2006 yılında Tekirdağ ilinde yapılan çalışmada ise yabancı prunus türlerinden çakal eriği (*Prunus spinosa* L.)'nde PPV'nin bulunuşu yine ilk kayıt olarak rapor edilmiştir.

Türkiye'de PPV ile enfekteli sert çekirdekli meyve ağaçlarını eradike etmek suretiyle hastalıkla mücadele edilmesine karşın virüsün epidemiyolojisinde önemli rol oynayan doğal ve yabancı prunus türlerinin de saptanması ve eradike edilmesi, hastalığın kontrolü açısından önem taşımaktadır. Ancak Türkiye'de PPV'nin doğal ve yabancı prunus türleri ile yabancı ot konukçularına yönelik çalışmalar çok sınırlı sayıda bulunmaktadır. Bu nedenle Tekirdağ İli'ndeki doğal ve yabancı prunus türlerinde PPV hastalığını araştırmak bu tez çalışmasının amacını oluşturmaktadır. Böylece Tekirdağ ili ve dört ilçesinde cadde ve yol kenarlarında süs bitkisi olarak değerlendirilen süs eriği çeşitlerinden *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra ve *Prunus ceracifera* Atropurpurea, süs kirazı *Prunus serrulata* "Kanzan" ve yabancı çalı formundaki *Prunus spinosa* L. çakal eriğinde hastalığın varlığı serolojik ve moleküler yöntemlerle araştırılacaktır. Böylece elde edilecek bulgular, literatüre önemli katkılar sağlayacağı gibi ilgili kurumları bilgilendirmek suretiyle enfekteli bitkilerin eradike edilmesi hastalıkla mücadelede büyük önem taşıyacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sert çekirdekli meyve ağaçlarının önemli bir hastalığı olan *Plum pox virus* (PPV)'ün neden olduğu Şarka hastalığı ilk kez 1910 yılında Makedonya'da erik ağaçlarında daha sonra 1915 yılında Bulgaristan'da yine erik ağaçlarında gözlenmiştir. Ancak Şarka hastalık etmeninin bir virüs türü olduğu ise 1932 yılında Atanasoff tarafından rapor edilmiştir. PPV daha sonra kayısı (1933), şeftali (1961) ve vişnede (1980) saptanmıştır. 1932 ve 1960 yılları arasında Bulgaristan'dan Yugoslavya, Macaristan, Romanya, Cezayir, Çekoslavakya, Almanya ve Rusya'ya yayıldığı tespit edilmiştir. Hastalığın Batı Avrupa'da görülmesinden sonra Almanya, Avusturya ve Hollanda'da saptanmış ve hızla İsviçre, Yunanistan, İngiltere, Türkiye, Fransa, İtalya, Belçika, İspanya, Portekiz, Mısır, Suriye'ye yayılmış ve sonunda Kıbrıs'da da tespit edilmiştir. 1990 yılından sonra Şili, Amerika, Ürdün, Hindistan ve Kanada'da rapor edilmiştir. Şarka hastalık etmeni PPV'ye ait yeni raporlar bildirilmektedir. 2004 yılında Kazakistan'da, 2005 yılında Çin'de kayısı ağaçlarında, 2006 yılında ise *Prunus* türlerinde Arjantin ve Pakistan'da saptanmıştır. En son rapor ise ticari Japon kayısı ağaçlarında Tokyo, Japonya'da tespit edildiği bildirilmiştir (Sochor ve ark. 2012).

Plum pox virus (PPV)'nün Türkiye'deki varlığı ise ilk kez 1968 yılında Sahtiyancı (1969) tarafından Edirne ilinde yetiştirilen eriklerde saptanmıştır. Kurçman (1973), Ankara ilinde yetiştirilen erik ağaçlarından *P. persica* GF-305 üzerine kabuk aşılama ile PPV'nün varlığını rapor etmiştir. Daha sonra Yürektürk (1984), Marmara Bölgesi'nde 1976-1982 yılları arasında yaptığı çalışmada şeftali, erik ve kayısı ağacında PPV enfeksiyonunun varlığını bildirmiştir. İzmir ve Yalova'daki sert çekirdekli meyve bahçelerinde PPV'nün varlığı Dunez (1986) tarafından rapor edilmiştir. Yıldızgördü ve Çalı (1994) Doğu Akdeniz bölgesinde sert çekirdekli meyvelerde zararlı virüs hastalıklarını saptamak amacı ile yaptıkları çalışmada 1 adet örneğin PPV ile enfekteli olduğunu bildirmişlerdir.

Polák (1989) kayısı, şeftali, erik, *Prunus amigdalopersica* ve *Prunus cerasifera* ssp. ağaçlarında PPV'nü Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve Immunosorbent Elektron Mikroskopu (ISEM) ile tespit etmiştir. Virüs belirtileri gösteren kayısı ve şeftali ağaçlarının yaprak ve kabuklarında PPV'yi ELISA testi ile saptamıştır. Sürgün kabuklarında virüs saptanmış ancak *P.cerasifera* ssp. yapraklarında hafif lekelenme belirtileri gösteren yaprak örneklerinde tespit edilmemiştir. Böylece kayısı, şeftali ve *P. cerasifera*'da PPV ELISA testi ile tespit etmiştir. Yaprak ve meyvelerde belirtiler görülen şeftali, *Prunus amigdalopersica* ve erik (*cvs Carská, Cacanská leptica*) ağaçlarında ise ISEM yöntemi ile

PPV'nü saptamıştır. Virüsü ayrıca, PPV belirtileri göstermeyen şeftali GF 305 ve *P. cerasifera* ssp. Myrobalana GF 31 ağaçlarının kabuk kısımlarında da saptadığını bildirmiştir.

Polak (2002) Çekoslavakya'da çok geniş bir dağılım gösteren erik ve myrobalans erik anacı türlerinden doğal olarak yetişen ve yol kenarlarında bulunan bu türlerin PPV'nin ana inokulum kaynağı ve rezervuar bitkisi olduğunu bildirmiştir. Bu çeşitlerin yetiştiriciliği yapılan erik kültürlerinden PPV'ye karşı daha hassas olduğunu bu nedenle de dayanıklı kültürlerin yetiştirilmesi gerektiğini rapor etmiştir. PPV'nin bir diğer doğal konukçusu *Prunus spinosa* L.'nin sınırlı bölgelerde bulunduğunu ve öncelikli öneme sahip olmadığını ikincil inokulum kaynağı olduğunu bildirmiştir. PPV-C ırkının kiraz ve vişnede şu zamana kadar Çekoslavakya'da saptanmadığını ancak PPV-M ırkının sadece iki erik ve bir damson erik ağacında bulunduğunu rapor etmiştir. PPV ile bulaşık 1 adet kayısı ve 1 adet şeftali fidanlarının üretim materyali ithalatı ile bulaştığını ve bu şekilde giriş yaptığını rapor etmiştir. Son zamanlarda PPV'nin bulaşık fide ve fidanlarla giriş yaptığını, PPV-D ırkının ise Çekoslavakya'da dağılımının ve yaygınlığının konukçu türleri arasında çok düşük olduğunu rapor etmiştir.

Sertkaya ve ark. (2003) Malatya ili dışında Türkiye'nin farklı bölgelerinde PPV'yi saptamak amacıyla yaptıkları çalışmada toplam 52 örnekten sadece Ankara ilinden toplanan 2 adet kayısı izolatında PPV-M ırkını tespit etmişlerdir.

James ve Thomson (2005) PPV'nin bulunuşunu, bazı ornamental süs bitkileri ve yabani prunus türlerinden oluşan doğal ve deneysel ortamlardaki konukçu türlerinde araştırmışlardır. Doğal ve deneysel konukçularında aşı ve aşı gözü ve yaprak biti vektörlerinin neden olduğu enfeksiyonların önemli olduğunu ancak arazi koşullarında kök kaynaşması yoluyla yayılmanın çok net anlaşamadığını bildirmişlerdir. PPV'nin inokulum kaynağı ve potansiyel rezervuar kaynağı olarak arazide veya fidanlıklarda konukçu türlerine yayılmasında, yaprak biti vektörlerinin kontrol altına alınması gerektiğini bildirmişlerdir. Sertifikasyon ve sürvey programlarının oluşturularak PPV ile enfekteli ağaçların eradike edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Elibüyük (2006) PPV'nin yabani ve süs bitkilerini enfekte etme kabiliyetini incelemek üzere çeşitli yabani ve doğal sert çekirdekli süs bitkisi türleri ile yabancı otları PPV'nin potansiyel rezervuarı olarak araştırmıştır. 2000 ile 2004 yılları arasında beş ayrı ornamental süs bitkisinde ve 24 farklı yabancı otta araştırmıştır. PPV'nin yabancı otlarda tespit edilmediğini ancak bir adet mor kiraz eriğinde (*Prunus cerasifera* Pissardii) saptadığını bildirmiştir. Böylece PPV-M ırkını DASI-ELISA testi ile tanılamış ve IC-RT-PCR testi ile de sonuçları doğrulamıştır. Ayrıca *Hyalopterus pruni*: erik unlu yaprak biti türünün PPV'nin *P.*

cerasifera Pissardi'deki vektörü olarak saptamıştır. Böylece bu çalışma, Türkiye'de süs bitkisi olarak değerlendirilen *P. cerasifera* Pissardii'de PPV'nin bulunuşunun ilk kaydı olarak rapor edilmiştir.

Liacer (2006) PPV'nü bazı yabancı ot konukçuları ve yabani prunus türlerinde araştırmıştır. Deneysel yöntemler kullanarak PPV'nin yeni yabancı ot konukçu türlerini rapor etmiştir. *Chenopodium foetidum*, *Nicotiana clevelandii*, *N. benthamiana* ve *Pisum sativum* türlerinde virüsün pürifiye edilmesi ve konsantrasyonu yönünden uygun olduğunu bildirmiştir. Doğal koşullarda PPV ile enfekteli konukçu listesinin deneysel ortamlarda enfeksiyona maruz kalan konukçu sayısından daha az olduğunu rapor etmiştir. PPV'nin konukçusu yabancı ot türlerinin özellikle meyve fidanlıklarında virüsün yayılması ve inokulum kaynağı olması açısından çok önem taşımadığını bildirmiştir.

