

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ISPARTA KIRAZ ÜRETİM ALANLARINDA GÖRÜLEN
ÖNEMLİ VİRÜSLERİN SEROLOJİK VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE TEŞHİSİ VE KILIF PROTEİN GEN
DİZİLİMLERİNİN BELİRLENMESİ**

Yusuf ÖZTÜRK

Danışman: Doç. Dr. Bayram ÇEVİK

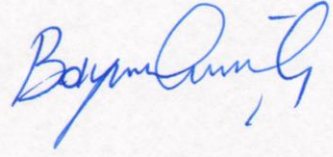
**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI
ISPARTA-2012**

TEZ ONAYI

Yusuf ÖZTÜRK tarafından hazırlanan “**Isparta Kiraz Üretim Alanlarında Görülen Önemli Virüslerin Serolojik Ve Moleküler Yöntemlerle Teşhisi Ve Kılıf Protein Gen Dizilimlerinin Belirlenmesi**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Süleyman Demirel Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Bayram ÇEVİK

Süleyman Demirel Üniversitesi, Bitki Koruma Anabilim Dalı



Jüri Üyeleri:

Doç. Dr. Erhan KOÇAK

Süleyman Demirel Üniversitesi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı



Yrd. Doç. Dr. Hülya ÖZGÖNEN

Süleyman Demirel Üniversitesi, Bitki Koruma Anabilim Dalı



Prof. Dr. Mehmet Cengiz KAYACAN

Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat eserleri Kanunundaki hükümlere bağlıdır.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. Orijini ve Yayılımı	5
2.2. Taksonomi ve Genom Yapıları	7
2.3. Konukçuları ve Taşınmaları	8
2.4. Yol Açtıkları Belirtiler	10
2.5. Serolojik ve Moleküler Yöntemlerle Tanılanması	12
2.6. Biyolojik İndeksleme İle İlgili Yapılan Çalışmalar	19
2.7. Gen Dizilimi ve Filogenetik Analiz	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	28
3.1. Arazi Çalışması	28
3.2. Bitki Materyali Muhafazası.....	29
3.3. DAS-ELISA Yöntemi	29
3.4. Oligonükleotid Primerler.....	30
3.5. Total RNA İzolasyonu	31
3.5.1. One Step-RNA izolasyon yöntemi.....	31
3.5.2. CTAB nükleik asit izolasyon yöntemi	32
3.5.3. RNAeasy nükleik asit izolasyon yöntemi	33
3.6. Kılıf Protein Genlerinin Çoğaltılması	34
3.6.1. Tersine transkripsiyon (RT)	34
3.6.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	34
3.7. Agoroze Jel Elektroforez Yöntemi.....	35
3.8. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	35
3.9. Kılıf Protein Genlerinin Dizilimlerinin Belirlenmesi.....	36
3.10. Kılıf Protein Geninin Dizi Analizleri	36
3.11. Kılıf Protein Geninin Filogenetik Analizleri.....	36
3.12. Biyolojik İndeksleme	37
3.12.1. Odunsu indikatör bitkilere aşılama	37
3.12.2. Otsu indikatör bitkilere mekanik inokülasyon	38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	40
4.1. Arazi Çalışmaları.....	40
4.2. ELISA Testi.....	43
4.3. Total RNA İzolasyonu	46
4.4. Tersine Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	47
4.5. Biyolojik İndeksleme	50
4.5.1. Otsu indikatör bitkilerde biyolojik indeksleme	50
4.5.2. Odunsu indikatör bitkilerde biyolojik indeksleme	51
4.6. Kılıf Protein Genlerinin Saflaştırılması ve DNA Dizilemesi.....	52

4.7. Kılıf Protein Genlerinin Dizi Analizi	54
4.7.1. Nükleotid dizi analizleri	54
4.7.1.1. <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (ACLSV) nükleotid dizi analizi	54
4.7.1.2. <i>Prunus necrotic ring spot virus</i> (PNRSV) nükleotid dizi analizi.....	60
4.7.1.3. <i>Prune dwarf virus</i> (PDV) nükleotid dizi analizi	68
4.7.2. Amino asit dizi analizi.....	78
4.7.2.1. <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (ACLSV) amino asit dizi analizi	78
4.7.2.2. <i>Prunus necrotic ring spot virus</i> (PNRSV) amino asit dizi analizi	84
4.7.2.3. <i>Prune dwarf virus</i> (PDV) amino asit dizi analizi.....	90
4.8. Filogenetik Analiz	98
4.8.1. <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (ACLSV) filogenetik analizi.....	98
4.8.2. <i>Prunus necrotic ring spot virus</i> (PNRSV) filogenetik analizi	102
4.8.3. <i>Prune dwarf virus</i> (PDV) filogenetik analizi	106
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	110
6. KAYNAKLAR.....	119
ÖZGEÇMİŞ	130

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ISPARTA KIRAZ ÜRETİM ALANLARINDA GÖRÜLEN ÖNEMLİ VİRÜSLERİN SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TEŞHİSİ VE KILIF PROTEİN GEN DİZİLİMLERİNİN BELİRLENMESİ

Yusuf ÖZTÜRK

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Bayram ÇEVİK

Kiraz dünyada ve ülkemizde ekonomik önemi yıldan yıla artan bir meyve türüdür. Kirazda ekonomik kayıplara yol açan çok sayıda virüs hastalığı bulunmaktadır. Bu virüsler içerisinde Elma mozaik virüsü (*Apple mosaic virus*, ApMV), Prunus nekrotik halkalı leke virüsü (*Prunus necrotic ring spot virus*, PNRSV), Erik cüceleşme virüsü (*Prune dwarf virus*, PDV) Şarka virüsü (*Plum pox virus*, PPV) ve Elma klorotik yaprak leke virüsü (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) ülkemizde ve dünyada sert çekirdekli meyvelerde en yaygın görülen virüslerdir. Bu çalışma da ülkemizin kiraz üretiminde önemli bir yere sahip olan Isparta ilinin 10 ilçesindeki 142 kiraz bahçesinde ApMV, PDV, PNRSV, CLRV, ACLSV ve PPV'nin varlığı double antibody sandwich – enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) ve ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyon (Polymerase chain reaction (RT-PCR) yöntemleri ile araştırılmış, belirlenen bazı izolatların biyolojik ve moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Sert çekirdekli meyve ağaçlarında görülen bu 6 virüsün varlığını belirlemek amacıyla 521 kiraz yaprak örneği öncelikle DAS-ELISA yöntemiyle test edilmiştir. ELISA testi sonucunda 269'u PDV, 23'ü ACLSV, 7'si PNRSV, 36'sı PDV+ACLSV, 8'i PDV+PNRSV, 1'i PDV+ApMV, 3'ü ACLSV+PNRSV, 2'si PDV+PNRSV+ApMV olmak üzere toplamda 349 örnek virüslerle enfekteli bulunmuştur. PDV en sık görülen virüs olurken CLRV ve PPV hiç bir örnekte tespit edilememiştir. ELISA sonuçlarında şüpheli veya pozitif çıkan örneklerin bir kısmına bölgeleri ve virüsleri temsil edecek şekilde seçilerek total RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonundan sonra, PDV, PNRSV, ACLSV, kılıf protein (CP) genlerini içeren bölge RT-PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. 22 PDV, 5 PNRSV ve 7 ACLSV izolatından sırasıyla 862 bç, 616 bç ve 677 bç büyüklüğünde hedeflenen bölgeye spesifik DNA'lar çoğaltılmıştır. Ancak test edilen PPV, CLRV ve ApMV örneklerinin hiç birinde virüslere spesifik bant çoğaltılamamıştır. RT-PCR yöntemiyle çoğaltılan PDV, PNRSV ve ACLSV'ye ait bantlar saflaştırılarak doğrudan dizileme için kullanılmıştır. Dizileme sonucunda bu virüslere ait CP genlerinin nükleotid dizileri ve kodladıkları amino asit dizilimleri belirlenmiştir. Bu diziler karşılaştırılıp analiz edilerek Isparta ili'nin farklı ilçelerinden elde edilen PDV, PNRSV ve ACLSV izolatlarının birbirleriyle ve dünyanın farklı üretim bölgelerinden izolatlarla benzerlik oranları ve filogenetik ilişkileri ortaya konulmuştur. Buna göre PDV, PNRSV ve ACLSV Isparta izolatları sırasıyla %86-98 ile %82 -%99, %86-99 ile %89-100 ve %80-98 ile %88-%100 arasında değişen oranlarda kılıf protein genlerinin nükleotid ve amino asit diziliminde benzerlik olduğu bulunmuştur. Nükleotid dizilimine göre ACLSV Isparta izolatı en fazla benzerliği Yunanistan'dan kiraz izolatı ile gösterirken, PNRSV Isparta izolatları en çok benzerliği Çek Cumhuriyeti kiraz ve vişne, Polanya, ABD ve Şili'den kiraz izolatlarıyla, Türkiye'den ise şeftali izolatlarıyla göstermiştir. PDV Isparta izolatları ise en fazla

benzerliği ABD ve İsrail’den kiraz ve İtalya’dan badem izolatları ile göstermiştir. Amino asit dizilimine göre ise ACLSV Isparta izolatu en çok benzerliği Yunanistan’dan kiraz izolatu ile gösterirken, PNRSV Isparta izolatu daha çok Tunus’tan şeftali ve Polanya’dan kiraz izolatuyla benzerlik göstermiştir. PDV Isparta izolatlarına en çok benzerlik gösterenler ise İtalya ve Polanya’dan vişne ve İtalya’dan badem izolatları olmuştur. Filogenetik analizler sonucunda ACLSV izolatlarının oğrafik bölgelere ve konukçuya göre gruplandığı ve Isparta izolatların Avrupa izolatlarıyla gruplanarak Avrupa kaynaklı olabileceğini gösterirken PNRSV ve PDV izolatlarının filogenetik analizleri coğrafik bölge ve konukçuya göre gruplanmadığını göstermiştir. Tespit edilen izolatların bazıları biyolojik karakterizasyonu amacıyla otsu ve odunsu test bitkilerine inokulasyonları yapılmıştır. Yapılan inokulasyon çalışmalarında PDV izolatları mekanik olarak inoküle edilen otsu bitkilerden *Nicotiana occidentalis*’de, PNRSV ve ACLSV izolatları ise aşılanarak inokulasyon yapılan odunsu Bing kiraz çeşidinde virüslere özgü belirtiler göstermişlerdir.

Anahtar Kelimeler: Kiraz, PDV, PNRSV, ACLSV, CLRV, ApMV, PPV, kılıf protein geni, filogenetik analiz

2012, 131 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

DETECTION OF IMPORTANT VIRUSES ON CHERRY PRODUCTION REGION OF ISPARTA BY SEROLOGICAL, MOLOCULER METHODS AND DETERMINATION OF COAT PROTEIN GENE SEQUENCES

Yusuf ÖZTÜRK

Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bayram ÇEVİK

Sweet Cherry is an important fruit species with increasing economic value in Turkey and the world but a number of viruses cause diseases and economic losses in sweet cherry. *Apple mosaic virus* (ApMV), *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Plum pox virus* (PPV) and *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) are the most commonly viruses in stone fruits in Turkey and the world. In this study the presence of ApMV, PDV, PNRSV, CLRV, ACLSV, PPV was determined in 142 sweet cherry orchard of 10 district of Isparta province by double antibody sandwich – enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) methods and biological and molecular characteristics of some of these isolates were determined. A total of 521 sweet cherry leaf samples were first tested for the presence these 6 viruses commonly found in stone fruits by DAS-ELISA method. ELISA test showed that 349 of 521 samples tested were infected with following virus(es); 269 with PDV, 23 with ACLSV, 7 with PNRSV, 36 with PPV+ACLSV, 8 with PDV+PNRSV, 1 with PDV+ApMV, 3 with ACLSV+PNRSV and 2 with PDV+PNRSV+ApMV. While PDV was the most wide spread virus, CLRV and PPV were not detected in any of samples tested. Some of the sample to represent different growing region and found to be infected or suspicious in ELISA were chosen selected and total RNA was isolated from these samples. After RNA isolation, the genomic region containing the coat protein (CP) regions of PDV, PNRSV, ACLSV were amplified by RT-PCR method. A spesific DNA fragment in the size of 862 bp, 616 bp and 677 bp were amplified from the targeted region containing the CP gene of 22 PDV, 5 PNRSV, 7 ACLSV isolates, respectively. However, no PPV, CLRV and ApMV specific DNA was amplified from the tested samples by RT-PCR method. PDV, PNRSV and ACLSV specific DNA fragments amplified by RT-PCR were purified and used for direct sequencing. The nucleotide and the deduced amino acid sequences of the region containing the CP gene of PDV, PNRSV and ACLSV were determined. These sequences PDV, PNRSV, ACLSV isolates from different production regions were compared with each other and other isolates from different stone fruit growing regions of the world and phylo-genetic relations among these isolates were also determined. Sequence comparisons of Isparta PDV, PNRSV and ACLSV, isolates showed %86-98 to, %82-%99, %86-99 to, %89-100 and %80-98 to %88-%100. Similarity among nucleotide and amino acid sequences of the CP genes respectively. Based on the nucleotid sequences while Isparta ACLSV isolate was most similar to sweet cherry isolate Greece, PNRSV Isparta isolates were most similar to sweet chery isolate from the Czech Republic from the United States, Poland and sweet cherry from Chile and was a peach isolate from Turkey. The amino acid sequence of PDV Isparta isolates was more similar to sweet cherry isolates from the USA and Israel and almond isolates from Italy. The amino acid sequences of ACLSV Isparta isolates were most similar to Greece sweet cherry isolates. PNRSV Isparta isolates were evaluated similar to Tunusian peach

isolates and sweet cherry isolates from Poland. Sour cherry isolates from Italy and Poland and almond isolate from Italy were most similar to PDV Isparta isolates. Based on the phylogenetic analyses, while ACLSV isolates were grouped geographically and host with european isolates; PNRSV and PDV Isparta isolates were not group based on the geogrophic location and host. Some of the selected isolates were inoculated to annual and perennial test plants for biological characterization. Inoculation studies showed that PDV isolates induced symptoms in *Nicotiana occidentalis* mechanically inoculated PNRSV, ACLSV isolates grafted inoculated on Bing sweet cherry variety and showed typically symptoms.

Key Words: Sweet cherry, PDV, PNRSV, ACLSV, CLRV, ApMV, PPV, Coat protein gene, phylogenetic analysis

2012, 131 pages

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Bayram ÇEVİK'e teşekkürlerimi sunarım. Tez jürime katılarak tezime destek olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Hülya ÖZGÖNEN ve Sayın Doç. Dr. Erhan KOÇAK'a sonsuz şükranlarımı sunarım. Tez çalışmalarım esnasında her türlü yardımı sağlayan Eğirdir Meyvecilik Araştırma İstasyonu Müdürü Enver Murat DOLUNAY'a, tezimin her aşamasında yanımda olan İstasyon Müdür Yardımcımız Suat KAYMAK'a teşekkür ederim. Arazi ve laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Ziraat Mühendisi arkadaşlarım Hamza ŞENYURT ve Ziraat Yüksek Mühendisi Mesut İŞÇİ'ye, tezimin yazım aşamasındaki yardımlarından dolayı Ziraat Yüksek Mühendisleri Mehmet AKSU, Salih BAKICI ve Özgür ÇALHAN arkadaşlarıma teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehtap ŞAHİN ÇEVİK'e, doktora öğrencileri Nevin AKDURA ve Şule ÜRÜN'e, yüksek lisans öğrencileri, Tuğba BAKIR, Gülderen KOCA ve Fatma Gül GÖZE'ye teşekkür ederim. Ayrıca, Biyolojik indeksleme çalışmalarında tohum ve fide sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi Bitki Koruma Bölümünden Yrd. Doç. Dr. Mehmet Ali SÖĞÜT ve Adana Biyolojik Mücadele İstasyonundan Ziraat Mühendisi Mahmut YEGÜL'e teşekkür ederim.

2235-YL-10 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Son olarak, bana en çok ihtiyaç duydukları bir dönemde tez çalışmalarım nedeniyle yanında olamadığım eşim Esra ÖZTÜRK ve oğullarımız Umeyr ile Yahya'ya bu zaman zarfında gösterdikleri sabır, anlayış ve destekten dolayı sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Yusuf ÖZTÜRK

ISPARTA, 2012

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Ispartada bitki materyallerinin temin edildiği ilçelerin coğrafik dağılımı .	28
Şekil 3.2. Odunsu indikatör bitkilere uygulanan aşılama çalışmaları.....	38
Şekil 3.3. Otsu indikatör bitkilere uygulanan mekanik inokülasyon çalışmaları.....	39
Şekil 4.1. Kiraz ağaçlarında PDV'nin yol açtığı düşünülen belirtiler.....	41
Şekil 4.2. Kiraz ağaçlarında PNRSV'nin yol açtığı düşünülen belirtiler.....	42
Şekil 4.3. Kiraz ağaçlarında ACLSV'nin yol açtığı düşünülen belirtiler.	42
Şekil 4.4. Yapılan ELISA testleri.....	43
Şekil 4.5. Isparta ili kiraz üretim alanlarından elde edilen örneklerin 28S ve 18S ribozomal RNA'larına ait agaroz jel fotoğrafı.....	47
Şekil 4.6. Isparta ili kiraz üretim alanlarından elde edilen örneklerden PDV' ye ait yaklaşık 862 bç uzunluğundaki kılıf protein geninin çoğaltıldığını gösteren jel fotoğrafı.....	48
Şekil 4.7. Isparta ili kiraz üretim alanlarından elde edilen örneklerden PNRSV' ye ait yaklaşık 616 bç uzunluğundaki kılıf protein geninin çoğaltıldığını gösteren jel fotoğrafı.....	49
Şekil 4.8. Isparta ili kiraz üretim alanlarından elde edilen örneklerden ACLSV' ye ait yaklaşık 677 bç uzunluğundaki kılıf protein geninin çoğaltıldığını gösteren jel fotoğrafı.....	49
Şekil 4.9. Mekanik inokülasyon sonucu <i>Nicotiana occidentalis</i> test bitkisindeki PDV belirtileri.....	51
Şekil 4.10. Mekanik inokülasyon sonucu oluşan virüs belirtileri	52
Şekil 4.11. ACLSV kılıf protein genine ait çoklu dizi karşılaştırması.....	58
Şekil 4.12. PNRSV kılıf protein genine ait çoklu dizi karşılaştırması.....	65
Şekil 4.13. PDV kılıf protein genine ait çoklu dizi karşılaştırması.....	75
Şekil 4.14. ACLSV kılıf protein genlerinin amino asit dizimlerine ait çoklu dizi karşılaştırması	83
Şekil 4.15. PNRSV kılıf protein genlerinin amino asit dizimlerine ait çoklu dizi karşılaştırması	89
Şekil 4.16. PDV kılıf protein genlerinin amino asit dizimlerine ait çoklu dizi karşılaştırması	97
Şekil 4.17. Dünyadaki ACLSV izolatları ile Isparta ili'ndeki ACLSV izolatlarının kılıf protein geni nükleotid dizi karşılaştırmalarının TreeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı	99
Şekil 4.18. Dünyadaki ACLSV izolatları ile Isparta ili ACLSV izolatlarının kılıf protein geni amino asit dizi karşılaştırmalarının TreeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı.	101
Şekil 4.19. Dünyadaki PNRSV izolatları ile Isparta ili'ndeki PNRSV izolatlarının kılıf protein geni nükleotid dizi karşılaştırmalarının TreeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı	103
Şekil 4.20. Dünyadaki PNRSV izolatları ile Isparta ili PNRSV izolatlarının kılıf protein geni amino asit dizi karşılaştırmalarının TreeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı	105
Şekil 4.21. Dünyadaki PDV izolatları ile Isparta ili'ndeki PDV izolatlarının kılıf protein geni nükleotid dizi karşılaştırmalarının TreeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı	107

Şekil 4.22. Dünyadaki PDV izolatları ile Isparta ili PDV izolatlarının kılıf protein geni amino asit dizi karşılaştırmalarının TreeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı	109
--	-----

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Örneklerin toplandığı ilçeler ve örnek sayıları	28
Çizelge 3.2. PCR testlerinde kullanılan primer çiftleri	31
Çizelge 4.1. DAS-ELISA testi sonuçları.....	45
Çizelge 4.2. Isparta ili kiraz üretim alanlarından saflaştırma yapılan PDV, PNRSV ve ACLSV örnekleri	53
Çizelge 4.3. Isparta ili'ne ait kiraz bahçelerinden toplanan ACLSV izolatlarının nükleotid dizilerinin benzerlik oranları.....	55
Çizelge 4.4. Isparta ilindeki ACLSV izolatları ile dünyadaki bazı ACLSV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimlerinin karşılaştırılması	56
Çizelge 4.5. Isparta ili'ne ait kiraz bahçelerinden toplanan PNRSV izolatlarının nükleotid dizilerinin benzerlik oranları.....	60
Çizelge 4.6. Isparta ili'ndeki PNRSV izolatları ile dünyadaki bazı PNRSV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimlerinin karşılaştırılması	62
Çizelge 4.7. Isparta ili'ne ait kiraz bahçelerinden toplanan PDV izolatlarının nükleotid dizilerinin benzerlik oranları.....	69
Çizelge 4.8. Isparta ili'ndeki PDV izolatları ile dünyadaki bazı PDV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimlerinin karşılaştırılması	72
Çizelge 4.9. Isparta ili'ne ait kiraz bahçelerinden toplanan ACLSV izolatlarının amino asit dizilerinin benzerlik oranları	78
Çizelge 4.10. Isparta ili ACLSV izolatları ile dünyadaki bazı ACLSV izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizilimlerinin karşılaştırılması	80
Çizelge 4.11. Isparta ili'ne ait kiraz bahçelerinden toplanan PNRSV izolatlarının amino asit dizilerinin benzerlik oranları	84
Çizelge 4.12. Isparta ili PNRSV izolatları ile dünyadaki bazı PNRSV izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizilimlerinin karşılaştırılması	86
Çizelge 4.13. Isparta ili'ne ait kiraz bahçelerinden toplanan PDV izolatlarının amino asit dizilerinin benzerlik oranları	91
Çizelge 4.14. Isparta ili PDV izolatları ile dünyadaki bazı PDV izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizilimlerinin karşılaştırılması	94

1. GİRİŞ

Türkiye, sahip olduğu iklim özellikleri ve toprak yapısıyla pek çok meyve türünün yetiştirilmesine olanak sağlamaktadır. Ülkemizde tarım alanlarının %7'si meyve-zeytin-bağ alanı olarak değerlendirilmekte ve yılda 16.6 milyon ton meyve üretimi gerçekleştirilmektedir. Toplam meyve üretimi dikkate alındığında sert çekirdekli meyveler üretimdeki %12'lik payı ile meyvecilikte önemli bir yer tutmaktadır (Anonim, 2011). Meyveler arasında önemli türlerin üretim miktarlarındaki değişikliğe bakıldığında, 2009 yılında bir önceki yıla göre elmada %9.1, armutta %5.8 ve kirazda %19.8 oranında artış kaydedilmiştir. Sert çekirdekli meyveler grubunda yer alan kiraz yıllara göre farklı üretim miktarları gösterse de genel olarak bir artış eğilimindedir. Son beş senede kiraz üretiminde %49 artış gerçekleşmiştir (Anonim, 2011).

Birleşmiş Millerler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre 2000 yılında 346.713 hektar olan dünya kiraz üretimi alanı 2009 yılında 381.482 hektara yükselmiştir. Yine 2000 yılında 1.901.558 ton olan üretim 2009 yılında 2.196.537 ton olarak gerçekleşmiştir. Bu veriler kirazın dünyada ve ülkemizde üretim alanı ve üretim miktarı artan bir meyve olduğunu göstermektedir. Türkiye'de 2010'da 417.905 ton ile dünya kiraz üretiminin %19'unu karşılayarak ilk sırada yer almıştır. Ülkemizi sırasıyla %12'lik payla ABD ve %11'lik payla İran takip etmektedir. Türkiye 2010 yılında 62.824 ton kiraz ihracatı ile üretimin %15'ini pazarlayabilmiş ve ülke ekonomisine 144 milyon ABD doları katkı sağlamıştır (Anonymous, 2011a).

Türkiye kiraz üretiminin ve ihracatının büyük bir kısmı İzmir, Manisa, Isparta, Denizli, Afyonkarahisar, Konya ve Bursa illerinden yapılmaktadır (Anonim, 2011). Türkiye'nin elma, gül üretimi ve kalitesinde lider durumda olan Isparta ilinde ülkemizde son yıllardaki kiraz üretimindeki artışa paralel olarak kiraz üretimi hızla yayılmaya başlayarak 35.529 da üretim alanı ve 21.885 ton üretim miktarı ile ilk sıralarda yer almıştır (Anonim, 2011). Özellikle Senirkent ve Uluborlu ilçeleri ürettiği kiraz miktarı ve kalitesiyle adından söz ettirmiştir. Uluborlu Napolyon'u

adıyla bir marka haline gelen Isparta kirazı dünya piyasalarında önemli bir yere sahip olmuştur.

Ülkemiz meyvecilik üretim potansiyeli bakımından önemli bir yere sahip olmasına rağmen, bu meyvelerin üretiminde ve ihracatında arzu edilen seviyelere gelememiştir. Bu durumun başlıca sebebi birim alandan elde edilen verim ve kalitenin düşük olmasıdır. Verim ve kalitenin düşük olmasının nedenlerinden biride başta virüs hastalıkları olmak üzere hastalıktan arı üretim materyalleri kullanılmamasından kaynaklanmaktadır. Ekonomik olarak ülke gelirine büyük katkıları olan bu meyve türlerinde önüne geçilemeyen virüs hastalıkları büyük sorunlar yaratmaktadır (Öztekin, 2006). Virüs hastalıklarının, bakteriyel ve fungal hastalıklar gibi kimyasal mücadelesinin olmaması bu hastalıkların ekonomik önemini de arttırmaktadır.

Virüs etmenlerinin çoğunun latent enfeksiyon yapması, farklı iklim ve ekolojik koşullarda belirtiler vermesi, bahçe tesisi edilirken yapılan yanlış uygulamalar viral hastalıkların hızlı bir şekilde ülkemizde yayılmasına ve ticari bahçelerde daha kurulum aşamasında fidan ölümlerine neden olmaktadır (Sipahioğlu vd., 2007). Ülkemizin büyük kısmında yetiştiriciliği yapılan sert çekirdekli meyvelerdeki virüs ve virüs benzeri hastalıklarının çok yaygın olmasının en önemli nedeni yeni tesis edilen bahçelerin viral etmenlerle enfekteli olan üretim materyalleri ile kurulmuş olmasıdır (Gümüş vd., 2007a).

Virüs hastalıkları genel olarak bitkilerin yapraklarında klorozlar ve nekrozlar, bitki büyümesinde duraklama, meyve ağaçlarının gelişimini sınırlandırarak meyve verim ve kalitesinde azalmaya sebep olarak ekonomik ömürlerinin azalmasına meyve veriminin düşmesine neden olmaktadır.

Virüs enfeksiyonu nedeni ile hastalanan ağaçlar, virüs tür ve ırkına bağlı olarak ölebilmesinin yanında enfekteli ağaçların diğer bazı hastalıklara karşı dayanıklılığını da azaltmaktadır (Nemeth, 1986). Bunun yanında dünyada yapılan pek çok çalışma sert çekirdeklielerde görülen virüs etmenlerinin %35 ile %100 varan verim

kayıplarına ve fidanlıklarda anaç kalem uyumsuzluklarına yol açtığı rapor edilmiştir (Dunez, 1988; Nemeth, 1994).

Sert çekirdekli meyveler farklı gruplara dahil olan birçok RNA virüsüne konukçuluk etmektedir. Sert çekirdekli meyve türlerinde yaklaşık 150 virüs hastalığı rapor edilirken (Dunez, 1988), bu hastalıkların sayısı kiraz ve vişne ağaçlarında diğer türlerde olduğundan daha fazla olup bunlarda 30'dan fazla virüs ve virüs benzeri hastalık bulunmaktadır (Nemeth, 1986; Myrta and Savino, 2008).

Elma mozaik virüsü (*Apple mosaic virus*, ApMV), Prunus nekrotik halkalı leke virüsü (*Prunus necrotic ring spot virus*, PNRSV) ve Erik cücelik virüsüyle (*Prune dwarf virus*, PDV) birlikte Şarka hastalığının etmeni Şarka virüsü (*Plum pox virus*, PPV) ve Elma klorotik yaprak leke virüsü (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) sert çekirdekli meyve virüslerinin en önemlileri ve en yaygınlarıdır (Nemeth, 1986; Dunez, 1988). Bu virüsler başta Avrupa olmak üzere dünyada sert çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan her yerde yaygın olarak bulunmaktadır. Kiraz ağaçları da bu virüslerin sebep olduğu önemli ekonomik kayıplara maruz kalmaktadır (Dunez, 1988; Myrta et al., 2003).

Yıllık 2 milyon tonu bulan üretimiyle (Anonim, 2011) dünya sert çekirdekli meyve üretiminde önemli bir yere sahip olan ülkemizin bazı bölgelerinde yapılan çalışmalar bu virüslerin ülkemizde de bulunduğunu göstermiştir (Azeri, 1994; Yıldızgördü and Çalı, 1994; Elibüyük ve Erdiller, 1998; Gazel ve Çağlayan, 1998; Ulubaş and Ertunç, 2004; Sertkaya vd., 2004; Sipahioğlu vd., 2004; Gümüş and Paylan, 2008; Akbaş et al., 2011; Çevik et al., 2011).

Virüslerin varlığı ve bunların neden olduğu verim, kalite sorunu sonucu oluşan ekonomik kayıp son derece önemlidir. Bu çalışma ile Türkiye'nin kiraz üretiminde önemli bir yere sahip olan Isparta İlinin 10 farklı kiraz üretim alanında en önemli 6 virüsün varlığı DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile araştırılmış, belirlenen izolatların biyolojik ve moleküler karakterizasyonu yapılarak Isparta ilinin farklı bölgelerini temsil edecek bazı virüs izolatların kılıf protein (CP) gen dizilimleri

belirlenmiş tespit edilen CP gen dizileri (Gen Bank) veri tabanında bulunan ülkemizin ve dünyanın diğeri üretim bölgelerinde elde edilen virüs izolatların CP genleri ile karşılaştırılarak izolatların genetik benzerliğı ve filogenetik ilişkisi araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Dünyada sert çekirdekli meyve üretiminin artması beraberinde ciddi sorunların gündeme gelmesine sebep olmuştur. Bu sorunların bir tanesi de virüslerden kaynaklanan ekonomik kayıpları oluşturan verim ve kalite düşüklüğüdür. Elma mozaik virüsü (*Apple mosaic virus*, ApMV), Prunus nekrotik halkalı leke virüsü (*Prunus necrotic ring spot virus*, PNRSV), Erik cücelik virüsü (*Prune dwarf virus*, PDV), Şarka virüsü (*Plum pox virus*, PPV), Kiraz yaprak kıvrılma virüsü (*Cherry leaf roll virus*, CLRV) ve Elma klorotik yaprak leke virüsü (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) sert çekirdekli meyve virüslerinin en önemlileri ve en yaygın olanlarıdır (Nemeth, 1986; Dunez, 1988). Yapılan pek çok çalışma bu virüslerin başta Avrupa olmak üzere dünyada sert çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan her yerde yaygın olarak bulunduğunu göstermiştir. (Dunez, 1988; Myrta et al., 2003). Bu bölümde araştırılan altı farklı sert çekirdekli meyve virüsüyle ilgili kaynak özetleri verilmiştir.

2.1. Orijini ve Yayılımı

Elma mozaik virüsü (*Apple mosaic virus*; ApMV) dünyada ilk olarak 1928 yılında ABD’de gül bitkisinde rapor edildikten sonra 1933 yılında da elmada tanımlanmıştır (Nemeth, 1986; Brunt et al., 1996). ApMV bugün ılıman iklim bölgelerinde elma yetiştiriciliği yapılan birçok ülkede enfeksiyona sebep olup, %20’ye varan oranda ürün kayıplarına neden olmaktadır. Özkan ve Kurçman (1976), yaptıkları araştırmada Orta Anadolu’daki elma bahçelerinde, Fidan ve Azeri (1996), Ege Bölgesi’nde elma ağaçlarında, Akbaş and Değirmenci (2010), erikde ilk olarak ApMV’nin bulunduğunu bildirmişlerdir. Yardımcı and Eryiğit (2005), Isparta bölgesinde elmalarda bu virüsün varlığını tespit etmişlerdir.

Erik cücelik virüsü (*Prune dwarf virus*; PDV) Fransa’da 1768 ve İngiltere’de 1839’da ağaçlar üzerinde etkisi belirlenmiş olmasına rağmen ilk kez erikte 1936 yılında Thomas ve Hildebrand tarafından prune cüceleşme adıyla tanımlanmıştır (Nemeth, 1986; Brunt et al., 1996). Sert çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan pek çok

bölgede bu virüsün varlığı yapılan çalışmalarla tespit edilmiş olup, özellikle kiraz yetiştirilen bölgelerde ağaçların yoğun miktarda bu virüsle enfekteli olduğu bildirilmiştir (Myrta and Savino, 2008). Ülkemizde PDV ilk kez Kurçman (1977), tarafından simptomolojik olarak tespit edilmiş, daha sonra yapılan çalışmalar (Dunez 1988; Azeri; 1994) PDV'nin yurdumuzun tüm sert çekirdekli meyve üretimi yapılan bölgelerinde yaygın bir şekilde bulunduğu göstermiştir.

Prunus nekrotik halkalı leke virüsü (*Prunus necrotic ringspot virus*; PNRSV) dünyada ilk kez 1941 yılında şeftali ağaçlarında bulunmuştur (Brunt et al., 1996). Daha sonra 1944 yılında kiraz ve vişnede farklı isimlerde (kirazda parçalanmış yaprak, tattered leaf ve vişnede nekrotik halkalı leke virüsü) hastalıklar olarak bildirilmiştir (Nemeth, 1986). 1970'lerin başlarında Afyon'da kiraz ve vişne ağaçlarında yapılan sürveylerde ilk kez PNRSV'nin varlığı ülkemizde belirlenmiştir (Kurçman, 1977). Günümüzde Türkiye'de ve dünyanın pek çok bölgesinde konukçusu olan ağaçlarda yaygın olarak görülen bir virüs durumuna gelmiştir.