Polák (2007) Doğal ortamda kendiliğinden yetişen çakal eriği (*Prunus spinosa* L.) ile yol kenarlarındaki erik ve myrobalan anaçlarında *Plum pox virus* (PPV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Apple chlorotic ringspot virus* (ACLSV) ve *Apple mosaic virus* (ApMV) hastalıklarını araştırmıştır. Ayrıca tatlı ve ekşi kiraz ağaçlarında ise PPV, PDV, PNRSV ve *Cherry leafroll virus* (CLR)lerini de araştırmıştır. En yaygın virüsün eriklerde PPV olduğunu bildirmiştir. Araştırılan ağaçların % 74'ü virüsle enfekteli iken myrobalanda PPV, PDV ve PNRSV'nin sırasıyla % 26, % 11 ve % 18 oranında enfeksiyona sahip olduğunu tespit etmiştir. *Prunus spinosa* L.'de PDV'nin % 27, kirazda ise PDV'nin % 25 ve PNRSV'nin ise % 22 enfeksiyon oranını sahip olduğunu bildirmiştir. Buna rağmen tatlı ve ekşi kirazlarda PPV saptanmamıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda Çek Cumhuriyeti'nde doğal ortamda kendiliğinden yetişen prunus cinsine mensup bitkilerde ACLSV ve ApMV hastalıklarının enfeksiyon oranlarının önemsiz olduğunu bildirmiştir.

Sebestyen ve ark. (2008) 2002 ve 2007 yıllarında Macaristan'da yaptıkları çalışmada 120 tür ve kültivarın bulunduğu fidanlıklarda yapılan sürveylerde ornamental prunus türlerinde PPV'nin doğal konukçularını araştırmışlardır. Bu amaçla PPV ile enfekteli 50-90 adet ağacı ELISA ve PCR yöntemiyle testlemiştir. Cadde kenarlarında süs bitkisi olarak değerlendirilen koyu kırmızı yaprakları bulunan 25 *P. cerasifera* cv. Nigra türünden 22'sinin PPV-D ırkı, 2'sinin PPV-M ırkı ve 1 ağacın ise PPV-D ve PPV-M ırkının karışık enfeksiyonlar halinde bulduklarını saptamışlardır. Böylece *Persica x davidopersica* cv. *Atropurpurea*, *P. cerasifera* cv. *Nigra*, *P. cerasifera* cv. *Pendula*, *P.cerasifera* cv. *Pissardii*, *P. cerasifera* cv. *Woodii*, *P. glandulosa*, *P. glandulosa* cv. *Alba Plena*, *P. japonica*, *Prunus x blireana*, *Prunus x blireana* cv. *Moseri* türlerinde PPV enfeksiyonlarını tespit etmişlerdir. Söz konusu bu süs bitkisinin koyu kırmızı yapraklara sahip olmasından dolayı virüs

konsantrasyonu yüksek olsa dahi tanınmasının zor olduğunu bildirmişlerdir. Latent enfeksiyon gösteren kırmızı yapraklı bu kültürlerin Macaristan'da PPV'nin dağılımında önemli bir rol oynadığını vurgulamışlardır. Macaristan'da şu ana kadar rapor edilmeyen PPV'nin doğal konukçusu bu süs bitkisi kültürlerinin ve prunus türlerinin çoğaltma materyali olarak kullanılmaması için sertifikasyon programlarına dahil edilmesi gerektiğini rapor etmişlerdir.

İlbağı ve ark. (2008) 54 adet simptom gösteren *Prunus spinosa* L. çakal eriği çalı türünde *Plum pox virus* (PPV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) ve *Apple mosaic virus* (ApMV)'lerini DAS-ELISA ve RT-PCR test yöntemi ile araştırmışlardır. DAS-ELISA test sonuçlarına göre, 54 örneğin 13'ünde % 24.1 oranında PPV, 8'inde % 11.1 oranında ACLSV, 12'sinde % 22.2 oranında ApMV tespit etmişlerdir. PPV ile enfekteli yaprak örneklerinden izole edilen *Prunus spinosa* L. izolatları RT-PCR testine tabi tutulmuştur. RT-PCR testinde PPV-M ırkının spesifik primerleri ile çoğaltılan 198 bp'lik DNA fragmentler elde etmişlerdir. DAS-ELISA ve RT-PCR test sonuçlarına göre Tekirdağ ilindeki *Prunus spinosa* L.'da PPV-M ırkının yanı sıra ACLSV ve ApMV'nin varlığını saptamışlardır. Yabani bir çalı türü olan *Prunus spinosa* L.'nin PPV, ACLSV ve ApMV virüslerinin inokulum kaynağı olması açısından Trakya bölgesinde yeni kurulan meyve tesisleri için ciddi bir tehdit oluşturduğunu bildirmişlerdir. Elde edilen bu sonuçlar Türkiye'de *Prunus spinosa* L.'da PPV, ACLSV ve ApMV'nin bulunuşunun ilk kaydı olarak rapor edilmiştir.

Kamenova (2008) Sofya ve çevresindeki yollarda, küçük yerleşim alanlarında, özel bahçelerde ve park alanlarında yetişen 425 adet myrobalan ağacı (*Prunus cerasifera* Ehrh.)'nı virüs belirtilerine göre görsel makroskobik olarak incelemiş ve PPV'nin varlığını saptamak üzere DAS-ELISA testine tabi tutmuştur. Irk farklılaşması için yapılan DAS-ELISA, PPV izolatlarının PPV-M ve PPV-D ırklarına özgü spesifik monoklonal antikorları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Az sayıdaki PPV izolatları, gen bölgesinin iki farklı bölgesini hedefleyen M ve D spesifik primerleri ile çoğaltmıştır. CP geninin 3' terminal bölgesini hedefleyen primerler ile yapılan PCR testinde, PPV'yi bilinmeyen izolatlarda saptamıştır. Toplam olarak % 49 oranında PPV enfeksiyonu saptanırken, örneklerin çoğunluğunda % 57 oranında PPV-M ırkı, % 29 oranında ise PPV-D ırkı ile bulaşıklık tespit etmiştir. Karışık enfeksiyonlar örneklerin % 2'sinde ortaya çıkmış ve bilinmeyen bir PPV ırkından etkilenen hastalıklı ağaçların oranının ise % 12 olduğunu bildirmiştir. Ayrıca enfekteli bir ağaçta PPV-Rec ırkını saptamıştır. Bulgaristan'da iki süs bitkisi türü olan *P. cerasifera* var. *rubrum* ve *P. cerasifera* cv. *Pissardii*'nin PPV'nin doğal yabani konukçuları olduğunu ve bunların tek veya karışık enfeksiyonlar halinde M ve D ırkları ile bulaşık olduğunu saptamıştır. IC-RT-PCR

sonuçlarına göre *Armeniaca desicarpa*'nın (*P. cerasifera* x *P. armeniaca*) bir ağaçta PPV-M ve PPV-Rec ırklarının karışık enfeksiyonlarını belirlemiştir. Bu çalışma ile Bulgaristan'daki *P. cerasifera* türlerinin PPV'nin doğal rezervuar kaynağı olduğunu ilk kayıt olarak rapor etmiştir.

Serçe ve ark. (2009) Ankara ilinden alınan 16 PPV izolatını serolojik ve moleküler yöntemlerle analiz etmişlerdir. Bir izolatın dışında tüm izolatların karışık enfeksiyonlar halinde bulunduğunu, PPV-M ve PPV-D ırklarının izolatların 9'unda % 60 oranında enfeksiyona sahip olduğunu saptamışlardır. 4 izolatın 5' ve 3' genomik bölgesinin kısmi nükleotid sekansını yapmışlar ve Türkiye Ab-Tk rekombinant PPV izolatı ile yakın ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. 3 izolatın genomik sekanslarının, genomun 1566 pozisyonundaki HC-Pro geninin AbTk gibi aynı rekombinasyona sahip olduğu görülmüştür. AbTK Türk izolatının tüm genom sekansı bilinmediği için virüsün evrimsel geçmişi saptanamamıştır. Ancak Ankara'dan elde edilen izolatların genomun HC-Pro genine özgün bir rekombinasyonda diğer PPV izolatları ile yakın ilişkili olduğunu saptamışlar ve aynı grupta yer aldığını bildirmişlerdir. Ancak PPV-Rec ırkına benzer şekilde söz konusu bu izolatların PPV virüsünün yeni bir ırkı olan PPV-T (Turkey) ırkı olarak isimlendirilmesini önermişlerdir.

Nemeth ve ark. (2010) iki botanik bahçesinde ve bir ağaç parkında binlerce odunsu bitki arasından virüs belirtileri gösteren bitkilerin tür ve çeşitlerini seçerek 11 farklı virüsün varlığını ELISA testi ile araştırmıştır. 28 bitki tür ve çeşidinin PPV, PDV, PNRSV, CLRV ve ASPV ile enfekteli olduklarını saptamıştır. PPV'nin varlığını *Prunus cerasifera* 'Pendula', *P. cerasifera* 'Pissardii', *P. glandulosa*, *P. glandulosa* 'Alba Plena', *P. glandulosa* 'Sinensis', *P. japonica*, *P. sogdiana*, *P. tomentosa* (Tibet'ten) ve *P. x blireana* 9 farklı tür ve çeşitte saptamıştır. 17 tür ve çeşidin ise PDV ile enfekteli olduklarını tespit etmiştir.

Rubio ve ark. (2011) üç farklı üretim döneminde *Prunus salicina*, *Prunus cerasifera*, *Prunus domestica* ve *Prunus armeniaca* erik kültürlerinde PPV'nin Dideron tipi izolatının reaksiyonlarını araştırmışlardır. PPV belirtisi gösteren tüm erik kültürlerinin ELISA testinde pozitif reaksiyon verdiğini ancak çeşitler arasında PPV'ye karşı reaksiyonların farklı olduğunu bildirmişlerdir. Çok şiddetli belirtisi gösteren *Prunus salicina* Japon erik çeşitlerinin çok hassas olduğunu ve ELISA'da yüksek pozitif değerlere sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ancak hafif belirtiler gösteren Calita, Laroda gibi bazı Japon eriklerinin ise düşük konsantrasyona sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca *Prunus cerasifera* süs eriklerinden J9'un çok duyarlı, Kometa çeşidinin duyarlı ancak P16 ve P2980 çeşitlerinin ise PPV'ye tolerant olduğunu bildirmişlerdir. Hibrit çeşitlerden J300 ve Flavor Supreme

çeşitlerinin ise duyarlı, Obilnaya çeşidinin ise Şarka hastalığına karşı tolerant olduğunu rapor etmişlerdir.

Karabacak ve İlbağı (2011) Trakya Bölgesi'nin Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ illerine bağlı 10 ilçedeki badem ağaçlarından alınan 158 adet çiçek ve 260 adet yaprak örneklerinde *Plum pox virus* (PPV), *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV) ve *Prune dwarf virus* (PDV) hastalıklarını araştırmışlardır. DAS-ELISA, TAS-ELISA ve RT-PCR test yöntemleri ile üç virüsün araştırıldığı badem ağaçlarında bireysel olarak % 31.15 oranında PNRSV, % 4.23 oranında PDV, % 1.92 oranında PPV hastalıklarını saptamışlardır. Ağaçların % 1.54'ünün PNRSV+PDV ve PNRSV+PPV virüsleri ile karışık enfeksiyonlar halinde bulunduğunu, Trakya Bölgesi'ndeki badem ağaçlarındaki toplam virüs enfeksiyon oranlarının ise % 38.85 oranında olduğunu bildirmişlerdir.