Elma klorotik yaprak leke virüsü (*Apple chlorotic leaf spot virus*; ACLSV) İngiltere de Luckwill ve Campbell tarafından *Malus platycarpa line pattern virus* olarak adlandırılmıştır. Mink ve Shay ABD'de virüsün elma klorotik yaprak leke olarak bulunduğunu belirtmiştir (Nemeth, 1986). Türkiye'de ACLSV'nin ilk kez sert çekirdekli meyve ağaçlarındaki varlığı Yalova'da GF305 şeftali anaçları kullanılarak yapılan biyolojik indeksleme de tespit edilmiştir (Yürektürk, 1984). Daha sonra Yalova ve İzmir'de (Dunez, 1988), Malatya, Elazığ ve Iğdır illerinde (Elibüyük, 1998; Sipahioğlu vd., 2004) ve Doğu Akdeniz'de (Yıldızgördü ve Çalı, 1994, Isparta'da (Çevik vd., 2011) varlığı tespit edilmiştir.

Kiraz yaprak kıvrılma virüsü (*Cherry leaf roll virus*; CLRV) ilk olarak Amerikan karaağacı, kiraz ve cevizde rapor edilmiştir (Nemeth, 1986). Avrupa'da ceviz fidanlıklarında CLRV ekonomik öneme neden olan zararlara yol açmaktadır. Son yıllarda ABD'de CLRV, PNRSV veya PDV ile birlikte karışık enfeksiyon şeklinde ortaya çıktığında kiraz ağaçlarında verim azalmasına neden olduğu belirtilmiştir (Gentkow et al., 2005).

Şarka virüsü (*Plum pox virus*; PPV) ilk kez Bulgaristan’da 1918 yılında “pozegaca” adındaki erik çeşidinde görüldüğü ve hastalığın bir virüsten kaynaklandığı 1932 yılında Bulgar araştırmacı Atanasoff tarafından kaydedildiği bildirilmiştir (Nemeth, 1986). Kirazlardaki ilk belirtisi Moldova’da ve daha sonraları Bulgaristan’da rapor edilmiştir. Ardından hızlı bir şekilde Avrupa’ya, Orta Doğunun bir kısmına (Mısır ve Suriye), Hindistan, Çin gibi Asya ülkelerine ve son olarak Şili, Arjantin, Amerika, Kanada’ya ulaşarak Amerika kıtasına yayılmıştır. (Anonymous, 2011b). Türkiye’de PPV’nin varlığı ile ilgili yapılan ilk çalışmalar Sahtiyancı ve Kurçman tarafından gerçekleştirilmiştir. Sahtiyancı (1968), Edirne’de erik ağaçlarında, Kurçman (1977), Ankara merkezde 2 bahçede kayısı ve erik ağaçlarında simtomolojik olarak PPV’nin varlığını gözlemlemişlerdir. Hastalık girişi 1980’li yıllarda Ege’de, 2000’li yıllarda ise Akdeniz bölgesinde yeni görülmeye başlanmıştır (Çağlayan vd., 2011). Türkiye’nin 56 ilinde yapılan bir çalışmada PPV’nin Ege ve Marmara bölgelerinde de bulunduğu bildirilmiştir (Akbaş et al., 2011).

2.2. Taksonomi ve Genom Yapıları

ApMV’nin 25-29 nm çapında yuvarlak partikülleri olup, tek sarmal ve 3 parçalı bir genoma sahiptir. Bu RNA’lardan RNA 3 hareket ve kapsid proteinini kodlamaktadır. Virionlar %16 nükleik asit, %84 protein içermekte ve *Bromoviridae* familyasının 3. alt grubu içerisinde *Ilarvirus* cinsinde yer almaktadır (Howell et al., 1991).

PDV ise 19-26 nm çapında yarı yuvarlak partiküllere sahip, 73 nm boyunda kısa basil şeklinde olup tek sarmallı RNA içermektedir. *Bromoviridae* familyasının *Ilarvirus* cinsinin 4. alt grubu altında yer alan PDV’nin kılıf proteinin molekül ağırlığı 24000 dalton olup virüs partikülleri %14 nükleik asit ve % 86 protein içermektedir. (Brunt et al., 1996).

PNRSV 23-27 nm çapında, yuvarlak partiküle sahip olup, tek sarmallı, üç parçalı RNA’dan oluşmaktadır. Virüs partikülleri %16 nükleik asit ve %84 protein içermektedir. Virüs *Bromoviridae* familyasının 4. alt grubunda *Ilarvirus* cinsinin bir üyesidir. RNA1 ve RNA2 RNA’nın replikasyonunda görev yaparken RNA3 hareket

proteini ve kılıf proteini kodlamaktadır (Ong, 1987; Brunt et al., 1996).

ACLSV 600-740x12 nm boyutlarında, çok kıvrımlı ipliksi bir partiküle sahip olup, virüs tek sarmallı ve tek parçalı RNA genomuna sahiptir. *Betaflexiviridae* familyasının *Trichovirus* cinsi içinde yer alan ACLSV'nin genomu 7555 nükleotidden oluşmakta ve virionun kendisi 2500 kDa ağırlığındadır (Martelli et al., 1994; Sutic et al., 1999).

CLRV 28 nm çapında yuvarlak partiküllü, tek sarmallı ve iki parçalı RNA genomu içeren bir virüstür. RNA-1 ve RNA-2 sırasıyla, yaklaşık 8.2 ve 6.8 kb boyutundadır. CLRV *Secoviridae* familyası içerisinde *Nepovirus* cinsinin bir türü içinde yer almaktadır (Jones, 1985).

PPV 750x15 nm boyutlarında çok kıvrımlı ipliksi bir partiküle sahip pozitif duyarlılıkta tek sarmal RNA içeren bir virüstür (Ravelonandro et al., 1988). Virüs partikülleri %7 nükleik asit ve %93 oranında da protein içermekte olup *Potyviridae* familyasında *Potyvirus* cinsi içerisinde yer almaktadır (Brunt et al., 1996).

2.3. Konukçuları ve Taşınmaları

ApMV mekanik inokulasyon ve aşı kaynaşmaları ile taşınabilmekte, tohumla ise taşınmamaktadır (Brunt et al., 1996; Petrzik and Lenz, 2002). *Rosaceae* familyasına giren bitkiler bu virüsün ana konukçuları olmasına rağmen, ApMV 19 familyadan 65 bitki türünde enfeksiyona yol açmakta olup çok geniş bir konukçu dizisine sahiptir (Zeki, 1991). Virüs şu ana kadar odunsu bitkilerden böğürtlen, ahududu, elma, kayısı, kiraz, badem, erik ve şeftali, fındık, gül ve şerbetçi otunda belirlenmiştir. Ayrıca, ApMV'nin dişbudak ve atkestenesi gibi orman ağaçlarında da varlığı saptanmıştır (Polak and Zieglerova, 1997).

PDV'nin konukçuları arasında en önemlileri *Prunus* türlerinden kayısı, kiraz, vişne, erik ve şeftali olup virüs mekanik inokulasyon, aşı kaynaşması, polen ve tohumla taşınmaktadır. Ancak virüs kiraz ve vişnede özellikle polen ve tohumla taşınmaktadır

(Nemeth, 1986; Smith et al., 1998). *Prunus* türlerinin %70-80 kadarının PDV ile bulaşık olabileceği rapor edilmiştir (Dunez, 1988).

PNRSV'nin konukçuları arasında *Rosaceae* familyasına mensup pek çok bitki yer almaktadır. Ekonomik açıdan en önemli konukçular arasında kiraz, vişne, erik, şeftali, kayısı ve gül yer almaktadır. Ayrıca PNRSV'nin PDV ile birlikte en sık görülen virüs olduğu bildirilmiştir (Nyland et al., 1976; Brunt et al., 1996). PNRSV enfekteli çoğaltma materyali ve mekanik olarak taşınabildiği gibi tohum ve polenle de taşınabilmektedir (Nemeth, 1986). Virüsün tohum ve polen kökenli olmasının, sert çekirdekli meyve ağaçlarında çok hızlı yayılmasında oldukça etkili olduğu bulunmuştur (Cole et al., 1982; Hamilton et al., 1984; Uyemoto et al., 1992). *Prunus* türlerinde tohumla taşınma oranının, türe bağlı olarak %70'e kadar ulaşabildiği bilinmektedir (Megahed and Moore, 1967). Tohumla taşınma en sık vişnelerde görülmektedir. Enfekteli polenlerin bitkiden bitkiye taşınmasında thrips ya da çiçeklerde dolaşan diğer arthropodların (kırmızı örümcek gibi) vektör görevi yaptığı birçok çalışmada bildirilmiştir (Johansen et al., 1994)

ACLSV'nin konukçularının çoğu *Rosaceae* familyasına ait meyve türleri olup ayva, armut, elma, kayısı, kiraz, şeftali, erik ve vişne en önemli türler arasında yer almaktadır. Virüs yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında çoğunlukla belirti vermeden bulunurken, sert çekirdekli meyve ağaçlarında çok ciddi hastalıklara sebep olmaktadır (Brunt et al., 1996). Elma, armut, şeftali, erik, vişne ve bademi kapsayan birçok meyve türünde hastalık yapmaktadır (Nemeth, 1986; Desvignes and Boye, 1989). Virüsün taşınması kök kaynaşması veya yaprak sürtünmesi gibi mekanik yaralanmalar sonucunda meydana gelmektedir. Virüs ayrıca bir odunsu bitkiden diğerine göz aşısıyla rahatlıkla taşınabilmekte ancak enfekteli ağaçlarda eşit bir dağılım göstermemektedir (Nemeth, 1986).

CLRV'nin konukçuları arasında kiraz, vişne, ceviz, zeytin, huş ve karaağaç yer almaktadır. CLRV'nin kiraz ve vişne ağaçlarını enfekte eden tip ırkının nematodlarla taşındığı gibi, tohumla, polenle ve mekanik inokulasyonla da taşındığı belirtilmiştir (Jones, 1985; Rebenstorf et al., 2006). Nematodlar ile taşınmada en sık görülen

türlerin *Xiphinema coxi*, *X. diversicaudatum* ve *X. vuittenezi* olduklar rapor edilmiştir (Flegg, 1969). Yaygın doğal konukçularında tohum kaynaklı bulaşma %0.5-35 oranları arasında olurken bir çok otsu konukçusunda bu oran 100%'dür. Ceviz, huş ve kaarağçta polenle taşınma daha ön plana çıkmaktadır (Diekmann and Putter, 1996).

PPV'nin kayısı, erik ve şeftalilerde enfeksiyonlara neden olduğu bilinirken Brunt vd. (1996), son yıllarda bu virüsün bu bitkiler dışında badem, ceviz, kiraz ve vişneyi de enfekte edebildiği saptanmıştır (Gottwald et al., 1995; Baumgartnerova, 1996). PPV'nin taşınması non-persistent olarak *Brachycaudus cardui*, *B. helichrysi*, *Myzus persicae* ve *Phorodon humuli* yaprak bitleriyle ve enfekteli materyalin vejetatif çoğaltılması ile yayılmakta ancak polen ve tohumla taşınmadığı bildirilmiştir (Labonne et al., 1995).

2.4. Yol Açıcıları Belirtiler

ApMV belirtileri elma çeşidine, virüs ırkına ve çevre şartlarına bağlı olarak yıldan yıla değişmektedir. Yapraklarda genellikle sarımsı beyaz lekeler yanında mozaik belirtileri oluşmakta ayrıca küçük sarı lekeler de meydana gelmektedir. Kuvvetli güneş ışığında yapraklarda nekrozlar oluşmakta ve erken dökülmeye rastlanmaktadır. Belirtiler genellikle yazın erken dönemde görülmekte olup sıcaklığın yükselmesiyle maskelenebilmektedir (Özkan ve Kurçman, 1976). ApMV, sert çekirdekli meyve ağaçlarında nekrotik halkalı leke, şerbetçi otunda ise klorotik benekler oluşturmakla beraber kiraz ve vişne ağaçlarında nadiren belirti göstermektedir (Dunez, 1988; Brunt et al., 1996; Smith, 1998).

PDV, sert çekirdekli meyvelerin yetiştirildiği tüm alanlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Ancak oluşturduğu belirtiler bitki türüne, virüs ırkına ve sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir (Diekmann and Putter, 1996). PDV ile bulaşık ağaçların yapraklarında genellikle küçülme ve daralma, damar bölgesinde kırışma, sürgün aralarında kısılma, özellikle kiraz ve vişnelerin yapraklarında klorotik halka ve lekeler meydana gelmektedir (Sutic et al., 1999). PDV, yaprak dışındaki organlarda

fazla belirti göstermeyip PNRSV ile karışık enfeksiyon durumunda, ağaçlarda meyve gözlerinin sayısının azalmasına ve çıplak sürgün oluşumuna neden olmaktadır (Kunze, 1988).

PNRSV'nin neden olduğu hastalığın gelişimi şok ve kronik devre olarak iki döneme ayrılmıştır. Virüsün şok devredeki belirtileri yapraklarda nekrotik ve klorotik alanlar, halkalar ve lekeler şeklinde kendini göstermektedir. Nekrotik halka ve lekelerin orta kısımlarının sonradan düşmesi ile yapraklarda saçma deliği görünümü oluşmaktadır. Bu devrede belirtiler genç ağaçların ölümüne kadar varabilen sonuçlara neden olabilir. Kronik dönemde ağaçlar sağlıklı gibi görünmekle beraber, dar ve derimsi yaprakların parlak ve gevrek olduğu, yaprak kenarlarında testere dişliliğin meydana geldiği belirtilmiştir (Nemeth, 1986). Virüsün genel simptomları; yapraklarda klorozlar, nekroz, yaprak deformasyonu ve gelişme geriliği olarak sıralanmıştır. Klorozun yapraklarda çizgi, halka, bant, leke ya da mozaik görünümünde olabilecekleri rapor edilmiştir. Ayrıca enfekteli bitkilerin gözleri, yaprakları ve dalları üzerinde nekrotik alanlar oluşabilir. Epinasti, kırışıklık ve enasyonların da hastalık simptomları arasında yer aldığı bildirilmektedir. Nekrozların genellikle şiddetli bir enfeksiyonu takiben gelişmenin ilk evrelerinde gözlemlendiği ve yapraklar da dahil olmak üzere dal ve sürgünleri de etkilediği belirtilmiştir (Bock, 1967; Nyland et al., 1976; Dunez, 1988).

ACLSV, kiraz ve vişnede birçok çeşitte belirti vermeden bulunmasına rağmen PNRSV ile birlikte meyvelerde nekrotik ve çökük lekeler şeklinde belirtilere neden olmaktadır (Dosba et al., 1986; Desvignes and Boye, 1989). ACLSV'nin ekonomik önemi virüsün dünyanın her yerinde yaygın bir şekilde epidemiyi oluşturmasıyla ve fidanlıklarda bazı Erik kombinasyonlarında ana problem olan aşı uyumsuzluklarına sebep olmasıyla ortaya çıkmaktadır. Virüsün birçok ırkı, meyve ağaçlarında latent olmasına karşın diğer bazı ırkları yaprak kızarmasıyla birlikte tepe sürgünlerinde çalılama ve bazı anaçlar üzerine aşılı elma varyetelerinin ölümüne yol açmaktadır (Desvignes and Boye, 1989). Virüs aynı zamanda eriklerde kabuk yarılmalarına, yaprak beneklenmelerine, şeftalide koyu yeşil renkli beneklere, şiddetli yaprak ve meyve deformasyonlarına, bazı kayısı çeşit anaç kombinasyonlarında ise aşı

uyuşmazlıklarına neden olabilmektedir (Nemeth, 1986; Desvignes and Boye, 1989; Sutic et al., 1999).

CLRV ile bulaşık ağaçların yaprak kenarları yukarı doğru kıvrılır ve bazı çeşitlerde ilkbaharda morumsu kırmızı yapraklanma görülür. Bunun yanında yapraklarda sarımsı yeşil lekeler, erken yaprak dökümü, enasyonlar, rozet oluşumuna yol açmaktadır. Meyve deformasyonları, meyvenin dikiş yerinde derin çatlaklar, verimde düşüklükler ve bir yıllık sürgünlerde zamk akıntılı kanser yaraları da oluşturmaktadır (Nemeth, 1986; Hamacher and Quad, 1991). Enfekteli kiraz ve vişne ağaçlarındaki en belirgin özellik, yapraklanma ve çiçeklenmede 1-2 haftalık bir gecikmedir (Anonim, 2008).

PPV şeftalilerde yaprak, meyve ve bazı çeşitlerin çiçek taç yapraklarında; kayısı ve erik ağaçlarında ise yaprak, meyve ve meyve çekirdeklerinde değişik şekillerde belirtilere yol açmaktadır (Lopez-Moya et al., 2000). PPV ile enfekteli kayısı ve erik meyvelerinde halka veya çizgi şeklinde lekeler, çukurluklar, nekrozlar, mezokarp dokularında kararmalar ve şekil bozuklukları, meyve çekirdeklerinin ise çekirdek renginden daha açık ve koyu, şekilsiz veya genellikle halka şeklinde lekeler gösterdiği belirtilmektedir (Guinchedi et al., 1977). Şeftali meyvelerinde ise zaman zaman şekil bozukluklarına, beyaz etlilerde dağınık beyazımsı halkalar, sarı etlilerde yeşilimsi beyaz halkalar oluşturduğu, meyve çekirdeklerinde ise herhangi bir belirtinin söz konusu olmadığı bildirilmiştir (Ogawa et al., 1995). Bu virüs bazı şeftali çeşitlerinde meyvelerde şeker oranını düşürerek meyve kalitesini de bozmaktadır. Kiraz ve vişne ağaçlarında meydana getirdiği belirtiler genellikle yapraklarda damar açılması, damar bantlaşması, klorotik meşe yaprağı formu ve bazı yapraklarda şekil bozukluğu rapor edilmiştir (Crescenzi et al., 1997).

2.5. Serolojik ve Moleküler Yöntemlerle Tanılanması

Sert çekirdekli meyve ağaçlarında virus hastalıklarının inkübasyon sürelerinin uzun olması, hastalık etmenlerinin konsantrasyonlarının düşük olması ve bitkide virüsün çoğalmasını engelleyen inhibitör maddelerin bulunması tanılama çalışmalarını

güçleştirmektedir. Ancak son yıllarda klasik tanılama yöntemlerinin iyileştirilmesi ve yeni tanılama yöntemlerinin geliştirilmesiyle bu sorunların üstesinden gelinerek oldukça hızlı ve güvenilir bir şekilde tanılama yapılmaktadır.

Sert çekirdekli meyve virüslerinin tanılanması için serolojik yöntemlerden DAS-ELISA, moleküler yöntemlerden RT-PCR ve dot blot hibridizasyon yöntemleri ve biyolojik indeksleme yaygın olarak kullanılmaktadır. Hedeflenen virüs ve konukçuya göre hassaslık düzeyleri göz önüne alınarak bu yöntemlerin biri veya birkaçı birlikte kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin virüslerin tanılanmasındaki duyarlılıkları birbirinden farklılık göstermektedir.

Serolojik yöntemlerden ELISA, bitki virüslerinin saptanmasında rutin olarak kullanılmaktadır (Torrance, 1981). Sert çekirdekli meyvelerde virüs tanılanması için ELISA yöntemi ilk olarak PPV tanısında kullanılmıştır. Erik meyve, çiçek, yaprak ve kök örneklerinde PPV'nin tanısı için uzun yıllar ELISA yöntemi uygulanmış ve çok sayıda örneğin hızlı ve kolay bir şekilde testlenmesi başarılmıştır (Clark et al., 1976). Daha sonra bu yöntem diğer virüslerde de kullanılarak hemen hemen tüm sert çekirdekli meyve virüslerinin tanılanmasında başarıyla uygulanmıştır.

Dünyada sert çekirdekli meyvelerde görülen virüslerden ApMV, ACLSV, PNRSV, PDV, CLRV ve PPV'nin ELISA ile tespitiyle pek çok çalışma yapılmıştır (Ismaeil et al., 2003; Myrta et al., 2003; Aneliya, 2005; Mandic et al., 2007; Myrta and Savino, 2008).

Myrta vd. (2003), Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkelerinde yapılan 10 yıllık sürvey çalışmaları sonucunda sert çekirdekli meyveler içerisinde %54 ile en çok kiraz ağaçlarının virüslerle enfekteli olduğunu tespit etmişlerdir. Kirazda en sık görülen virüs PDV (%67.2) olurken bunu karışık enfeksiyonlar (%13.0), ACLSV (%10.6) ve PNRSV (%5.9) takip etmiştir. Yapılan çalışmalarda bu virüslerin %8-22 arasında değişen oranlarda iki veya daha fazla karışık enfeksiyon tespit edilmiştir. Bazı bölgelerde yüksek enfeksiyon oranı ve karışık enfeksiyonların kayda değer

ekonomik kayıplar ve %57'ye varan verim kayıplarına neden olduğu belirlenmiştir (Varveri and Bem, 1995; Dominguez et al., 1998; Myrta et al., 2003).

Akdeniz ülkeleri dünya kiraz üretiminin yaklaşık %38'ini karşılamaktadır. Akdeniz ülkelerindeki kiraz alanlarında en sık görülen virüs hastalıkları yapılan pek çok çalışma ile belirlenmiştir. Akdeniz ülkelerinde serolojik yöntemlerle gerçekleştirilen testlerde kirazlardaki virüs enfeksiyon oranı %48 olarak bulunmuştur. Bu oran güney Akdeniz ülkelerinde %10 civarındayken, kuzey akdeniz ülkelerinde %60'lara kadar çıkmıştır. En sık görülen virüsler sırası ile PDV, PNRSV, ACLSV ve ApMV olmuştur. Enfekteli ağaçların %80'inde tespit edilen PDV büyük bir farkla kirazda en yaygın görülen virüs olmuştur (Myrta and Savino, 2008).

Sırbistan'da 125 vişne ve kiraz ağacı ELISA ile test edilmiştir. Tüm örneklerle PNRSV, PDV, ACLSV, ApMV ve PPV için DAS-ELISA testi uygulanmıştır. ELISA testi sonucunda PDV, ACLSV ve PNRSV'nin bulunma oranı %63 olarak bulunmuştur. Bu virüslere ilave olarak 80 ağaç da *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Strawberry latent ring spot virus* (SLRSV), *Petunia asteroid mosaic virus* (PetAMV), *Raspberry ringspot virus* (RpRSV), *Tomato black ring virus* (TBRV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) ve *Tomato ringspot virus* (ToRSV) ELISA ile test edilmiş ve sadece 1 ağaç PetAMV için pozitif bulunmuştur (Mandic et al., 2007).

Ülkemizde sert çekirdekli virüslerle yapılan ilk çalışmalar Afyon'da 1970'lerin başlarında Kurçman (1977) tarafından yapılmıştır. Simptomolojik gözlemler ve bazı indeksleme çalışmaları ağaçların virüslerle enfekteli olduğunu göstermiş, daha sonra yapılan çalışmalar otsu bitkilere mekanik inokulasyon uygulanarak kiraz ve vişne ağaçlarında ve bazı fidanlıklarda PNRSV, CLRV ve RRSV'nin varlığı tespit edilmiştir. Serolojik yöntemlerin gelişmesiyle yapılan çalışmalar hızla artmış ve pek çok virüsün teşhisi yapılmıştır.

Türkiye'de sert çekirdekli meyve virüslerin varlığı yapılan pek çok çalışma ile bildirilmiştir. ApMV, ACLSV, PNRSV, PDV, CLRV ve PPV ticari bahçelerde ve

sert çekirdekli ağaçlarda Ege Bölgesinde Azeri (1994), Doğu Akdenizde Baloğlu vd. (1995), Çağlayan Yıldızgördü and Hurugil (1996), Gazel ve Çağlayan (1998), Sertkaya vd. (2004), Sertkaya (2008), Doğu Anadolu’da Elibüyük ve Erdiller (1998), Sipahioglu vd. (1999), Orta Anadolu’da Elibüyük (2003), tarafından yaygın olarak tespit edilmiştir. Bu virüslerin bazıları aynı zamanda ticari olarak üretim yapan özel ve resmi fidanlıklarda da ortaya çıkmıştır. Bu virüsler tek başlarına bulunabildiği gibi, iki ya da daha fazla karışık enfeksiyonlar halinde bazı bölgelerde bulunduğu ELISA ile tespit edilmiştir.

Erdiller (1988), serolojik testler ve otsu bitkilere mekanik inokulasyon ile Ankarada PPV’nin varlığını ilk olarak tespit etmiş, daha sonra yapılan başka bir çalışmada da simptomolojik gözlemler, mekanik inokulasyon ve serolojik testler kullanarak PPV’nin varlığı teyit edilmiştir (Elibüyük ve Erdiller, 1991).

ELISA yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda sert çekirdekli meyvelerden kirazda en sık görülen virüsün PDV olduğu ve enfeksiyon oranının %5-55 arasında değiştiği ortaya konmuştur (Azeri, 1994; Çağlayan Yıldızgördü and Hurugil, 1996; Fidan ve Özdemir, 2000; Paylan, 2006).

İzmir ili ve ilçelerinde kiraz alanlarında yapılan bir çalışmada ELISA testlerinin sonucunda, 400 örneğin 49’unda PDV, 9’unda ACLSV, 24’ünde PNRSV ve 3’ünde de birden çok virüs tespit edilmiştir. Testlenen 400 örnekte CLRV, PPV ve ApMV enfeksiyonları saptanmamıştır. Bu verilere göre PDV %12.7 ile kiraz alanlarında en sık görülen virüs olurken %68,5’lik kısımda herhangi bir virüs tespit edilmemiştir (Paylan, 2006).

Isparta ili Türkiye’nin Batı Akdeniz bölgesinde yer alan önemli meyve üretim merkezlerinden birisidir. Bu nedenle bölgede sert çekirdekli virüslerin varlığını tespiti için birkaç çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda bir koleksiyon bahçesinde 16 sert çekirdekli örnek ACLSV ve PNRSV için ELISA ile test edilmiş ve sadece bir örnekte ACLSV pozitif örneği bulunmuştur (Ulubaş and Ertunç, 2005).

Isparta ili Eğirdir ilçesinde kiraz kalem damızlıklarında yapılan bir başka çalışmada DAS-ELISA testleri sonucunda, 29 kiraz ağacı (%23.2) ACLSV ile, sekiz kiraz ağacı (%6.4) ArMV ile, 65 kiraz ağacı (%52) PDV ile, dört kiraz ağacı (%3.2) SLRSV ile ve iki kiraz ağacı (%1.6) TBRV ile enfekteli olarak saptanmıştır. Buna karşın ApMV, CLRV, PNRSV ve RpRSV'ları yönünden damızlık ağaçlar temiz bulunmuştur (Fidan ve Özdemir, 2000).

Isparta'da yapılan başka bir çalışmada da elma bahçelerinde 276 yaprak örneği toplanmış, tüm örnekler ApMV için DAS-ELISA ile test edilmiş ve örneklerin 82'si pozitif bulunmuştur (Yardimci and Eryigit, 2005).

Çevik vd. (2011), Isparta ilinin 7 farklı bölgesinde 45 sert çekirdekli meyve bahçesinde yaptıkları bir çalışmada 175 yaprak örneği toplamışlar ve bu örneklerin hepsi ApMV, PDV, PPV, PNRSV ve ACLSV için ELISA ile test edilmişlerdir. ELISA sonuçlarına göre ApMV ve PPV tespit edilemezken, PDV, ACLSV ve PNRSV ile enfekteli sırasıyla 46 (%26.3), 24 (%13.7) ve 16 (%9.1) örnek tespit edilmiştir. Ayrıca dokuz kiraz ağacında (%5.1), virüsle enfekteli karışık enfeksiyonlar tespit edilmiştir. PDV'nin bölgede %26.3 enfeksiyon oranıyla en yaygın virüs olduğu ortaya konmuştur.

Bununla birlikte odunsu konukçuların dokusunda bulunan virüsün homojen olmayan dağılımından ve mevsime bağlı konsantrasyon dalgalanmalarından dolayı ELISA testi ile saptanmasında bazı sorunlar ortaya çıkabilmektedir (Torrance, 1981). Serolojik kökenli bir test olan ELISA'nın güvenilirliği ve kullanımı, bazı sınırlamalara bağlıdır. Özellikle meyve ağaçları ya da daha geniş bir ifadeyle odunsu bitkilerde, düşük virüs konsantrasyonu ile virüsün ağaçtaki heterojen dağılımı gibi unsurlar dikkate alındığında bu yöntemin mevsimsel olarak yanlış sonuçlar vermesini mümkün kılabilir (Dal Zotto and Nome, 1999). Bu nedenle ELISA yöntemi, örnekleme zamanına bağlı olarak işlevini gerçekleştirebilen bir test olup, bir virüsün farklı ırkları ile enfekteli olan örneklerde, virüs ırklarının belirlenmeme olasılığı da bulunmaktadır. Bu yüzden daha duyarlı ve güvenilir teknik olarak bilinen ve özellikle de mevsime bağlı farklı virüs konsantrasyonlarından az etkilenen Polimeraz

zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction, PCR) sayesinde ELISA’da yaşanan birçok problem ortadan kalkmıştır (Smith et al., 1998). PCR, genetik materyalin (DNA, RNA) üzerinde seçilmiş bir ya da birden fazla bölgenin oligonükleotit pirimer ve *Taq* polimeraz enzimi kullanılarak bir otomatik sıcaklık döngü (termo cycle) sistem (PCR cihazı) yardımıyla çoğaltılması işlemidir (Mathews, 1993). Ayrıca RNA’dan DNA sentezleme suretiyle PCR, RNA genomuna sahip virüslerde de RT-PCR olarak kullanılmaktadır. Farklı amaçlarla farklı alanlarda yaygın bir kullanım alanına sahip olan PCR ve RT-PCR son derece duyarlı ve özel bir tanı tekniği olup, günümüzde bitki virüslerinin tanınmasında ve meyve ağaçlarında hastalık yapan bitki patojeni virüslerin tanınmasında başarılı bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Saiki et al., 1985). Virüslerin belirlenmesinde kullanılacak tekniklerin duyarlılık, hız, maliyet ve uygulama kolaylığı gibi özellikleri taşıması gerekmekte olup PCR ve RT-PCR’ın bu özellikleri taşıdığı kaydedilmiştir. RT-PCR sürvey çalışmalarında yaygın bir kullanım alanı olan ELISA’ya göre 100-10.000 kat daha duyarlı olduğu belirlenmiştir (Vunsh et al., 1991; Rowhani et al., 1995). Bu nedenle son yıllarda yapılan tanılama çalışmalarında ELISA ve RT-PCR kombinasyonu kullanılmaktadır. Genellikle örnekler önce ELISA ile ön taramadan geçirilmekte daha sonra ELISA’da negatif olan izolatlar PCR ile tekrar testlenmekte veya doğrudan RT-PCR yapılmaktadır (Parakh et al., 1995; Pallas et al., 1998; Sanchez-Navaro et al., 1998; Saade et al., 2000; Herranz et al., 2005).

Türkiye’de de yurt dışında olduğu gibi sert çekirdekli meyve virüsleriyle ilgili pek çok çalışma yapılmıştır (Ulubaş and Ertunç 2004; 2005; Usta vd., 2005; Sipahioğlu et al., 2006; Gümüş et al., 2007b; Çağlayan et al., 2008; kbaş et al., 2011). Özellikle yapılan çalışmalar ELISA VE RT-PCR’ın kombine kullanıldığı çalışmalar şeklindedir

Usta vd. (2005), bir kiraz izolatından aldıkları örnekte PNRSV’nin tespitinde iki farklı teşhis yönteminin (DAS ELISA ve RT-PCR) başarısını karşılaştırmışlar, RT-PCR’ın ELISA testi ile kıyaslandığında PNRSV izolatını teşhiste daha hassas olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca yaprak dokusunun kök, kabuk ve yeşil sürgün

kabuğu dokularına nazaran kirazda PNRSV'yi saptamada en iyi bitkisel doku olduğu da belirlenmiştir.

Türkiye'nin sert çekirdekli meyve yetiştiriciliğinin yapıldığı farklı bölgelerindeki fidanlıklar ile meyve bahçelerinde bulunan erik, kayısı, nektarin, şeftali, kiraz ve vişne ağaçlarında yapılan bir araştırmada 486 bitkisel materyal PNRSV'nin ve 369 örnek ise ACLSV'nin belirlenebilmesi için serolojik ve moleküler yöntemlerle testlenmişlerdir. Tüm örneklerle uygulanan RT-PCR sonucunda 51 örneğin PNRSV ve yine 51 örneğin ACLSV ile enfekteli olduğu belirlenirken DAS-ELISA ile yapılan testler sonucunda ise sadece 31 materyalin ise PNRSV ve 13 ACLSV örneğin enfekteli olduğu tespit edilmiştir (Ulubaş and Ertunç 2004; 2005).

Çağlayan vd. (2008), Doğu Akdeniz Bölgesinde 240 kiraz ve 73 vişne örneğinde PNRSV, PDV ve PPV'nin varlığını DAS-ELISA ve RT-PCR testleri ile araştırmış, ELISA sonucunda en yaygın virüs PDV(%10.8) olurken, bunu PNRSV(%3.8) izlemiştir. Tüm pozitif örnekler kirazlardan elde edilmiş, vişne örneklerinin hepsi negatif sonuç vermiştir. ELISA sonuçlarında bir kiraz örneği PPV ile bulaşık tespit edilmesine rağmen RT-PCR sonucunda negatif çıkmıştır.

Ege Bölgesinde yapılan bir çalışmada farklı sert çekirdekli meyve ağaçlarından alınan 1225 örnek ACLSV, PPV, ApMV, PNRSV ve PDV için DAS-ELISA, *Plum bark necrosis stem pitting associated virus* (PBNSPaV) için RT-PCR ile test edilmiştir. Testlemeler sonucunda PDV(14.0%) en yaygın virüs olurken, kiraz virüslerin en çok (35%) görüldüğü sert çekirdekli meyve ağacı olmuştur (Gümüş et al., 2007b). Aynı araştırmacı Türkiye'nin farklı bölgelerinde bulunan ve sert çekirdekli meyve türlerine ait çeşit koleksiyonlarına sahip araştırma enstitülerinden sağlanan 320 örneğin serolojik ve moleküler testler sonucunda 50 tanesinin en az bir virüsle enfekteli olduğunu ortaya çıkarmıştır (Gümüş vd., 2007a).

Son yıllarda aynı anda birden fazla virüs tespiti sağlayan multipleks RT-PCR (MRT-PCR) yöntemi geliştirilmiş ve rutin tanı testleri için daha az zaman, emek, maliyetinden dolayı arzu edilen bir tanı yöntemi haline gelmiştir (Hassan et al., 2006;

Menzel et al., 2002; Sanchez-Navarro et al., 2005). MRT-PCR ile daha az zamanda daha çok hedef bölge amplifikasyonu gerçekleştirildiğinden özellikle birden fazla virüsün birlikte bulunduğu durumlarda kullanışlı bir inceleme yöntemidir.

Saade vd. (2000), sert çekirdekli meyve ağaçlarını sık görülen PNRSV, PDV ve ApMV'nin nonisotopic molekül hibridizasyon ve multiplex RT-PCR ile anında tanısı için bir çalışma yapmışlardır. mRT-PCR'la tek bir testte 3 virüsü tanımlamışlardır. MRT-PCR hassasiyet, güvenilirlik, uygulanabilirlik, zaman ve maliyet tasarrufu yönünden pek çok avantajlarının olduğu belirlenmiştir..

MRT-PCR testi ApMV, ACLSV, PNRSV, PDV, PPV, ApLV, APLPV ve PBNPaV dahil olmak üzere sekiz farklı sert çekirdekli meyve virüsün eş zamanlı tespiti için geliştirilmiştir. Bu yöntem kullanılarak yapay karışımlarda ve arazi koşullarında doğal olarak karışık enfekteli bitkilerde bulunan virüsler etkili bir şekilde belirlenmiştir (Sanchez-Navarro et al., 2005).

Çevik vd. (2011), tarafından bu yöntem modifiye edilerek ELISA ile test ettikleri 175 örnekten seçilen 30 örneği virüs tanısı için MRT-PCR ile tekrar teste tabi tutulmuş olup PPV tespit edilemezken 20 örnekte ApMV, PDV, PNRSV ve ACLSV tek tek veya karışık enfeksiyon halinde bulunmuştur. MRT-PCR sonucunda enfekteli bitki oranlarının %20 arttığı belirlenmiştir.

2.6. Biyolojik İndeksleme İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Biyolojik indeksleme, hasta olduğu düşünülen bitkiden virüs içeren bitki doku veya ekstraktlarının test bitkisi olarak kullanılan çeşitli sağlıklı bitkilerin yüzeyine değişik şekillerde mikroskobik veya makroskopik yaralar oluşturmak suretiyle uygulanmasıdır.

Kegler (1966), sert çekirdekli meyve ağaçlarından otsu indikatör bitkilere ilk virüs naklinin 1948 yılında vişneden hıyar bitkisine yapıldığını belirtmiş, yaptıkları

Çalışmada PDV ve PNRSV'yi sert ekirdeklilerden hıyara 0.01 M fosfat tamponu (pH 7.5) yardımıyla nakletmişlerdir.

Mandic vd. (2007), yaptıkları bir çalışmada kiraz ağaçlarında buldukları virüsleri mekanik inolulasyon ile otsu indikatör bitkilerden *Nicotiana occidentalis*, *N. benthamiana*, *Cucumis sativus*, *Chenopodium quinoa* ve *C. amaranticolor* bulaştırmış, 45 pozitif örnekten sadece 5'inde PDV ve PNRSV ELISA ile tespit edilmiştir. Aynı çalışmada otsu indikatör bitki olarak *P. serrulata* (süs kirazı) kullanılmış bitkilerde yaprak defermosyanları, epinasti ve nekrotik belirtiler oluşmuştur.

Parakh vd. (1995), RT-PCR tekniğini biyolojik indeksleme ve ELISA testi ile eş zamanlı olarak PDV teşhisinde kullanmışlardır. RT-PCR tekniğinin PDV'nin teşhisindeki başarısından ötürü sert çekirdekli meyvelerdeki PDV izolatlarının teşhisinde, sağlıklı damızlık materyal elde etmede ve karantina kapsamı çerçevesinde kullanılabilecek önemli bir teşhis tekniğı olduğunu vurgulamışlardır.

Hong vd. (1999), ACLSV'nin Çin'de elmalarda ACLSV-C, İtalya'daki bademlerde ACLSV-B izolatının biyolojik ve biyokimyasal özelliklerini karakterize etmişlerdir. Konukular üzerinde yaptıkları çalışmalarda her iki izolatın 5 familyaya ait 19 türde ve *C. quina*, *C. amaranticolor* ve *N. occidentalis* bitkilerini infekte edebileceğini lokal ve sistemik klorotik yaprak lekelenmelerine neden olabileceğini bulmuşlardır. Çalışmada virüse spesifik primerler kullanarak otsu bitkilerdeki ACLSV'nin RT-PCR yöntemiyle başarıyla teşhisini gerçekleştirerek yüksek kalitede PCR ürünü elde etmişlerdir.

Yürektürk (1984), şeftali, kiraz, kayısı ve bademde bir sürvey çalışması yapmış ve bu çalışmada Marmara bölgesinde 345 örneğın 34' ünün PPV ile enfekteli olduğunu GF 305 anacına aşısı ile enfekte ederek tespit etmiştir

Paylan (2006), kiraz ağaçlarında tespit ettiği virüsleri *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *C. sativus* ve *G. globosa* test bitkilerine mekanik inokulasyon ile bulaştırmış, bunun

sonucunda yapraklarda renk değişiklikleri, şekil bozuklukları ve beneklenmeler gibi belirtiler tespit etmiştir.

Hurigil-Gazel (1997), *Prunus* türlerinde yaptıkları bir çalışmada PNRSV, ACLSV, PDV, ApMV'ünü DAS-ELISA ile tespit etmiş, bulunan virüsleri *Cucumis sativus*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *Chenopodium quinoa* ve *C. amaranticolor* test bitkilerine mekanik inokulasyon yapmıştır. Test bitkilerinden sadece *C. sativus* bitkileri PDV, PNRSV ve ApMV ile enfekte olabilmışlerdir. PNRSV ile enfekteli bitkilerden 15 gün sonra yaprak damarlarında renk açılması, PDV ile enfekteli bitkilerden damar açılması ile birlikte yapraklarda küçülme ve deformasyonlar gözlenmiştir.

Koç ve Baloğlu (2004), yaptıkları bir çalışmada kiraz ve erikten elde ettikleri PNRSV izolatlarının biyolojik karakterizasyon için test bitkisi olarak kullanılan bitkilerden *C. quinoa*'da klorotik benek ve lezyon belirtileri, GF-305' te klorotik halka belirtisi oluşmuştur. Kiraz izolatlarının aşı gözleri kullanılarak *Prunus mahaleb* üzerine gerçekleştirilen aşılama da % 50 oranında fidan kayıpları meydana gelmiştir.

2.7. Gen Dizilimi ve Filogenetik Analiz

Dünyada ve ülkemizde son yıllarda virüslerin tüm genom dizilimleri yapılmış ve çok sayıda virüsün genomunun kısmi baz dizilimi belirlenmiştir. Bu nedenle dizi analizlerine dayalı virüs tanımlamaları yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

PNRSV'nin nükleik asit düzeyinde moleküler karakterizasyonu amacıyla yapılan bir çalışmada Amerikan PNRSV şeftali izolatının PE-5'in RNA3'ünün nükleotid dizilimi klonlanmış cDNA'dan belirlenmiştir. Elde edilen RNA dizilerinin 1941 nt uzunluğunda olduğu ve 2 ORF içerdiğini, ORF-1'in 31.7 kDa büyüklüğünde ve 284 amino asit (aa) uzunluğunda bir protein kodlarken ORF-2'nin 25.0 kDa büyüklüğünde ve 224 aa uzunluğunda kılıf proteini kodladığı belirlenmiştir. Kılıf protein genini amino asit dizilimi elma mozaik virüsünün bir izolatı kılıf proteiniyle

%92 benzerlik gösterirken, diğ er bir izolatu ile %66 benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir (Hammond and Crosslin 1995).

Yapılan başka bir çalışmada, Almanya'dan PNRSV PV-0096 izolatına ait RNA3'ünün tamamının nükleotid dizilimi belirlenerek 1943 nt uzunluğuunda olduğunu ve olduğuunu, 74 nt'lik bir intergenik bölgeyle birbirinden ayrılan iki ORF içerdiği belirlenmiştir. PV-0096 izolatının ORF-1'i 855 nt uzunluğuunda ve 31.4 kDa b y kl ğu nde bir protein kodlarken ORF-2'nin 675 nt uzunluğuunda ve 24.9 kDa b y kl ğu nde kılıf protein kodladığı belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda PNRSV izoaltının RNA 3' n 3' ucundaki gen kodlanmayan bölgenin (UTR) TSV, PDV ve ApMV ile yüksek derecede benzerlik gösterdiği de ortaya konmuştur (Guo et al., 1995).

Farklı sert çekirdekli meyvelerdeki PNRSV izolatları arasındaki moleküler farklılığın araştırıldığı çalışmada, izolatların çoğu üç farklı restriksiyon enzim kombinasyonu kullanılarak ayırt edilmiştir. Bu izolatların 15'inin RNA4'ünün kılıf protein geninin baz dizisi belirlenmiş ve filogenetik analizler sonucu diğ er araştırıcılar tarafından çalışılan izolatlar da dahil PNRSV izolatlarının PV-32, PE-5 ve PV-96 olarak 3 farklı grupta toplandığı belirtilmiştir. İzolatların RNA4 dizileri 884 nt uzunluğuunda olup 224 amino asit b y kl ğu nde bir protein kodlamaktadır. Grup içi benzerlik PV-96 için %94.8-99.5, PV-32 için %97.9-99.2 ve PE-5 için %96.8-99.8 olarak belirlenmiştir. PE-5 grubuna ait 5' UTR dizilerin diğ er iki gruptan oldukça farklı olduğuunu göstermiştir. Ayrıca filogenetik analizlerde oluşan gruplarla konukçu ve coğrafik bölge arasında net bir ilişki olmadığı bilgisine ulaşılmıştır (Aparicio et al., 1999).

PNRSV ile enfekteli sert çekirdekli meyve ağaçlarında virüsün moleküler tipi ve çeşitliliği ile ilgili bir çalışmada  ek Cumhuriyeti'nde 5 farklı konukçu türünden alınan 16 PNRSV izolatının RNA3 baz dizileri belirlenmiş ve daha önce diğ er araştırıcılar tarafından baz dizileri belirlenen diğ er izolatlarla birlikte 46 izolatın tümünün yapılan filogenetik analize göre virüsün alındığı konukçuya bağlı olarak Aparicio vd. (1999), tarafından da açıklandığı gibi üç ana grup altında toplandığı

belirlenmiştir. Birinci grubun çoğunlukla kiraz izolatlarından (7 kiraz, 1 şeftali, 1 elma) oluştuğu belirlenmiştir. Ayrıca, PNRSV RNA3'ünde en değişken bölgenin CP geninin olduğunu bildirmişlerdir. (Vaskova et al., 2000).

Çek Cumhuriyeti'nde kiraz genotiplerinin koleksiyonlarında varlığı tespit edilen 5 PPV izolatından yaygın olarak kullanılan P1 P2 primerler kullanılarak 1375 bp bir bölge RT-PCR ile çoğaltılmış, PPV N1b-CP-3'NCR bölgesinin DNA dizi analizi sonucunda PPV 13/2 CZ izolatının PPV-Rec grubu üyesi olduğu belirlenmiştir (Navrátil et al., 2008).

German vd. (1990), yaptıkları çalışmada farklı izolatları kullanarak ACLSV'nin nükleotid dizilerinin tamamını klonlanmış cDNA'dan ilk kez belirlemişlerdir. Buna göre ACLSV'nin RNA dizisinin 3' terminal poly(A) kuyruğu hariç 7555 nükleotidden oluştuğu ve 3 ORF içerdiklerini tespit etmişlerdir. ORF'ler sırası ile 216.5, 50 ve 28 kDa molekül ağırlığına sahiptir. ORF 1 korunmuş dizileri içeren ve RNA replikasyonunda proteinlere homoloji gösteren bir protein kodlarken, ORF 2 MP, ORF 3 kılıf proteinlerini kodlandıklarını ortaya çıkarmışlardır.

Japonya'da yapılan bir çalışmada, ACLSV-A izolatının nükleotid dizilerinin tamamı belirlenmiştir. Japonya'dan ACLSV-A elma ile daha önce tüm dizilimi yapılan Fransa'dan ACLSV-P erik izolatlarının nükleotid dizilimlerinin karşılaştırılmasında %79.8 benzerlik belirlenmiştir. Aynı izolatların amino asit dizilerinin karşılaştırılmasında ise ORF 1 ve ORF 2'nin kodladıkları proteinlerin benzerlikleri %88.4 ve %79.9 olarak belirlenmiştir. ACLSV-P izolatının 28.3 kDa büyüklüğündeki ORF 3 ile 21.4 kDa ORF 3 'e sahip ACLSV-A izolatının amino asit dizilimleri arasında %88.6 oranında benzerlik tespit edilmiştir. Immunoblot analizi sonucunda 21.4 kDa büyüklüğündeki proteinin *Escherichia coli* 'de ifade edilmesi bu proteinin ACLSV-A'nın kılıf proteini olduğunu göstermiştir (Sato et al., 1993).

ABD'de Ta Tao 5 şeftali izolatının tüm genomunun nükleotid dizilimi yapılarak ACLSV'nin genomunun 3' terminal poly(A) kuyruğu hariç 7474 nükleotidden oluştuğu ve 3 ORF içerdiği tespit edilmiştir. ORF1 1,880 aa ve 216.5 kDa, ORF2

446 aa ve 49.4 kDa, ORF3'ün ise 193 aa ve 21.7 kDa uzunluğunda ve büyüklüğünde oldukları belirlenmiştir. Ta Tao5 izolatı Gen Bank veri tabanından alınan 7 farklı ACLSV izolatı ile nükleotid dizilerinin karşılaştırılmasında %72.8–69.5 oranları arasında benzerlik gösterdiği ve en fazla benzerliğin Fransa'dan Balaton1 kiraz izolatı ile olduğu bildirilmiştir (Marini et al., 2008).

Hindistan'da yapılan bir çalışmada, 2 ACLSV şeftali izolatının CP geninin baz dizisi belirlenmiş ve bunlar Türkiye'den 2 izolatın da yer aldığı dünyanın farklı bölgelerinden alınmış olan 15 ACLSV izolatının birbiriyle olan genetik ilişkisi incelenmiştir. Hindistan şeftali izolatlarının gen bankasındaki diğer izolatlarla nükleotid ve amino asit dizilimindeki benzerlik oranlarının sırasıyla %69-84 ile %69-93 oranlarında olduğu belirlenmiştir. Türk izolatları, Hindistan izolatları ile ayırt edici bir benzerlik veya farklılık ortaya koymazken en yakın ilişkiyi İtalya şeftali izolatlarıyla göstermiştir (Rana et al., 2009).

Farklı konukçu (kayısı, erik, şeftali, badem, elma, armut) ve bölgelerden (İtalya, İspanya, Türkiye, Ürdün, Lübnan, Cezayir, Çin) elde edilen 35 ACLSV izolatının CP geninin amino asit dizilimi karşılaştırılması sonucunda 4 izolatın CP geninin diğer izolatlardan farklılık gösterdiği ortaya çıkmıştır. Yapılan filogenetik analizler sonucunda ACLSV izolatları arasında 2 farklı grup olduğu görülmüştür. Türkiye'den AP-T elma izolatların çoğu izolatın bulunduğu olan birinci büyük grupta yer alırken APR-EA5 kayısı izolatı 4 izolatın yer aldığı ikinci gruptaki izolatlarla gruplanmıştır. Araştıma kapsamında CP amino asit dizilimlerine göre yapılan filogenetik analizler ve filogenetik gruplar izolatların konukçuları veya alındıkları coğrafik bölgeler arasında bir ilişki olmadığını göstermiştir (Al Rwahnih et al., 2004).

PDV'nin moleküler karakterizasyonuna yönelik çalışmalar ilk olarak virüsün RNA3'ünün tüm baz dizilerinin belirlenmesi ile başlamıştır (Bachman vd., 1994). Yapılan çalışmada virüsün RNA3'ünün tamamından cDNA elde edilip klonlandıktan sonra nükleotid dizilimi cDNA'dan belirlenerek RNA3'ün 2129 nt'den oluştuğu ortaya konmuştur. Yapılan dizi analizleri sonucunda RNA 3 ve 72 nt bir intergenik

bölge ile ayrılan iki ORF içerdiği RNA'nın 5' ucunda yer alan ORF-1'in 882 nt uzunluğunda hareket proteini genini kodladığı, ORF-2'nin ise 657 nt uzunluğunda olup CP genini kodladığı belirlenmiştir. Araştırmacılar virüslerin TSV ve ALMV (*Alfalfa mosaic virus*) ile baz gösterdiğini ve bazı yapısal özelliklerin ortak olduğunu kaydetmişlerdir.

PDV ile yapılan başka bir çalışmada, Orta Avrupa ülkelerinden erik, kiraz ve şeftali ağaçlarından elde edilen 11 PDV izolatının, kılıf protein geninin nükleik asit dizileri ve intergenik bölgeleri belirlenmiş ve bu izolatlar daha önce başka araştırmacılar tarafından yayınlanmış iki izolat ile nükleik asit dizilimleri karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda kılıf proteinin %88 oranında korunduğu tespit edilmiştir. CP'nin C-terminalin yarısında yüksek oranda benzerlik gösterdiğini bu bölgede 13 amino asit yer değişimi gözlenirken N-terminal yarıda 22 adet olduğunu belirlemişlerdir. PDV izolatlarının moloküler ağırlıkları arasındaki en büyük farkın 27.7 kDa olduğu ortaya çıkmıştır. Araştırmacılar, amino asit yer değişimleri ile konukçu türü veya coğrafik orijine bağlı bir ilişki tespit edemediklerini bildirmişlerdir (Vaskova et al., 2000).

Bachman vd. (1994), nın daha önce RNA3'ün CP geninin dizilimini yaptığı PDV' li Amerika-Şeftali izolatıyla Mısır ve Amerika'dan 2'şer izolatın baz dizisi belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışmada, Mısır'dan şeftali ve erik izolatı, Amerika'dan 2 kiraz izolatı kullanılmıştır. Dizileme sonucunda Mısır izolatları ve Amerika kiraz izolatının, Amerika şeftali izolatı ile sırası ile %97 ve %98 arasında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Youssef et al., 2002).

Yurtmen vd. (2002), daha önce karakterizasyonu yapılan Apr (Kayısı-Macaristan), Ro (Gül-İsrail) ve Pe (Şeftali-Amerika) izolatları ile Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen şeftaliye aşılınmış üç farklı PNRSV, M1, M2, M3 izolatının nükleotid dizilerini belirlemişlerdir. Nükleotid dizilimine göre en fazla benzerlik % 99 ile M1 ve M2 izolatı arasında olurken, en uzun benzerlik % 83 ile Apr izolatıyla Pe izolatı arasında gözlenmiştir.

Çağlayan vd. (2004), Türkiye’ye ait PPV izolatlarını karakterize etmek için PPV enfekteli örnekler arasından seçilen iki erik ve bir kayısı PPV izolatının, virüsün protein kılıf protein genine ait baz dizilerini tespit etmişler ve gen bankasından temin edilen diğer PPV ırklarının baz dizileri ile çoklu karşılaştırmalar yapmışlardır. Bunun sonucunda Türk izolatlarının en yüksek homoloji oranını (%96.21) M ırkı ile gösterdiği tespit edilmiştir. PPV-D, El amar ve kiraz ırkları ile benzerlik oranları % 87’nin altında olmuştur. Yerli izolatların nükleotid dizileri ile oluşturulan dendogramda benzerlik indeksleri ile elde edilen sonuçlara paralel olarak PPV-D, M, El Amar, kiraz ve vişne izolatları ayrı gruplarda yer almıştır.

Türkiye’de araştırmacılar Bursa ve Amasya’dan aldıkları 2 şeftali ve 1 kiraz izolatının CP geninin nükleotid dizilerini klonlayarak elde etmişlerdir. Elde edilen baz dizileri Gen bankası veritabanında da yer alan dünyanın farklı bölgelerinden elde edilen diğer 11 ACLSV izolatı ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda izolatlar üç ana gruba ayrılmıştır. İlk grup, ağırlıklı olarak Uzak doğu izolatları içerirken ikinci grup ise Macar (Doğu Avrupa) ACLSV izolatlarından oluşmaktadır. Buna karşılık karışık avrupa izolatların yer aldığı üçüncü grup, kendi içinde iki alt gruba ayrılmıştır. Türk izolatlarından bir tanesi (Şeftali-Bursa) Fransa ve Macaristan izolatlarının yer aldığı birinci alt grupta, iki tanesi (Şeftali-Amasya, Kiraz-Amasya) Polanya ve Almanya izolatlarının bulunduğu diğer alt grupta yer almıştır. Amasya-Kiraz izolatının nükleotid ve aminoasit dizilimlerinin en fazla benzerliği sırasıyla %87.71-94.12 ile Polanya ve Macaristan izolatları ile gösterirken en az benzerliği sırasıyla %79.89-84.03 ile Çin ve Japonya izolatlarıyla göstermiştir. Çalışma ayrıca Türk izolatlarının kökeninin coğrafik bölge ile ilişkisinin olduğunu ve Avrupa kaynaklı olduğunu ortaya çıkarmıştır (Ulubas Serce and Rosner, 2006).

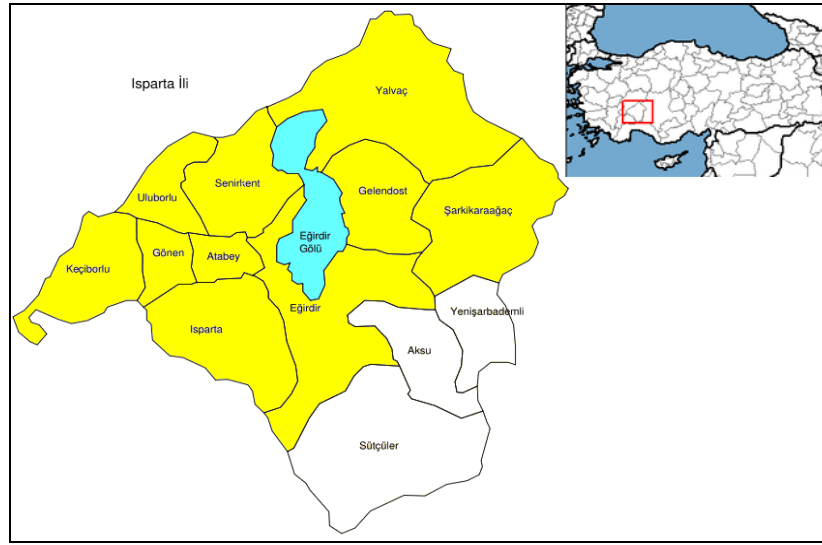
Türkiye’nin sert çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan bölgelerinden temin edilen izolatların filogenetik analizinde PNRSV izolatları arasında üç büyük grup ve üç küçük grup ayırt edilmiştir. Yapılan çalışmada coğrafik bölgelere göre sınıflamanın mümkün olmadığı ve izolatların bölgelere bağlı olmaksızın grup oluşturduğu belirlenmiştir (Ulubaş and Ertunç, 2004).

Ulubas Serce vd. (2009), yapmış oldukları başka bir çalışmada 10 PDV izolatının CP genini içeren 657 nükleotidden oluşan bölgenin dizilimini belirleyerek analizini yapmışlardır. Türk izolatlarının gen bankasındaki diğer izolatlarla filogenetik analizi sonucu 4 grub olduğu belirlenmiştir. İlk. grupta kiraz izolatları yer almış ve bunlar korunmuş aminoasit dizileriyle diğer gruplardan ayrılmıştır. İkinci grupta bir kayısı ve kiraz izolatı yer almış ve Türk izolatlarının büyük çoğunluğu bu grupta yer almıştır. Üçüncü grupta erik, şeftali, kiraz, ve bir kayısı izolatları yer almış, 4. grupta ise sadece badem ağaçlarından elde edilen bir grup oluşmuştur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Arazi Çalışması

Araştırma materyalini oluşturan örnekler Isparta'nın önemli kiraz üretim alanlarından Uluborlu, Senirkent, Gelendost, Şarkıkaraağaç, Yalvaç, Eğirdir, Gönen, Keçiborlu, Atabey ve Merkez ilçelerinden (Şekil 3.1.) bölgelerin üretim alanları ve miktarları göz önüne alınarak toplam 521 örnek toplanmıştır (Çizelge 3.1).



Şekil 3.1. Ispartada bitki materyallerinin temin edildiği ilçelerin coğrafik dağılımı

Çizelge 3.1. Örneklerin toplandığı ilçeler ve örnek sayıları

İLÇE	Üretim Alanı (da)	Toplanan Örnek Sayısı
Senirkent	12.2	166
Uluborlu	10.7	160
Atabey	3.65	48
Şarkıkaraağaç	1.6	27
Yalvaç	1.4	10
Keçiborlu	1.4	20
Merkez	1.4	42
Gönen	0.8	15
Eğirdir	0.5	23
Gelendost	0.5	10
Toplam	35.529	521

Örneklerin alındığı merkezlerdeki tarım teşkilatlarıyla önceden irtibata geçilerek bölgeleri temsil edecek şekilde yörelerdeki kiraz bahçeleri gezilmiştir. Örneklerin toplanması amacıyla, ApMV, PDV, PNRSV, CLRV, ACLSV, PPV belirtisi gösteren 142 bahçeden gözlemler yapılarak gayeli örnekleme ile ağaçların en az 4 farklı yönünden 521 adet yaprak örneği alınmıştır. Herhangi bir virüs belirtisi göstermeyen durumda tesadüfî olarak örnekleme yapılmıştır. Yaprak örnekleri polietilen torbalara konularak etiketlenmiş ve buz kutularında laboratuara taşınmıştır. Gezilen ve örnek alınan kiraz bahçelerinin koordinatları GPS cihazı ile belirlenmiş, mevkii, yaşı, çeşidi, anacı, ağaçta nasıl belirtiler oluşturduğu gibi bilgiler kaydedilerek gerekli durumlarda fotoğrafları çekilmiştir.

3.2. Bitki Materyali Muhafazası

Örnekler ilkbahar mevsiminde 1 Mayıs 2010-15 Haziran 2010 tarihleri arasında toplanmıştır. Hastalık belirtisi gözlemlenen bahçelerden toplanan örnekler polietilen torbalar içinde etiketlenerek buz kutusunda laboratuara getirilmiş ve 2 farklı koşul ve yöntemle muhafaza edilmiştir. ELISA testinde kullanılmak üzere araziden laboratuara getirilen örnekler 4°C’de bekletilmiş ve 3 gün içerisinde ELISA testi uygulanmıştır. RNA izolasyonu ve moleküler çalışmalar için bitki örneklerinin bir kısmı -80°C de muhafaza edilirken bir kısmı da kurutma yöntemiyle saklanmıştır. Bitki örneklerinin kurutulmasında orta büyüklükte en az 1 yaprak kullanılmış ve bunlar 65°C’de 48 saat etüvde bekletilmiştir. Kuruyan yapraklar plastik poşetlere konularak etiketlenmiş ve toz haline getirilmiştir (Sipahioğlu et al., 2006).

3.3. DAS-ELISA Yöntemi

Toplanan tüm örneklere; ApMV, ACLSV, CLRV, PPV, PDV ve PNRSV virüslerinin varlığını saptamak amacıyla “Double Antibody Sandwich-ELISA” (DAS-ELISA) yöntemi kullanılmıştır (Clark and Adams, 1977). Yapılan DAS-ELISA testinde Bioreba (İsviçre) firmasından temin edilen poliklonal antiserum içeren ELISA kitleri kullanılmıştır. Her bir virüs için üretici firmanın önerileri doğrultusunda standart DAS-ELISA protokolü aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

ELISA platelerin (Nunc F96 Maxisorp) her bir çukuruna kaplama tamponunda 1:1000 oranında seyreltilmiş olan IgG'den 200 µl eklenerek 30°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. ELISA plate yıkama tamponu ile yıkanarak 3 dakika beklenmiş ve bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Ekstraksiyon tamponu ile hazırlanan örnekler, pozitif ve negatif kontroller her bir çukura 200 µl eklenerek 4°C'de 16 saat inkübe edilmiştir. ELISA plate ikinci aşamada açıklandığı şekilde tekrar yıkanmıştır. Konjuge tamponu içerisinde 1:1000 oranında seyreltilen IgG, her bir çukura 200 µl eklenerek 30°C'de 4 saat inkübe edilmiş ve ELISA plate ikinci aşamada açıklandığı şekilde tekrar yıkanmıştır. Substrat çözeltisine 1mg/ml olacak şekilde paranitrofenilfosfat substratından her bir çukura 200 µl konularak oda sıcaklığında karanlık ortamda 1 saat bekletilerek sarı renk oluşumu beklenmiştir. Sonuçlar sarı renk oluşumu gözlenerek ve 405 nm dalga boyunda absorbands değeri ELISA okuyucusunda (MR-96A Microplate Reader II) ölçülerek yapılmıştır. 405 nm dalga boyunda okunan absorbands değeri, sağlıklı kontrol değeri en az iki katı ve daha yukarı okuma değeri veren örnekler pozitif, renk oluşturarak negatiften belirgin farklılık gösteren ancak negatif 2 katına ulaşmayanlar ise şüpheli olarak kabul edilmiştir

3.4. Oligonükleotid Primerler

Moleküler alışmalarda DAS-ELISA ve RT-PCR sonucunda tespit edilen virüslerden PDV, PNRSV ve ACLSV'ye ait her bir virüsün CP geninin bir kısmını veya tamamını içeren korunmuş bölgelerine spesifik tüm ırkları kapsayan birer çift primer kullanılmıştır (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. PCR testlerinde kullanılan primer çiftleri

Primer kodu	Virüs	Primer baz dizisi	Ürün uzunluğu (bp)	Kaynak
PD1	PDV	5' – AAA GAA GAG AAG TCC GAC AAG – 3'	862	Vaskova et al., 2000
PD2		5' – AAG CAG CAT TTC CAA CTA CGA –3'		
PN1	PNRSV	5' – GAG CTC TGG TCC CAC TCA GG - 3'	616	Spiegel et al., 1999
PN2		5' – TCA CTC TAG ATC TCA AGC AG - 3'		
AC1	ACLSV	5' – TTCATGGAAAGACAGGGGCAA – 3'	677	Menzel et al., 2002
AC2		5' – AGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA 3'		
Ap1	ApMV	5' – ATCCGAGTGAACAGTCTATCCTCTAA -3'	262	Menzel et al., 2000
Ap2		5'- GTAACCTCACTCGTTATCACGTACAA – 3'		
P1	PPV	5' – ACCGAGACCACTACACTCCC – 3'	243	Wetzel et al., 1992
P2		5' – CAGACTACAGCCTCGCCAGA – 3'		
C1	CLRV	5'-TGGC-GACCGTGTAACGGCA-3'	416	Werner et al., 1997
C2		5'-GTCGGAAA-GATTACGTAAAAGG-3'		

3.5. Total RNA İzolasyonu

ELISA sonuçlarında pozitif çıkan veya şüpheli olarak bilinen örneklerin bir kısmına moleküler testlerde kullanmak amacıyla RNA izolasyonu yapılmıştır. Nükleik asit izolasyonunda Bio-Basic (Kanada) firması tarafından geliştirilen tek aşamalı RNA izolasyon solüsyonu (One Step-RNA Solution), Li vd. (2008)'ın modifiye ettiği CTAB nükleik asit izolasyon yöntemi (Doyle and Doyle, 1987) ve Qiagen RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) kullanılarak 3 farklı yöntem uygulanmıştır.

3.5.1. One Step-RNA izolasyon yöntemi

Yaprak örnekleri sıvı azot içerisinde havanda toz haline gelinceye kadar iyice ezilmiştir. Toz halindeki yaprak örneğinden 100 mg alınarak 1.5 ml santrifüj tüpüne konulmuş, tüpe One Step-RNA solüsyonundan 1 ml eklenip, vorteksle (Yellowline TT3 3) iyice karıştırılarak homojenizasyon sağlanmıştır. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra tüpler soğutmalı santrifüjde 12000 x g (RCF) hızda ve 4°C'de ve

10 dk süreyle çevrilerek çözünmez bitki dokuları çöktürülmüştür. Tüpteki üstte bulunan sıvı kısım alınarak yeni bir tüpe aktarılmış (yaklaşık 600-700 µl) ve tüp oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra 200 µl kloroform eklenip, tüpler elde 15 sn süreyle hızlı bir şekilde veya vorteks ile iyice karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığında 2-3 dk bekletildikten sonra tüp 12000 x g (RCF) hızda 4°C’de 10-15 dk santrifüj (Hettich Zentrifugen Mikro 220 R) yapılarak karışım fazlara ayrılmıştır. Oluşan 3 fazdan RNA’ları içeren üst faz pipet yardımıyla yaklaşık 500 µl alınarak yeni bir tüpe aktarılmıştır. Tüpe 500 µl isoproponal alkol eklenip karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk bekletilerek RNA’nın çökmesi sağlanmıştır. Tüpler 12000 x g (RCF) 4°C de 10 dk santrifüj yapılarak RNA’ lar tüpün altında çökertilmiş sonra sıvı kısım atılarak RNA içeren çökelti (pelet) bırakılmıştır. Tüpteki çökelen RNA’ya 1 ml %75’lik etanol eklenip vorteks yapıldıktan sonra 7500 x g(RCF) 4°C de 5 dk santrifüj yapılmış, santrifüjden çıkan tüplerdeki etanol dökülmüş, tüp ters çevrilerek içinde etanol kalmaması sağlanmıştır. Etanolun buharlaşması için tüplerin ağzı açık olarak 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiş veya pipetle etanol uzaklaştırılmıştır. Son olarak tüpteki RNA’nın üzerine 50 µl steril saf su ilave edilerek pipet yardımıyla RNA’nın sıvı içinde çözünmesi sağlanmış ve örnekler kullanılıncaya kadar -80°C’de saklanmıştır.

3.5.2. CTAB nükleik asit izolasyon yöntemi

Yaprak örnekleri havanda sıvı azot içerisinde toz haline gelinceye kadar ezilmiş, ezilmiş yaprak dokusundan, 100 mg alınarak 2 ml santrifüj tüpüne konulmuştur. Tüpteki doku örneklerine %2 CTAB, %2 PVP- 40, 100 Mm Tris-HCl, Ph 8.0, 1.4 M NaCl, 20mM EDTA ve 0.2 %2 mercaptoethanol içeren 1ml CTAB tampon eklenerek vorteksle iyice karıştırılmıştır. Örnekleri içeren tüpler -20°C de 5-15 dk bekletilerek dondurulmuş, sonra vortekste en yüksek hızda en az 60 sn karıştırılmıştır. Elde edilen homojenat 65°C de 15 dk su banyosunda (Mommert) inkübasyona bırakıldıktan sonra 10.000 x g (RCF)’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında 650 µl supernatant alınarak yeni bir 1.5 ml santrifüj tüpüne eklenmiş ve üzerine eşit hacimde 24:1 chloroform:isoamyl alkol karışımı eklenerek 15.000 x g (RCF) de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında 500 ul

supernatant alınarak 350 µl isopropanol içeren yeni bir 1.5 ml santrifüj tüpüne eklenmiş ve karışım 15.000 x g (RCF)'de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında sıvı kısım dökülmüş ve elde edilen pelletler 1 ml %70 lik ethanol ile yıkanmıştır. Karışım 15.000 x g (RCF) de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra sıvı kısım dökülerek tüpler oda sıcaklığında 10-15 dk bekletilmiş, kurutulan peletler 100 µl, 20mM Trls-HCl, pH 8.0 solusyonu ile çözündürüldükten sonra örnekler -80°C'de saklanmıştır.