İlbağı ve Çıtır (2014) 2010 yılında yaptıkları çalışmada Trakya Bölgesindeki badem ağaçlarından toplanan 260 adet yaprak örneğinde PPV hastalığını DAS-ELISA ve RT-PCR test yöntemiyle araştırmışlardır. 5 badem ağacında PPV, 81 ağaçta PNRSV ve 11 ağaçta PDV virüslerini saptamışlardır. PPV ile enfekteli 5 badem izolatlarının kısmi nükleotid sekanslarını saptamışlar ve Gen bankasına kayıtlı 17 farklı badem izolatu ile filogenetik olarak sınıflandırmışlardır. Dünyadaki diğer badem izolatları ile % 75.72 - % 96.87 oranında nükleotid benzerliği saptandığını ancak Türk izolatlarının birbirleri arasındaki nükleotid benzerliğinin ise % 95.82- 96.61 olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca 5 Türk badem izolatlarının nükleotid ve aminoasit sekanslarının filogenetik sınıflandırmasında PPV-T izolatu ile aynı grup içerisinde yer aldığını bildirmişlerdir. Elde edilen sonuçların Türk badem izolatlarının Türkiye'de önceki çalışmalarla saptanan kayısı izolatları gibi PPV-T ırkına ait olduğunu rapor etmişlerdir.

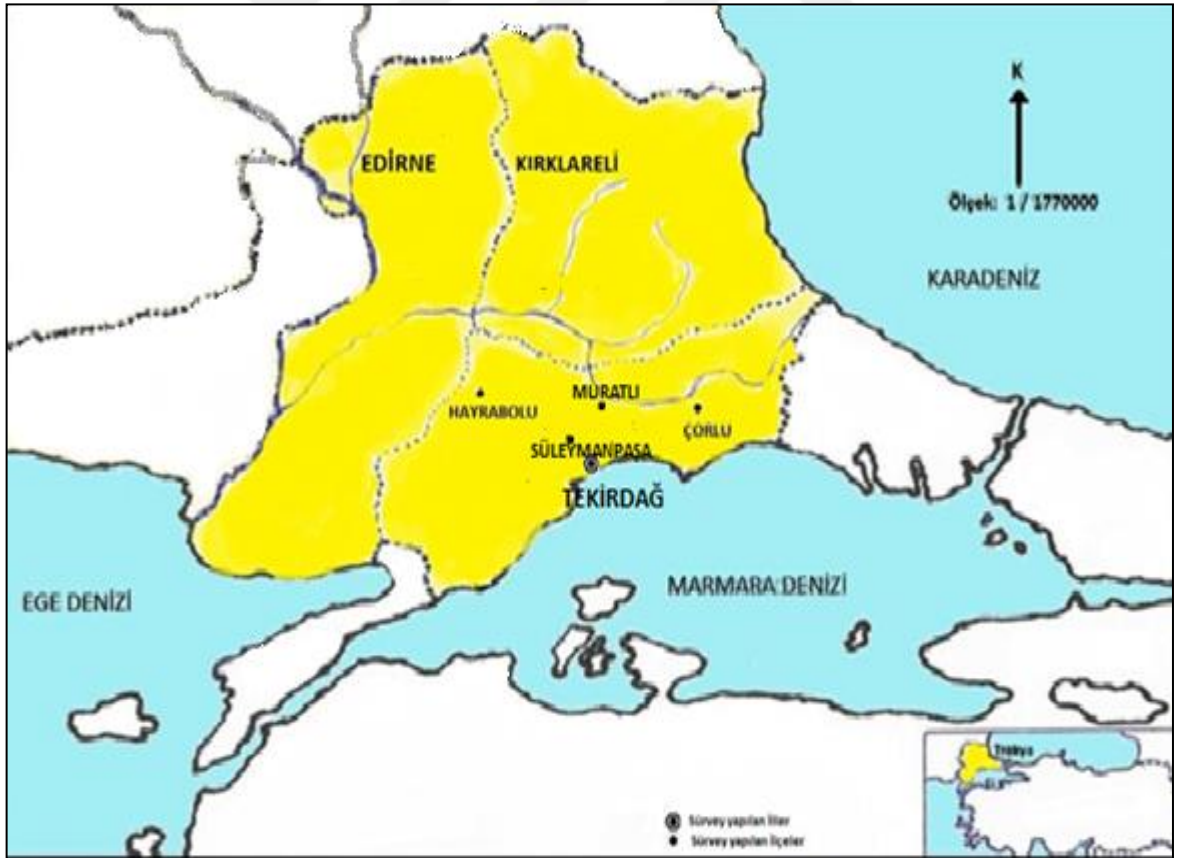
Gürcan ve Ceylan (2016) PPV virüsünün sert çekirdekli meyve türlerinin önemli bir hastalığı olduğunu, 1960 yılından itibaren Türkiye'nin farklı bölgelerinde varlığının rapor edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar PPV ırklarını tanımlamak ve genetik değişkenliğini saptamak üzere yaptıkları çalışmada enfekteli bölgelerden, uzak mesafe ve farklı lokasyonlardan aldıkları 612 örnekte öncelikli olarak PPV serolojik ve moleküler yöntemlerle saptamışlardır. 314 adet pozitif reaksiyon veren örneklerde virüs türlerinin farklı ırkları arasında korunmuş bir bölge olan Potyvirus türleri arasında değişkenlik gösteren PPV'nin P3-6K1 gen bölgesini içeren 664 nükleotid uzunluğundaki kısmını sekanslamışlardır. Bursa'daki bir izolatta saptanan PPV-Rec ırkının dışında, PPV-D ve PPV-T ırklarının sınırlı bahçelerde bulunduğunu ancak PPV-M ırkının ise birçok fidanlıkta bulunduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca PPV-T ırkının Türkiye'de dominant bir ırk olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Sürvey Çalışmaları

Tekirdağ İli'nin Merkez ilçe Süleymanpaşa, Muratlı, Çorlu ve Hayrabolu ilçelerindeki PPV'nin doğal ve yabancı konukçu türlerinden yaprak örnekleri almak üzere 06.06.2016-10.06.2016 tarihleri arasında sürvey çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sürvey çalışmalarında yol ve cadde kenarlarında süs bitkisi olarak değerlendirilen prunus türlerinden süs eriği çeşitleri: *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra, *Prunus ceracifera* Atropurpurea, süs kirazı: *Prunus serrulata* Lindl. Kanza ve doğada kendiliğinden yetişen yabancı çalı türlerinden çakal eriği: *Prunus spinosa* L.'da simptom gösteren ve göstermeyen bitkilerden toplam 104 adet yaprak örnekleri toplanmıştır.



Şekil 3.1. Trakya Bölgesi'nin Tekirdağ İli'nde sürvey çalışmasının gerçekleştirildiği alanlar

3.1.2. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması

Şekil 3.1.'de gösterilen Tekirdağ İli'nin 4 ilçesinden merkez ilçe Süleymanpaşa ve Çorlu, Hayrabolu, Muratlı ilçelerinde yapılan sürvey çalışmalarında sistemik virüs hastalık belirtileri gösteren ve göstermeyen *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra (Süs eriği), *Prunus ceracifera* Atropurpurea (Süs eriği), *Prunus serrulata* Lindl. Kanza (Süs kirazı) ve *Prunus spinosa* L. (Çakal eriği) yaprak örnekleri toplanmış ve karakteristik virüs hastalık belirtileri gösteren bitkilerin fotoğrafları çekilerek kayıt altına alınmıştır. Böylece Tekirdağ İli'nin Merkez Süleymanpaşa ilçesinden 80 yaprak örneği, Çorlu ilçesinden 13 yaprak örneği, Hayrabolu ilçesinden 4 yaprak örneği ve Muratlı ilçesinden 7 yaprak örneği alınarak toplam 104 adet yaprak örneği ile çalışma gerçekleştirilmiştir. Arazi çalışmalarında Tekirdağ İli sert çekirdekli meyve üretim alanlarına yakın ve uzak mesafelerde bulunan PPV'nün doğal ve yabancı konukçu türlerinde mozayik, damar arası bantlaşması, şekil bozukluğu, klorotik lokal lekeler ile sistemik renk değişikliği belirtileri gösteren yaprak örnekleri toplanmıştır.

3.1.3. Double Antibody Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) Testinde Kullanılan Materyaller

Sürvey alanından toplanan 104 adet belirtil gösteren ve göstermeyen yaprak örnekleri DAS-ELISA testinde materyal olarak kullanılmıştır. *Plum pox virus* (PPV)'nün serolojik tanısı için DAS-ELISA testinde kullanılan poliklonal antiserumlar, pozitif ve negatif kontroller Bioreba (Reinach BL1, İsviçre) firmasından temin edilmiştir. Serolojik testlerde kullanılan ELISA plate'ler ve pipet uçları Invitrogen (CA, USA) firmasından temin edilmişlerdir.

3.1.4. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Testinde Kullanılan Materyaller

Çalışma materyalini oluşturan *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra, *Prunus ceracifera* Atropurpurea, *Prunus serrulata* Lindl. Kanza ve *Prunus spinosa* L. prunus türlerinde karakteristik virüs belirtileri sergileyen örnekler ile DAS-ELISA testinde negatif kontrollerin absorbans değerinin iki katına yakın absorbans değerleri gösteren enfekteli yaprak örnekleri seçilmiştir. Böylece 8 adet *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra, 10 adet *Prunus ceracifera* Atropurpurea, 2 adet *Prunus serrulata* Lindl. Kanza ve 5 adet *Prunus spinosa* L.

olmak üzere toplam 25 adet enfekteli yaprak örnekleri RT-PCR testinde materyal olarak değerlendirilmiştir. Total nükleik asit izolasyonu için Foissac ve ark. (2001)'nın önerdiği yöntemde kullanılan kimyasallar Invitrogen (CA, USA) firmasından temin edilmiştir. cDNA sentezi Fermentas (NY, USA) firmasından satın alınan cDNA sentez kiti ile gerçekleştirilmiştir. PCR işlemi için gerekli olan PCR bileşenleri ise yine Fermentas (NY, USA) firmasından temin edilmiştir.



3.2. Yöntem

3.2.1. Arazi Gözlemleri ve Enfekteli Bitki Materyallerinin Ede Edilmesi

Tekirdağ İli'nin Merkez ilçesi Süleymanpaşa ve Çorlu, Hayrabolu, Muratlı ilçelerinde gerçekleştirilen sürvey çalışmalarında karakteristik mozayik, klorotik lokal lekeler, şekil bozukluğu, damar arası bantlaşma ve sistemik renk değişikliği belirtileri gösteren ve göstermeyen bitkilerden alınan 104 yaprak örneğinin her biri 100 gr'dan az olmamak üzere toplanmıştır. Böylece 31 adet *Prunus ceracifera* Pissardii Nigra yaprak örneği, 31 adet *Prunus ceracifera* Atropurpurea, 6 adet *Prunus serrulata* Lindl. Kanzas yaprak örneği ve 36 adet *Prunus spinosa* L. yaprak örneği olmak üzere 104 adet yaprak örneği etiketlenmek suretiyle polietilen torbalara konulmuş ve buz kutusu içerisinde laboratuara getirilmiştir. Toplanan yaprak örnekleri serolojik ve moleküler testlerde kullanılmak üzere laboratuardaki - 20 °C'de çalışan derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Sürvey alanı kapsamında yer alan Tekirdağ İli Merkez ilçe ve diğer 3 ilçeden alınan örneklerin dağılımı Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Tekirdağ İli ve ilçelerinden toplanan doğal ve yabani konukçu türlerine ait örneklerin ilçelere göre dağılımı

İlçe	Tür Adı	Örnek Adedi
Süleymanpaşa	<i>Prunus ceracifera</i> Atropurpurea	31
	<i>Prunus ceracifera</i> Pissardi Nigra	31
	<i>Prunus spinosa</i> L.	12
	<i>Prunus serrulata</i> Lindl. Kanzas	6
Çorlu	<i>Prunus spinosa</i> L.	13
Hayrabolu	<i>Prunus spinosa</i> L.	4
Muratlı	<i>Prunus spinosa</i> L.	7
TOPLAM	4	104

3.2.2. Serolojik Test Yöntemi (DAS-ELISA Testi)

Çalışma materyalini oluşturan virüs simptomu gösteren ve göstermeyen 104 adet yaprak örneklerinde *Plum pox virus* (PPV)'un serolojik yöntemlerle araştırılmasında Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) test yöntemi kullanılmıştır. DAS-ELISA testi, Clark ve Adams (1977)'in temel alındığı yöntemle göre antiserumların temin edildiği Bioreba (Reinach BL1, İsviçre) firmasının önerdiği prosedür doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Buna göre;

- Kaplama tampon çözeltisi içerisinde 1/20 oranında seyreltilen antibadiler ELISA platelerinin her bir çukuruna 200 µl konulmuş ve nemli bir kutu içerisine yerleştirilen plateler 30 °C'de çalışan inkübatörde 4 saat süre ile inkübe edilmiştir. Inkübasyondan sonra plateler içerisindeki sıvı boşaltılmış ve yıkama tampon çözeltisi (1x PBST) ile 4 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

- Çalışma materyali olarak toplanan yaprak örnekleri steril porselen havan içerisinde 1/10 oranında ekstraksiyon tampon çözeltisi içerisinde ezilerek bitki özsuvarı elde edilmiştir. Cam tüpler içerisine konulan ekstraktlar karıştırılmak suretiyle ELISA platelerinin her bir çukuruna 200 µl'lik miktarlarda ve iki tekerrürlü olacak şekilde konulmuştur. Her bir virüse ait pozitif ve negatif kontroller de 200 µl'lik miktarlarda ELISA platelerinin sol çukuruna iki tekerrürlü olacak şekilde yerleştirilmiş ve ELISA plateler nemli bir kutu içerisine konularak +4 °C'de bir gece inkübe edilmişlerdir. Inkübasyondan sonra bitki ekstraktları boşaltılmış ve 4 kez yıkama tampon çözeltisi (1x PBST) ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

- Kullanımdan 10 dakika önce hazırlanan Konjugate tampon çözeltisi içerisinde seyreltilen enzimle bağlantılı antiserum 1/20 oranında seyreltilmiş ve 200 µl'lik miktarlarda platelerin her bir çukuruna konulmuştur. Nemli kutu içerisine yerleştirilen plateler 30 °C'de çalışan inkübatörde 5 saat süre ile inkübe edilmişlerdir. Inkübasyon süresi sonunda plateler yıkama tampon çözeltisi (1x PBST) ile 4 kez yıkanmıştır.



Şekil 3.2. DAS-ELISA testinde ELISA platelerinin yıkanması işlemi

- Substrat tampon çözeltisi içerisinde seyreltilen 1mg/ 20ml pNPP çözeltisinden 200 µl'lik miktarlarda platelerin çukurlarına konulmuş ve 30 °C'de çalışan inkübatörde inkübe edilmişlerdir. Sonuçlar 60-120 dakika sonunda ilk olarak görsel daha sonra da ELISA okuyucusu (Thermo-Multiskan FC-Waltham-MA, USA)'nda 405 nm dalga boyundaki absorbans değerleri okunarak değerlendirilmiştir. Ancak enfekteli olduğundan şüphelenilen yaprak örneklerindeki virüs konsantrasyonları düşük oranlarda olabileceğinden plateler buzdolabında +4 °C'de 1 gece daha bekletilmiş (Epidemiologie und Pathogendiagnostik Institut-Aschersleben/Almanya'daki kullanılan yöntem uygulanmıştır) ve ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda tekrar okutulmuş absorbans değerleri kayıt altına alınmıştır.

3.2.3. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Test Yöntemi

Karakteristik virüs belirtileri sergileyen ve negatif değerin iki katına yakın absorbans değerleri gösteren 8 adet *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra, 10 adet *Prunus ceracifera* Atropurpurea, 2 adet *Prunus serrulata* Lindl. Kanza ve 5 adet *Prunus spinosa* L. olmak üzere 25 adet enfekteli prunus yaprak örnekleri RT-PCR testine tabi tutulmuşlardır.

3.2.3.1. Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu

25 adet enfekteli yaprak örneğinin total nükleik asit ekstraksiyonları Foissac ve ark. (2001) tarafından önerilen yönteme göre yapılmıştır. Buna göre 100 mg bitki materyali 1ml ekstraksiyon tamponu ile steril havan içerisinde ezilerek homojenize edilmiştir. Steril eppendorf tüpler içerisine 500 µl hacimdeki özsu konularak üzerlerine 100 µl miktarlarda % 10'luk Sodium lauryl sarcosyl solüsyonu ilave edilmiş ve tüpler ara sıra sallanmak üzere 10 dakika süreyle 70 °C'de inkübe edilmişlerdir. Daha sonra 5 dakika süreyle buza daldırılan tüpler soğutulmuştur. Tüpler 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra sıvı fazın 300 µl'si daha önceden hazırlanmış eppendorf tüplere transfer edilmiş ve içerisine 150 µl ethanol, 25 µl silica süspansiyonu ve 300 µl 6 M Sodium iodine ilave edilmiştir. Karışım, sallayıcı platform üzerinde oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Tüpler 6000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı faz atılmış ve 500 µl yıkama tamponu ile oluşan pelletler yıkanmıştır. Tüpler 6.000 rpm'de 1 dakikalık santrifügasyona tabi tutulduktan sonra ikinci defa eppendorf tüplerdeki pelletler aynı hacimdeki yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Elde edilen pelletler, 150 µl RNase-free su ile çözündürüldükten sonra ve 4 dakika 70 °C'de inkübe edilmiştir. Tüpler 3 dakika 14.000 rpm de santrifüj edildikten sonra, sıvı faz yeni hazırlanan eppendorf tüplere transfer edilerek, pelletler atılmıştır. Elde edilen total nükleik asit, complementer DNA (cDNA) elde edilinceye kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.2. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

3.2.3.2.1. Complementer DNA (cDNA) Sentezi

cDNA sentezi, kitin satın alındığı firmanın (Fermentas) prosedürüne uygun olarak yapılmıştır. Nükleaz-free microsantrifüj tüp içerisine aşağıdaki bileşenler eklenmiştir.

- 2 µl total RNA
- 1 µl antisens primer (100 pmol/µl)
- 9 µl RNase free

su eklenerek 12 µl'ye tamamlanmış ve elde edilen karışım vortekslenerek 65 °C'de 5 dakika inkübe edilmiş ve hızla buza daldırılarak soğutulmuştur.

- 4 µl 5X First strand buffer

- 1 µl Ribonukleaz inhibitör
- 2 µl dNTPs (10 mM)
- 1 µl Revers transkriptaz enzim

eklenmek suretiyle elde edilen 8 µl'lik hacimdeki bileşenler tüplere aktarılmış ve mikropipetle aşağı yukarı çekmek suretiyle karıştırılmıştır. 42 °C'de 1 saat süre ile inkube edilmiş ve daha sonra 70 °C'de 5 dakika bekletildikten sonra elde edilen cDNA, PCR işlemi yapılıncaya kadar – 20 °C'de saklanmıştır.

3.2.3.3. Polymerase Chain Reaction (PCR) Testi

PPV'nin doğal ve yabancı konukçu türlerinin araştırıldığı PCR testinde 10 adet *Prunus ceracifera* Atropurpurea, 8 adet *Prunus cerecifera* Pissardi Nigra, 2 adet *Prunus serrulata* Kanzan, 5 adet *Prunus spinosa* L. yaprak örneklerinden izole edilen cDNA'lar kullanılmıştır. PCR reaksiyonu için PCR tüpleri içerisine her bir örneğe ait 2.5 µl 10x Reaction buffer, 3.75 µl MgCl₂ (25 mµ), 1 µl dNTP_s (10 mµ), 1.5 µl PCI (5'-TTGAGTCAAATGGRACAGTTGG-3'antisense), 1.5 µl PP3 (5'-TTATCTCCAGGARTTGGAGC-3'sense) primerleri, 0.2 µl Tag DNA polymerase enzyme (MBI Fermentas), 2 µl cDNA ve 12.55 µl RNase free su eklenerek Thermo PCR aletine (Waltham-MA, USA) yerleştirilmiştir. PCR ile cDNA'nın çoğaltımı Çizelge 3.2.'de gösterilen sıcaklık aralıklarında gerçekleştirilmiştir. PPV'nin CI geninin 5' terminal bölgesi ve P3, 6K 1 geninin 3' terminal bölgesine spesifik dizayn edilen (Glasa ve ark. 2002) primer çiftleri I.D.T. (Iowa, USA) firmasından temin edilmiştir.