3.5.3. RNAeasy nükleik asit izolasyon yöntemi

Yaprak örnekleri havanda sıvı azot içerisinde toz haline gelinceye kadar ezilmiş, ezilmiş yaprak dokusundan, 100 mg'ı aşmayacak şekilde 2 ml santrifüj tüpüne konulmuştur. Tüpe 450 µl RLT tamponu eklenip vorteksle iyice karıştırılmıştır. Tüpün üstte bulunan sıvı kısmı alınarak RNeasy filtrasyon kolonuna aktarılacak en yüksek hızda 2 dk santrifüj edilmiştir. Ardından filtrasyon kolonundan geçerek toplanan sıvı kısmın yarısı kadar etil alkol (%96-100) eklenmiş ve bekletilmeden pipetle karıştırılmıştır. Tüpteki yaklaşık 650 µl sıvı kısım pipet yardımıyla alınarak RNeasy saflaştırma kolonuna aktarılmış ve 10000 x g (RCF) hızda 30 s santrifüj edilmiştir. Kolondan geçerek alttaki tüpe geçen sıvı kısım dökülerek kolona 700 µl RW1 tamponu eklenmiş ve 10000 x g (RCF) hızda 30 s santrifüj edilmiştir. Altta kalan sıvı kısım tekrar dökülerek kolona 500 µl RPE tamponu eklenmiş ve 10000 x g (RCF) hızda 30 s santrifüj edilmiştir. Aynı işlem bir kez daha tekrar edildikten sonra RNeasy kolonları yeni bir 2 ml santrifüj tüpüne yerleştirilmiş ve bu tüpler 1 dk en yüksek hızda santrifüj edilmiştir. Kolon tekrar yeni bir 1.5 ml santrifüj tüpüne yerleştirilmiş ve üzerine 30-50 µl RNase'dan arı su ilave edilip 1 dk bekletildikten sonra tüpler 10000 x g (RCF) hızda 1 dk santrifüj yapılarak RNA'lar elde edilmiştir. Örnekler kullanılıncaya kadar -80°C de saklanmıştır.

3.6. Kılıf Protein Genlerinin oğaltılması

3.6.1. Tersine transkripsiyon (RT)

Enfekteli bitki dokusundan izole edilen toplam RNA'dan virüslerin kılıf protein genlerinin çoğaltılması iki aşamalı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi (RT-PCR) ile yapılmıştır. RNA izolasyonu sonucu elde edilen RNA'lar dan revers transkriptaz enziminin sağlandığı firmanın (MBI Fermentas) önerilerine göre komplementer DNA (cDNA) sentezlenmiştir. Bu amaçla 5 µl total RNA, 1 µl 200 pmol random primer eppendorf tüp içine konularak su ile 12 µl'ye tamamlanmıştır. Karışım 65°C 5 dk inkübasyondan sonra hemen buz üzerine alınarak 5 dk bekletilmiş ve RNA'ların denatürasyonu sağlanmıştır. Denatürasyonu yapılan RNA'lara ayrı bir tüpte son hacmi 20 µl olacak şekilde 4 µl 5x reaksiyon ortamı (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 2 µl 10mM dNTP mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 20 U RNase inhibitörü (Fermentas-Kanada), 20 U RevertAid Reverse transkriptaz (Fermentas-Kanada) eklenerek RT karışımı hazırlanmıştır. PCR makinesi 25°C 5 dk, 42°C 60 dk, 70°C 5 dk ve 4°C sürekli olarak kalacak şekilde programlanarak cDNA sentezi yapılmıştır.

3.6.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR işlemi Ex Taq DNA polimeraz (Takara-Japonya) enzimi kullanılarak daha önce rapor edilen protokole göre 50 µl hacimde yapılmıştır. PCR tüplerine 2.5 µl cDNA, her bir virüse spesifik 20 pmol primer çifti 0,5 mM dNTP'ler, 1X reaksiyon tamponu (50 Mm KCL, 10 mM Tris HCL 25°C Ph 9. , 0,1 %Triltron X-100), 2.5 ünite Ex Taq DNA polimeraz enzimi (Takara-Japonya) içeren ve su ile 50 µl'ye tamamlanan PCR karışımı hazırlanmıştır. Tüpler PCR cihazına (Biorad C1000 Thermal Cycler) yerleştirilerek kılıf protein genlerinin çoğaltılması yapılmıştır. Test edilecek her bir virüs için spesifik olan program uygulanmıştır. Buna göre PDV ve PNRSV için PCR karışımı 94°C 2 dk, 40 defa tekrarlanan 94°C 30 sn 57°C' de 1 dk ve 72°C 1dk'dan sonra 72°C'de 5 dk ve 4°C bekleyecek şekilde, ACLSV için 94°C 2 dk, 40 defa

tekrarlanan 94°C 30 sn 62°C' de 1 dk ve 72°C 1dk dan sonra 72°C'de 5 dk ve 4°C bekleyecek şekilde programlanan PCR cihazına konularak kılıf protein genlerinin çoğaltılması yapılmıştır.

3.7. Agoroze Jel Elektroforez Yöntemi

Elde edilen PCR ürünleri %1 agarose jeline yüklenerek, elektroforez yöntemi kullanılarak, büyüklük markörleriyle birlikte ayrıştırılmıştır. Elektroforez 1XTAE ortamında yapılmış, aynı ortam jelin hazırlanmasında da kullanılmıştır. Jele 2.5 µl yükleme boyası (6X; 15 ml için 150 mg bromophenol blue, 18 gr gliserol, 6 ml 50XTAE) ile birlikte 10 µl yüklenen RT-PCR ürünleri, 100 V'da 30 dk süreyle elektroforeze tabi tutulmuştur. PCR ürünleri Etidium bromid ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir (Kodak EL Logic 200).

3.8. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

RT-PCR ile çoğaltılan CP genleri EZ Coloum PCR pürifikasyon kiti (Biobasic, Kanada) kullanılarak DNA dizilimi belirlenecek olan 22 PDV izolatu, 5 PNRSV izolatu ve 7 ACLSV izolatu saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemine göre; PCR ürünlerinin tamamı 50 µl olarak kabul edilmiş, 1.5 ml PCR tüplerinin içine PCR ürününün toplamının 3 katı (150 µl) Bağlama tamponu I (Binding Buffer) katılmış ve pipet ile karıştırılmıştır. Karıştırılan PCR ürünü EZ-10 kolon tüplerinin içine konulmuş ve oda sıcaklığında 2 dk bekledikten sonra 10,000 x g (RCF) de 2 dk santrüfjü edilmiştir. Tüpün altındaki sıvı kısım dökülmüş ve kolon üzerine 500 ul yıkama solüsyonu ilave edilerek 10,000 x g (RCF) de 2 dk santrüfjü'den sonra, 3. aşama tekrar edilmiştir. PCR tüpleri 10,000 x g (RCF) de 2 dk boş olarak tekrar sanrifjü yapılmıştır. Kolanlar başka bir 1.5 ml tüpe alınarak 50 ul Bırakma solüsyonu (Elution Buffer) tamponu ilave edilerek oda sıcaklığında 2 dk bekledikten sonra 10,000 x g (RCF)'de 2 dk santrüfjü edilmiş ve son olarak saflaştırılan DNA'lar dizilemeye gönderilinceye kadar -20'de saklanmıştır.

3.9. Kılıf Protein Genlerinin Dizilimlerinin Belirlenmesi

Saflaştırılan CP genlerinin DNA dizilimleri her bir virüsün CP genlerine spesifik primerler kullanılarak döngü dizileme yöntemiyle otomatik DNA dizileme cihazı kullanılarak yapılmıştır. Dizileme işlemi Refgen Biyoteknoloji (Ankara) firmasından hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

3.10. Kılıf Protein Geninin Dizi Analizleri

Her bir izolat için elde edilen CP DNA dizilimleri Vector NTI DNA dizi analiz programında incelenerek izolatların CP gen dizilimlerine ait nükleotid dizilimi elde edilmiştir. Daha sonra nükleotid diziliminden yararlanılarak PDV, PNRSV ve ACLSV'e ait CP genlerinin amino asit dizilimleri elde edilmiştir. Isparta ilinin farklı kiraz üretim bölgelerinden alınan izolatların kılıf protein genlerine ait nükleotid ve amino asit dizileri AlingnX programında çoklu dizi karşılaştırma yapılarak birbirleriyle olan benzerlik oranları yüzde olarak belirlenmiştir. Daha sonra gen bankasında DNA ve protein veri tabanlarında araştırma yapılarak dünyanın farklı kiraz üretim bölgelerinden elde edilen PDV ve PNRSV izolatlarına ait tam, ACLSV izolatlarının ise kısmi kılıf protein genlerinin nükleotid ve amino asit dizilimleri elde edilmiştir. Bu diziler Isparta ilinin farklı kiraz üretim alanlarından elde edilen izolatların kılıf protein genlerine ait nükleotid ve amino asit dizileriyle AlingnX programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Isparta ilindeki PDV, PNRSV ve ACLSV izolatlarının dünya izolatlarıyla benzerlik oranları yüzde olarak belirlenmiştir.

3.11. Kılıf Protein Geninin Filogenetik Analizleri

Isparta ilinin farklı kiraz üretim bölgelerinden alınan PDV, PNRSV ve ACLSV izolatlarının AlingnX programında çoklu nükleotid ve amino asit dizi karşılaştırmaları yapılan PDV, PNRSV, ACLSV kılıf protein genine ait çoklu dizi karşılaştırma dosyaları, Clustal X2 programına aktararak filogenetik analizler yapılmıştır. Filogenetik analiz verileri kullanılarak Kiamura iki parametre algoritması

uygulanan neighbor-joining yöntemiyle filogenetik soyağacı oluşturulmuştur. Oluşturulan soy ağacının doğruluğunu istatistiksel olarak belirlemek amacıyla 100 tekerrürlü 'bootstrap' analizi yapılmıştır. Son olarak oluşturulan soyağaçları TreeView soy ağacı görüntüleme programı kullanılarak görüntülenerek Isparta ili'nin farklı kiraz üretim bölgelerinden toplanan PDV, PNRSV ve ACLSV izolatlarının birbiriyle yakınlık dereceleri ve genetik ilişkileri ortaya konulmuştur. Aynı şekilde dünyanın diğer kiraz üretim bölgelerinden elde edilen izolatların gen bankasında bulunan kılıf protein genlerinin nükleotid ve amino asit dizilerinin çoklu karşılaştırmaları yukarıda belirtildiği gibi filogenetik analizlere tabi tutulup soy ağaçları oluşturularak TreeView programında görüntülenmiştir.

3.12. Biyolojik İndeksleme

ELISA ve PCR testleri sonucunda virüslü çıkan örneklerin bazıları seçilerek her bir virüs için biyolojik tanılama çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda otsu ve odunsu indikatör bitkiler kullanılmıştır.

Otsu indikatör bitki olarak *C. amaranticolor*, *C. quinoa* *Cucumis sativus* ve *Nicotiana occidentalis* kullanılmış olup *C. amaranticolor*, *C. quinoa* tohumları Adana Biyolojik Mücadele Araştırma İstasyonundan, *N. occidentalis* fideleri Süleyman Demirel Üniversitesi Bitki Koruma Bölümünden temin edilmiştir. Odunsu indikatör bitkilerden Bing çeşidi kiraz fidanları Eğirdir Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsünden ve GF 305 şeftali anacı kalemleri ise Karacabey Fidan ve Fide Test Merkezinden temin edilmiştir. Mekanik inokulasyon ve biyolojik tanılama çalışmaları Eğirdir Meyvecilik Araştırma İstasyonu Müdürlüğündeki iklim odası ve seralarda yürütölmüştür.

3.12.1. Odunsu indikatör bitkilere aşılama

Odunsu indikatör bitkilerden Bing Kiraz Çeşidi ve GF 305 anacından alınan aşı gözüne sahip kalemler sonbaharda Eğirdir Meyvecilik Araştırma İstasyonu Müdürlüğüne ait üretim parsellerindeki kiraz ve şeftali çöğürü anaçlara göz aşısı

yapılmıştır. Şubat ayında bu fidanlar saksılara alınıp seralara yerleştirilmiştir. ELISA ve moleküler çalışmalarda pozitif çıkan PDV, PNRSV, ACLSV izolatlarından her biri için 5 adet fidan seçilmiştir. Fidanların sulama, gübreleme gibi bakım işleri burada yapılmıştır. Ağustos ayı sonunda aşıya gelen *Prunus persicae* GF 305 şeftali anacında ve Bing kiraz çeşidinde virüs'ün belirtilerini görmek amacıyla ELISA ile pozitif olarak değerlendirilen virüslü ağaçlardan alınan odunlu kabuk dokuları bu bitkilere T göz aşısı yöntemiyle aşılanmıştır. Aşılaması yapılan bitkilere ait fotoğraflar Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Odunsu indikatör bitkilere uygulanan aşılama çalışmaları
a) Bing kiraz çeşidinde uygulanan T göz aşısı, b) *Prunus persicae* GF 305 anacına uygulanan T göz aşısı

3.12.2. Otsu indikatör bitkilere mekanik inokülasyon

Mekanik inokülasyon için kullanılacak otsu bitkilerinin tohumları 1:1:1 oranında toprak, kum ve torf karışımı bulunan saksılara ekilmiştir. Fideler 25-26°C sıcaklığa ve %70 neme sahip bitki büyütme kabinlerinde büyütülmüş ve 2-4 yapraklı hale gelen fidelere mekanik inokülasyon işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla, virüs taşıdığı bilinen bitkilerden alınan yaprak örnekleri (1 gr) 1:10 hacimde 0.03 M fosfat tamponu (pH 7.2) ile steril havanlar içerisinde iyice ezilmiştir. İndikatör bitkilerin karborandum tozu ile kaplanmış yapraklarına, bitki ekstraktı steril gazlı bez yardımıyla 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Musluk suyu ile yıkanan bitkiler iklim odalarında (25-26°C, %60-70 nisbi nem) bekletilmiş, günlük olarak kontrol

edilerek simptom oluşumu gözlenmiştir. Aşılması yapılan bitkilere ait fotoğraflar Şekil 3.3’de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Otsu indikatör bitkilere uygulanan mekanik inokülasyon çalışmaları.
a) Mekanik inokülasyona hazır *Nicotiana occidentalis* bitkileri, b) Laboratuarda mekanik inokülasyon yapılan *Nicotiana occidentalis* bitkileri

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Arazi Çalışmaları

Araştırma materyalini oluşturan örnekler Isparta'nın önemli kiraz üretim alanlarından Uluborlu, Senirkent, Gelendost, Şarkıkaraağaç, Yalvaç, Eğirdir, Gönen, Keçiborlu, Atabey ve Merkez ilçelerinden bölgelerin üretim alanları ve miktarları göz önüne bulundurularak toplanmış ve bu bölgeleri temsil eden toplam 521 örnek alınmıştır. Örneklerin alındığı kiraz ağaçlarında genel olarak ana dallarda kurumalar, kloroz, yaprak kıvrıcıklığı, çevresindekilere göre bodur kalmış ağaçlar, yapraklarda parçalanmalar, daralma ve incelmeler, sürgün uçlarından itibaren kurumalar, ince ve sık yapraklı yan sürgünler, delinmiş yapraklar, mozaik, klorotik ve hale şeklindeki halkalı leke belirtileri gözlenmiştir. Örnek alınan bazı ağaçlarda bu belirtilerin biri bulunurken bazı ağaçlarda ise birden çok semptom aynı anda tespit edilmiştir. Daha sonra yapılan testlerde belirgin bir semptom göstermemesine rağmen bazı örneklerin yoğun miktarda virüsle bulaşık olduğu ortaya çıkmıştır. Örnek toplanan kiraz çeşitlerinin çoğu 0900 Ziraat olup, bunun yanında Starks Gold (Beyaz Kiraz), Sweet Heart çeşitlerinden de virüs belirtisi gösteren örnekler toplanmıştır.

Yapraklarda gözlenen renk değişiklikleri ve halka şeklinde lekeler, yapraklarda daralma ve dişlilik, kırışıklık, ince ve sık yapraklı yan sürgünler gibi belirtiler ELISA testlerinde PDV ile enfekteli örnekler olarak saptanmıştır. PDV'nin kiraz ağaçlarında meydana getirdikleri belirtiler şekil 4.1. de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Kiraz ağaçlarında PDV'nin yol açtığı düşünülen belirtiler
a)Yapraklarda klorofil parçalanmaları, b) Aynı ağaç üzerinde yer alan yaprak kenarlarındaki dişlilik ve patlıcan yaprağı görünümündeki belirtiler c) Yapraklarda klorotik halka lekeler, d) Yapraklardaki damar boyuncaki kırışıklıklar

Yapraklarda nekrotik, klorotik lekeler, delinmiş ve parçalanmış yapraklar gibi belirtiler ELISA testlerinde PNRSV ile enfekteli örnekler olarak saptanmıştır. PNRSV'nin kiraz ağaçlarında yol açtığı belirtiler Şekil 4.2. de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Kiraz ağaçlarında PNRSV'nin yol açtığı düşünülen belirtiler.
a)Yapraklarda saçma deliği belirtileri, b) Parçalanmış ve delinmiş yapraklar, c)
Yapraklarda klorotik halka lekeler, d) PNRSV+PDV karışık enfeksiyon sonucu
oluşan yapraklardaki farklı şekil bozuklukları

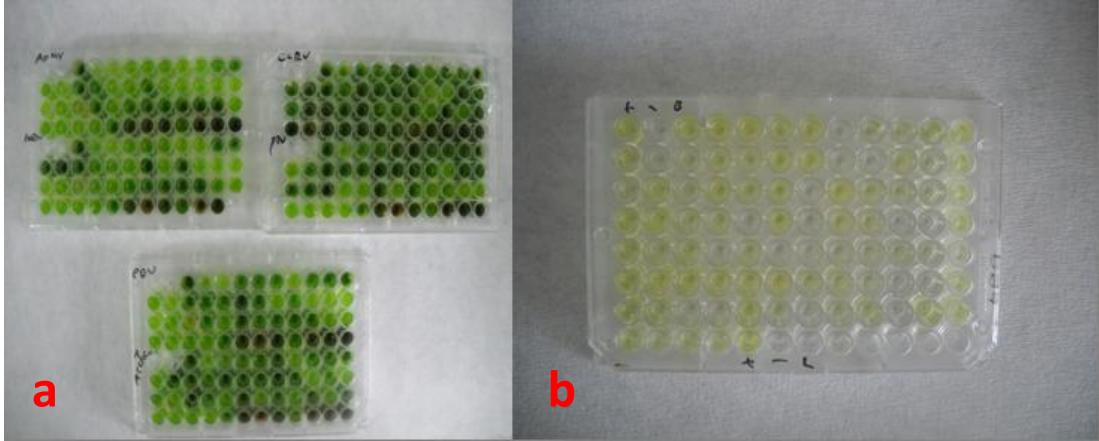
ACLSV ile enfekteli ağaçlarda belirgin simptomlar görülmezken, ACLSV ancak PDV ve PNRSV ile karışık enfeksiyon halindeyken belirtiler oluşturmuştur. ACLSV'nin kiraz ağaçlarında yol açtığı belirtiler Şekil 4.3. de gösterilmektedir.



Şekil 4.3. Kiraz ağaçlarında ACLSV'nin yol açtığı düşünülen belirtiler.
a) ACLSV+PDV karışık enfeksiyon sonucu oluşan yapraklardaki şekil bozuklukları,
b) ACLSV+PDV karışık enfeksiyon sonucu oluşan kırısklık ve dişlilik

4.2. ELISA Testi

ELISA testinde kullanılmak üzere araziden laboratuvara getirilen örnekler 4°C’de bekletilmiş ve 3 gün içerisinde ELISA testi uygulanmıştır. Toplanan tüm örneklerle; ApMV, ACLSV, CLRV, PPV, PDV ve PNRSV virüslerinin varlığını saptamak amacıyla “Double Antibody Sandwich-ELISA” (DAS-ELISA) yöntemi uygulanmıştır. Yapılan ELISA testlerinde BIOREBA (İsviçre) firmasından temin edilen poliklonal antiserum içeren ELISA kitleri kullanılmıştır. Her virüs için firmanın protokolünde belirtilmiş olduğu yöntem dikkate alınarak standart ELISA testi yapılmıştır. ELISA testi sonunda substratın eklenmesinden 1 saat sonra 405 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri, sağlıklı kontrol değerinin en az iki katı ve daha yukarı okuma değeri veren örnekler pozitif, renk oluşturarak negatiften belirgin farklılık gösteren ancak negatif kontrollerin 2 katına ulaşmayanlar ise şüpheli olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.4. Yapılan ELISA testleri
a) Antijen yüklenmiş platler, b) Sarı renk oluşturan pozitif örnekler

Toplam 142 bahçeden alınan 521 örneğin tamamı DAS-ELISA ile her bir virüse spesifik antikorlar ile ayrı ayrı test edilmiştir. Yapılan ELISA testleri sonucunda test edilen 521 örnekten 349 tanesinin bir veya birkaç virüsle bulaşık olduğu belirlenmiştir. ELISA sonucunda tüm bölgelerde PDV varlığı saptanırken, PPV ve CLRV ise hiçbir bölge ve örnekte tespit edilememiştir. 269 pozitif örnekle kirazda

en yaygın bulunan virüs PDV olurken bunu 36 pozitif örnekle PDV+ACLSV karışık enfeksiyonları ve 23 örnekle de tek başına ACLSV takip etmiştir. ACLSV sadece Gönen ve Gelendost ilçelerinde bulunmazken diğer ilçelerin tümünde tek başına veya karışık enfeksiyon şeklinde bulunduğu belirlenmiştir. ApMV tek başına hiçbir örnekte enfeksiyon oluşturmazken Uluborlu'da 1 örnekte PDV+ApMV, Isparta Merkez'de 2 örnekte ApMV+PNRSV+PDV karışık enfeksiyon şeklinde toplam 3 örnekte bulunmuştur. Uluborlu ilçesi 117 enfekteli örnek ile virüslerin en yoğun bulunduğu ve tespit edilen tüm virüslerin bulunduğu tek ilçe olmuştur. Yalvaç ilçesi 2 PDV ve 1 ACLSV enfekteli örneği ile toplamda en az virüse sahip olurken, Gelendost sadece PDV enfekteli 6 örnek ile en az virüs türünün bulunduğu ilçe olarak tespit edilmiştir. Toplanarak test edilen örneklerin enfeksiyon oranları incelendiğinde farklı ilçelerde test edilen örneklerin %66.9 oranında bir veya birkaç virüsle enfekteli olduğu bulunmuştur. İlçeler bazında enfeksiyon oranlarına bakıldığında 10 ilçenin 9'unun %50'nin üzerinde olduğu görülmüştür. Uluborlu ilçesi %75.6 oranıyla en yüksek virüs oranının bulunduğu ilçe olurken bunu %73.8 oranı ile Isparta-Merkez izlemiştir. Yalvaç ilçesi %30.0 ile virüs enfeksiyon oranının en az olduğu ilçe olarak belirlenmiştir. Virüslere göre enfeksiyon oranlarına bakıldığında ise PDV %51.6 oranı ile en yüksek enfeksiyonun bulunduğu virüs olurken bunu %6.9 ile PDV+ACLSV karışık enfeksiyonları takip etmiştir. ACLSV, PDV+PNRSV, PNRSV, ACLSV+PNRSV, ApMV+PNRSV+PDV ve PDV+ApMV'ye ait enfeksiyon oranları sırası ile %4.41, %1.5, %1.3, %0.5, %0.4 ve %0.2 olarak belirlenmiştir. ELISA testi sonuçları ayrıntılı olarak Çizelge 4.1. de gösterilmiştir.

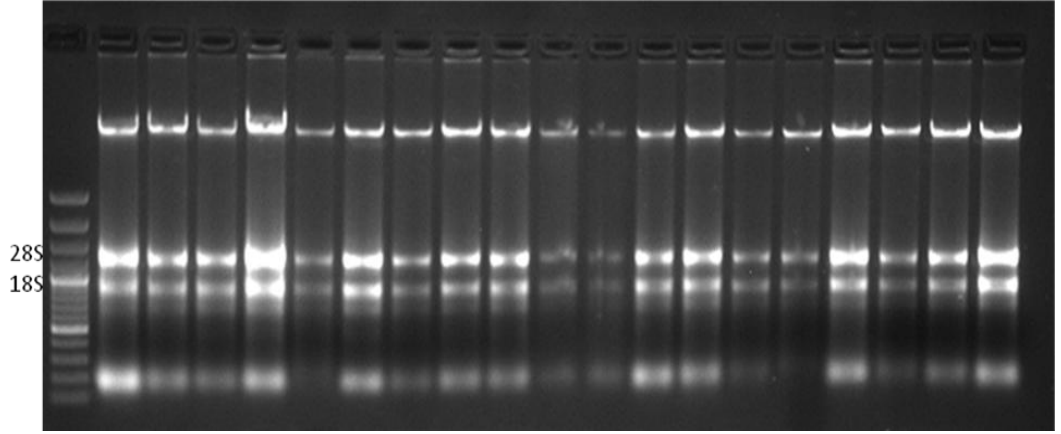
Çizelge 4.1. DAS-ELISA testi sonuçları

İlçe	ÖRNEK SAYISI			BELİRLENEN VİRÜSLER									
	Bahçe sayısı	Test edilen	Sağlıklı	PDV	ACLSV	PNRSV	PDV + ACLSV	PDV + PNRSV	ACLSV + PNRSV	PDV + ApMV	ApMV + PNRSV + PDV	Toplam	Enfeksiyon oranı (%)
Uluborlu	44	160	39	96	6		17	1		1		121	75,6
Senirkent	39	166	59	99	3	1	3	1				107	64,4
Merkez	16	42	11	18	2	1	5	3			2	31	73,8
Atabey	20	48	16	22	5		5					32	66,6
Gönen	6	15	7	6				2				8	53,3
Yalvaç	3	10	7	2	1							3	30,0
Gelendost	2	10	4	6								6	60,0
Şarkıkaraağaç	4	27	12	5	5		5					15	55,5
Keçiborlu	4	20	8	10	1		1					12	60,0
Eğirdir	4	23	9	5		5		1	3			14	60,8
Toplam	142	521	172	269	23	7	36	8	3	1	2	349	66,9
Enfeksiyon oranı (%)				51,6	4,41	1,3	6,9	1,5	0,5	0,2	0,4	66,9	

4.3. Total RNA İzolasyonu

Bu çalışmada araştırılan virüsler RNA virüsü olduğundan dolayı kılıf protein geninin RT-PCR yöntemiyle çoğaltılması için öncelikle ELISA sonuçlarında pozitif veya şüpheli örneklerden seçilenlerin bir kısmına total RNA izolasyonu yapılmıştır. Nükleik asit izolasyonu için Bio-Basic (Kanada) firması tarafından geliştirilen tek aşamalı One Step-RNA izolasyon yöntemi, CTAB nükleik asit izolasyon yöntemi ve Qiagen RNeasy Plant Mini Kit kullanılarak seçilen örneklerle 3 farklı metod uygulanarak en uygun yöntem belirlenmiştir.

Farklı yöntemlerle elde edilen toplam RNA'ların niteliğini belirlemek amacıyla RNA'ların 5µl'si %1 agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak görüntülenmiştir. CTAB nükleik asit izolasyon yöntemi ve Qiagen RNeasy Plant Mini Kit ile elde ayrıştırılan total RNA'lar incelendiğinde 28S ve 18S ribozomal RNA'larının belirgin bantlar oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.5.). Bu örneklerden başarılı bir şekilde toplam RNA izolasyonunun yapıldığı ve elde edilen RNA'ların parçalanmadığını göstermiştir. One Step-RNA izolasyon yöntemi ile total RNA'lar incelendiğinde ise 28S ve 18S ribozomal RNA'larının bantlar oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Bu yöntemde elde edilen total RNA'larla RT-PCR yapıldığında da örneklerin çalışmadığı görülmüştür. Bu nedenle geriye kalan örneklerde CTAB total nükleik asit yöntemi kullanılmıştır. -80°C de dondurularak saklanan ve 4°C'de kurutularak saklanan örnekler her iki izolasyon yönteminde de kullanılmış ve örnekleri saklama koşulları arasında total RNA'ların elde edilmesinde herhangi bir farkın olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar enfekteli bitki dokularından izole edilen total RNA'ların bitki RNA'ları yanında hedeflenen virüslere ait genomik ve subgenomik RNA'ları da içerdiğini ve bu virüslerin kılıf protein geninin çoğaltılmasında kullanılabileceğini göstermiştir.

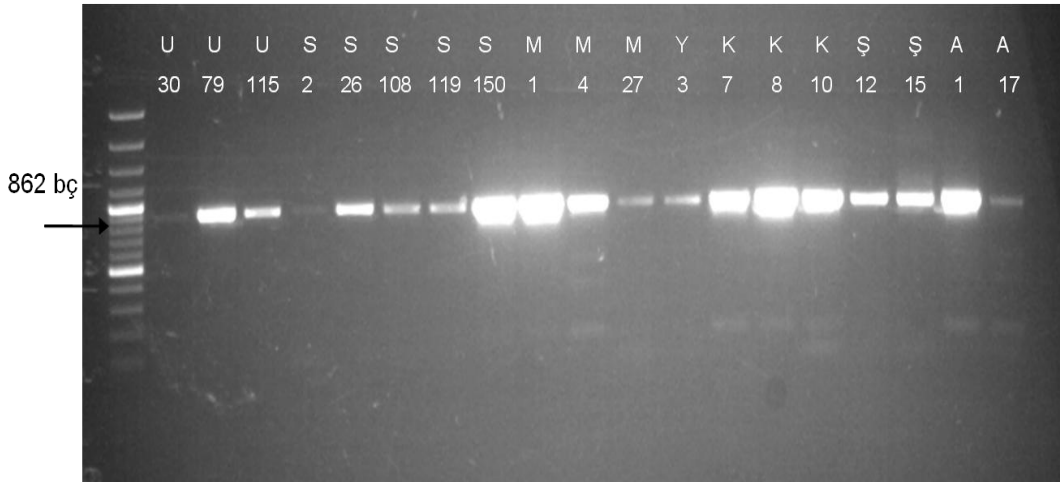


Şekil 4.5.İsparta ili kiraz üretim alanlarından elde edilen örneklerin 28S ve 18S ribozomal RNA'larına ait agaroz jel fotoğrafı

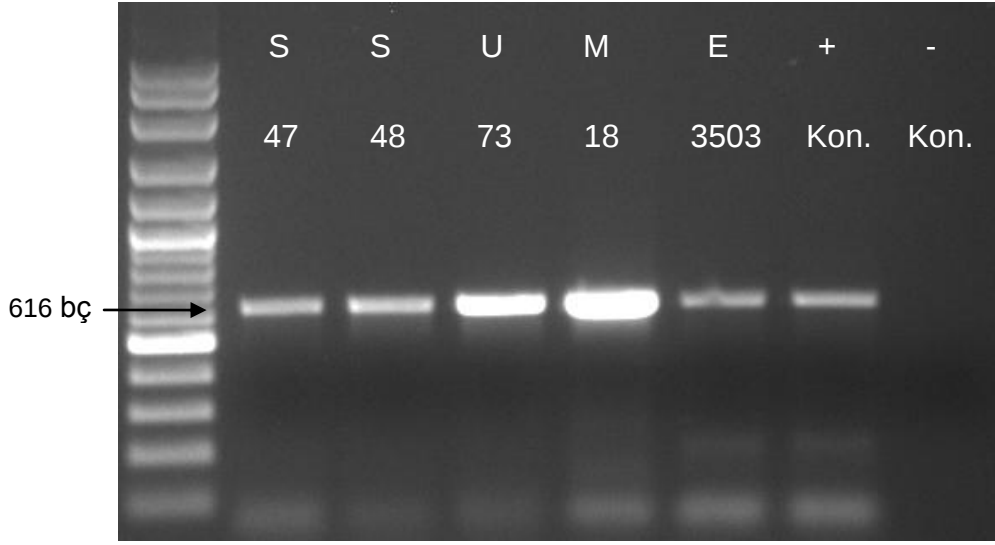
4.4. Tersine Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Total RNA izolasyonu sonucu elde edilen RNA'lardan iki aşamalı tersine transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi kullanılarak önce random primer ile tamamlayıcı (komplementer) DNA (cDNA) sentezlenmiştir. Daha sonra CP geni içeren korunmuş bölgelere spesifik PDV1-PDV2, PNRSV1-PNRSV2, ACLSV1-ACLSV2, PPV1-PPV2, CLRV1-CLRV2 ve ApMV1-ApMV2 primerleri kullanılarak Isparta ilinin farklı kiraz üretim bölgelerinden elde edilen DAS-ELISA sonucu pozitif sonuç veren veya şüpheli bulunan örneklerin bir kısmı seçilerek hedeflenen PPV, PNRSV, ApMV, ACLSV, CLRV ve PDV'nin tüm veya kısmi CP genleri RT-PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. RT-PCR sonucunda elde edilen PCR ürünlerinin bir kısmı 100 bç plus DNA büyüklük markörüyle birlikte %1'lik agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak analiz edilmiştir. PDV için yapılan RT-PCR analizleri sonucunda ELISA sonunda enfekteli bulunan 22 örnekten yaklaşık 862 bç büyüklüğünde CP genini içeren bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.6.). Buna karşın negatif kontrol olarak kullanılan su ve sağlıklı bitkilerde herhangi bir bant elde edilmemiştir. Ayrıca PNRSV'nin RNA3'ünün CP bölgesinden ELISA sonunda enfekteli bulunan 5 örnekten yaklaşık 616 bç büyüklüğünde bir parçayı çoğaltan PNRSV1-PNRSV2 primerleri kullanılarak RT-PCR yöntemiyle test edilen tüm örneklerde beklenen büyüklükte 616 bç uzunluğunda spesifik DNA bandı

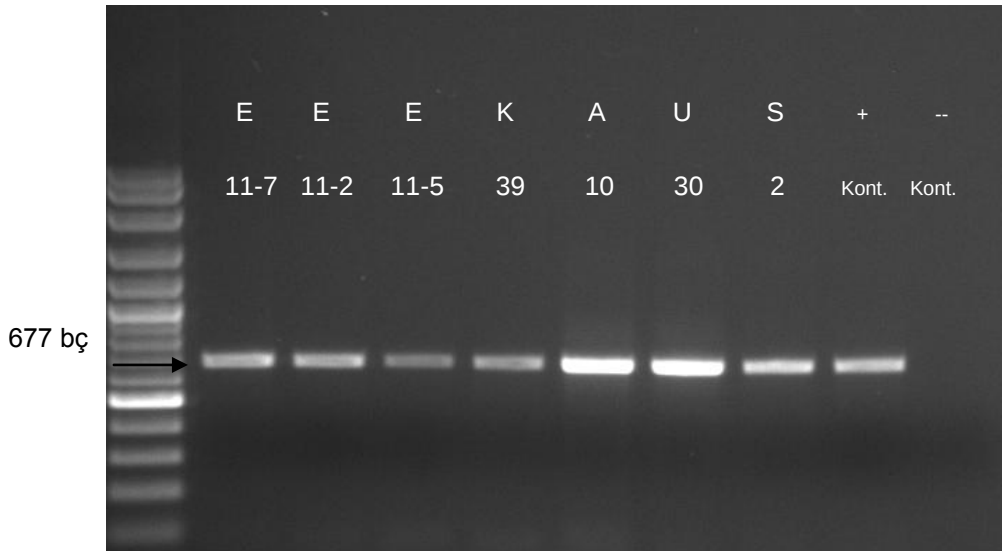
çoğaltılmıştır (Şekil 4.7.). Pozitif kontrolde beklenen spesifik band dışında herhangi bir band oluşmamış ve ayrıca sağlıklı bitkiden elde edilen RNA ile sadece sudan oluşan negatif kontrollerde herhangi bir bant oluşumu görülmemiştir. ACLSV için yapılan RT-PCR testinde ACLSV1-ACLSV2 primerleriyle ELISA sonunda enfekteli bulunan 7 örnekten 677 bç büyüklüğünde CP geninin tamamını ve 3' UTR bölgesini kapsamayan bir DNA çoğaltılarak istenen bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.8.). Farklı virüs izolatlarından çoğaltılan bantların yoğunluklarında bazı farklılıklar gözlenmiş, bunun nedeninin total RNA izolasyonunda kullanılan enfekteli dokularda bulunan virüs miktarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Enfekteli dokulardan elde edilen RNA'larda PDV, PNRSV ve ACLSV için beklenen büyüklüklerde bantların elde edilmesi kiraz örneklerinden PDV, PNRSV ve ACLSV kılıf protein genlerinin spesifik olarak çoğaltıldığını göstermiştir. Ayrıca ELISA'da pozitif ve şüpheli olarak bulunan 3 ApMV izolatına yapılan RT-PCR sonucunda hiçbir örnekte ApMV'ye ait CP geni çoğaltılamamıştır. Benzer şekilde ELISA'da şüpheli bulunan 4 PPV ve 3 CLRV izolatına uygulanan RT-PCR sonucunda hiçbir örnekte pozitif sonuç elde edilememiştir. Bu sonuçlar Isparta ili kiraz üretim alanlarında ApMV, PPV ve CLRV'nin bulunmadığını göstermiştir.



Şekil 4.6. Isparta ili kiraz üretim alanlarından elde edilen örneklerden PDV'ye ait yaklaşık 862 bç uzunluğundaki kılıf protein geninin çoğaltıldığını gösteren jel fotoğrafı



Şekil 4.7. Isparta ili kiraz üretim alanlarından elde edilen örneklerden PNRSV'ye ait yaklaşık 616 bç uzunluğundaki kılıf protein geninin çoğaltıldığını gösteren jel fotoğrafı



Şekil 4.8. Isparta ili kiraz üretim alanlarından elde edilen örneklerden ACLSV'ye ait yaklaşık 677 bç uzunluğundaki kılıf protein geninin çoğaltıldığını gösteren jel fotoğrafı

4.5. Biyolojik İndeksleme

Isparta ilinin farklı kiraz üretim alanlarından toplanan ve RT-PCR yöntemiyle pozitif olduğu belirlenen PDV Merkez 1 izolatu PDV inokülasyon çalışması için, PNRSV Eğirdir 3503 izolatu PNRSV'nin ve ACLSV Eğirdir 11-5 izolatu ise ACLSV'nin otsu ve odunsu bitkilere inokülasyonu çalışmaları için kullanılmıştır.

4.5.1. Otsu indikatör bitkilerde biyolojik indeksleme

Kullanılan PNRSV ve ACLSV izolatları hiçbir otsu test bitkisinde herhangi bir semptom oluşturmamıştır. Buna karşın PDV Merkez 1 izolatu *Chenopodium amaranticolor*, *C. Quinoa* ve *Cucumis sativus* bitkilerinde hiçbir semptom oluşturmazken, *Nicotiana occidentalis* bitkisinde değişik semptomlar oluşturduğu gözlemlenmiştir. Test bitkilerinde virüsün oluşturduğu belirtilerin görülmesine kadar geçen sürenin 2-3 hafta arasında değiştiği gözlenmiştir. PDV Merkez 1 izolatu *N. occidentalis* bitkisinde yapraklarda küçülme, şekil bozukluğu, klorotik lezyonlar şeklinde belirtiler oluşturmuştur. *N. occidentalis*'de daha sonra yapılan RT-PCR testinde pozitif sonuç vermiş, negatif kontrollerde herhangi bulaşma olmadığı belirlenmiştir. Mekanik inokülasyon sonucu virüsün oluşturduğu semptomlar Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. Mekanik inokülasyon sonucu *Nicotiana occidentalis* test bitkisindeki PDV belirtileri.

a) Yapraklarda küçülme, b) Şekil bozukluğu, c) Klorotik lezyonlar, d) Sağlıklı bitki

4.5.2. Odunsu indikatör bitkilerde biyolojik indeksleme

Odunsu indikatör bitkilere göz aşısı ile yapılan inokülasyon işlemlerinde GF 305'e yapılan göz aşılarının hiç birisinin tutmadığı belirlenmiştir. Merkez 1 PDV izolatı Bing kiraz çeşidine yapılan inokülasyon çalışmalarında herhangi bir simptom oluşturmamış ve yapılan RT-PCR testinde de negatif sonuç vermiştir. Eğirdir 11-5 ACLSV izolatı ve Eğirdir 3503 PNRSV izolatı ise Bing kiraz çeşidine yapılan inokülasyon çalışmaları sonucunda Bing'de sürgün gelişimi çok zayıf olmuş, bu yüzden değerlendirmeler aşı yapılmış Eğirdir 11-5 ACLSV ve Eğirdir 3503 PNRSV izolatlarına göre yapılmıştır. Eğirdir 11-5 ACLSV izolatının yapraklarında damar aralarında sararma, kırışıklık ve yapraklarda dişlilik gibi belirtiler oluşturmuştur (Şekil 4.10.a,b). Aynı şekilde Eğirdir 3503 PNRSV izolatının yapraklarında belirgin

şekilde klorotik lekeler meydana getirdiği belirlenmiş (Şekil 4.10.c,d) ve ACLSV, PNRSV izolatlarından yapılan RT-PCR testinde de pozitif sonuç vermiştir.



Şekil 4.10. Mekanik inokulasyon sonucu oluşan virüs belirtileri
a) PNRSV'ye ait yapraklarda sararma ve kırıxıklık, b) PNRSV'ye ait yaprak kenarlarındaki dişlilik, şekil bozukluğu, c-d) ACLSV'ye ait klorotik lekeler

4.6. Kılıf Protein Genlerinin Saflaştırılması ve DNA Dizilemesi

Isparta ili kiraz üretim alanlarında elde edilen ELISA ve RT-PCR sonucunda enfekteli olduğu belirlenen örneklerden tekrar RT-PCR yapılarak çoğaltılan PDV, PNRSV ve ACLSV kılıf protein genlerini içeren DNA bantları saflaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Saflaştırma için PDV1-PDV2, PNRSV1-PNRSV2 ve ACLSV1-ACLSV2 primerleri kullanılarak, 22 PDV, 5 PNRSV ve 7 ACLSV izolatının kılıf protein genleri çoğaltılmıştır (Çizelge 4.2.). Saflaştırma işlemi sonucunda PDV için

862 bç, PNRSV için 616 bç ve ACLSV için 677 bç büyüklüğündeki bandlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.2. Isparta ili kiraz üretim alanlarından saflaştırma yapılan PDV, PNRSV ve ACLSV örnekleri

No	Virüs	İzolat Adı	Alınan Bölge
1	PDV	U-30	Uluborlu
2	PDV	U-79	Uluborlu
3	PDV	U-115	Uluborlu
4	PDV	S-2	Senirkent
5	PDV	S-26	Senirkent
6	PDV	S-108	Senirkent
7	PDV	S-119	Senirkent
8	PDV	S-150	Senirkent
9	PDV	M-1	Merkez
10	PDV	M-4	Merkez
11	PDV	M-27	Merkez
12	PDV	K-7	Keçiborlu
13	PDV	K-8	Keçiborlu
14	PDV	K-10	Keçiborlu
15	PDV	A-1	Atabey
16	PDV	A17	Atabey
17	PDV	Gö-1	Gönen
18	PDV	Gö-9	Gönen
19	PDV	Ş-12	Şarkıkaraağaç
20	PDV	Ş-15	Şarkıkaraağaç
21	PDV	G-1	Gelendost
22	PDV	Y-3	Yalvaç
1	ACLSV	E-11-2	Eğirdir
2	ACLSV	E-11-5	Eğirdir
3	ACLSV	E-11-7	Eğirdir
4	ACLSV	K-10	Keçiborlu
5	ACLSV	A-39	Atabey
6	ACLSV	U-30	Uluborlu
7	ACLSV	S-2	Senirkent
1	PNRSV	S-47	Senirkent
2	PNRSV	S-48	Senirkent
3	PNRSV	U-73	Uluborlu
4	PNRSV	M-18	Merkez
5	PNRSV	E-3503	Eğirdir

Saflaştırılan PDV, PNRSV ve ACLSV kılıf protein genini taşıdığı kesin olarak belirlenen PCR ürünleri DNA dizilimi belirlenmesi amacıyla Refgen Biyoteknoloji (Ankara) firmasına gönderilmiştir. PDV, PNRSV ve ACLSV kılıf protein genlerini içeren PCR ürünlerinin DNA dizilimi PDV1-PDV2, PNRSV1-PNRSV2 ve ACLSV1-ACLSV2 primerleri kullanılarak iki yönlü olarak döngü dizileme yöntemiyle otomatik DNA dizileme cihazıyla yapılmıştır. Elde edilen DNA dizileri Vector NTI (Invitrogen, ABD) dizi analiz programlarında incelenmiştir. Dizileme sonucunda her iki yönde diziler elde edilmiştir. Her bir izolat için her iki yönde elde edilen diziler karşılaştırılıp birleştirilerek izolatın dizilimi tespit edilmiştir. Her bir virüs için çoğaltılan DNA uzunluklarına yakın DNA dizileri elde edilmiştir. Dizileme sonucunda PDV için 750-800, ACLSV ve PNRSV için ise 550-600 bp uzunluğunda diziler elde edilmiştir.

4.7. Kılıf Protein Genlerinin Dizi Analizi

4.7.1. Nükleotid dizi analizleri

4.7.1.1. *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) nükleotid dizi analizi

Isparta ilinde kiraz üretiminin yaygın olarak yapıldığı kiraz bahçelerinden alınan ACLSV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimleri kendi aralarında karşılaştırıldığında, izolatların CP genleri arasında %95-100 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.3.). En çok benzerlik %100'lük oranla Eğirdir izolatlarından Eğirdir 11-2, 11-5 ve 11-7 izolatları arasında olduğu tespit edilmiştir.

Kılıf protein geni nükleotid dizi karşılaştırmasına göre tüm izolatlar arasında en çok farklılığın Atabey'den alınan Atabey 39 izolatı ile Keçiborlu 10, Senirkent 2 ve Uluborlu 30 izolatları arasında olduğu belirlenmiştir. Atabey 39 izolatı bu izolatlar ile %95 oranında benzerlik göstererek en çok farklığa sahip izolat olmuştur.

Çizelge 4.3. Isparta ili'ne ait kiraz bahçelerinden toplanan ACLSV izolatlarının nükleotid dizilerinin benzerlik oranları

	Eğirdir 11-2	Eğirdir 11-5	Eğirdir 11-7	Keçiborlu 10	Senirkent 2	Uluborlu 30
Atabey 39	96	96	96	95	95	95
Eğirdir 11-2		100	100	96	96	97
Eğirdir 11-5			100	96	96	97
Eğirdir 11-7				96	96	97
Keçiborlu 10					96	97
Senirkent 2						97

Gen bankası veritabanlarında dünyanın farklı sert ve yumuşak çekirdekli meyve üretim bölgelerinden elde edilen 18 ACLSV protein geninin nükleotid dizilimleri alınarak Isparta ilinin farklı ilçelerinden elde edilen ACLSV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimiyle karşılaştırarak benzerlik oranları belirlenmiştir. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda Isparta ili ACLSV izolatlarının dünya izolatlarıyla %80-98 arasında değişen oranlarla benzerlik gösterdikleri ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada kullanılan 7 ACLSV izolatı ile dünyada bulunan 18 farklı ACLSV izolatı arasındaki benzerlik oranları Çizelge 4.4'te gösterilmiştir. Çizelge yakından incelendiğinde nükleotid dizi benzerliği bakımından ülkemiz izolatlarıyla en çok benzerlik gösteren izolatın % 98'lik oranla Yunanistan'dan FN391006 kiraz izolatı olduğu belirlenmiştir. Yunanistan izolatı Eğirdir 11-2, 11-5, 11-7 izolatlarıyla %98 oranında benzerlik gösterirken, Bulgaristan DQ32916 kiraz izolatı %97 oranla Isparta izolatlarıyla en fazla benzerliğe sahip ikinci izolat olmuştur. İspanya'dan AJ586629 kayısı izolatı, ülkemiz izolatlarından Eğirdir 11-2, 11-5, 11-7, Uluborlu 30, Atabey 3 ve Senirkent 2 ile %80'lik oranla en az benzerliğe sahip olan izotlar olarak belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen çoklu dizi karşılaştırmaları Şekil 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Isparta ilindeki ACLSV izolatları ile dünyadaki bazı ACLSV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimlerinin karşılaştırılması

	DQ329161 Bulgaristan-Şeftali	DQ329162 Bulgaristan-Elma	FJ952167 Türkiye-Elma	FJ952168 Çek Cumhuriyeti -Elma	FN386788 Yunanistan-Armut	AJ586629 İspanya-Kayısı	AJ586630 İtalya Kayısı	AJ586644 İtalya-Şeftali	AJ586649 Lübnan-Şeftali	GQ334208 Çin-Armut	FJ608984 Çin-Armut	AM498044 Hindistan-Kiraz	FJ952171 Ukranya-Elma	DQ329160 Bulgaristan Kiraz	Egirdir 11-2	Egirdir 11-5	Egirdir 11-7	FN391006 Yunanistan-Kiraz	Keçiborlu-10	Uluborlu-30	FJ952174 Sırbistan-Elma	GQ334192 Kanada-Elma	Atabey 39	Senirkent 2
AJ586628 İtalya-Badem	88	87	90	88	88	84	86	85	85	85	84	81	80	82	82	82	82	82	82	82	82	80	81	81
DQ329161 Bulgaristan-Şeftali		91	93	91	90	84	88	85	86	86	86	87	85	86	86	86	86	86	86	85	87	82	87	86
DQ329162 Bulgaristan-Elma			92	93	89	86	88	86	86	87	86	84	83	85	86	86	86	85	86	84	86	81	85	84
FJ952167 Türkiye-Elma				96	91	86	88	87	87	87	87	84	83	84	84	84	84	85	85	84	87	82	84	84
FJ952168 Çek Cum.-Elma					91	87	89	87	86	86	86	83	83	84	85	85	85	85	86	84	86	81	84	84
FN386788 Yunanistan-Armut						85	87	86	87	87	88	83	82	83	82	82	82	84	84	82	85	84	83	84
AJ586629 İspanya-Kayısı							85	83	85	85	85	79	79	81	80	80	80	81	82	80	81	80	80	80
AJ586630 İtalya-Kayısı								85	88	87	87	84	83	85	84	85	85	85	84	84	83	82	85	84
AJ586644 İtalya-Seftali									88	89	88	80	81	82	81	81	81	82	82	81	83	80	81	81
AJ586649 Lübnan-Seftali										98	95	84	83	85	84	84	84	85	84	84	85	84	84	84
GQ334208 Çin-Armut											94	84	84	84	84	84	84	84	84	84	86	85	84	83
FJ608984 Çin-Armut												82	83	84	82	82	82	83	82	82	84	83	83	82
AM498044 Hindistan-Kiraz													92	92	92	92	92	92	92	92	91	85	92	93
FJ952171 Ukranya-Elma														91	91	91	91	91	91	90	92	86	92	91
DQ329160 Bulgaristan-Kiraz															97	97	97	97	95	95	90	85	97	94
Egirdir 11-2																100	100	98	96	97	90	86	96	96
Egirdir 11-5																	100	98	96	97	90	86	96	96

Çizelge 4.4. (devam)

	DQ329161	Bulgaristan-Şeftali
Egirdir 11-7	DQ329162	Bulgaristan-Elma
FN391006 Yunanistan-Kiraz	FJ952167	Türkiye-Elma
Keçiborlu 10	FJ952168	Çek Cumhuriyeti -Elma
Uluborlu 30	FN386788	Yunanistan-Armut
FJ952174 Sırbistan-Elma	AJ586629	İspanya-Kayısı
GQ334192 Kanada-Elma	AJ586630	İtalya Kayısı
Atabey 39	AJ586644	İtalya-Şeftali
	AJ586649	Lübnan-Şeftali
	GQ334208	Çin-Armut
	FJ608984	Çin-Armut
	AM498044	Hindistan-Kiraz
	FJ952171	Ukranya-Elma
	DQ329160	Bulgaristan Kiraz
	Egirdir 11-2	
	Egirdir 11-5	
	Egirdir 11-7	
	FN391006	Yunanistan-Kiraz
	Keçiborlu-10	
	Uluborlu-30	
	FJ952174	Sırbistan-Elma
	GQ334192	Kanada-Elma
	Atabey 39	
	Senirkent 2	

		1	75
AJ586628 Italya-Badem	(1)	TCGAGCAGAGAGATTCTGAATCTAGTGTGGAGTGAAGTCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
DQ329161 Bulgaristan-Seftali	(1)	TCGAGCAGAGAGATTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
DQ329162 Bulgaristan-Elma	(1)	TCAGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
FJ952167 Türkiye-Elma	(1)	TCGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
FJ952168 Çek Cumh.-Elma	(1)	TCGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
FN386788 Yunanistan-Armut	(1)	TCAGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
AJ586629 Ispanya-Kayisi	(1)	TCAGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
AJ586630 Italya-Kayisi	(1)	TCGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
AJ586644 Italya-Seftali	(1)	TCAGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
AJ586649 Lübnan-Seftali	(1)	TCGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
GQ334208 Çin-Armut	(1)	TCGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
FJ608984 Çin-Armut	(1)	TCAGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
AM498044 Hindistan-Kiraz	(1)	TCGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
FJ952171 Ukranya-Elma	(1)	TCGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
DQ329160 Bulgaristan-Kiraz	(1)	TCAGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
Egirdir 11-2	(1)	TCGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
Egirdir 11-5	(1)	TCGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
Egirdir 11-7	(1)	TCGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
FN391006 Yunanistan-Kiraz	(1)	TCGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
Keçiborlu 10	(1)	TCGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
Uluborlu 30	(1)	TCGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
FJ952174 Sirbistan-Elma	(1)	TCGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
GQ334192 Kanada-Elma	(1)	TCGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
Atabey 39	(1)	TCGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
Senirkent 2	(1)	TCGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
Consensus	(1)	TCGGAGCAGAGGAGTTCTGGATCTAGTGTGGAGTGAATCAATGGAGGATCAAGAGTTATCGGGCTCTA	
		76	150
AJ586628 Italya-Badem	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
DQ329161 Bulgaristan-Seftali	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
DQ329162 Bulgaristan-Elma	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
FJ952167 Türkiye-Elma	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
FJ952168 Çek Cumh.-Elma	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
FN386788 Yunanistan-Armut	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
AJ586629 Ispanya-Kayisi	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
AJ586630 Italya-Kayisi	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
AJ586644 Italya-Seftali	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
AJ586649 Lübnan-Seftali	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
GQ334208 Çin-Armut	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
FJ608984 Çin-Armut	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
AM498044 Hindistan-Kiraz	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
FJ952171 Ukranya-Elma	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
DQ329160 Bulgaristan-Kiraz	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
Egirdir 11-2	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
Egirdir 11-5	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
Egirdir 11-7	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
FN391006 Yunanistan-Kiraz	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
Keçiborlu 10	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
Uluborlu 30	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
FJ952174 Sirbistan-Elma	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
GQ334192 Kanada-Elma	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
Atabey 39	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
Senirkent 2	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
Consensus	(76)	AATCTGAAGAGGAGTGTCAACATGATCAAGCTTCAAGACTACCTCTTCGATCCGAAATCAAGCATGAGT	
		151	225
AJ586628 Italya-Badem	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
DQ329161 Bulgaristan-Seftali	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
DQ329162 Bulgaristan-Elma	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
FJ952167 Türkiye-Elma	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
FJ952168 Çek Cumh.-Elma	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
FN386788 Yunanistan-Armut	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
AJ586629 Ispanya-Kayisi	(151)	CTTGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
AJ586630 Italya-Kayisi	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
AJ586644 Italya-Seftali	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
AJ586649 Lübnan-Seftali	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
GQ334208 Çin-Armut	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
FJ608984 Çin-Armut	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
AM498044 Hindistan-Kiraz	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
FJ952171 Ukranya-Elma	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
DQ329160 Bulgaristan-Kiraz	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
Egirdir 11-2	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
Egirdir 11-5	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
Egirdir 11-7	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
FN391006 Yunanistan-Kiraz	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
Keçiborlu 10	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
Uluborlu 30	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
FJ952174 Sirbistan-Elma	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
GQ334192 Kanada-Elma	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
Atabey 39	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
Senirkent 2	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
Consensus	(151)	TCGGTCAATATCCAGAGCTTTCGACCGGAGCGAGGAAAGGGCTGGTCAAACTCAAGTTAAACGGGGT	
		TTCCGGCAGGT TGTGAGGC TTTCG CC GAGGCAAGAACGGGTGGT AAGTTGAAGTTAAAGGGGTTTC	

Şekil 4.11. ACLSV kılıf protein genine ait çoklu dizi karşılaştırması

		226	300
AJ586628 İtalya-Badem	(226)	ACTAATCTCTTCGTAACCATGCCGGAAGTGGGGSCAAATACCGGAATGATGTTTGAATTCATAAGGGTCTC	
DQ329161 Bulgaristan-Seftali	(226)	ACCAACCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGSCAAGTACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
DQ329162 Bulgaristan-Elma	(226)	ACCAACCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
FJ952167 Türkiye-Elma	(226)	ACTAATCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
FJ952168 Çek Cumh.-Elma	(226)	ACCAACCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
FN386788 Yunanistan-Armut	(226)	ACTAATCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
AJ586629 İspanya-Kayisi	(226)	ACGAATCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
AJ586630 İtalya-Kayisi	(226)	ACGAATCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
AJ586644 İtalya-Seftali	(226)	ACCAACCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
AJ586649 Lübnan-Seftali	(226)	ACGAATCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
GQ334208 Çin-Armut	(226)	ACGAATCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
FJ608984 Çin-Armut	(226)	ACTAATCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
AM498044 Hindistan-Kiraz	(226)	ACGAATCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
FJ952171 Ukranya-Elma	(226)	ACGAATCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
DQ329160 Bulgaristan-Kiraz	(226)	ACGAATCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
Egirdir 11-2	(226)	ACGAATCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
Egirdir 11-5	(226)	ACGAATCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
Egirdir 11-7	(226)	ACGAATCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
FN391006 Yunanistan-Kiraz	(226)	ACGAATCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
Keçiborlu 10	(226)	ACGAATCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
Uluborlu 30	(226)	ACGAATCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
FJ952174 Sırbistan-Elma	(226)	ACGAATCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
GQ334192 Kanada-Elma	(226)	ACGAATCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
Atabey 39	(226)	ACGAATCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
Senirkent 2	(226)	ACGAATCTCTTCATACCATGCCGGAAGTGGGAGTAAATACCGGAGGTGATGTTTGAATTCATAAAGGGCTT	
Consensus	(226)	ACGAACCT TTTTCTACCATGCCAGAGT GGAGG AATACCCGGAGT ATGTTTGATTTCAATAAAGGGCTG	375
AJ586628 İtalya-Badem	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
DQ329161 Bulgaristan-Seftali	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
DQ329162 Bulgaristan-Elma	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
FJ952167 Türkiye-Elma	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
FJ952168 Çek Cumh.-Elma	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
FN386788 Yunanistan-Armut	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
AJ586629 İspanya-Kayisi	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
AJ586630 İtalya-Kayisi	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
AJ586644 İtalya-Seftali	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
AJ586649 Lübnan-Seftali	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
GQ334208 Çin-Armut	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
FJ608984 Çin-Armut	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
AM498044 Hindistan-Kiraz	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
FJ952171 Ukranya-Elma	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
DQ329160 Bulgaristan-Kiraz	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
Egirdir 11-2	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
Egirdir 11-5	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
Egirdir 11-7	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
FN391006 Yunanistan-Kiraz	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
Keçiborlu 10	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
Uluborlu 30	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
FJ952174 Sırbistan-Elma	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
GQ334192 Kanada-Elma	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
Atabey 39	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
Senirkent 2	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	
Consensus	(301)	AACATGTTTATCATGAATAAGGCCACGCAAAAGGTCTAATTAATATGAATCGGCTCTTTTGCAAACTGATTT	431
AJ586628 İtalya-Badem	(376)	GCGAGAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
DQ329161 Bulgaristan-Seftali	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
DQ329162 Bulgaristan-Elma	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
FJ952167 Türkiye-Elma	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
FJ952168 Çek Cumh.-Elma	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
FN386788 Yunanistan-Armut	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
AJ586629 İspanya-Kayisi	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
AJ586630 İtalya-Kayisi	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
AJ586644 İtalya-Seftali	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
AJ586649 Lübnan-Seftali	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
GQ334208 Çin-Armut	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
FJ608984 Çin-Armut	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
AM498044 Hindistan-Kiraz	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
FJ952171 Ukranya-Elma	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
DQ329160 Bulgaristan-Kiraz	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
Egirdir 11-2	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
Egirdir 11-5	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
Egirdir 11-7	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
FN391006 Yunanistan-Kiraz	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
Keçiborlu 10	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
Uluborlu 30	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
FJ952174 Sırbistan-Elma	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
GQ334192 Kanada-Elma	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
Atabey 39	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
Senirkent 2	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	
Consensus	(376)	GCAAAAGTGAATGAGGCAAGATCTGTCCTTTGACTGACCTTTGCAATTTG	

Şekil 4.11. (devam)

4.7.1.2. *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV) nükleotid dizi analizi

Isparta ilinde kiraz üretiminin yaygın olarak yapıldığı kiraz bahçelerinden alınan PNRSV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimleri kendi aralarında karşılaştırıldığında, izolatların CP genleri arasında %94-100 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. En çok benzerlik %100'lük oranla Eğirdir 3503 ile Uluborlu 73 ve Senirkent 47 ile Senirkent 48 izolatı arasında olduğu belirlenmiştir. Kılıf protein geni nükleotid dizi karşılaştırmasına göre tüm izolatlar arasında en az benzerlik gösteren ise Eğirdir 3503 ile Merkez 18 izolatı arasında % 94 oranla meydana gelmiştir. Çalışmada kullanılan tüm izolatların birbirleriyle gösterdikleri nükleotid dizi benzerlikleri Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Isparta ili'ne ait kiraz bahçelerinden toplanan PNRSV izolatlarının nükleotid dizilerinin benzerlik oranları

	Uluborlu 73	Merkez 18	Senirkent 47	Senirkent 48
Eğirdir 3503	100	94	99	99
Uluborlu 73		95	99	99
Merkez 18			95	95
Senirkent 47				100

Gen bankası veritabanlarında dünyanın ve ülkemizin farklı sert ve yumuşak çekirdekli meyve üretim bölgelerinden bulunan 23 PNRSV protein geninin nükleotid dizilimleri alınarak Isparta ili'nin farklı ilçelerinden elde edilen PNRSV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimiyle karşılaştırarak benzerlik oranları belirlenmiştir. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda Isparta ili PNRSV izolatlarının dünya izolatlarıyla %86-99 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan 5 PNRSV izolatı ile ülkemizden 6 ve dünyadan da 17 farklı PNRSV izolatı arasındaki benzerlik oranları Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. Çizelge yakından incelendiğinde nükleotid dizi benzerliği bakımından en çok benzerlik gösteren izolatların Isparta'dan Senirkent 47 ve Senirkent 48 izolatlarının %99'lık oranla dünya izolatlarından DQ983491 Polanya kiraz, AF170166 Çekoslovakya vişne, AF170163 Çekoslovakya vişne, AF170165 Çekoslovakya kiraz, FJ231736 ABD kiraz, EF565251 Şili kiraz ve Türkiye

izolatlarından EF519311 Türkiye şeftali ile EF519306 Türkiye şeftali izolatları arasında ve Merkez 18 izolatının %99 oranla AF170157 Çekoslavya kiraz, DQ983494 Polanya kiraz izolatları arasında olduğu tespit edilmiştir. İtalya'dan AJ133210 kiraz izolatı ise Eğirdir 03 izolatı ile %86'lık oranla en az benzerliğe sahip olan izolat olarak belirlenmiştir. Elde edilen çoklu dizi karşılaştırmaları Şekil 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Isparta ili'ndeki PNRSV izolatları ile dünyadaki bazı PNRSV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimlerinin karşılaştırması

	Uluborlu 73	Senirkent 47	Egirdir O3	Merkez 18	AJ133206 Tunus-Şeftali	AF170157 ÇekoslavaK.-Kiraz	AJ133210 İtalya-Kiraz	DQ983494 Polanya-Kiraz	FJ231737 ABD-Visne	EF519309 Türkiye-Erik	EF519310 Türkiye-Visne	AJ133209 İtalya-Kiraz	AJ133203 İtalya-Kiraz	AJ133208 İspanya Nektarin	EF519307 Türkiye-Şeftali	DQ983491 Polanya-Kiraz	EF519306 Türkiye-Şeftali	EF519308 Türkiye-Şeftali	EU368738 Macaristan-Vine	AF170166 ÇekoslavaK.-Vişne	FJ231736 ABD-Kiraz	FR773524 Hindistan-Kiraz	EF519311 Türkiye-Şeftali	AF170163 ÇekoslavaK.-Visne	AF170165 ÇekoslavaK.-Kiraz	EF565251 Şili-Kiraz	HQ833193 Çin-Kiraz
Senirkent 48	99	100	99	95	95	95	87	95	96	95	94	98	97	98	98	99	99	98	98	99	99	98	99	99	99	99	98
Uluborlu 73		99	100	95	95	94	87	95	96	94	94	97	96	98	98	98	98	98	98	98	98	98	99	99	99	98	98
Senirkent 47			99	95	95	95	87	95	96	95	94	98	97	98	98	99	99	98	98	99	99	98	99	99	99	99	98
Egirdir O3				94	94	94	86	94	96	94	94	97	96	98	97	98	98	98	98	98	98	97	98	98	98	98	98
Merkez 18					98	99	87	99	95	93	93	95	94	95	95	95	95	95	95	95	95	95	96	96	96	95	95
AJ133206 Tunus-Şeftali						99	88	99	96	94	94	95	94	95	95	96	96	95	95	95	95	95	96	96	96	96	95
AF170157 Çek Cumh.-Kiraz							87	99	96	93	93	95	94	95	95	95	95	95	95	95	95	94	96	95	95	95	95
AJ133210 İtalya-Kiraz								87	89	86	86	88	87	87	86	87	87	87	87	86	86	86	87	87	87	87	86
DQ983494 Polanya-Kiraz									96	93	93	95	94	95	95	96	95	95	95	95	95	95	96	96	96	95	95
FJ231737 ABD-Visne										94	94	96	95	96	96	97	97	96	96	96	96	96	97	97	97	96	96
EF519309 Türkiye-Erik											100	94	93	95	94	95	95	95	95	94	95	94	95	95	95	95	95

Çizelge 4.6. (devam)

	Uluborlu 73	Senirkent 47	Egirdir O3	Merkez 18	AJ133206 Tunus-Şeftali	AF170157 Çekoslavak.-Kiraz	AJ133210 İtalya-Kiraz	DQ983494 Polanya-Kiraz	FJ231737 ABD-Visne	EF519309 Türkiye-Erik	EF519310 Türkiye-Visne	AJ133209 İtalya-Kiraz	AJ133203 İtalya-Kiraz	AJ133208 İspanya Nektarin	EF519307 Türkiye-Şeftali	DQ983491 Polanya-Kiraz	EF519306 Türkiye-Şeftali	EF519308 Türkiye-Şeftali	EU368738 Macaristan-Vine	AF170166 ÇekoslavaK.- Vişne	FJ231736 ABD-Kiraz	FR773524 Hindistan-Kiraz	EF519311 Türkiye-Şeftali	AF170163 Çekoslavak.-Visne	AF170165 Çekoslavak.-Kiraz	EF565251 Şili-Kiraz	HQ833193 Çin-Kiraz
EF519310 Türkiye-Visne												94	93	94	94	95	95	94	94	94	95	94	95	95	95	94	94
AJ133209 İtalya-Kiraz													96	97	97	98	97	97	97	98	97	97	98	98	98	97	97
AJ133203 İtalya-Kiraz														97	97	98	98	97	97	97	97	97	98	98	98	97	97
AJ133208 İspanya-Nektarin															100	99	99	98	98	98	99	98	99	99	99	99	98
EF519307 Türkiye-Şeftali																99	99	98	98	98	98	98	99	99	99	98	98
DQ983491 Polanya-Kiraz																	100	99	99	99	99	99	100	100	100	99	99
EF519306 Türkiye-Şeftali																		99	99	99	99	98	99	99	99	99	99
EF519308 Türkiye-Şeftali																			99	98	99	98	99	99	99	99	98
EU368738 Macaristan-Visne																				98	99	98	99	99	99	99	98
AF170166 Çek Cumh.-Visne																					99	99	99	99	99	99	98
FJ231736 ABD-Kiraz																						99	99	99	99	99	99

Çizelge 4.6. (devam)

[illegible]