Çizelge 3. 2. PPV hastalığının PCR ile çoğaltımında uygulanan sıcaklık aralıkları

Uygulanan Sıcaklık Aralıkları		
1 döngü	40 döngü	1 döngü
	94 °C 30 sn	
95 °C 5dk	62 °C 30 sn	72 °C 10 dk
	72 °C 45 sn	

3.2.3.4. % 2'lik Agaroz Jelin Hazırlanması

2 gr Agaroz, 100 ml 1x TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu içerisinde mikrodalga fırında 3-4 dakika süreyle ısıtılmıştır. Düz bir zemin üzerindeki jel tabağına yüklenecek örnek

sayısına uygun jel tarağı yerleştirilmiştir. Hazırlanan jel, jel tabağına kabarcık oluşturmayacak şekilde dikkatle dökülmüştür. 20-30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra katılaşan jel, içerisinde 1x TAE tamponu bulunan jel tankı içerisine yerleştirilmiştir. Parafilm üzerinde 5 µl yükleme tampon çözeltilisi ve 10 µl PCR ürünü konularak karıştırılmış ve jelin çukurlarına yüklenmiştir. Jelin ilk çukuruna 3 µl DNA marker (100 bp) yükledikten sonra 100 volt'luk bir akımda 40-50 dakika süre ile elektrofroze tabi tutulmuştur.

3.2.3.5. DNA'yı Boyama ve Görüntüleme

Elektroforez işleminden sonra bantların görünür hale gelebilmesi için, 1 litre saf suya 200 µl ethidium bromide (10 µg/ml) eklenmiş bir kap içerisinde 25-30 dakika bekletilerek agaroz jelin boyanması sağlanmıştır. Ethidium bromide ile boyanan jel, Vilber Lourmat (MArne-la-Valée cedex/ Fransa) marka jel dökümantasyon sisteminde görüntülenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Arazi Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Tekirdağ İli'nin Merkez Süleymanpaşa ilçesi ile Çorlu, Hayrabolu ve Muratlı ilçelerinde yapılan sürvey çalışmalarında, PPV'nin üç farklı doğal konukçusu ornamental süs bitkisi çeşitlerinden *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra, *Prunus ceracifera* Atropurpurea, *Prunus serrulata* Lindl. Kanza ve yabani konukçu prunus türlerinden *Prunus spinosa* L.'da sistemik hastalık belirtileri gözlenmiştir. Arazi çalışmalarında yapılan gözlemlerde bitkinin yapraklarında mozayik, klorotik lekeler, damar arası bantlaşma, şekil bozuklukları ve renk değişiklikleri en karakteristik belirtiler olarak gözlenmiştir.

Tekirdağ İli'nde şehir merkezi ve NKÜ kampüs alanında yol boyunca (Şekil 4.1.) ve cadde kenarlarında süs bitkisi olarak değerlendirilen koyu kırmızı renkte yapraklara sahip olan *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra ve *Prunus ceracifera* Atropurpurea süs eriğinde bazı ağaçlarda belirgin şekilde karakteristik virüs belirtileri gözlenmiştir.



Şekil 4.1. NKÜ, Ziraat Fakültesi kampüs alanı içerisindeki yol kenarlarında bulunan *Prunus ceracifera* görünümü

Tekirdağ İli şehir merkezi ve Namık Kemal Üniversitesi kampüs alanındaki cadde ve yol kenarlarında süs bitkisi olarak değerlendirilen *Prunus ceracifera* Atropurpurea'nın yaprak damarları arasındaki damar bantlaşması belirtileri arazi çalışmalarında en dikkati çeken belirtiler olarak gözlenmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. NKÜ kampüs alanındaki *Prunus ceracifera* Atropurpurea yapraklarında damarlar arası bantlaşmanın en tipik belirtileri

Aynı şekilde Şekil 4.3.'de görüleceği üzere yine kampüs alanı içerisinde *P. ceracifera* Atropurpurea yapraklarında yaprak kenarlarından başlayan damarlar arasındaki karakteristik renk değişiklikleri ve mozayik gözlenmiştir. NKÜ kampüs alanı ve şehir merkezinde cadde kenarlarında süs bitkisi olarak değerlendirilen *Prunus ceracifera* Atropurpurea ve *P. ceracifera* Pissardi Nigra'da yaprakların alt kısımlarındaki damar bantlaşması ve renk değişiklikleri bir başka virütik belirtiler olarak dikkati çekmiştir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.3. *Prunus ceracifera* Atropurpurea yapraklarında damar arası renk değişiklikleri ve mozaik simptomlarının görünümü



Şekil 4.4. *Prunus ceracifera* Atropurpurea yapraklarının alt kısımlarında damar bantlaşması ve renk değişikliklerinin görünümü

Simptom sergileyen ağaçlardaki yapraklara çok dikkatli bir şekilde bakıldığında bariz virütik belirtiler dikkati çekmiş ve bu ağaçların fotoğrafları çekilerek kayıt altına alınmıştır. Yapraklardaki bu belirtilerin yanısıra bazı ağaçlarda renk değişiklikleri de bir başka belirti olarak gözlenmiştir. Ancak arazi gözlemlerinde karakteristik virüs belirtileri gösteren ağaçların çok sayıda olmadığı da gözlenmiştir.

Ornamental süs bitkisi olarak değerlendirilen *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra ve *Prunus ceracifera* Atropurpurea'nın dışında çalı formundaki dikenimsi ağaççık şeklinde olan yabani formdaki çakal eriği: *Prunus spinosa* L. Tekirdağ İli'nin şehir dışındaki tarım dışı kullanım alanlarında, orman ve dağlık alanlarında yetişmektedir (Şekil 4.5.). PPV'nin yabani konukçu türleri içerisinde yer alan ve PPV'nin önemli konukçularından biri olan çakal eriğinde tipik mozaik belirtileri Şekil 4.6.'da görülmektedir. Belirti gösteren bitkinin yapraklarında mozaik belirtilerinin dışında kaşık şeklinde kıvrılmalar ve yapraklardaki renk değişiklikleri de virüs benzeri belirtiler olarak dikkati çekmiştir. Şekil 4.7.'de görüleceği üzere *P. spinosa* L.'nin yapraklarındaki bir başka belirti olarak klorotik lokal lekeler de dikkati çeken belirtilerdir.



Şekil 4.5. Tekirdağ İli'nin Çorlu ilçesindeki dağlık bir alanda *Prunus spinosa* L.'nin görünümü



Şekil 4.6. *Prunus spinosa* L. yapraklarında mozaik simptomları ve yapraklarda kaşık şeklinde kıvrılmaların görünümü



Şekil 4.7. *Prunus spinosa* L. yapraklarında klorotik lokal lekelerin görünümü

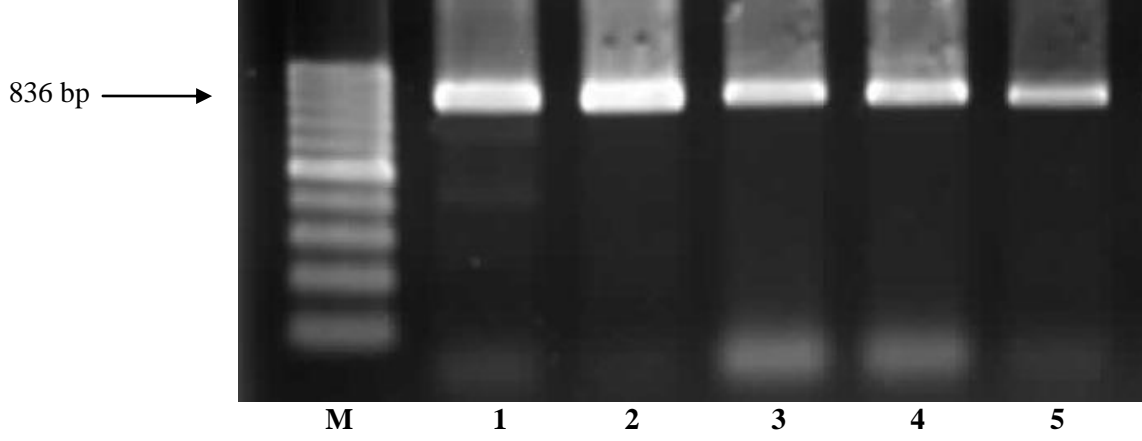
Tekirdağ İli'nde süs bitkisi olarak değerlendirilen, PPV'nin bir diğer konukçusu *Prunus serrulata* Lindl. Kanzas süs kirazında ise şekil bozukluğu ve renk değişiklikleri arazi gözlemlerinde dikkati çeken semptomlardandır. Semptom göstermeyen ve çoğu zaman semptomsuz taşıyıcı olarak bilinen birçok süs bitkisi PPV'nin doğal konukçuları arasında yer almaktadır. Ancak çalışma kapsamı içerisinde yer alan Tekirdağ İli ve ilçelerinde yetişen PPV'nin doğal konukçularından ornamental süs bitkileri prunus türleri ile yabancı konukçu türü çakal eriğinde karakteristik virüs ve virüs benzeri semptomlar bazı bitkilerde görülmesine rağmen çalışma materyali olarak toplanılan birçok bitkide virütik belirtiler gözlenmemiştir.

4.2.1. DAS-ELISA Test Sonuçları

Tekirdağ İli'nin merkez Süleymanpaşa, Hayrabolu, Muratlı ve Çorlu ilçelerinden alınan toplam 104 yaprak örneklerine uygulanan Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) test sonuçlarına göre örneklerin hiçbirinde *Plum pox virus* (PPV) hastalığının varlığına rastlanmamıştır. Böylece sert çekirdekli meyve türlerinin en önemli viral etmeni olan *Plum pox virus* (PPV), Tekirdağ İli merkez Süleymanpaşa ilçesi, Çorlu, Hayrabolu ve Muratlı ilçelerindeki doğal ve yabancı konukçu türlerinden *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra, *Prunus ceracifera* Atropurpurea, *Prunus serrulata* Lindl. Kanzas ve *Prunus spinosa* L. yaprak örneklerinin hiçbirinde pozitif reaksiyon göstermemiştir.

4.2.2. RT-PCR Test Sonuçları

Karakteristik virüs semptomlarından mozayik, klorotik lokal leke, damar arası bantlaşma, şekil bozukluğu ve sistemik renk değişikliği belirtileri sergileyen ve DAS-ELISA testinde negatif absorbans değerlerinin iki katı absorbans değerlerine yakın değerler veren 25 adet yaprak örneğine uygulanan RT-PCR test sonuçlarına göre 5 adet *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra yaprak örneğinde PPV saptanmıştır. Buna göre PPV'nin RT-PCR testi ile teşhisinde Tekirdağ İli, merkez İlçe Süleymanpaşa'dan alınan 8 adet *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra yaprak örneğinin 5 adedinde 836 bp'lik bant elde edilmiştir. Böylece PPV genomu üzerinde P3 ve 6K 1 geninin 3' terminal ve CI geninin 5' terminal bölgesine spesifik PP3 ve PCI primerleri (Glasa ve ark. 2002) kullanılarak yapılan RT-PCR testinde beklenen uzunlukta elde edilen DNA fragmentleri Şekil 4.8.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. RT-PCR testi sonucunda elde edilen PCR ürünleri (M: 100 bp DNA marker; 1,2,3,4,5 no'lu PPV ile enfekteli *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra yaprak örnekleri)

Böylece DAS-ELISA testinde pozitif reaksiyon vermeyen ancak virüs semptomu gösteren 10 adet *Prunus ceracifera* Atropurpurea, 2 adet *Prunus serrulata* Kanzan, 3 adet *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra ve 5 adet *Prunus spinosa* L. yaprak örneklerinin RT-PCR test sonuçlarına göre PPV ile enfekteli olmadıkları saptanmıştır. Çalışma materyalini oluşturan prunus türlerinde karakteristik virüs semptomu gösteren bitki örneklerinin DAS-ELISA ve RT-PCR testinde PPV hastalığı için pozitif sonuç vermemesi söz konusu bitki türlerinde diğer viral hastalık etmenlerinin olabileceği kanısını doğurmaktadır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Meyve yetiştiriciliğinde erik, şeftali, nektarin, kiraz, vişne ve kayısının içinde bulunduğu sert çekirdekli meyveler dünyada önemli bir ürün grubunu oluşturmaktadır. Türkiye’de mevcut ekolojik koşulların uygunluğu sert çekirdekli meyve yetiştiriciliğinin önemini gittikçe artırmakta buna bağlı olarak üretim miktarları da sürekli artış göstermektedir. Sert çekirdekli meyve türleri Türkiye’nin değişik bölgelerinde değişen yoğunlukta yetiştirilmektedir. Nitekim Ülkemiz, meyve yetiştiriciliği bakımından büyük bir potansiyele sahip olup, yetiştirilen birçok meyve türünün de anavatanı konumundadır. Bu nedenle de Türkiye meyvecilik kültürü bakımından büyük bir çeşitliliğe sahiptir. Binlerce yıldır gerek kaynağı ve gerekse dışarıdan getirilen çeşitlerin yetiştirme materyaline eklenmesiyle bazı meyve türlerinde yüzlerce çeşit ortaya çıkmıştır (Özbek 1977). Türkiye ekonomisi ve insan sağlığı bakımından önemi çok fazla olan sert çekirdekli meyve türlerinin yıllar itibari ile ürün dalgalanmalarındaki başlıca sebep, bu meyve türlerinin üretimini kısıtlayan hastalık ve zararlılardır. Türkiye’de iç ve dış karantina listesinde yer alan ve sert çekirdekli meyve grubunun en önemli hastalık etmenlerinden biri olan PPV’nün epidemik hale gelmesi, üretimi tehdit edecek en önemli etkenlerdendir. *Plum pox virus* (PPV)’nün taşınma ve yayılmalarının aşısı, polen, vektör böcekler ve hastalıklı materyal ile kolay olmasının yanında kimyasal mücadele yönteminin olmayışı diğer hastalık ve zararlılara göre önemlerini bir kat daha artmaktadır. 1910 yılında Makedonya’da erik ağaçlarında daha sonra 1915 yılında Bulgaristan’da yine erik ağaçlarında saptanan bu hastalığın virütik bir etmen olduğu 1932 yılında Atanasoff tarafından rapor edilmiştir. PPV daha sonra kayısı (1933), şeftali (1961) ve vişnede (1980) saptanmıştır. 1932 ve 1960 yılları arasında Avrupa’daki ülkelere yayılan bu hastalık dünyada birçok ülkeye yayılmış 1990 yılında ise Şili, Amerika, Ürdün, Hindistan ve Kanada’da rapor edilmiştir. En son rapor ise ticari Japon kayısı ağaçlarında Tokyo, Japonya’da tespit edildiği bildirilmiştir (Sochor ve ark. 2012). Şu zamana kadar bilinen 7 ırkının dışında yeni ırkları da tespit edilen bu hastalığın Türk kayısı izolatlarında saptanan ırkın PPV-T olduğu Serçe ve ark. (2009) tarafından, Türk badem izolatlarında saptanan ırkın ise PPV-T olduğu İlbağı ve Çıtır (2014) tarafından rapor edilmiştir. Başta Avrupa ülkeleri olmak üzere tüm dünya’da yayılma alanı bulan PPV’nin Türkiye’de bulunmasına dair ilk kayıt 1968 yılında Edirne ilindeki erik ağaçlarında Sahtiyancı (1969) tarafından rapor edilmiştir. Türkiye’de günümüze kadar yapılan çalışmalarda sert çekirdekli meyve türlerinden erik, kayısı, nektarin, şeftali ve bademde saptandığı farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Kurçman 1973, Yürektürk 1984, Dunez 1986, Yıldızgördü ve Çalı 1994, Serçe ve ark. 2009,

İlbağı ve Çıtır 2014, Gürcan ve Ceylan 2016). Dünya’da günümüze kadar saptanmış olan (D) Dideron (Kerlan ve Dunez 1979), (M) Marcus (Kerlan ve Dunez 1979), El Amar (Wetzel ve ark. 1991), (C) Cherry (Nemchinov ve Hadidi 1998), (Rec) Recombinant (Glasa ve ark. 2004), (W) Winona (James ve Varga 2005), (T) Turkey (Serçe ve ark. 2009), Cherry Russian (Glasa ve ark. 2012) ve Ancestor Marcus (Palmisano ve ark. 2012) olmak üzere 9 ayrı ırkı bulunan PPV’nin, ülkemizde Marmara, Ege, Akdeniz, İç Anadolu ve Trakya Bölgelerinde olmak üzere 4 ırkı saptanmıştır. Ancak diğer bölgeler için belirsizlik söz konusudur. Türkiye’de şeftalide PPV-M ırkı (Elibüyük 2003), kayısıda PPV-M ırkı (Sertkaya ve ark. 2003), erik, nektarin, kayısı, şeftalide PPV-M ırkı (Ulubaş ve ark. 2011), kayısı, erik, şeftali, kiraz ve vişnede PPV-M ve PPV-D ırkları (Elibüyük 2004), erik izolatında PPV-Rec (Canderesse ve ark. 2007), erik izolatında PPV-M (Koç ve Baloğlu 2006), kayısı izolatında PPV-T ırkı (Serçe ve ark. 2009) ve badem izolatında PPV-T ırkı (İlbağı ve Çıtır 2014) saptanmıştır.

PPV’nün neden olduğu Şarka hastalığının sert çekirdekli meyve türlerinin dışında doğal, yabani formdaki çalı formları ve ornamental süs bitkileri grubundaki prunus türlerinde olmak üzere birçok yabancı ot konukçusu da bulunmaktadır. Yaprak bitleriyle yayılabilen, aşı ve çoğaltma materyalleri ile ülkeler arası yayılma alanı bulan PPV’nin epidemisinde doğal ve yabani formdaki prunus türleri önemli rol oynamaktadır. Nitekim dünya’da yapılan çalışmalarda 1989 yılında Polak *Prunus amigdalopersica* ve *Prunus cerasifera*’da bulunduğunu ELISA ve ISEM yöntemleri ile saptanmış, Sebestyen ve ark. (2008) ise Macaristan’daki *P. cerasifera* cv. Nigra türünde PPV-D ve PPV-M ırkını tekli ve karışık enfeksiyonlar halinde tespit etmişlerdir. Koyu kırmızı yapraklara sahip olan *Prunus cerasifera*’nın yaprak renginden dolayı virüs konsantrasyonu yüksek olsa dahi tanınmasının zor olduğunu bildiren araştırmacılar PPV’nin dağılımında önemli bir rol oynadığını vurgulamışlardır. PPV’nin doğal konukçusu bu süs bitkisi kültürlerinin prunus türlerinin çoğaltma materyali olarak kullanılmaması için sertifikasyon programlarına dahil edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Kamenova (2008) ise Bulgaristan-Sofya’da yollarda, küçük yerleşim alanlarında, özel bahçelerde ve park alanlarında yetişen myrobalan anacı (*Prunus cerasifera* Ehrh.)’nda PPV’yi saptamak üzere DASI-ELISA ve IC-RT-PCR yöntemlerini uygulamışlardır. *P. cerasifera* var. *rubrum* ve *P. cerasifera* cv. Pissardi’nin PPV’nin doğal konukçuları olduğunu ve bunların tek veya karışık enfeksiyonlar halinde M ve D ırklarını, *Armeniaca desicarpa* (*P. cerasifera* x *P. armeniaca*)’da ise PPV-M ve PPV-Rec ırklarını saptayarak *P. cerasifera* türlerinin PPV’nin doğal rezervuar kaynağı olduğunu rapor etmiştir. Nemeth ve ark. (2010) iki botanik bahçesinde ve bir ağaç parkında binlerce odunsu bitkiden

Prunus cerasifera 'Pendula', *P. cerasifera* 'Pissardii', *P. glandulosa*, *P. glandulosa* 'Alba Plena', *P. glandulosa* 'Sinensis', *P. japonica*, *P. sogdiana*, *P. tomentosa* (Tibet'ten) ve *P. x blireana* 9 farklı tür ve çeşitte PPV'yi saptamıştır. Türkiye'de ise PPV'nin doğal yabancı konukçu türleri ve ornamental süs bitkileri ile yabancı ot konukçularında yapılan çalışmalar çok sınırlı sayıdadır. Nitekim 2006 yılında Elibüyük tarafından yapılan çalışmada PPV'nin yabancı ve süs bitkilerini enfekte etme kabiliyetini incelemek üzere çeşitli yabancı ve doğal sert çekirdekli süs bitkisi türleri ile yabancı otlarda PPV'ni araştırmıştır. DASI-ELISA ve IC-RT-PCR testini uyguladığı *Prunus cerasifera* Pissardi'de PPV-M ırkını saptamış ve *Hyalopterus pruni*: erik unlu yaprak biti türünün PPV'nin bu konukçudaki vektörü olduğunu, *P. cerasifera*'nın PPV'nin rezervuar kaynağı olduğunu ilk kayıt olarak rapor etmiştir. Ancak bu çalışma dışında ülkemizde PPV'nin *Prunus ceracifera* Pissardi türündeki varlığına dair daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında Tekirdağ İli'ndeki yol ve cadde kenarlarını süsleyen ornamental süs bitkilerinden *Prunus cerasifera* Pissardi Nigra, *Prunus ceracifera* Atropurpurea ve *Prunus serrulata* Lindl. Kanzas'dan alınan toplam 68 adet semptomlu ve semptomsuz yaprak örneklerinde PPV araştırılmıştır. İlk olarak DAS-ELISA testine tabi tutulan toplam 68 adet ornamental süs bitkisi prunus çeşitlerinin hiçbirinde DAS-ELISA testi sonuçlarına göre PPV saptanmamıştır. Ancak mozayik, şekil bozukluğu, klorotik lokal lekeler ve damar arası bantlaşması belirtileri sergileyen 18 adet *Prunus cerasifera* (10 adet *Prunus ceracifera* Atropurpurea, 8 adet *Prunus cerecifera* Pissardi Nigra) ve 2 adet *Prunus serrulata* Kanzas yaprak örnekleri ile 2 adet *Prunus serrulata* Lindl. Kanzas süs bitkilerinde RT-PCR test sonuçlarına göre 5 adet *Prunus cerasifera* Pissardi Nigra yaprak örneğinde saptanmıştır. Bu çalışma, ülkemizde bulunan *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra süs bitkisinde PPV'nin varlığını kanıtlayan ilk rapordur. RT-PCR ile testlenen *Prunus serrulata* Lindl. Kanzas bitkisinde ise PPV tespit edilmemiştir. Nitekim DAS-ELISA ve RT-PCR test sonuçlarına göre karakteristik virüs semptomu sergileyen bitkilerde PPV'nin bulunmayışı diğer viral hastalık etmenlerinin varlığına işaret etmektedir. Nitekim bu durum söz konusu süs bitkilerinin farklı virüs hastalıkları açısından da araştırılmasını gerekli kılmaktadır.