		526	541
Senirkent 48	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
Uluborlu 73	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
Senirkent 47	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
Egirdir 03	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
Merkez 18	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
AJ133206 Tunus-Seftali	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
AF170157 Çek Cumh.-Kiraz	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
AJ133210 İtalya-Kiraz	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
DQ983494 Polanya-Kiraz	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
FJ231737 ABD-Visne	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
EF519309 Türkiye-Erik	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
EF519310 Türkiye-Visne	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
AJ133209 İtalya-Kiraz	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
AJ133203 İtalya-Kiraz	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
AJ133208 İspanya-Nektarin	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
EF519307 Türkiye-Seftali	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
DQ983491 Polanya-Kiraz	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
EF519306 Türkiye-Seftali	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
EF519308 Türkiye-Seftali	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
EU368738 Macaristan-Visne	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
AF170166 Çek Cumh.-Visne	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
FJ231736 ABD-Kiraz	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
FR773524 Hindistan-Kiraz	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
EF519311 Türkiye-Seftali	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
AF170163 Çek Cumh.-Visne	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
AF170165 Çek Cumh.-Kiraz	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
EF565251 Sili-Kiraz	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
HQ833193 Cin-Kiraz	(526)	CGATGAGACCTGCTT	
Consensus	(526)	CGATGAAGACCTGCTT	

Şekil 4.12. (devam)

4.7.1.3. *Prune dwarf virus* (PDV) nükleotid dizi analizi

Isparta ilinde kiraz üretiminin yaygın olarak yapıldığı kiraz bahçelerinden alınan PDV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimleri kendi aralarında karşılaştırıldığında, izolatların CP genleri arasında %84-100 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. En çok benzerlik %100'  k oranla Gönen 1 ile Keçiborlu 10 izolatu arasında tespit edilmiştir. Kılıf protein geni nükleotid dizi karşılaştırmasına göre tüm izolatlar arasında en çok farklılık gösteren ise Atabey 17 ile Merkez 4 izolatu arasında olduğu belirlenmiştir. Benzerlik %84 oranının da meydana gelmiştir. Çalışmada kullanılan tüm izolatların birbirleriyle gösterdikleri nükleotid dizi benzerlikleri  izelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Isparta ili'ne ait kiraz bahçelerinden toplanan PDV izolatlarının nükleotid dizilerinin benzerlik oranları

	Atabey 1	Keçiborlu 10	Gönen 1	Senirkent 26	Senirkent 2	Merkez 1	Yalvaç 3	Merkez 4	Senirkent 108	Sarkikaraağaç 15	Keçiborlu 7	Gönen 9	Gelendost 1	Keçiborlu 8	Merkez 27	Senirkent 150	Sarkikaraağaç 12	Uluborlu 79	Uluborlu 79	Senirkent 119	Uluborlu 30
Atabey 17	90	90	90	90	90	90	86	84	85	88	91	90	89	88	91	91	92	90	91	88	87
Atabey 1		99	99	98	98	91	89	87	89	91	94	93	92	91	94	94	95	93	94	91	90
Keçiborlu 10			100	99	99	92	89	88	90	91	94	93	92	91	95	95	96	94	94	91	91
Gönen 1				99	99	92	89	87	89	91	94	93	92	91	95	95	96	94	94	91	91
Senirkent 26					98	91	89	87	89	91	94	92	92	91	95	95	95	93	94	90	90
Senirkent 2						91	88	86	88	90	93	92	91	90	94	94	94	93	93	90	90
Merkez 1							89	87	90	91	93	92	92	90	94	94	94	93	94	91	90
Yalvaç 3								93	96	96	88	88	88	87	90	90	90	89	90	87	86
Merkez 4									96	92	86	86	86	85	88	88	87	87	88	86	84
Senirkent 108										94	88	88	88	87	90	90	90	89	90	87	86
Sarkikaraa. 15											91	90	90	89	93	93	93	91	92	88	88
Keçiborlu 7												97	94	93	95	95	96	95	95	93	92
Gönen 9													94	93	95	95	95	94	95	92	92

Çizelge 4.7. (devam)

	Atabey 1	Keçiborlu 10	Gönen 1	Senirkent 26	Senirkent 2	Merkez 1	Yalvaç 3	Merkez 4	Senirkent 108	Sarkikaraağaç 15	Keçiborlu 7	Gönen 9	Gelendost 1	Keçiborlu 8	Merkez 27	Senirkent 150	Sarkikaraağaç 12	Uluborlu 79	Uluborlu 79	Senirkent 119	Uluborlu 30
Gelendost 1														96	95	95	95	94	94	95	94
Keçiborlu 8															94	94	94	92	93	94	94
Merkez 27																100	99	96	97	93	93
Senirkent 150																	99	96	97	93	93
Sarkikara. 12																		96	97	93	93
Uluborlu 79																			99	92	92
Uluborlu 79																				93	92
Senirkent 119																					93

Gen bankası veritabanlarında dünyanın farklı sert çekirdekli meyve üretim bölgelerinden bulunan 12 PDV protein genlerinin nükleotit dizilimleri alınarak Isparta ili'nin farklı ilçelerinden elde edilen PDV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimiyle karşılaştırarak benzerlik oranları belirlenmiştir. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda Isparta ili PDV izolatlarının dünya izolatlarıyla %86-98 arasında değişen oranlarla benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan 22 PDV izolatı ile dünyadan da 12 farklı PDV izolatı arasındaki benzerlik oranları Çizelge 4.8'de gösterilmiştir. Çizelge yakından incelendiğinde nükleotid dizi benzerliği bakımından en çok benzerlik gösteren izolatın %98'lik oranla Merkez 1 ile dünya izolatlarından GU066792 ABD kiraz, GU066796 İsrail kiraz ve GU066795 İtalya badem izolatları arasında olduğu tespit edilmiştir. En fazla ikinci benzerliği ise Şarkikaraağaç 12 ve Uluborlu 79 izolatının GU181405 Polanya vişne izolatı ile %97 oranında meydana getirdiği belirlenmiştir. Merkez 4 izolatı ise GU066791 Polanya kiraz ve GU066793 İtalya kiraz ile %86'lık oranla en az benzerliğe sahip olan izolatlar olarak belirlenmiştir. Elde edilen çoklu dizi karşılaştırmaları Şekil 4.13'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Isparta ili'ndeki PDV izolatları ile dünyadaki bazı PDV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimlerinin karşılaştırması

	GU181399 İtalya-Visne	GU187047 Polanya-Seftali	Atabey 1	Keçiborlu 10	Gönen 1	Senirkent 26	senirkent 2	GU066786 Polanya-Visne	GU066791 Polanya-Kiraz	GU066798 Almanya-Seftali	GU066793 İtalya-Kiraz	GU066792 ABD-Kiraz	GU066796 İsrail-Kiraz	GU066795 İtalya-Badem	Merkez 1	GU181400 Polanya-Kiraz	Yalvaç 3	Merkez 4	Senirkent 108	Sarkikarağaç 15	GU181404 İtalya-Visne	GU181405 Polanya-Visne	Keçiborlu 7	Gönen 9	Gelendost 1	Keçiborlu 8	Merkez 27	Senirkent 150	Sarkikarağaç 12	Uluborlu 79	Uluborlu 79	Senirkent 119	Uluborlu 30
Atabey 17	91	91	90	90	90	90	90	90	88	89	89	90	90	91	90	85	86	84	85	88	92	91	91	90	89	88	91	91	92	90	91	88	87
GU181399 İtalya-Visne		100	94	94	94	94	93	92	91	91	92	94	93	94	93	89	89	87	90	91	95	95	93	93	92	91	95	95	96	94	95	90	90
GU187047 Polanya-Seftali			94	94	94	94	93	92	91	91	92	94	93	94	93	89	89	87	90	91	95	95	93	93	92	91	95	95	96	94	95	90	90
Atabey 1				99	99	98	98	92	91	91	91	92	92	92	91	89	89	87	89	91	94	94	94	93	92	91	94	94	95	93	94	91	90
Keçiborlu 10					100	99	99	93	91	91	91	93	92	93	92	89	89	88	90	91	95	95	94	93	92	91	95	95	96	94	94	91	91
Gönen 1						99	99	93	91	91	91	93	92	93	92	89	89	87	89	91	95	94	94	93	92	91	95	95	96	94	94	91	91
Senirkent 26							98	92	90	91	90	92	92	92	91	89	89	87	89	91	94	94	94	92	92	91	95	95	95	93	94	90	90
Senirkent 2								92	90	90	90	92	91	92	91	88	88	86	88	90	94	93	93	92	91	90	94	94	94	93	93	90	90
GU066786 Polanya-Visne									96	96	95	97	96	97	96	90	90	88	90	91	95	95	93	92	91	90	94	94	94	93	94	90	89
GU066791 Polanya-Kiraz										95	94	95	95	95	94	88	89	86	88	90	92	93	92	91	90	90	93	93	93	92	92	90	89
GU066798 Almanya-Seftali											94	95	95	96	95	88	89	87	89	90	94	93	92	92	91	90	93	93	93	92	93	90	89

Çizelge 4.8. (devam)

	GU181399 İtalya-Visne	GU187047 Polanya-Seftali	Atabey 1	Keçiborlu 10	Gönen 1	Senirkent 26	senirkent 2	GU066786 Polanya-Visne	GU066791 Polanya-Kiraz	GU066798 Almanya-Seftali	GU066793 İtalya-Kiraz	GU066792 ABD-Kiraz	GU066796 İsrail-Kiraz	GU066795 İtalya-Badem	Merkez 1	GU181400 Polanya-Kiraz	Yalvaç 3	Merkez 4	Senirkent 108	Sarkikaraağaç 15	GU181404 İtalya-Visne	GU181405 Polanya-Visne	Keçiborlu 7	Gönen 9	Gelendost 1	Keçiborlu 8	Merkez 27	Senirkent 150	Sarkikarağaç 12	Uluborlu 79	Uluborlu 79	Senirkent 119	Uluborlu 30
GU066793 İtalya-Kiraz												96	95	95	94	88	89	86	88	90	93	93	91	91	90	89	93	93	93	91	92	89	88
GU066792 ABD-Kiraz													99	99	98	90	90	88	90	92	95	95	93	92	92	91	95	95	95	93	94	91	90
GU066796 İsrail-Kiraz														99	98	89	89	88	90	91	95	95	92	92	92	91	94	94	94	93	94	91	90
GU066795 İtalya-Badem															98	90	90	88	90	92	95	96	93	92	92	91	95	95	95	94	94	91	90
Merkez 1																89	89	87	90	91	94	95	93	92	92	90	94	94	94	93	94	91	90
GU181400 Polanya-Kiraz																	95	92	95	94	90	90	88	87	88	87	91	91	91	89	90	87	86
Yalvaç 3																		93	96	96	90	90	88	88	88	87	90	90	90	89	90	87	86
Merkez 4																			96	92	88	88	86	86	86	85	88	88	87	87	88	86	84
Senirkent 108																				94	90	90	88	88	88	87	90	90	90	89	90	87	86
Sarkikaraağaç 15																					92	91	91	90	90	89	93	93	93	91	92	88	88
GU181404 İtalya-Vişne																						98	94	94	93	93	96	96	96	95	96	92	92

Çizelge 4.8. (devam)

	GU181399 İtalya-Visne	GU187047 Polanya-Seftali	Atabey 1	Keçiborlu 10	Gönen 1	Senirkent 26	senirkent 2	GU066786 Polanya-Visne	GU066791 Polanya-Kiraz	GU066798 Almanya-Seftali	GU066793 İtalya-Kiraz	GU066792 ABD-Kiraz	GU066796 İsrail-Kiraz	GU066795 İtalya-Badem	Merkez 1	GU181400 Polanya-Kiraz	Yalvaç 3	Merkez 4	Senirkent 108	Sarkikaraağaç 15	GU181404 İtalya-Visne	GU181405 Polanya-Visne	Keçiborlu 7	Gönen 9	Gelendost 1	Keçiborlu 8	Merkez 27	Senirkent 150	Sarkikaraağaç 12	Uluborlu 79	Uluborlu 79	Senirkent 119	Uluborlu 30
GU181405 Polanya-Vişne																							94	94	93	93	96	96	97	96	97	92	92
Keçiborlu 7																								97	94	93	95	95	96	95	95	93	92
Gönen 9																									94	93	95	95	95	94	95	92	92
Gelendost 1																										96	95	95	95	94	94	95	94
Keçiborlu 8																											94	94	94	92	93	94	94
Merkez 27																												100	99	96	97	93	93
Senirkent 150																													99	96	97	93	93
Sarkikaraağaç 12																														96	97	93	93
Uluborlu 79																															99	92	92
Uluborlu 79																																93	92
Senirkent 119																																	93

Şekil 4.13. (devam)

		511	595
	Atabey 17	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGAGATCCGATCAG
GU181399	Italya-Visne	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGAGATCCGATCAG
GU187047	Polanya-Seftali	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGAGATCCGATCAG
	Atabey 1	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGAGATCCGATCAG
	Keçiborlu 10	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGAGATCCGATCAG
	Gönen 1	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGAGATCCGATCAG
	Senirkent 26	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGAGATCCGATCAG
	senirkent 2	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGAGATCCGATCAG
GU066786	Polanya-Visne	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGAGATCCGATCAG
GU066791	Polanya-Kiraz	(511)	TTTTCCTAACCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGAGATCCGATCAG
GU066798	Almanya-Seftali	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGAGATCCGATCAG
GU066793	Italya-Kiraz	(511)	GAATTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
GU066792	ABD-Kiraz	(511)	GAATTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
GU066796	Israil-Kiraz	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
GU066795	Italya-Badem	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
	Merkez 1	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
GU181400	Polanya-Kiraz	(511)	ACCTTTACCCGCGTTACCGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
	Yalvaç 3	(511)	ACCTTTACCCGCGTTACCGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
	Merkez 4	(511)	ACCTTTACCCGCGTTACCGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
	Senirkent 108	(511)	ACCTTTACCCGCGTTACCGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
	Sarkikaraağaç 15	(511)	ACCTTTACCCGCGTTACCGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
GU181404	Italya-Visne	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
GU181405	Polanya-Visne	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
	Keçiborlu 7	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
	Gönen 9	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
	Gelendost 1	(511)	TTTTCCTAACCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
	Keçiborlu 8	(511)	TTTTCCTAACCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
	Merkez 27	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
	Senirkent 150	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
	Sarkikaraağaç 12	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
	Uluborlu 79	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
	Uluborlu 79	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
	Senirkent 119	(511)	TTTTCCTAACCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
	Uluborlu 30	(511)	TTTTCCTAACCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
	Consensus	(511)	GCTTTTACGCCGACGTTCCGGGTGTGTTTGTACTCAGTACCTTCAACACTCGATGCCAAGCAATTGAGATCCCTCGATCAG
		596	657
	Atabey 17	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
GU181399	Italya-Visne	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
GU187047	Polanya-Seftali	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
	Atabey 1	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
	Keçiborlu 10	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
	Gönen 1	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
	Senirkent 26	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
	senirkent 2	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
GU066786	Polanya-Visne	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
GU066791	Polanya-Kiraz	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
GU066798	Almanya-Seftali	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
GU066793	Italya-Kiraz	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
GU066792	ABD-Kiraz	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
GU066796	Israil-Kiraz	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
GU066795	Italya-Badem	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
	Merkez 1	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
GU181400	Polanya-Kiraz	(596)	TAATATATTTTCAAGCGGATACCGCTCTCATAGATCGATGGACGGAATAGTCAGTGGATGA
	Yalvaç 3	(596)	TAATATATTTTCAAGCGGATACCGCTCTCATAGATCGATGGACGGAATAGTCAGTGGATGA
	Merkez 4	(596)	TACTTAGGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATAGATCGATGGACGGAATAGTCAGTGGATGA
	Senirkent 108	(596)	TGTTATATTTTCAAGCGGATACCGCTCTCATAGATCGATGGACGGAATAGTCAGTGGATGA
	Sarkikaraağaç 15	(596)	TAATATATTTTCAAGCGGATACCGCTCTCATAGATCGATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
GU181404	Italya-Visne	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
GU181405	Polanya-Visne	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
	Keçiborlu 7	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
	Gönen 9	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
	Gelendost 1	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
	Keçiborlu 8	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
	Merkez 27	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
	Senirkent 150	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
	Sarkikaraağaç 12	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
	Uluborlu 79	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
	Uluborlu 79	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
	Senirkent 119	(596)	TGCANCGCTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
	Uluborlu 30	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA
	Consensus	(596)	TGTTATACGTTCAAGCGGATACCGCTCTCATGGACCAATGGATAAAATAGTCAGTGGATGA

Şekil 4.13.(devam)

4.7.2. Amino asit dizi analizi

4.7.2.1. *Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)* amino asit dizi analizi

Isparta ilinin farklı kiraz bahçelerinden alınan ACLSV izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizilimleri kendi aralarında karşılaştırılmıştır. İzolatların kılıf proteinleri arasında %98 ile %100 arasında değişen oranlarda benzerlik olduğu tespit edilmiştir. Araştırmada kullanılan tüm Isparta ACLSV izolatların birbirleriyle gösterdikleri aminoasit dizi benzerlikleri Çizelge 4.9'da verilmiştir. En çok benzerlik %100'lük oranla Eğirdir izolatlarının kendi aralarında oluşturduğu belirlenmiştir. Ayrıca sırasıyla Atabey 39 ve Senirkent izolatları kendi aralarında ve Eğirdir izolatlarıyla %100 benzerlik göstererek en çok korunmuş izolatlar olarak belirlenmiştir.

Kılıf protein geni amino asit dizi karşılaştırmasına göre tüm izolatlar içerisinde en az benzerliğin %98 oranla Uluborlu 30 izolat ile diğer izolatlar arasında meydana geldiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.9. Isparta ili'ne ait kiraz bahçelerinden toplanan ACLSV izolatlarının amino asit dizilerinin benzerlik oranları

	Eğirdir 11-2	Eğirdir 11-5	Eğirdir 11-7	Keçiborlu 10	Uluborlu 30	Senirkent 2
Atabey 39	100	100	100	99	98	100
Eğirdir 11-2		100	100	99	98	100
Eğirdir 11-5			100	99	98	100
Eğirdir 11-7				99	98	100
Keçiborlu 10					99	99
Uluborlu 30						98

Dünyanın farklı sert ve yumuşak çekirdekli meyve üretim bölgelerinden elde edilen ve gen bankası veri tabanlarında kılıf protein gen dizilimi bulunan 18 farklı izolatın kılıf protein genlerinin amino asit dizilimleri alınarak Isparta ili'nin farklı kiraz bahçelerinden alınan ACLSV izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizilimiyle karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalar sonucunda Isparta ilinde bulunan

ACLSV izolatlarının diğ er uluslararası izolatlarla benzerlik oranları amino asit düzeyinde de belirlenmiştir. Isparta ili ACLSV izolatlarının dünya izolatlarıyla %88 ile %100 arasında değişen oranda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu araştırmada kullanılan 7 ACLSV izolatının amino asit dizilimleri ile bunların uluslararası izolatlar ile benzerlik oranları  izelge 4.10'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, Isparta ili ACLSV izolatlarının amino asit dizilimi bakımından en fazla Yunanistan ve Bulgaristan izolatlarının kılıf protein genleriyle benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. Eğirdir izolatları ile Atabey 39 ve Senirkent 2 izolatları DQ329160 Bulgaristan kiraz izolatıyla ayrıca Atabey 39 ve Senirkent 2 izolatları FN391006 Yunanistan kiraz izolatlarıyla %100 benzerlik göstermiştir. Eğirdir izolatları, Atabey 39, Senirkent 2 ve Keçiborlu 10 izolatları AM498044 Hindistan kiraz ve FJ952171 Ukrayna elma izolatlarıyla %99'luk oranla en fazla ikinci benzerliği göstermiştir. Isparta iline ait ACLSV izolatlarının amino asit dizilimi bakımından genel olarak İtalya izolatlarının kılıf protein genleriyle farklılık göstermiştir. Buna göre AJ586628 İtalya badem izolatı %88'lik oranla Uluborlu 30 izolatıyla en az benzerliği göstermiştir. Elde edilen çoklu dizi karşılaştırmaları şekil 4.14'de verilmiştir.

Çizelge 4.10. Isparta ili ACLSV izolatları ile dünyadaki bazı ACLSV izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizilimlerinin karşılaştırılması

	DQ329161 Bulgaristan-Seftali	DQ329162 Bulgaristan Elma	FJ952167 Türkiye-Elma	FJ952168 Çek Cumh.-Elma	FN386788 Yunanistan-Armut	AJ586629 İspanya-Kayısı	AJ586630 İtalya-Kayısı	AJ586644 İtalya-Seftali	AJ586649 Lübnan-Seftali	GQ334208 Çin-Armut	FJ608984 Çin-Armut	AM498044 Hindistan-Kiraz	FJ952171 Ukranya-Elma	DQ329160 Bulgaristan-Kiraz	Egirdir 11-2	Egirdir 11-5	Egirdir 11-7	FN391006 Yunanistan-Kiraz	Keciborlu 10	Uluborlu 30	FJ952174 Sırbistan-Elma	GQ334192 Kanada Elma	Atabey 39	Senirkent 2
AJ586628 İtalya-Badem	94	92	93	94	93	90	94	92	92	92	92	90	89	90	90	90	90	90	90	88	87	89	90	90
DQ329161 Bulgaristan-Seftali		99	99	99	99	95	98	95	96	96	96	93	92	93	93	93	93	93	93	92	92	92	93	93
DQ329162 Bulgaristan-Elma			98	97	97	94	96	94	95	95	95	92	91	92	92	92	92	92	92	90	90	91	92	92
FJ952167 Türkiye-Elma				98	98	94	97	94	96	96	96	92	92	92	92	92	92	92	92	91	91	92	92	92
FJ952168 Çek Cumh.-Elma					98	94	98	94	95	95	95	92	91	92	92	92	92	92	92	90	90	91	92	92
FN386788 Yunanistan-Armut						94	97	94	95	95	95	92	92	92	92	92	92	92	92	90	90	91	92	92
AJ586629 İspanya-Kayısı							94	93	95	94	93	91	90	91	91	91	91	91	91	90	90	90	91	91
AJ586630 İtalya-Kayısı								96	96	96	96	92	91	92	92	92	92	92	92	90	90	91	92	92
AJ586644 İtalya-Seftali									96	97	96	90	90	90	90	90	90	90	90	89	89	88	90	90
AJ586649 Lübnan-Seftali										98	96	92	91	92	92	92	92	92	92	90	90	90	92	92
GQ334208 Cin-Armut											97	92	91	92	92	92	92	92	92	90	90	90	92	92

Çizelge 4.10. (devam)

[illegible]

Çizelge 4.10. (devam)

		DQ329161 Bulgaristan-Seftali
GQ334192 Kanada-Elma		DQ329162 Bulgaristan Elma
Atabey 39		FJ952167 Türkiye-Elma
		FJ952168 Çek Cumh.-Elma
		FN386788 Yunanistan-Armut
		AJ586629 İspanya-Kayısı
		AJ586630 İtalya-Kayısı
		AJ586644 İtalya-Seftali
		AJ586649 Lübnan-Seftali
		GQ334208 Çin-Armut
		FJ608984 Çin-Armut
		AM498044 Hindistan-Kiraz
		FJ952171 Ukranya-Elma
		DQ329160 Bulgaristan-Kiraz
		Egirdir 11-2
		Egirdir 11-5
		Egirdir 11-7
		FN391006 Yunanistan-Kiraz
		Keciborlu 10
		Uluborlu 30
		FJ952174 Sırbistan-Elma
		GQ334192 Kanada Elma
	96	Atabey 39
	96	Senirkent 2
	100	

		1		72
AJ586628	Italya-Badem	(1)	SEQTEFLNIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
DQ329161	Bulgaristan-Seftali	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
DQ329162	Bulgaristan-Elma	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
FJ952167	Türkiye-Elma	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
FJ952168	Çek Cumh.-Elma	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
FN386788	Yunanistan-Armut	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
AJ586629	Ispanya-Kayisi	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
AJ586630	Italya-Kayisi	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
AJ586644	Italya-Seftali	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
AJ586649	Lübnan-Seftali	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
GQ334208	Cin-Armut	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
FJ608984	Cin-Armut	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
AM498044	Hindistan-Kiraz	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
FJ952171	Ukranya-Elma	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
DQ329160	Bulgaristan-Kiraz	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
	Egirdir 11-2	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
	Egirdir 11-5	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
	Egirdir 11-7	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
FN391006	Yunanistan-Kiraz	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
	Keciborlu 10	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
	Uluborlu 30	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
FJ952174	Sirbistan-Elma	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
GQ334192	Kanada-Elma	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
	Atabey 39	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
	Senirkent 2	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
	Consensus	(1)	SEQTEFLDIVVEVKSMEQKVI	GSNLEVVNMIKAFKTTSSDPNIS
		73		143
AJ586628	Italya-Badem	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
DQ329161	Bulgaristan-Seftali	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
DQ329162	Bulgaristan-Elma	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
FJ952167	Türkiye-Elma	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
FJ952168	Çek Cumh.-Elma	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
FN386788	Yunanistan-Armut	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
AJ586629	Ispanya-Kayisi	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
AJ586630	Italya-Kayisi	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
AJ586644	Italya-Seftali	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
AJ586649	Lübnan-Seftali	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
GQ334208	Cin-Armut	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
FJ608984	Cin-Armut	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
AM498044	Hindistan-Kiraz	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
FJ952171	Ukranya-Elma	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
DQ329160	Bulgaristan-Kiraz	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
	Egirdir 11-2	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
	Egirdir 11-5	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
	Egirdir 11-7	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
FN391006	Yunanistan-Kiraz	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
	Keciborlu 10	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
	Uluborlu 30	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
FJ952174	Sirbistan-Elma	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
GQ334192	Kanada-Elma	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
	Atabey 39	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
	Senirkent 2	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI
	Consensus	(73)	GVFTNLFTMPVEVGGKYPELMFDFNKG	LNMFIMNKAQQKVI

Şekil 4.14. ACLSV kılıf protein genlerinin amino asit dizimlerine ait çoklu dizi karşılaştırması

4.7.2.2. *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV) amino asit dizi analizi

Isparta ilinin farklı kiraz bahçelerinden alınan PNRSV izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizilimleri kendi aralarında karşılaştırılmıştır. İzolatların kılıf proteinleri arasında %94 ile %100 arasında değişen oranlarda benzerlik olduğu tespit edilmiştir. Araştırmada kullanılan Isparta PNRSV izolatların birbirleriyle gösterdikleri aminoasit dizi benzerlikleri Çizelge 4.11’de verilmiştir. En çok benzerlik %100’lük oranla Senirkent 47 ile Senirkent 48 izolatları arasında belirlenmiştir. Kılıf protein geni amino asit dizi karşılaştırmasına göre en az benzerliğin tüm izolatlar içerisinde %94 oranla Merkez 18 ile Eğirdir 03 izolatları arasında meydana geldiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.11. Isparta ili’ne ait kiraz bahçelerinden toplanan PNRSV izolatlarının amino asit dizilerinin benzerlik oranları

	Senirkent 47	Senirkent 48	Eğirdir O3	Uluborlu 73
Merkez 18	96	96	94	96
Senirkent 47		100	97	98
Senirkent 48			97	98
Eğirdir O3				99

Dünyanın ve ülkemizin farklı sert ve yumuşak çekirdekli meyve üretim bölgelerinden elde edilen ve gen bankası veri tabanlarında kılıf protein gen dizilimi bulunan 23 farklı izolatın kılıf protein genlerinin amino asit dizilimleri alınarak Isparta ili’nin farklı kiraz bahçelerinden alınan PNRSV izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizilimiyle karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalar sonucunda Isparta ili’nde bulunan PNRSV izolatlarının diğer uluslararası ve ülkemiz izolatlarıyla benzerlik oranları amino asit düzeyinde de belirlenmiştir. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda Isparta ili PNRSV izolatlarının dünya ve ülkemiz izolatlarıyla %89 ile %100 arasında değişen oranda benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. Bu araştırmada kullanılan 5 PNRSV izolatının amino asit dizilimleri ile bunların uluslararası izolatlar ile benzerlik oranları Çizelge 4.12’de verilmiştir. Merkez 18 izolatı AJ133206 Tunus şeftali ve DQ983494 Polanya kiraz izolatı ile

%100 oranla en fazla benzerlik gösterten izolat olmuştur. Senirkent 48 ve Senirkent 47 izolatları DQ983491 Polanya kiraz, AF170166 Çekoslovakya vişne, FJ231736 ABD kiraz, AF170163 Çekoslovakya vişne, AF170165 Çekoslovakya kiraz ve EF565251 Şili kiraz izolatları ile %99 ile en fazla ikinci benzerlik gösteren izolatlar olmuştur. Senirkent 48, Senirkent 47 ve Eğirdir 03 izolatı amino asit dizilimi bakımından AJ133210 İtalya kiraz izolatı ile %89 oranla en az benzerliği göstermiştir. Elde edilen çoklu dizi karşılaştırmaları Şekil 4.15’de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Isparta ili PNRSV izolatları ile dünyadaki bazı PNRSV izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizilimlerinin karşılaştırılması

	Uluborlu 73	Senirkent 47	Egirdir O3	Merkez 18	AJ133206 Tunus-Seftali	AF170157 Cekoslovakya-Kiraz	AJ133210 Italya-Kiraz	DQ983494 Polanya-Kiraz	FJ231737 ABD-Visne	EF519309 Türkiye-Erik	EF519310 Türkiye-Visne	AJ133209 Italya-Kiraz	AJ133203 Italya-Kiraz	AJ133208 İspanya-Nektarin	EF519307 Türkiye-Seftali	DQ983491 Polanya-Kiraz	EF519306 Türkiye-Seftali	EF519308 Türkiye-Seftali	EU368738 Macaristan-Visne	AF170166 Cekoslovakya-Visne	FJ231736 ABD-Kiraz	FR773524 Hindistan-Kiraz	EF519311 Türkiye-Seftali	AF170163 Cekoslovakya-Visne	AF170165 Cekoslovakya-Kiraz	EF565251 Sili-Kiraz	HQ833193 Çin-Kiraz
Senirkent 48	98	100	97	96	96	94	89	96	97	96	96	97	95	98	98	99	98	98	98	99	99	98	98	99	99	99	98
Uluborlu 73		98	99	96	96	94	90	96	97	96	96	97	94	97	97	98	97	97	97	98	98	97	98	98	98	98	97
Senirkent 47			97	96	96	94	89	96	97	96	96	97	95	98	98	99	98	98	98	99	99	98	98	99	99	99	98
Egirdir O3				94	94	93	89	94	96	95	95	96	93	96	96	97	96	96	96	97	97	96	97	97	97	97	96
Merkez 18					100	99	89	100	98	97	97	96	93	96	96	97	96	96	96	96	97	97	96	97	97	97	96
AJ133206 Tunus-Seftali						99	89	100	98	97	97	96	93	96	96	97	96	96	96	96	96	97	96	97	97	97	96
AF170157 Cekoslovakya-Kiraz							89	99	97	96	96	94	92	95	95	96	95	95	95	94	96	94	96	96	96	96	94
AJ133210 Italya-Kiraz								89	90	89	89	90	88	89	89	90	89	89	89	89	90	89	90	90	90	90	89
DQ983494 Polanya-Kiraz									98	97	97	96	93	96	96	97	96	96	96	96	97	96	97	97	97	97	96
FJ231737 ABD-Visne										99	99	98	94	98	98	98	98	98	98	97	98	97	99	98	98	98	97

Çizelge 4.12. (devam)

	Uluborlu 73	Senirkent 47	Egirdir 03	Merkez 18	AJ133206 Tunus-Seftali	AF170157 Cekoslovakya-Kiraz	AJ133210 Italya-Kiraz	DQ983494 Polanya-Kiraz	FJ231737 ABD-Visne	EF519309 Türkiye-Erik	EF519310 Türkiye-Visne	AJ133209 Italya-Kiraz	AJ133203 Italya-Kiraz	AJ133208 Ispanya-Nektarin	EF519307 Türkiye-Seftali	DQ983491 Polanya-Kiraz	EF519306 Türkiye-Seftali	EF519308 Türkiye-Seftali	EU368738 Macaristan-Visne	AF170166 Cekoslovakya-Visne	FJ231736 ABD-Kiraz	FR773524 Hindistan-Kiraz	EF519311 Türkiye-Seftali	AF170163 Cekoslovakya-Visne	AF170165 Cekoslovakya-Kiraz	EF565251 Sili-Kiraz	HQ833193 Çin-Kiraz
EF519309 Türkiye-Erik											100	97	93	97	97	97	97	97	97	96	97	96	98	97	97	97	97
EF519310 Türkiye-Visne												97	93	97	97	97	97	97	97	96	97	96	98	97	97	97	97
AJ133209 Italya-Kiraz													94	97	97	97	97	96	96	97	97	97	98	97	97	97	96
AJ133203 Italya-Kiraz														95	95	96	95	94	94	95	96	95	95	96	96	96	94
AJ133208 Ispanya-Nektarin															100	99	99	98	98	98	99	98	99	99	99	99	98
EF519307 Türkiye-Seftali																99	99	98	98	98	99	98	99	99	99	99	98
DQ983491 Polanya-Kiraz																	99	99	99	99	100	99	99	100	100	100	99
EF519306 Türkiye-Seftali																		98	98	98	99	98	99	99	99	99	98
EF519308 Türkiye-Seftali																			100	98	99	98	98	99	99	99	98
EU368738 Macaristan-Visne																				98	99	98	98	99	99	99	98
AF170166 Cekoslovakya-Visne																					99	98	98	99	99	99	98

Çizelge 4.12. (devam)

[illegible]