Doğal ortamda kendiliğinden yetişen çakal eriği (*Prunus spinosa* L.) ile myrobalan anaçlarında PPV ile birlikte 5 farklı virüs hastalığının varlığı Polak (2007) tarafından araştırılmıştır. En yaygın virüsün eriklerde PPV olduğunu, *Prunus spinosa* L.'da PPV'nin bulunmadığını ancak *Prunus spinosa* L. örneklerinin % 27'sinin PDV ile enfekteli olduğunu rapor etmiştir. Buna rağmen 2006 yılında İlbağı ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada Tekirdağ İli'ndeki çakal eriği (*Prunus spinosa* L.)'nde PPV-M ırkının varlığı DAS-ELISA ve RT-PCR test yöntemi ile kanıtlanmıştır. PPV'nin dışında ACLSV ve ApMV hastalıklarının da

saptandığını, *Prunus spinosa* L.'nin PPV, ACLSV ve ApMV virüslerinin inokulum kaynağı olarak Trakya Bölgesi'nde yeni kurulan meyve tesisleri için ciddi bir tehdit oluşturduğunu bildirmişlerdir. Elde edilen bu sonuçların Türkiye'de *Prunus spinosa* L.'da saptanan PPV, ACLSV ve ApMV'nin bulunmasına dair ilk kayıt olduğunu rapor etmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise DAS-ELISA test sonucuna göre Tekirdağ İli'nin merkez ilçe ve diğer 3 ilçeden alınan 36 adet *Prunus spinosa* L. yaprak örneğinde PPV saptanmamıştır. Mozaik, klorotik lokal lekeler ve şekil bozukluğu semptomları sergileyen 5 adet *Prunus spinosa* L. yaprak örneklerine uygulanan RT-PCR test sonuçlarına göre de örneklerin hiçbirinde PPV saptanmamıştır. 2006 yılında Tekirdağ İli'nin merkez ilçesinden alınan *Prunus spinosa* L. yaprak örneklerinde PPV saptanmış olmasına rağmen bu çalışmada tespit edilmemesi, yerleşim yerlerinin şehir dışındaki uzak mesafelere kurulması ve kentleşmenin bu alanlara yayılmasının bir sonucu olarak çalı formundaki bu bitkilerin eradike edilmesi durumunu ortaya çıkarmaktadır. Nitekim PPV'nin yabani konukçu türü olan bu bitkilerin eradikasyonu PPV'nin epidemiyolojisi açısından son derece önemlidir. Nitekim James ve Thomson (2005) PPV'nin inokulum kaynağı ve potansiyel rezervuar kaynağı olan bitkilerden arazide veya fidanlıklardaki konukçu türlerine yayılmasını önlemek için yaprak biti vektörlerinin kontrol altına alınması ve sertifikasyon ve survey programlarıyla PPV ile enfekteli ağaçların eradike edilmesinin önemini vurgulamışlardır. Nitekim Ülkemizde Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının ülkesel çapta PPV ile mücadele çalışmalarında enfekteli ağaçların eradikasyonu ile hastalığın epidemik hale gelmemesi için gerekli önlemleri alması büyük önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasında Tekirdağ merkez ilçe ve diğer üç ilçedeki dağlık ve ormanlık alanlardan alınan *Prunus spinosa* L.'da PPV'nin bulunmayışı, Tekirdağ İli'nde yeni kurulan meyve tesislerinin PPV açısından bir tehdit oluşturmadığına işaret etmektedir. Ancak karakteristik çarpıcı virüs semptomları sergileyen *Prunus spinosa* L. çakal eriğinin diğer virüs hastalıkları açısından araştırılmasını gerekli kılmaktadır. Sert çekirdekli meyve ağaçları için ekonomik anlamda yıkıcı ve zarar verici bir etmen olan PPV'nin doğal ve yabani konukçularının araştırıldığı bu tez çalışmasında 5 adet *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra süs eriğinde hastalığın saptanmış olması söz konusu ağaçların yeni kurulacak sert çekirdekli meyve tesisleri için tehdit oluşturduğunu göstermektedir. Nitekim yaprak bitleri ile yayılabilen PPV'nin epidemik hale gelmesini önlemek, buna yönelik tedbirlerin alınmasını sağlamak bölgedeki sert çekirdekli meyve üretimi açısından son derece önemlidir.

6. KAYNAKLAR

- Anonim (2014). FAO. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (erişim Tarihi: 01/08/2017).
- Anonim (2015). Türkiye İstatistik Kurumu. <http://www.tuik.gov.tr/bitkiselap/bitkisel.zul>. (erişim tarihi: 08/01/2017).
- Atanasoff D (1932). Plum pox a new virus disease. In Yearbook University of Sofia, University of Sofia, F.O.A. Ed. Sofia. 11: 49–69.
- Baumgartnerova H (1996). First findings of *Plum pox virus* in walnut trees (*Juglans regia* L.). Acta Virol. 40: 59–60.
- Candresse T, Svanella-Dumas L, Gentit P, Çağlayan K, Çevik B (2007). First report of the presence of Plum pox virus Rec strain in Turkey. Plant Dis 91: 331.
- Clark MF, Adams AN (1977). Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virology 34: 475-483.
- Dunez J (1986). Preliminary observations on virus and virus like diseases of stone fruit trees in mediterranean and near east countries. FAO Plant Protection Bulletin. 34: 43-48.
- Elibuyuk IO (2003). Natural Spread of Plum Pox Virus in Ankara, Turkey. J. Phytopathology 151 :617-619.
- Elibuyuk, I.O (2004). Current Situation of Sharka Disease in Ankara, Turkey. Phyoparasitica 32 :417-420.
- Elibüyük I.O (2006). Detection of plum pox virus in ornamental *Prunus cerasifera*. Phytoparasitica 34(4): 347-352.
- Foissac X, Savalle-Dumas L, Gentit P, Dulucq M.J, Candresse T (2001). Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Capillo and Faveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). Acta Horticulturae, 357:52-59.
- Garcia JA, Riechmann JL, Lain S, Martin MT, Guo H, Simon L (1994). Molecular characterization of Plum pox potyvirus. EPPO Bulletin, 24: 543–553.

- Gildow F, Travis J, Halbrend T (2000). www.Sharka.Cas.Psu.Edu, From Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson K, Zurcher EJ (1999). "Plum Pox Potyvirus" in Plant Virus Online: Description and Lists From the VIDE Database. Version: 16 th January.1997.
- Glasa M, Marie-Jeanne V, Moury B, Kudela O, Quiot J.B (2002). Molecular variability of the P3-6K1 genomic region among geographically and biologically distinct isolates of *Plum pox virus*. Arch. Virol. 147: 563–575.
- Glasa M, Boeglin M, Labonne G (2004). Aphid transmission of natural recombinant plum pox virus isolates to different *Prunus* ssp—a contribution for understanding the epidemiology of an atypical ppv. In *Proceedings of the sixth international symposium on virus and virus-like diseases of temperate fruit crops: Fruit tree diseases*, International Society Horticultural Science:Leuven 1,pp:217–220.
- Glasa M, Prichodko Y, Zhivaeva T, Shneider Y, Predajna L, Šubr Z, Canderesse T (2012). Complete and partial genome sequences of the unusual *Plum pox virus* (PPV) isolates from sour cherry in Russia suggest their classification to a new PPV strain. In *Book of Abstracts: International Conference on Virus and Other Transmissible Diseases of Fruit Crops (ICVF)*, June 3–8, Rome, Italy, p:37.
- Gürcan K, Ceylan A (2016). Strain identification and sequence variability of *Plum pox virus* in Turkey. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 40: 746-760.
- İlbağ H, Bostan H, Çıtır A (2008). *Prunus spinosa* L. a natural wild host of some important fruit viruses in Tekirdağ, Turkey. Acta Horticulturae, 781: 33–36.
- İlbağ H, Çıtır A (2014). Detection and partial molecular characterization of Plum pox virus on almond trees in Turkey. Phytoparasitica. 42(4): 485-491.
- James D, Thomson D (2005). Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: ornamental and wild *Prunus* species. OEPP Bulletin. 36 (2): 222–224.
- Karabacak M, İlbağ H (2011). Description and Detection of Almond Virus Disease in the Trakya Region of Turkey. The Journal of Turkish Phytopathology, (1-3): 33-39.

- Kamenova I (2008). *Prunus cerasifera* as a host of plum pox virus in bulgaria. *Journal of Plant Pathology*, s:15-18.
- Kerlan C, Dunez J (1979). Differentiation biologique et s´erologique de souches du virus de la sharka. *Annales de Phytopathol.* 11: 241–250.
- Koç G, Baloğlu S (2006). First Report of Sharka in the Çukurova Region of Turkey. *Journal of Plant Pathology* 88(3 suppl.), S68.
- Kurçman S (1973). Nachweis des Sharka-virus an aprikosen und pflaumenbaumen aumenbaumen in Ankara. *Journal of Turkish Phytopathology* 2: 124–129.
- Lain S, Riechmann JL, Garcia JA (1989). The complete nucleotide sequence of Plum pox potyvirus RNA. *Virus Res.* 13: 157–172.
- Liácer G (2006). Blackwell Publishing Ltd Hosts and symptoms of Plum pox virus: Herbaceous hosts. *OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 36: 227–228.
- Maiss E, Timpe U, Brisske E, Jelkmann W, Casper R, Himmler G, Mattanovich D, Katinger HWD (1989). The complete nucleotide sequence of *Plum pox virus* RNA. *J. Gen. Virol.* 70: 513–524.
- Manachini B, Casati P, Aliverti I, Cinanni L (2004). Transmission of PPV–M to *Prunus persica* by *Brachycaudus schwartzi* and *Phorodon humuli* (Hem. Aphididae). *J. Appl. Entomol.* 128: 677–680.
- Nemchinov L, Hadidi A (1998). Specific oligonucleotide primers for the direct detection of Plum pox virus-cherry group. *Journal of Virological Methods*, 70: 231-234.
- Németh M, Nyerges K, Hangyál R, Kósa G (2010). Surveying viruses on ornamental trees and shrubs in two Hungarian botanical gardens and an arboretum. *Julius-Kühn-Archiv*, (427): 293.
- Özbek S (1977). Genel Meyvecilik. Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Yayınları, (6):111
- Palmisano F, Boscia D, Minafra A, Myrta A, Candresse T (2012). An atypical Albanian isolate of *Plum pox virus* could be the progenitor of the Marcus strain. In *Book of*

- abstracts: International conference on virus and other transmissible diseases of fruit crops (ICVF) Rome, Italy, June 3–8. p:33.
- Polak J (1989). Diagnosis of Plum pox virus in infected symptomless trees of apricot, peach and *Prunus cerasifera* ssp. *myrobalana* by ELISA and ISEM. *Acta Hort.*, 235:299-303.
- Polak J (2002). Distribution of Plum pox virus in the Czech Republic. *Plant Protect. Sci.*, 38: 98–102.
- Polak J (2006). Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: Woody species other than fruit and ornamental species of *Prunus*. *EPPO Bull.* 36: 225–226.
- Polák J (2007). Viruses of blackthorn and road-bordering trees of plum, myrobalan, sweet and sour cherries in the Czech Republic. *Plant Protection Science-Prague*, 43(1): 1.
- Rubio M, Garci A, Ibarra A, Dicenta F, Martinez-Gomez P (2011). *Plum pox virus* (sharka) sensitivity in *Prunus salicina* and *Prunus cerasifera* cultivars against a Dideron-type isolate. *Plant Breeding*.130: 283-286.
- Sahtiyancı Ş (1968). Şarka. *Tomurcuk*, 79: 5–6.
- Sahtiyancı Ş (1969). Virus de la Sharka chez les pruniers. *Bulletin Phytosanitaire, FAO*,17-69.
- Sebestyén D, Nemeth M, Hangyal R, Krizbai L, Ember I, Nyerges K, Kolber M, Kiss E, Bese, G (2008). Ornamental *Prunus* Species As New Natural Hosts of Plum Pox Virus and their Importance in the Spread of the Virus in Hungary. *Journal of Plant Pathology*, 90 (1): 57-61.
- Serce C.U, Candresse T, Svanella–Dumas L, Krizbai L, Gazel M, Caglayan K (2009). Further characterization of a new recombinant group of Plum pox virus isolates, PPV-T, found in orchards in the Ankara province of Turkey. *Virus Res.*142: 121–126.
- Sertkaya G, Ulubaş Ç, Çağlayan K (2003). Detection and Characterization of Plum Pox Potyvirus (PPV) by DAS-ELISA and RT-PCR / RFLP Analysis in Turkey. *Turk J Agric For.*, 213-220.
- Sochor J, Babula P, Adam V, Krska B, Kizek R (2012). Sharka: The Past, the present and the future. *Viruses* 4: 2853-2901.

Ulubaş Serçe Ç, Gazel M, Çağlayan K (2011). Plum pox virus streynlerinin Türkiye'deki Dağılımı. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, Kahramanmaraş, s:72.

Yıldızgördü KÇ, Çalı S (1994). Occurrence And Detection Of Virus And Virus Like Diseases Of Plum and Apricot Trees In The East Mediterranean Area. Turkish Phytopathological Society Pub. No :7, s: 551-553.

Yürektürk M (1984). Studies on Plum pox of stone fruit trees growing in Marmara region. Publication of Atatürk Horticultural Research Institute.

Wetzel T, Candresse T, Ravelonandro M, Delbos RP, Mazyad H, Aboulata AE, Dunez J (1991). Nucleotide sequence of the 3'-terminal region of the RNA of the Elamar strain of *Plum pox potyvirus*. J.Gen.Virol.72: 1741–1746.

EK 1

DAS-ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline) (PBS) pH:7.4

NaCl	8,0 g
KH ₂ PO	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,9 g
KCI	0,2 g
NaN	0,2 g

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH 0.1 M NaOH veya 0.1 M HCl ile ayarlanmış ve +4 °C'de saklanmıştır.

2. Kaplama Tampon Çözeltisi (Coating Buffer) pH: 9.6

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
NaN ₃	0,2 g
Bromocresol purple	5,0 mg

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre suda eritilip pH ayarlanmış ve +4 °C'de saklanmıştır.

3. Yıkama Tampon Çözeltisi (Washing Buffer) (PBST) pH: 7.4

Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS)	1 litre
Tween-20	0,5 ml

1 litre PBS tampon çözeltisi içerisine 0,5 ml Tween-20 ilave edilerek hazırlanmıştır. Kullanım süresince +4 °C'de saklanmıştır.

4. Ekstraksiyon Tampon Çözeltisi (Sample Extration Buffer) pH:7.3

PVP (Mw 10-40)	10 g
Tween-20	0,5 ml

1 litre yıkama tampon çözeltisi içerisinde 10 g Polyvinylpyrrolidone (PVP-40) ve 0,5 ml Tween-20 ilave edilerek hazırlanmıştır.

5. Konjugat Tampon Çözeltisi (Enzyme Conjugate Buffer) pH: 7.4

PBST 1 litre

BSA 2 g

Congo Red 40 mg

1 litre PBST içerisinde 2 g BSA ve 40 mg Congo Red ilave edilerek pH ayarlanıp +4 °C'de saklanmıştır.

6. Substrat Tampon Çözeltisi (Substrat Buffer) pH:9.8

Diethanolamine 97 ml

NaN 0,2 g

97 ml Diethanolamine 1 litre saf su içerisine ilave edildikten sonra 0,2 g NaN₃ eklenmiş ve pH: 9.8'e ayarlanmıştır. Çözelti +4 °C'de saklanmış ve kullanılmadan önce pH kontrol edilmiştir.

EK 2

Toplam Nükleik Asit Ekstraksiyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. Ekstraksiyon Tampon Çözeltisi (Grinding Buffer) pH 5.6-5.8

Guanidine, 4 M Thiocyanate, 0.2 M NaOAc (pH 5.2), EDTA 25 nM, 1.0 M KOAc, % 2.5 wt/vol PV-40, % 1 2-ME (mercaptoethanol)

Guanidine

Thiocyanate 23.64 g

NaOAc 1.36 g

EDTA 0.465 gr

KOAc 4.9 g

PV-40 1.25 g

2-ME (Mercaptoethanol) % 1

CH₃COOH ile pH ayarlanmıştır. Otoklav ile steril edilmiştir. Çalışma süresince ezme tamponu 4 °C'de saklanmıştır. % 1'lik Mercaptoethanol ekstraksiyondan hemen önce eklenmiştir. Ekstrasyon tamponu 50 ml'ye göre hazırlanmıştır.

2. Silika Süspansiyonu pH 2.0

Silica (Sigma % 12) 60 g

Bir mezur kabındaki 500 ml saf su içerisinde 60 gr silica koyulmuş ve karıştırılmıştır. 24 saat beklenmiştir 470 ml üst sıvı atılmıştır (üst sıvının % 90'ı) ve 500 ml'ye tamamlanmıştır iyice karıştırılmıştır. 5 saat bekletilmiştir ve 540 ml üst sıvı (üst sıvının % 85'i atılmıştır) geriye kalan 60 ml bulamaç HCl ile pH'ı 2.0'ye ayarlanmıştır. Otoklav edilmiş ve karanlıkta oda sıcaklığında saklanmıştır.

3. Sodyum İyodid Solusyonu (NaI)

Na₂SO₃ 0.74 g

NaI (Sigma S8379) 36 g

40 ml kimyasal saf su içerisinde kimyasallar çözdürülmüştür. Daha sonra saf ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. Otoklav ile steril edilmiştir. Çalışma süresince 4 °C'de saklanmıştır.

4. Yıkama Tampon Çözeltisi (Washing Buffer 1X)

10.0 mM Tris-HCl pH 7.5 (1M), 0.5 mM EDTA (5M), 50.0 mM NaCl (0.5 M), Ethanol (% 50)

Bileşimler eklendikten sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra % 50 oranında etanol yani 100 ml saf etanol eklenerek 200 ml'ye tamamlanmıştır. Etanol eklemekten önce otoklav ile sterilize edilmiştir ve 4 ° C'de saklanmıştır.



EK 3

Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. TAE_x50 Buffer Stok Solüsyon

242 gr Tris-Base (FW:121.14)

57.1 ml Glacial acid

0.5 M EDTA (pH. 8)

242 gr Tris-base 750 ml saf su içerisinde eritilmiştir. Üzerine 57.1 ml Glacial asit ve 100 ml 0.5 M EDTA (pH. 8) ilave edildikten sonra 250 ml saf su ilave edilerek çözelti 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. 50XTAE stok solüsyondan seyreltilen 1XTAE buffer Jel Elektroforezde kullanılmıştır.

2. Etidium Bromide

10 mg etidium bromid 1 ml saf su içerisinde ependorf tüpünde eritilmiştir. Daha sonra 200 µl ethidium bromide (10 µg/ml) 1 litre saf su içerisine ilave edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez konusu olarak ‘Tekirdağ İli’nde *Plum Pox Virus* (PPV): Şarka Virüs Hastalığının Doğal Yabani Konukçu Türlerinin Saptanması Üzerine Araştırmalar’’ konusunu veren, Lisans ve Yüksek Lisans eğitim ve öğretim hayatım boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Havva İLBAĞI’na teşekkür ederim. Ayrıca her zaman desteğini ve yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇITIR’a teşekkür ederim. Tez çalışmamın laboratuvar aşamalarında her türlü desteği sağlayan Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü’nden araştırmacı Ziraat Yüksek Mühendisi Lerzan ÖZTÜRK’e teşekkür ederim. Tez çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen, değerli meslektaşlarım Ziraat Mühendisi Önder AYDIN ve Ziraat Mühendisi Elif YETEMEN’e teşekkür ederim. Eğitim hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen, beni yetiştiren aileme, eğitimin hayatta en önemli şey olduğunu bana öğreten sevgili anneciğim Enbiya BAŞ’a, sahip olduğum en değerli varlık olan kardeşim Beyza BAŞ’a ayrıca; hayat duruşunu ve çalışma prensibini daima örnek aldığım babam Yaşar BAŞ’a içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

28.10.1989 yılında Adapazarı'nda dünyaya geldi. İlk ve orta öğrenimini Adapazarı'nda tamamladıktan sonra, 2006 yılında Şehit Üsteğmen Selçuk Esedoğlu Lisesi'nden mezun oldu. 2008 yılında girdiği ÖSYM sınavları sonucunda başarılı olarak Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı. 2014 yılında Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nden mezun oldu. 2014 yılında Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsüne kayıt yaptırarak Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Halen Ferrero Türkiye'de Ziraat Mühendisi olarak çalışmaktadır.