Senirkent 48	(1)	PNRASSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
Uluborlu 73	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
Senirkent 47	(1)	PNRASSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
Egirdir 03	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
Merkez 18	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
AJ133206 Tunus-Seftali	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
AF170157 Cekoşlovakya-Kiraz	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
AJ133210 İtalya-Kiraz	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
DQ983494 Polanya-Kiraz	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
FJ231737 ABD-Visne	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
EF519309 Türkiye-Erik	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
EF519310 Türkiye-Visne	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
AJ133209 İtalya-Kiraz	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
AJ133203 İtalya-Kiraz	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
AJ133208 İspanya-Nektarin	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
EF519307 Türkiye-Seftali	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
DQ983491 Polanya-Kiraz	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
EF519306 Türkiye-Seftali	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
EF519308 Türkiye-Seftali	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
EU368738 Macaristan-Visne	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
AF170166 Cekoşlovakya-Visne	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
FJ231736 ABD-Kiraz	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
FR773524 Hindistan-Kiraz	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
EF519311 Türkiye-Seftali	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
AF170163 Cekoşlovakya-Visne	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
AF170165 Cekoşlovakya-Kiraz	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
EF565251 Sili-Kiraz	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
HQ833193 Cin-Kiraz	(1)	PNRVSSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
Consensus	(1)	PNRASSGTGPVVRQPVVKTWTVRGPNVPRIPKGFVAHNRREVTTTAVKYLSDFTTTLQPLMGQNLTLTLV
		76 150
Senirkent 48	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
Uluborlu 73	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
Senirkent 47	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
Egirdir 03	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
Merkez 18	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
AJ133206 Tunus-Seftali	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
AF170157 Cekoşlovakya-Kiraz	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
AJ133210 İtalya-Kiraz	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
DQ983494 Polanya-Kiraz	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
FJ231737 ABD-Visne	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
EF519309 Türkiye-Erik	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
EF519310 Türkiye-Visne	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
AJ133209 İtalya-Kiraz	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
AJ133203 İtalya-Kiraz	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
AJ133208 İspanya-Nektarin	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
EF519307 Türkiye-Seftali	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
DQ983491 Polanya-Kiraz	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
EF519306 Türkiye-Seftali	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
EF519308 Türkiye-Seftali	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
EU368738 Macaristan-Visne	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
AF170166 Cekoşlovakya-Visne	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
FJ231736 ABD-Kiraz	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
FR773524 Hindistan-Kiraz	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
EF519311 Türkiye-Seftali	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
AF170163 Cekoşlovakya-Visne	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
AF170165 Cekoşlovakya-Kiraz	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
EF565251 Sili-Kiraz	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
HQ833193 Cin-Kiraz	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
Consensus	(76)	IVRMNSSLNGWIGVVEDYKVEQPCPNALSRKGFGLKDQPRGWQFEPPSOLDLDFDTFARTHVVIEFKTEVPAGAK
		151 180
Senirkent 48	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
Uluborlu 73	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
Senirkent 47	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
Egirdir 03	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
Merkez 18	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
AJ133206 Tunus-Seftali	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
AF170157 Cekoşlovakya-Kiraz	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
AJ133210 İtalya-Kiraz	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
DQ983494 Polanya-Kiraz	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
FJ231737 ABD-Visne	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
EF519309 Türkiye-Erik	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
EF519310 Türkiye-Visne	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
AJ133209 İtalya-Kiraz	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
AJ133203 İtalya-Kiraz	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
AJ133208 İspanya-Nektarin	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
EF519307 Türkiye-Seftali	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
DQ983491 Polanya-Kiraz	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
EF519306 Türkiye-Seftali	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
EF519308 Türkiye-Seftali	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
EU368738 Macaristan-Visne	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
AF170166 Cekoşlovakya-Visne	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
FJ231736 ABD-Kiraz	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
FR773524 Hindistan-Kiraz	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
EF519311 Türkiye-Seftali	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
AF170163 Cekoşlovakya-Visne	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
AF170165 Cekoşlovakya-Kiraz	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
EF565251 Sili-Kiraz	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
HQ833193 Cin-Kiraz	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI
Consensus	(151)	VLVRDLYVVVSDLPVQIPTDVLVDEDLI

Şekil 4.15. PNRSV kılıf protein genlerinin amino asit dizimlerine ait çoklu dizi karşılaştırması

4.7.2.3. *Prune dwarf virus* (PDV) amino asit dizi analizi

Isparta ili'nde kiraz üretiminin yaygın olarak yapıldığı kiraz bahçelerinden alınan PDV izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizilimleri kendi aralarında karşılaştırıldığında, izolatların kılıf proteinleri arasında %79-100 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. En çok benzerlik %100'lük oranla Gönen 1, Keçiborlu 10 ve Senirkent 26 izolatının birbirleriyle ve Merkez 27 ile Senirkent 150 izolatı arasında olduğu belirlenmiştir. Kılıf protein geni amino asit dizi karşılaştırmasına göre tüm izolatlar arasında en çok farklılık gösteren ise Atabey 17 ile Uluborlu 30 izolatı arasında olduğu belirlenmiştir. Farklılık %79 oranında meydana gelmiştir. Çalışmada kullanılan Isparta PDV izolatların birbirleriyle gösterdikleri amino asit dizi benzerlikleri Çizelge 4.13'de verilmiştir

Çizelge 4.13. Isparta ili'ne ait kiraz bahçelerinden toplanan PDV izolatlarının amino asit dizilerinin benzerlik oranları

	Gönen 1	Keçiborlu 10	Senirkent 26	Senirkent 2	Atabet 17	Yalvaç 3	Merkez 4	Senirkent 108	Sarkikaraağaç 15	Gelendost 1	Uluborlu 30	Keçiborlu 8	Senirkent 119	Gönen 9	Keçiborlu 7	Merkez 1	Uluborlu 79	Merkez 27	Senirkent 150	Sarkikaraağaç 12
Atabey 1	98	98	98	96	87	88	86	88	89	88	85	87	88	89	92	93	94	94	94	94
Gönen 1		100	100	98	86	88	87	89	90	90	86	88	88	90	93	94	95	95	95	96
Keçiborlu 10			100	98	86	88	87	89	90	90	86	88	88	90	93	94	95	95	95	96
Senirkent 26				97	86	88	87	89	89	89	86	88	88	89	92	94	95	94	94	95
Senirkent 2					84	87	86	88	88	88	84	86	87	88	90	93	93	93	93	94
Atabey 17						82	82	83	85	83	79	81	82	85	87	88	89	88	88	89
Yalvaç 3							90	94	94	84	82	83	84	85	88	89	89	89	89	90
Merkez 4								95	90	83	81	82	84	83	86	88	88	88	88	88
Senirkent 108									93	87	83	85	86	87	89	92	91	91	91	92
Sarkikara. 15										88	84	86	86	88	91	92	93	93	93	93
Gelendost 1											90	92	91	89	91	91	93	93	93	93
Uluborlu 30												88	88	87	88	88	89	89	89	89
Keçiborlu 8													89	86	90	89	91	91	91	91
Senirkent 119														87	89	89	90	90	90	91

Çizelge 4.13. (devam)

[illegible]

Dünyanın ve ülkemizin farklı sert çekirdekli meyve üretim bölgelerinden elde edilen ve gen bankası veri tabanlarında kılıf protein gen dizilimi bulunan 12 farklı izolatın kılıf protein genlerinin amino asit dizilimleri alınarak Isparta ili'nin farklı kiraz bahçelerinden alınan PDV izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizilimiyle karşılaştırılmıştır. Elde edilen çoklu dizi karşılaştırmaları Şekil 4.16'da verilmiştir. Bu karşılaştırmalar sonucunda Isparta ili'nde bulunan PDV izolatlarının diğer uluslararası ve ülkemiz izolatlarıyla benzerlik oranları amino asit düzeyinde de belirlenmiştir. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda Isparta ili PDV izolatlarının dünya ve ülkemiz izolatlarıyla %82 ile %99 arasında değişen oranda benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. Bu araştırmada kullanılan 22 PDV izolatının amino asit dizilimleri ile bunların uluslararası izolatlar ile benzerlik oranları Çizelge 4.14'de verilmiştir. Merkez 1, Uluborlu 79 ve Sarkikaraağaç 12 izolatı GU066795 İtalya badem ile ayrıca Uluborlu 79, Şarkikaraağaç 12 GU181404 İtalya vişne ile ve Şarkikaraağaç 12, GU181405 Polanya vişne izolatları ile %99 oranla en fazla benzerlik gösteren izolatlar olmuştur. Merkez 1, GU181404 İtalya vişne ile, Merkez 27 ve Senirkent 150 izolatları GU181404 İtalya vişne, GU066795 İtalya badem, GU181405 Polanya vişne ile ve Şarkikaraağaç 12, GU066786 Polanya vişne izolatları ile %98 ile en fazla ikinci benzerlik gösteren izolatlar olmuştur. Atabey 17, izolatı amino asit dizilimi bakımından GU181400 Polanya kiraz ile %82 oranla en az benzerliği göstermiştir.

Çizelge 4.14. Isparta ili PDV izolatları ile dünyadaki bazı PDV izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizilimlerinin karşılaştırılması

	Gönen 1	Keçiborlu 10	Senirkent 26	Senirkent 2	Atabey 17	GU066793 İtalya-Kiraz	GU181400 Polanya-Kiraz	Yalvaç 3	Merkez 4	Senirkent 108	Sarkikaraağaç 15	Gelendost 1	Uluborlu 30	Keçiborlu 8	Senirkent 119	Gönen 9	Keçiborlu 7	GU066792 ABD-Kiraz	GU066796 İsrail-Kiraz	Merkez 1	GU066795 İtalya-Badem	GU181399 İtalya-Visne	GU187047 Polanya-Seftali	GU181404 İtalya-Visne	GU066786 Polanya-Visne	GU066791 Polanya-Kiraz	GU066798 Almanya-Seftali	GU181405 Polanya-Visne	Uluborlu 79	Merkez 27	Senirkent 150	Sarkikaraağaç 12
Atabey 1	98	98	98	96	87	89	88	88	86	88	89	88	85	87	88	89	92	93	93	93	94	93	93	94	92	90	91	93	94	94	94	94
Gönen 1		100	100	98	86	89	90	88	87	89	90	90	86	88	88	90	93	94	94	94	95	94	94	95	94	91	92	94	95	95	95	96
Keçiborlu 10			100	98	86	89	90	88	87	89	90	90	86	88	88	90	93	94	94	94	95	94	94	95	94	91	92	94	95	95	95	96
Senirkent 26				97	86	89	89	88	87	89	89	89	86	88	88	89	92	94	94	94	95	94	94	94	93	91	91	94	95	94	94	95
Senirkent 2					84	88	88	87	86	88	88	88	84	86	87	88	90	93	93	93	94	92	92	93	92	89	90	93	93	93	93	94
Atabey 17						85	82	82	82	83	85	83	79	81	82	85	87	88	88	88	88	87	87	89	88	87	88	88	89	88	88	89
GU066793 İtalya-Kiraz							87	88	86	89	90	86	83	84	85	87	90	94	92	93	93	91	91	93	93	92	91	92	92	92	92	93
GU181400 Polanya-Kiraz								95	91	95	93	86	82	84	85	86	88	90	90	90	91	89	89	90	91	88	88	92	91	91	91	91
Yalvaç 3									90	94	94	84	82	83	84	85	88	89	89	89	90	88	88	89	91	88	88	91	89	89	89	90
Merkez 4										95	90	83	81	82	84	83	86	88	88	88	88	87	87	88	89	87	87	88	88	88	88	88
Senirkent 108											93	87	83	85	86	87	89	91	92	92	92	90	90	92	93	91	91	92	91	91	91	92

Çizelge 4.14. (devam)

	Gönen 1	Keçiborlu 10	Senirkent 26	Senirkent 2	Atabey 17	GU066793 İtalya-Kiraz	GU181400 Polanya-Kiraz	Yalvaç 3	Merkez 4	Senirkent 108	Sarkikaraağaç 15	Gelendost 1	Uluborlu 30	Keçiborlu 8	Senirkent 119	Gönen 9	Keçiborlu 7	GU066792 ABD-Kiraz	GU066796 İsrail-Kiraz	Merkez 1	GU066795 İtalya-Badem	GU181399 İtalya-Visne	GU187047 Polanya-Seftali	GU181404 İtalya-Visne	GU066786 Polanya-Visne	GU066791 Polanya-Kiraz	GU066798 Almanya-Seftali	GU181405 Polanya-Visne	Uluborlu 79	Merkez 27	Senirkent 150	Sarkikaraağaç 12
Sarkikaraağaç 15												88	84	86	86	88	91	91	91	92	92	90	90	93	92	90	90	92	93	93	93	93
Gelendost 1													90	92	91	89	91	91	91	91	92	90	90	92	91	89	89	92	93	93	93	93
Uluborlu 30														88	88	87	88	87	88	88	88	87	87	88	87	86	87	88	89	89	89	89
Keçiborlu 8															89	86	90	89	89	89	90	88	88	90	89	88	87	91	91	91	91	91
Senirkent 119																87	89	89	90	89	90	88	88	90	88	87	89	89	90	90	90	91
Gönen 9																	93	91	91	92	92	92	92	94	92	89	92	92	93	92	92	93
Keçiborlu 7																		94	94	94	94	94	94	95	94	92	93	94	95	94	94	95
GU066792 ABD-Kiraz																			98	98	98	96	96	97	96	94	94	96	97	96	96	97
GU066796 İsrail-Kiraz																				98	98	96	96	97	96	94	94	96	97	96	96	97
Merkez 1																					99	97	97	98	97	95	95	97	98	97	97	98
GU066795 İtalya-Badem																						97	97	98	97	95	95	98	99	98	98	99
GU181399 İtalya-Visne																							100	98	95	93	94	95	96	96	96	97

Çizelge 4.14. (devam)

[illegible]

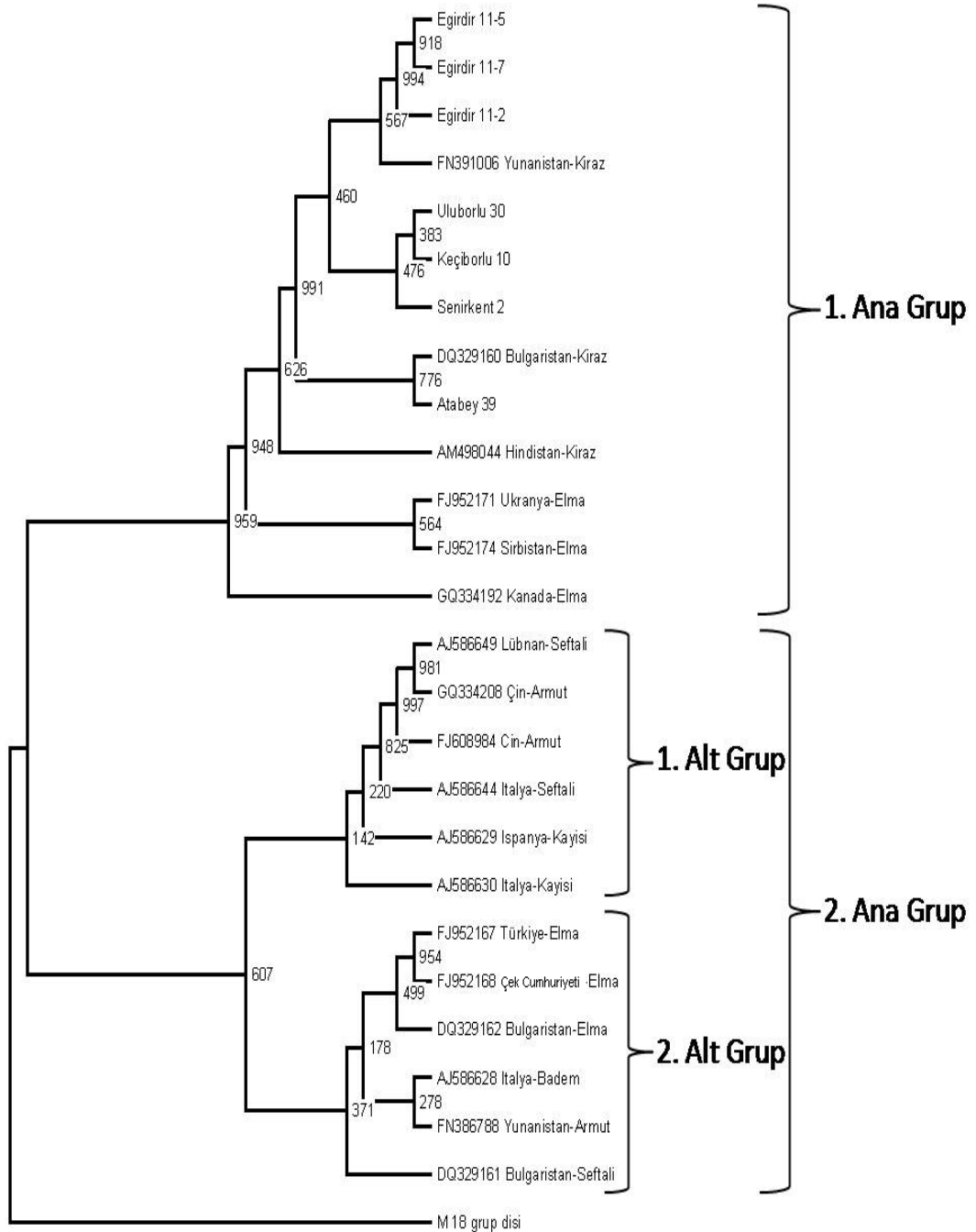
		1	85
Atabey 1	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINSTTPVGVFVVKQSPGGSSKSVSEWHLHGPNVSKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Gönen 1	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINSTTPVGVFVVKQSPGGSSKSVSEWHLHGPNVSKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Keçiborlu 10	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINSTTPVGVFVVKQSPGGSSKSVSEWHLHGPNVSKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Senirkent 26	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINSTTPVGVFVVKQSPGGSSKSVSEWHLHGPNVSKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Senirkent 2	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINSTTPVGVFVVKQSPGGSSKSVSEWHLHGPNVSKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Atabey 17	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
GU066793 Italya-Kiraz	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
GU181400 Polanya-Kiraz	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Yalvaç 3	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Merkez 4	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Senirkent 108	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Sarkikaraağaç 15	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Gelendost 1	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Uluborlu 30	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Keçiborlu 8	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Senirkent 119	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Gönen 9	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Keçiborlu 7	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
GU066792 ABD-Kiraz	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
GU066796 İsraill-Kiraz	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Merkez 1	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
GU066795 Italya-Badem	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
GU181399 Italya-Vişne	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
GU187047 Polanya-Seftali	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
GU181404 Italya-Vişne	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
GU066786 Polanya-Vişne	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
GU066791 Polanya-Kiraz	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
GU066798 Almany-Seftali	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
GU181405 Polanya-Vişne	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Uluborlu 79	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Merkez 27	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Senirkent 150	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Sarkikaraağaç 12	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Consensus	(1)	MSGKATKGGPTTRSGSFALARKINNTTPPAGFVVKQTPGGSSKSVSEWHLHGPNVFKRFRGMRTSENLTIVNSTAGVYITMK	
Atabey 1	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	86
Gönen 1	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	170
Keçiborlu 10	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
Senirkent 26	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
Senirkent 2	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
Atabey 17	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
GU066793 Italya-Kiraz	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
GU181400 Polanya-Kiraz	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
Yalvaç 3	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
Merkez 4	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
Senirkent 108	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
Sarkikaraağaç 15	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
Gelendost 1	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
Uluborlu 30	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
Keçiborlu 8	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
Senirkent 119	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
Gönen 9	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
Keçiborlu 7	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
GU066792 ABD-Kiraz	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
GU066796 İsraill-Kiraz	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
Merkez 1	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
GU066795 Italya-Badem	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
GU181399 Italya-Vişne	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
GU187047 Polanya-Seftali	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
GU181404 Italya-Vişne	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
GU066786 Polanya-Vişne	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
GU066791 Polanya-Kiraz	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
GU066798 Almany-Seftali	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
GU181405 Polanya-Vişne	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
Uluborlu 79	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
Merkez 27	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
Senirkent 150	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
Sarkikaraağaç 12	(86)	IELFKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
Consensus	(86)	VRELKDFSDTKVYGIVFRYCLDVSNVYGLIKGFDNAPVAPNPLQRRKFTARQASGVQILAPGTGVGDPDDLFWFIKYDN	
Atabey 1	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	171
Gönen 1	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	218
Keçiborlu 10	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
Senirkent 26	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
Senirkent 2	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
Atabey 17	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
GU066793 Italya-Kiraz	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
GU181400 Polanya-Kiraz	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
Yalvaç 3	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
Merkez 4	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
Senirkent 108	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
Sarkikaraağaç 15	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
Gelendost 1	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
Uluborlu 30	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
Keçiborlu 8	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
Senirkent 119	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
Gönen 9	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
Keçiborlu 7	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
GU066792 ABD-Kiraz	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
GU066796 İsraill-Kiraz	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
Merkez 1	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
GU066795 Italya-Badem	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
GU181399 Italya-Vişne	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
GU187047 Polanya-Seftali	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
GU181404 Italya-Vişne	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
GU066786 Polanya-Vişne	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
GU066791 Polanya-Kiraz	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
GU066798 Almany-Seftali	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
GU181405 Polanya-Vişne	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
Uluborlu 79	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
Merkez 27	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
Senirkent 150	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
Sarkikaraağaç 12	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	
Consensus	(171)	AEQGVVPWFCTQVLRSMKRVETPDVLYAERDTALMDAMDKIVSG	

Şekil 4.16. PDV kılıf protein genlerinin amino asit dizimlerine ait çoklu dizi karşılaştırması

4.8. Filogenetik Analiz

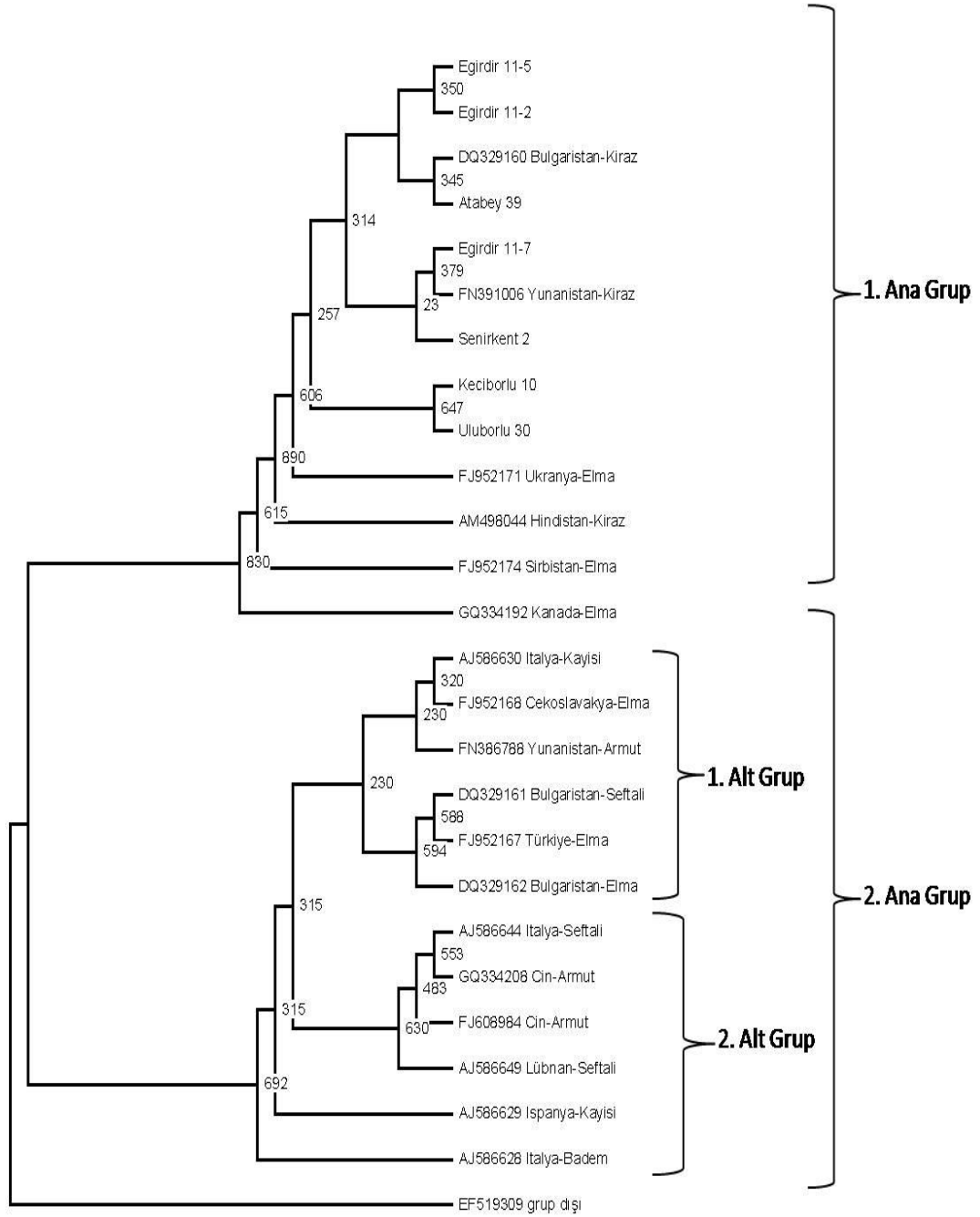
4.8.1. *Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)* filogenetik analizi

Gen bankası veri tabanlarında dünyanın farklı yumuşak ve sert çekirdekli meyve üretim alanlarından elde edilen 18 farklı izolatın kılıf protein genlerine ait nükleotid ve amino asit dizileri kullanılarak, Isparta ili'ne ait 7 izolat ile karşılaştırılmış ve filogenetik analizler yapılmıştır. ACLSV izolatlarının nükleotid dizilimine göre oluşturulan filogenetik soy ağacı Şekil 4.17'de verilmiştir. Nükleotid dizileri kullanılarak yapılan filogenetik analizler sonucunda izolatların genetik ilişkisi belirlenmiştir. Bu analizlere göre karşılaştırmalarda kullanılan birbirine yakın genetik ilişki gösteren 2 ana grup belirlenmiş, ikinci ana grup da 2 alt gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan birincisi on üç izolat, ikinci ana grubun birinci ve ikinci alt grupları da 6'şar izolat içermiştir. Oluşturulan soy ağaçlarının dalları 142-997 arasında değişen bootstrap değerleriyle desteklenmekte olup tesadüfi olmadığı ve soy ağacındaki dallardan çoğunun istatistiksel açıdan desteklendiğini göstermiştir. Isparta'daki ve dünyadaki tüm kiraz izolatları birinci ana grupta toplanırken ikinci ana grupta yumuşak ve sert çekirdekli ACLSV izolatları karışık olarak yer almıştır. Bu da kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimlerine göre yapılan filogenetik analizlerde izolatların coğrafik bölgelere ve konukçu izolatlarına göre gruplandığını göstermiştir.



Şekil 4.17. Dünyadaki ACLSV izolatları ile Isparta ili'ndeki ACLSV izolatlarının kılıf protein geni nükleotid dizi karşılaştırmalarının TreeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı

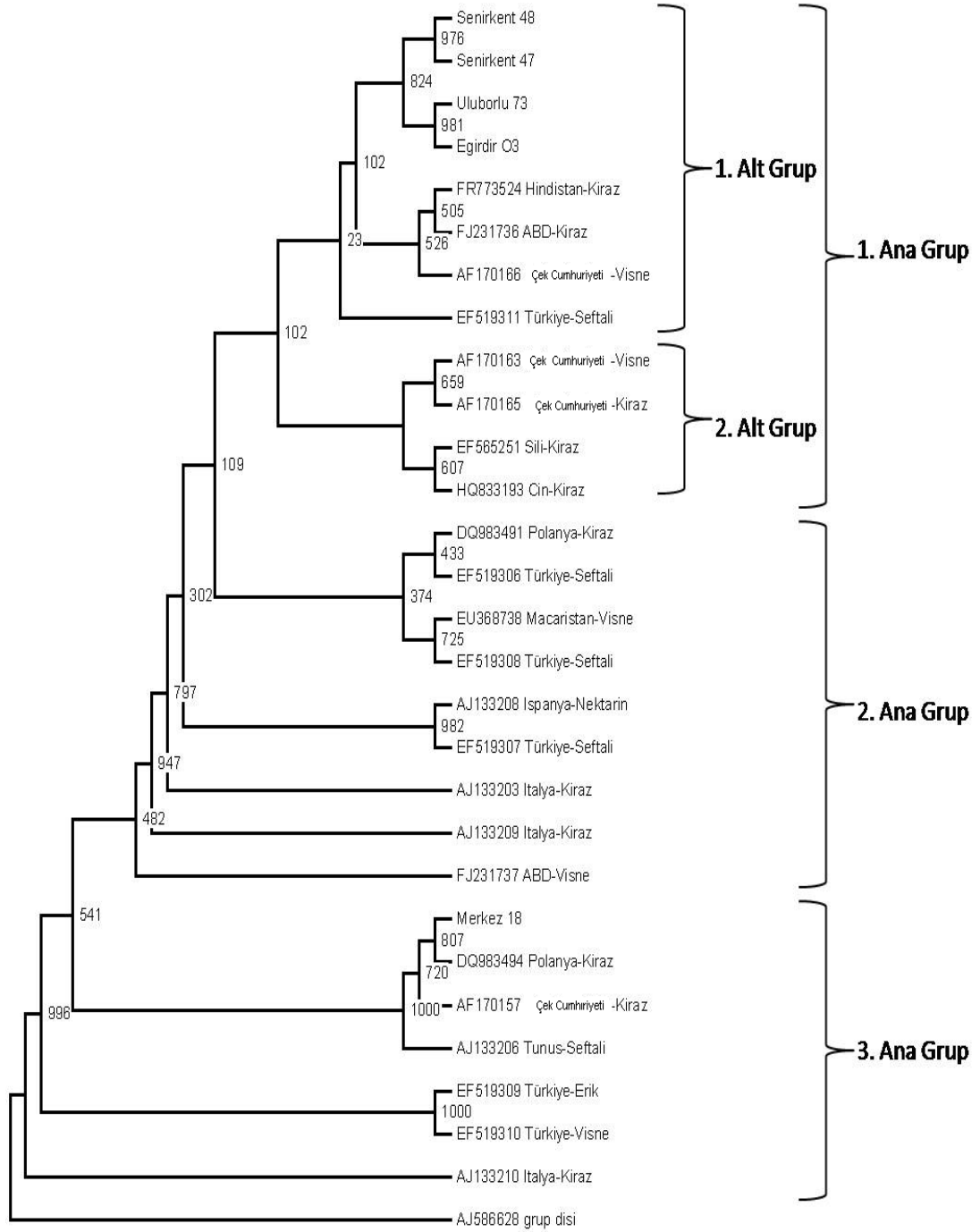
Gen bankası veri tabanlarında dünyanın yumuşak ve sert çekirdekli meyve üretim alanlarından elde edilen 18 farklı izolatın kılıf protein genlerine ait amino asit dizileri kullanılarak, Isparta ili'ne ait 7 izolat ile karşılaştırılmış ve filogenetik analizler yapılmıştır. Amino asit dizilimi kullanılarak yapılan filogenetik analizler sonucunda da nükleik asit dizileriyle oluşturulan soy ağacına benzer bir soy ağacı elde edilmiştir. Bu analizlere göre birbirine yakın ilişki gösteren 2 ana grup belirlenmiş, ikinci ana grup da 2 alt gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan birincisi 13 izolat, ikinci ana grubun birinci ve ikinci alt grupları da 6 şar izolat içermiştir. Oluşturulan soy ağaçlarının dalları 23-890 arasında değişen bootstrap değerleriyle desteklenmekte olup tesadüf olmadığı ve soy ağacındaki dallardan çoğunun istatistiksel açıdan desteklendiğini göstermiştir. Ispartadaki ve dünyadaki tüm kiraz izolatları birinci ana grupta toplanırken ikinci ana grupta yumuşak ve sert çekirdekli ACLSV izolatları karışık olarak yer almıştır. Bu da kılıf protein genlerinin amino asit dizilimlerine göre yapılan filogenetik analizlerde izolatların coğrafik bölgelere ve konukçu izolatlarına göre gruplandığını göstermiştir. Amino asit dizilimine göre oluşturulan filogenetik soy ağacı Şekil 4.18'de gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Dünyadaki ACLSV izolatları ile Isparta ili ACLSV izolatlarının kılıf protein geni amino asit dizi karşılaştırmalarının TreeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı.

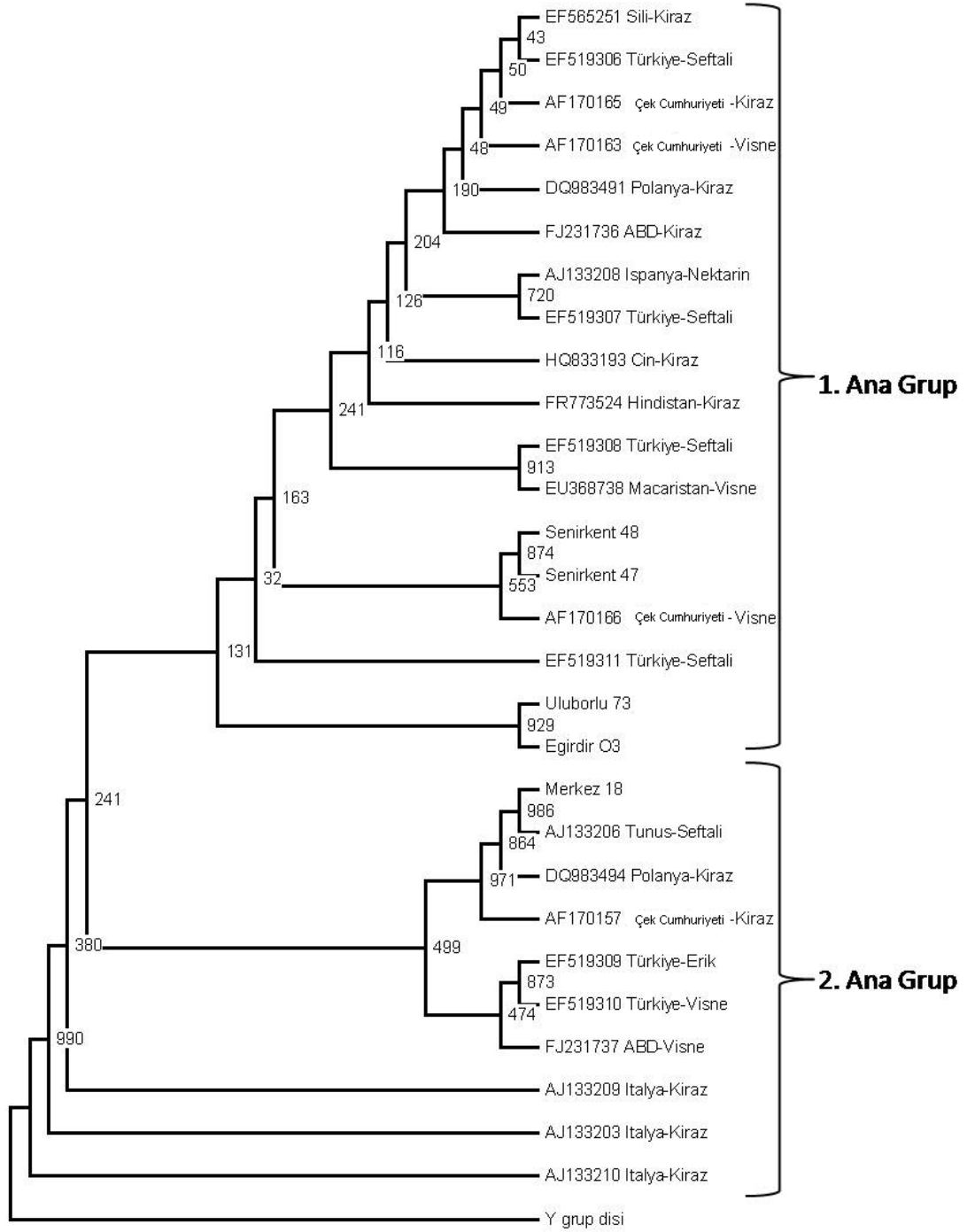
4.8.2. *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV) filogenetik analizi

Gen bankası veri tabanlarında dünyanın farklı sert çekirdekli meyve üretim alanlarından 17 ve Türkiye’den elde edilen 6 farklı izolatın kılıf protein genlerine ait nükleotid ve amino asit dizileri kullanılarak, Isparta ili’ne ait 5 izolat ile karşılaştırılmış ve filogenetik analizler yapılmıştır. Nükleotid dizilimine göre oluşturulan filogenetik soy ağacı Şekil 4.19’da verilmiştir. Nükleotid dizileri kullanılarak yapılan filogenetik analizler sonucunda izolatların genetik ilişkisi belirlenmiştir. Bu analizlere göre birbirine yakın ilişki gösteren 3 ana grup belirlenmiştir. Bu gruplardan birinci ana grup 2 alt gruba ayrılmıştır. Oluşturulan soy ağaçlarının dalları 23-1000 arasında değişen bootstrap değerleriyle desteklenmekte olup tesadüfi olmadığı ve soy ağacındaki dallardan çoğunun istatistiksel açıdan desteklendiğini göstermiştir. Isparta izolatlarının 4’ü 1. ana grubun ilk alt grubunda yer alırken diğer izolat 3. ana grupta yer almıştır. Isparta izolatlarının yer aldığı grupta dünyanın farklı bölgelerinden temin edilen kiraz ve vişne izolatları ağırlıklı olarak yer almıştır. Türkiye şeftali izolatlarının 3’ü 2. ana grupta yer alırken Türkiye vişne ve erik izolatları 3. ana grupta yer almıştır. Bu da kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimlerine göre yapılan filogenetik analizlerde izolatların coğrafik bölgelere ve konukçu türüne göre gruplanmadığını göstermiştir.



Şekil 4.19. Dünyadaki PNRSV izolatları ile Isparta ili'ndeki PNRSV izolatlarının kılıf protein geni nükleotid dizi karşılaştırmalarının TreeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı

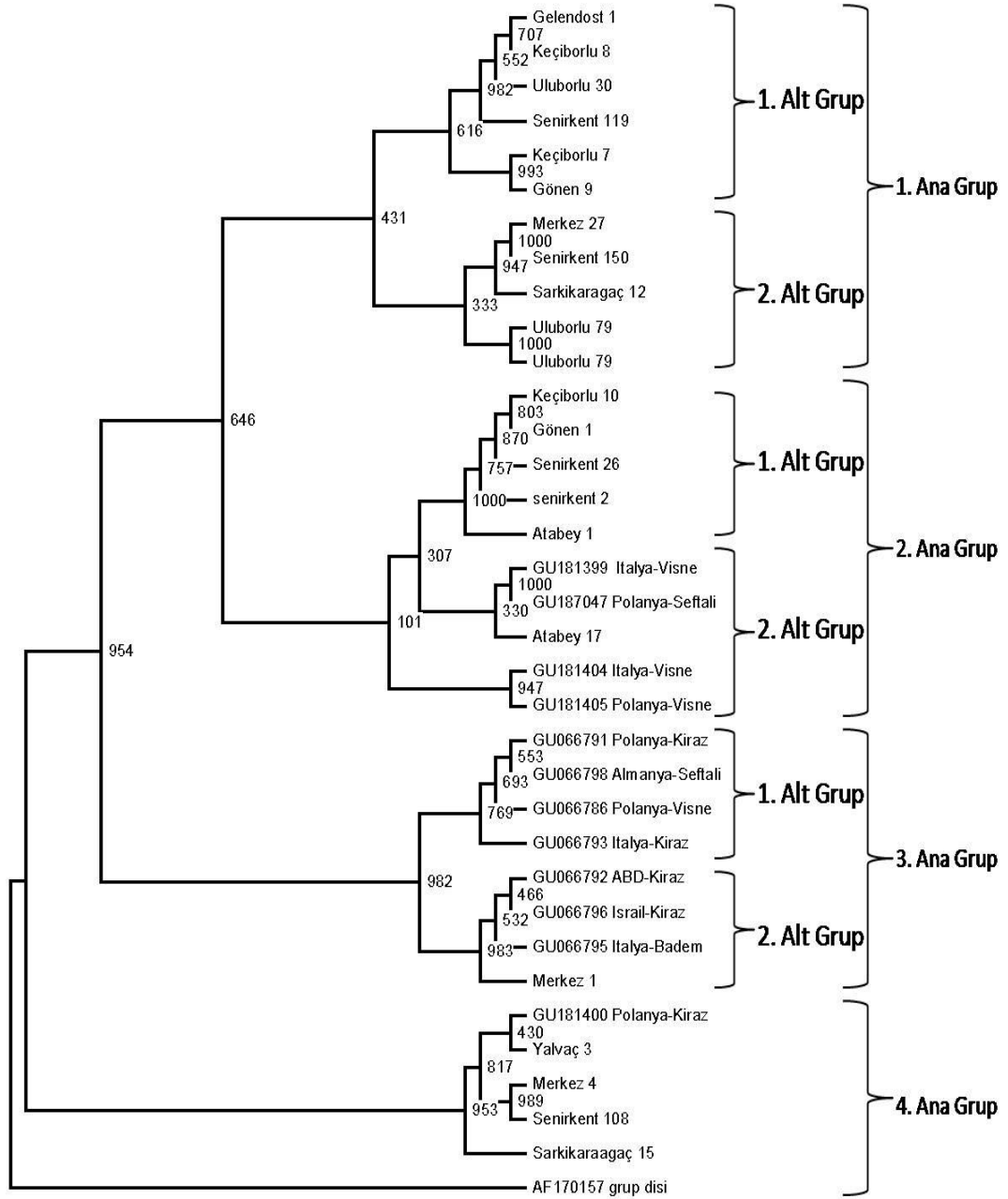
Gen bankası veri tabanlarında dünyanın farklı sert çekirdekli meyve üretim alanlarından 17 ve Türkiye’den elde edilen 6 farklı izolatın kılıf protein genlerine ait amino asit dizileri kullanılarak, Isparta ili’ne ait 5 izolat ile karşılaştırılmış ve filogenetik analizler yapılmıştır. Amino asit dizilimine göre oluşturulan filogenetik soy ağacı Şekil 4.20’de verilmiştir. Amino asit dizileri kullanılarak yapılan filogenetik analizler sonucunda izolatların genetik ilişkisi belirlenmiştir. Bu analizlere göre birbirine yakın ilişki gösteren 2 ana grup belirlenmiştir. Oluşturulan soy ağaçlarının dalları 43-990 arasında değişen bootstrap değerleriyle desteklenmekte olup tesadüfî olmadığı ve soy ağacındaki dallardan çoğunun istatistiksel açıdan desteklendiğini göstermiştir. Isparta izolatlarının 4’ü 1. ana grupta yer almıştır. Isparta izolatlarının yer aldığı grupta dünyanın farklı bölgelerinden temin edilen sert çekirdekli meyve izolatları ve Türkiye şeftali izolatları yer almıştır. Merkez 18 izolatı diğer Isparta izolatlarından ayrılarak 2. Ana grupta Türkiye erik ve vişne izolatlarıyla beraber yer almıştır. İtalya kiraz izolatları oluşturdukları bootstrap değerleriyle herhangi bir grup içinde yer almamışlardır. Amino asit dizilimi kullanılarak yapılan filogenetik analizlere göre izolatların coğrafik bölgelere ve izolat çeşidine göre gruplanmadığını göstermiştir.



Şekil 4.20. Dünyadaki PNRSV izolatları ile Isparta ili PNRSV izolatlarının kılıf protein geni amino asit dizi karşılaştırmalarının TreeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı

4.8.3. *Prune dwarf virus* (PDV) filogenetik analizi

Gen bankası veri tabanlarında dünyanın farklı sert çekirdekli meyve üretim alanlarından elde edilen 12 farklı izolatın kılıf protein genlerine ait nükleotid ve amino asit dizileri kullanılarak, Isparta ili'ne ait 22 izolat ile karşılaştırılmış ve filogenetik analizler yapılmıştır. Nükleotid dizilimine göre oluşturulan filogenetik soy ağacı Şekil 4.21'de verilmiştir. Nükleotid dizileri kullanılarak yapılan filogenetik analizler sonucunda izolatların genetik ilişkisi belirlenmiştir. Bu analizlere göre birbirine yakın ilişki gösteren 4 ana grup belirlenmiş, ana gruplar da alt gruplara ayrılmıştır. Birinci ana grup 2 alt gruba ayrılmış olup burada sadece Isparta izolatları toplanmıştır. İkinci ana grup da 2 alt gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan 1. alt grupta Isparta izolatları, 2. alt grupta İtalya ve Polanya izolatları yer almıştır. Üçüncü ana grupta 2 alt gruba ayrılmıştır. Bu grup dünyanın farklı bölgelerinden elde edilen sert çekirdekli izolatlar yer almıştır. Isparta izolatlarından Merkez 1 izolatı tek başına bu izolatlar içerisinde yer almıştır. Dördüncü ana grup alt gruplara ayrılmamış olup, dünya izolatlarından Polanya kiraz izolatı Isparta izolatlarıyla bu grupta toplanmıştır. Bu dağılımda coğrafik bölgelere göre sınıflama mümkün olmamakta, izolatların bölgelere bağlı olmaksızın grup oluşturdıkları belirlenmiştir. Nükleotid dizilimine göre oluşturulan filogenetik soy ağacı Şekil 4.21'de verilmiştir.



Şekil 4.21. Dünyadaki PDV izolatları ile Isparta ili'ndeki PDV izolatlarının kılıf protein geni nükleotid dizi karşılaştırmalarının TreeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı

Amino asit dizilimi kullanılarak yapılan filogenetik analizler sonucunda da nükleik asit dizileriyle oluşturulan soy ağacına benzer bir soy ağacı elde edilmiştir (Şekil 4.22.). Bu analizlere göre birbirine yakın ilişki gösteren 5 ana grup belirlenmiştir. Birinci ana grup 2 alt gruba ayrılırken 1. alt grupta Avrupa izolatları yer alırken 2. alt grupta Isparta izolatları yer almıştır. İkinci ana grup 3 alt gruba ayrılmış, bunlardan 1. Alt grupta ABD, İtalya, İsrail ve Merkez 1 izolatı yer almış, 2. alt grupta sadece Avrupa izolatları toplanmış, 3. alt grupta sadece 2 Isparta izolatı bulunmuştur. Üçüncü ve diğer ana gruplar alt gruplara ayrılmamıştır. Amino asit dizilimi kullanılarak yapılan filogenetik analizler izolatların coğrafik bölgelere ve izolat çeşidine göre gruplanmadığını göstermiştir.



Şekil 4.22. Dünyadaki PDV izolatları ile Isparta ili PDV izolatlarının kılıf protein geni amino asit dizi karşılaştırmalarının TreeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan bu çalışmada Türkiye'nin kiraz üretiminde önemli bir yere sahip olan Isparta ilinin 10 farklı kiraz üretim alanında sert çekirdekli meyvelerde en yaygın olarak görülen 6 virüsün varlığı DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile araştırılmış, belirlenen izolatların biyolojik ve moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Isparta ilinin farklı bölgelerini temsil edecek bazı virüs izolatların tüm veya kısmi CP gen dizilimleri belirlenmiş tespit edilen CP gen dizileri Gen Bankası veri tabanında bulunan ülkemizin ve dünyanın diğer üretim bölgelerinde elde edilen virüs izolatların CP genleri ile karşılaştırılarak izolatların genetik benzerliği ve filogenetik ilişkisi araştırılmıştır. Ülkemizde sert çekirdekli meyvelerde görülen virüslerin varlığı ile daha önce ilgili pek çok çalışma yapılmıştır (Azeri, 1994; Yıldızgördü and Çalı, 1994; Elilibüyük ve Erdiler, 1998; Gazel ve Çağlayan, 1998; Fidan ve Özdemir, 2000; Ulubaş and Ertunç, 2004; Sertkaya et al., 2004; Sipahioğlu vd., 2004; Gümüş and Paylan, 2008; Çevik et al., 2011). Ancak yapılan çalışmalar çoğunlukla virüslerin teşhisi ve tespiti düzeyinde kalmış ve özel olarak bir meyve türüne odaklanılmamıştır. Bu nedenle kiraz üretiminin yoğun olarak yapıldığı ülkemizde ve Isparta ilindeki kirazlarda hastalığa yol açan virüs izolatların biyolojik ve moleküler karakterizasyonu konusunda yapılan çalışmalar sınırlı ve eksik kalmıştır. Bu çalışma Isparta ilindeki kiraz üretim alanlarında bulunan virüslerin belirlenmesi ve elde edilen virüs izolatlarının kılıf protein gen dizilimlerinin belirlenmesi konusunda yapılan ilk kapsamlı çalışmadır.

Isparta ili'nin survey yapılan 10 ilçesinden toplam 142 bahçeden 521 kiraz örneği alınmıştır. DAS-ELISA sonuçlarına göre 269 örnekte PDV(%51.6), 23 örnekte ACLSV(%4.41), 7 örnekte PNRSV(%1.3), 48 örnekte (%9.1) iki virüsle, 3 örnekte (%0.4) üç virüsle karışık enfeksiyon halinde bulunmuştur. En sık görülen virüs PDV olurken bunu karışık enfeksiyonlar ve ACLSV takip etmiştir. Yapılan testlemelerde PPV ve CLRV hiçbir örnekte tespit edilememiştir. Serolojik testler sonucunda elde edilen bulgular, daha önce Akdeniz ülkelerinde, Myrta vd. (2003)'nin, İzmir'de Paylan (2006)'ın, ve Çevik vd. (2011)'nin Ispartada yapılan tüm sert çekirdekli meyveleri kapsayan çalışmalarında elde edilen PDV'nin en sık görülen virüs olduğu,

kirazda PPV, CLRV ile ApMV'nin bulunmadığı verileri ile paralellikler göstermiştir. Akdeniz ülkelerinde yapılan araştırmalarda enfekteli örneklerin çoğunluğunun PDV (%67.2), bunu karışık enfeksiyonlar (%13.0), ACLSV (%10.6) ve PNRSV (%5.9) takip etmiştir (Myrta et al., 2003). İzmir'de kirazda yapılan çalışmada 400 örneğin 51'inde PDV, 11'inde ACLSV, 24'ünde PNRSV ve 3'ünde de birden çok virüs tespit edilmiştir. Testlenen 400 örnekte CLRV, PPV ve ApMV enfeksiyonları saptanmamıştır. Daha önceki Isparda'da yapılan çalışmada ise ELISA sonuçlarına göre ApMV ve PPV tespit edilemezken, PDV, ACLSV ve PNRSV ile enfekteli örnek sayısı ve yüzdesi sırasıyla 46 (%26.3), 24 (%13.7), 16 (%9.1) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 9 kiraz ağacında 2 veya 3 virüsle enfekteli karışık enfeksiyonlar tespit edilmiştir. PDV'nin %26,3 ile en yaygın virüs olduğu ortaya çıkmıştır. Bu çalışmanın bulguları kiraz ağaçlarında ACLSV, PNRSV ve PDV dahil olmak üzere bir veya daha fazla virüs ile enfekte olduklarını ortaya çıkarmıştır (Çevik et al., 2011). Daha önce Türkiye de yapılan pek çok çalışmada da karışık enfeksiyonlar belirlenmiştir (Baloğlu vd., 1995; Elibüyük ve Erdiller, 1998; Gazel ve Çağlayan, 1998; Sipahioglu et al., 1999; Fidan ve Özdemir, 2000; Ulubaş and Ertunç, 2005; Paylan, 2006; Çevik et al., 2011). Örnek alınan kiraz çeşitleri çoğunlukla 0900 Ziraat olup, bunun yanında Starks Gold (Beyaz Kiraz) ve Sweet Heart çeşitlerinden de örnekler test edilmiş ve yapılan ELISA sonuçlarına göre çeşitler arasında virüs belirtileri ve virüs türleri arasında bir ilişki olmadığı ortaya çıkmıştır. PDV, ACLSV ve PNRSV virüslerinin ticari bahçelerde, özel ve resmi fidanlıklarda yaygın olduğu ve bulaşmaların denetimsiz ve kontrolsüz fidanlar ve üretim materyallerinden kaynaklandığı görülmüştür.

ApMV, CLRV ve PPV'nin kirazlarda hastalık yapabileceği bildirilmesine (Nemeth 1986; Baumgartnerova, 1996; Sutic et al. 1999; Rebenstorff et al., 2006) rağmen örneklerin hiç birinde tespit edilememiştir. DAS-ELISA sonuçlarına göre sadece 3 örnekte düşük yoğunlukta ApMV tespit edilmiş ancak aynı örnekler RT-PCR testlerinde negatif sonuç vermiştir. Bu sonuçlar ApMV, CLRV ve PPV'nin çalışılan hiç bir örnekte tespit edilememesi, bu virüslerin Isparta ilinde yetiştirilen kirazlarda bulunmadığını ortaya koymaktadır. Buna karşın ApMV yumuşak çekirdekli meyvelerden özellikle elmada hem ülkemiz genelinde ve Isparta ilinde (Yardimci

and Eryiğit, 2005; Uludağ, 2007) yaygın olmasına rağmen virüs sert çekirdekli meyvelerde tespit edilememiştir. Bunun sebebi olarak sert çekirdekli meyveleri enfekte eden ApMV ırklarının ülkemizde (Isparta) bulunmadığı düşünülmektedir. Aynı şekilde CLRV ülkemizde, ceviz ve zeytin ağaçlarında görülürken (Beler and Acikgoz, 2005; Ozturk et al., 2008) kirazda çok yaygın olmaması, polenle ve nematodlarla da taşınabilen bu virüsün polen uyumsuzluğu göstemesi ve kiraz bahçelerinin ceviz ve zeytin bahçeleri ile bir arada kurulmaması veya kirazı enfekte eden CLRV ırklarının ülkemizde bulunmaması olarak düşünülmektedir. PPV Türkiye'de yapılan çalışmalarda sert çekirdekli meyvelerden şeftali, erik ve kayısıda tespit edilmesine rağmen (Elibüyük ve Erdiller, 1991; Elibüyük, 2003; Caglayan et al., 2004; Çevik vd., 2007; Akbaş et al., 2011) ülkemizde kirazlarda tespit edilememiş ve genellikle dünyanın ana üretim bölgelerinde kiraz ağaçları ile ilişkili olmadığı ve sadece bir kaç yerde birkaç kez bulunduğu belirlenmiştir (Kalashyan et al., 1994; Crescenzi et al., 1997).

Dünyada ve ülkemizde kiraz ağaçlarında en yaygın olarak bulunan PDV'nin bitkilerde oluşturduğu simptomların bitki türüne, virüs ırkına ve sıcaklığa bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (Diekmann and Putter, 1996). PDV ile bulaşık ağaçların yapraklarında küçülme ve daralma, damar bölgesinde kırışma, sürgün aralarında kısalma özellikle kiraz yapraklarında klorotik halka ve lekeler meydana gelmektedir (Nemeth, 1986; Sutic et al., 1999). Yapılan gözlemlerde Isparta bölgesindeki kiraz ağaçlarında en sık görülen PDV belirtisinin yapraklarda klorotik halka, lekeler ve damar bölgesinde kırışma olduğu belirlenmiştir. PNRSV'nin oluşturduğu en tipik belirti ise yapraklarda saçma deliği ve yaprak kenarlarındaki testere dişlilik olarak görülmüştür. Bu belirtiler tipik olarak başka kiraz üretim bölgelerinde de görülmüştür (Paylan, 2006;Ulubaş et al., 2009).

ACLSV'nin kiraz ve vişnenin birçok çeşidinde belirti vermeden bulunmasına rağmen PNRSV ile birlikte meyvelerde nekrotik ve çökük lekeler şeklinde belirtilere neden olduğu belirtilmiştir (Dosba et al., 1986; Desvignes and Boye, 1989). Bu çalışmada örneklerin erken ilkbaharda alınmış olmasından dolayı meyveler üzerinde belirtilen bu simptomların gözlemlenemediği düşünülmektedir. ACLSV yapraklarda tek başına

herhangi bir belirti oluşturmamasına rağmen genellikle karışık enfeksiyonlarda PDV ve PNRSV'ye has belirtiler ortaya çıkmıştır. Örnek alınan bazı ağaçlarda simptomların biri bulunurken bazı ağaçlarda ise birden çok simptom aynı anda gözlemlenmiştir. Daha sonra yapılan testlerde hiç simptom göstermeyen bazı örneklerin bile yoğun miktarda virüsle bulaşık olduğu ortaya çıkmıştır. Bunun nedeni olarak testlenen virüslerin ırklarından farklı bir ırkın bitkide bulunmasından dolayı çapraz koruma olması veya virüslerin belirti vermeden latent olarak kalması olduğu düşünülmektedir. Buna benzer bir sonuç Uyemoto vd. (1989),’nin yaptıkları çalışmada elde etmişlerdir. Bu araştırmacılar PDV ve PNRSV ile enfekteli ağaçların aynı bahçede bulunan sağlıklı ağaçlar gibi normal göründüklerini saptamışlardır. Pek çok virüsün bitkide düzensiz olarak dağıldığı ve en uygun tespit edilme dönemlerinin aktif gelişme dönemi olduğundan dolayı (Dal Zotto et al., 1999) virüs testlemeleri için örnekler erken ilkbaharda alınmıştır.

Dünyada ve Ülkemizde yapılan pek çok çalışma ELISA’nın hala sert çekirdekli meyve virüslerinin tespitinde en yaygın olarak kullanılan test olduğunu ortaya koymuştur. (Azeri, 1994; Yıldızgördü and Çalı, 1994; Elibüyük ve Erdiller, 1998; Gazel ve Çağlayan, 1998; Ismaeil et al., 2003; Myrta et al., 2003; Ulubaş and Ertunç, 2004; Sertkaya et al., 2004; Sipahioğlu vd., 2004; Gümüş and Paylan, 2008; Aneliya, 2005; Mandic et al., 2007; Myrta and Savino, 2008; Akbaş et al., 2011; Çevik et al., 2011). Yaptığımız bu çalışma da erken ilkbahar döneminde PDV, PNRSV ve ACLSV’nin tespitinde alınan örneklerde DAS-ELISA yönteminin bazı olumsuzluklarına rağmen rahatlıkla kullanılabileceğini göstermiştir.

RNA izolasyonu ve moleküler çalışmalar için bitki örneklerinin bir kısmı -80°C de muhafaza edilirken bir kısmı da kurutma yöntemiyle 4°C saklanmıştır. Sipahioğlu vd. (2006), yaptıkları çalışmada yaprak örneklerinin kurutularak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada örneklerin toplanmasından 2-3 ay sonrasında -80°C’de dondurulan ve kurutularak 4°C de saklanan yapraklar RNA izolasyonunda başarılı bir şekilde kullanılmış, RNA miktarı ve kalitesi açısından iki farklı saklama koşulu arasında bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Ancak kurutularak 4°C saklamak

gerek uygulama kolaylığı gerekse makine teçhizat gerektirmemesi bakımından daha uygun görülmektedir.

Nükleik asit izolasyonunda One Step-RNA izolasyon yöntemi, CTAB nükleik asit izolasyon yöntemi ve Qiagen RNeasy Plant Mini Kit kullanılarak 3 farklı metod uygulanmıştır. One Step-RNA izolasyon yöntemi ile hiçbir örnekte RNA elde edilmezken CTAB nükleik asit izolasyon yöntemi ve Qiagen RNeasy Plant Mini Kit ile RNA'lar elde edilmiştir. One Step-RNA izolasyon yönteminde örneklerin büyük bir çoğunluğunda pembe-kırmızı renkte pelet oluşumu gözlenmiş bu durum bu yöntemin kirazdaki fenolik bileşikler temizleyemediği kanaatini oluşturmuştur. Li vd. (2008)'nin CTAB ve RNeasy kitinin RNA kalite ve miktarını tespit etmek için yaptıkları bir çalışmada da kirazın yüksek miktarda polisakkarit içermesine rağmen her iki metod'un uygulanabildiğini belirlemişlerdir. Daha önce yapılan çalışmalarda genellikle benzer yöntemler kullanılmakla birlikte en yaygın kullanılan yöntem silika jel yöntemi (Boom et al., 1990; Rott and Jelkman 2001) olmuştur. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar CTAB gibi uygulaması kolay ve maliyeti düşük bir yöntemin de kirazda virüs tanısında kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Yapılan mekanik inokulasyon çalışmalarında PNRSV ve ACLSV izolatları hiçbir otsu test bitkisinde herhangi bir symptom oluşturmamıştır. PDV'nin Merkez 1 izolatı *Chenopodium amaranticolor*, *C. Quinoa* ve *Cucumis sativus* bitkilerinde hiçbir belirti oluşturmazken, *Nicotiana occidentalis* bitkisinde yapraklarda küçülme, şekil bozukluğu ve klorotik lezyonlar gibi değişik symptomlar oluşturduğu gözlemlenmiştir. Dunez (1988), *C. quinoa* ile *C. amaranticolor* adlı bitkileri otsu indikatör olarak kullanmış, odunsu bitkilerden otsu bitkilere mekanik inokulasyonu %2.5'lik nikotin solüsyonu ile gerçekleştirmiştir ve bu bitkilerde yapraklarda renk değişikliği ve şekil bozukluğu gibi belirtiler saptamıştır. Bir başka çalışmada da Paylan (2006), *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *C. sativus* ve *G. globosa*'ya yapılan mekanik inokulasyonlar sonucunda yapraklarda renk değişiklikleri, şekil bozuklukları, beneklenmeler gibi belirtiler tespit etmiştir. Hurigil-Gazel (1997), sert çekirdekli meyvelerde yaptığı bir çalışmada mekanik inokulasyon denemelerinde *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *C. sativus*, *N. benthamiana* ve *N. clevelandii* test

bitkilerinden sadece *C. sativus* PDV, PNRSV ve ApMV ile enfekte olabilmıştır. Yürektürk (1984), ile Koç ve Baloğlu (2004) yaptıkları çalışmalarda sert çekirdekli meyvelerde tespit ettikleri virüsleri GF-305 anacına aşısı ile enfekte ederek tespit etmişlerdir. Ancak bizim yaptığımız çalışmada odunsu indikatör bitkilere göz aşısı ile yapılan inokülasyon işlemlerinde GF 305'e yapılan göz aşısının hiç birisinin tutmadığı belirlenmiştir. Bing kiraz çeşidine yapılan inokülasyon çalışmalarında PDV'ye ait herhangi bir belirleyici simptom görülmemiştir. Eğirdir 11-5 izolatu ACLSV izolatu , Bing kiraz çeşidine yapılan inokülasyon çalışmalarında yapraklarda damar aralarında sararma, kırışıklık ve yapraklarda dişlilik gibi belirtiler oluştururken, Eğirdir 3503 PNRSV izolatının ise klorotik lekeler meydana getirdiği belirlenmiştir. PDV'nin odunsu bitkilerde belirti oluşturmamasının veya çok hafif görülmesinin nedenleri Turgut (2008) tarafından indeksleme çalışma koşullarının yeterli uygunlukta olamaması, dokularda virüs konsantrasyonunun çok düşük olması veya çok ılımlı ırkların bölgede bulunması ve gözlem süresinin yetersiz kalması olabileceğini öne sürmüştür. Bu çalışmada aşılama çalışmalarının Ağustos ayında hava sıcaklıklarının yüksek olduğu dönemde başlamış olması, bitkilerin yeteri kadar büyümemesinin virüs konsantrasyonunu azalttığı düşünülmektedir. Bu amaçla tez çalışması sonlanmasına rağmen söz konusu indeks bitkilerde gözlem yapılmaya devam edilmesine karar verilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda her iki hastalık etmeninin biyolojik yöntemlerle teşhis edilebildiği, fakat bu test çalışmalarının büyük işgücü ve fazla zaman gerektirdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlarda serolojik ve moleküler çalışmaların virüs tanılanmasında çok daha hassas olduğu ve daha kısa zamanda daha kesin sonuçlar verdiği bir kez daha gösterilmiştir. Ancak kullanılan otsu bitkilerin bir veya bir kaçında bile hastalık belirtilerinin görülmesi ve daha sonra bu bitkilerden PDV, PNRSV ve ACLSV'nin çoğaltılması Isparta ili kiraz üretim alanlarından elde edilen virüs izolatlarının biyolojik olarak aktif olduklarını göstermiştir.

Isparta ili'nde farklı kiraz üretim alanlarından alınan izolatlar kılıf protein genlerinin nükleotit ve amino asit dizileri dünyanın diğer ACLSV izolatları ile karşılaştırıldıklarında sırasıyla %80-98 ve %88-%100 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Nükleotid dizilerine göre Eğirdir izolatları

Yunanistan ve Bulgaristan'dan kiraz izolatları ile genetik olarak en yakın izolat olarak belirlenmiştir. Nükleotid dizilerinin benzerliğinde olduğu gibi amino asit diziliminde de Yunanistan ve Bulgaristan izolatları en fazla benzerliğe sahip olurken Hindistan kiraz ve Ukranya elma izolatları en fazla ikinci benzerliği göstermiştir. Bunun yanında İtalya badem izolatı Uluborlu 30 izolatıyla en az benzerliği göstermiştir. Isparta ACLSV izolatlarının komşumuz olan Yunanistan ve Bulgaristan izolatlarıyla yakın ilişki içinde olması bu izolatların bölgesel olarak yayıldığını ve virüs bulaşma materyallerinin buradan ülkemize geçtiği, kiraz ihracatı yaptığımız Ukrayna'ya da virüsün ülkemizden geçtiği düşünülmektedir. İspanya-Kayısı ve İtalya-Badem izolatlarıyla olan genetik uzaklığın konukçu hassasiyetinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak Hindistan'da yapılan, Türkiye'den de iki şeftali izolatının yer aldığı çalışmada Hindistan'dan ACLSV'li şeftali izolatlarının gen bankasındaki diğer izolatlarla karşılaştırılmasında Türk izolatları, Hindistan izolatları ile ayırt edici bir benzerlik veya farklılık ortaya koymazken en yakın ilişkiyi İtalya-Şeftali izolatlarıyla göstermiştir (Rana et al., 2009). Türkiye'den iki şeftali ve bir kiraz izolatı, Gen Bank'ta yer alan dünyanın farklı bölgelerindeki diğer ACLSV izolatı ile karşılaştırılmıştır. Amasya-Kiraz izolatının nükleotid ve aminoasit dizilimlerinin en fazla benzerliği Polanya ve Macaristan izolatları ile olurken en az benzerliği sırasıyla Çin ve Japonya izolatları arasında olmuştur (Ulubas Serce and Rosner, 2006). Bu çalışma diğer çalışmalar incelendiğinde sonuçların birbirleri ile paralellik arzettiği, Isparta ACLSV izolatlarının coğrafik bölgeye göre gruplandığı ve Avrupa kaynaklı olabileceğini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca ACLSV izolatlarının elde edildikleri konukçular yönünden aralarında bir bağlantıları olduğu belirlenmiştir. Coğrafik açıdan birbirine yakın bölgede benzer izolatların bulunması virüsün üretim materyalleriyle yayıldığına işaret etmektedir.

Isparta PNRSV izolatlarının dünyanın diğer PNRSV izolatları ile karşılaştırıldığında kılıf protein genlerinin nükleotid ve amino asit diziliminde sırasıyla %86-99 ile %89-100 oranları arasında benzerlik olduğu belirlenmiştir. Isparta izolatları en fazla benzerliği Çek Cumhuriyeti, Polanya, ABD, Şili kiraz, Çek Cumhuriyeti vişne ve Türkiye'den Türkiye şeftali izolatlarıyla gösterirken, en az benzerliği ise İtalya'dan kiraz izolatı ile göstermiştir. Isparta izolatlarının dünyanın diğer PNRSV izolatları ile

amino asit benzelikleri karşılaştırıldıklarında Merkez 18 izolatu Tunus şeftali ve Polanya kiraz izolatu ile en fazla benzerlik gösteren izolat olmuştur. Amino asit dizilimi bakımından nükleotid diziliminde olduğu gibi İtalya kiraz izolatu ile en az benzerliği göstermiştir. Yaptığımız çalışma Isparta PNRSV izolatlarının nükleotid ve aminoasit dizilerinin karşılaştırılmasında izolatların Aparicio vd. (1999)'nin ve Ulubaş and Ertunç, (2004), 'un buldukları sonuçlara benzer şekilde coğrafik ve konukçu izolatlarına göre gruplanmadığını dağınık bir coğrafik yayılım gösterdiği belirlenmiştir. Ancak Ulubaş-Serçe and Rosner (2006), yaptıkları çalışmada Türk PNRSV izolatlarının kökeninin coğrafik bölge ile ilişkisinin olduğu ve Avrupa kaynaklı olabileceğini ortaya koymuşlardır.

PDV Isparta izolatlarının dünyanın diğer PDV izolatları ile karşılaştırıldığında kılıf protein genlerinin nükleotid ve amino asit diziliminde sırasıyla %86-98 ile %82 - %99 oranları arasında benzerlik olduğu belirlenmiştir. Isparta izolatları en fazla benzerliği ABD kiraz, İsrail kiraz ve İtalya badem izolatları ile, en az benzerliği ise Polanya kiraz, İtalya kiraz izolatu ile göstermiştir. Isparta izolatlarının dünyanın diğer PDV izolatları ile amino asit benzelikleri karşılaştırıldıklarında İtalya badem, İtalya vişne, Polanya vişne izolatu en fazla, Polanya kiraz izolatu ise en az benzerliğe sahip olmuştur. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Vaskova vd. (2000)'nin bulduğu gibi nükleotid ve amino asit farklılıklarının ortaya çıkmasında izolatların elde edildiği konukçu veya coğrafik bölge arasında bir ilişkinin olmadığını ortaya çıkarmıştır. Yapılan filogenetik analizler 4 ana grup oluştuğunu birinci ve ikinci grupta genellikle Isparta izolatlarının, üçüncü grupta karışık izolatların olduğu göstermiş bu sonuçlar Ulubas Serce vd. (2009)'nin elde ettikleri sonuçlar ile paralellik göstermiştir.

Bu çalışma sonucunda Isparta ili için önemli bir ürün olan kirazın yetiştirildiği bölgelerde bulunan virüs hastalık etmenleri ortaya konularak bunların moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Elde edilen bulgular Isparta ilinde bulunan PDV, ACLSV ve PNRSV izolatlarının genel olarak genetik açıdan birbirlerine benzediklerini göstermektedir. Bu da virüs izolatlarının genellikle polen veya üretim materyalleriyle yayıldığı ve üzerlerinde yoğun bir seleksiyon baskısının olmadığını göstermektedir. Bu çalışma sonucunda elde edilen bulgular virüslerden özellikle

PDV'nin çok yaygın olduğunu ve sadece polen ve üretim materyalleriyle yayılan bir virüs olmasından dolayı virüsten ari üretim materyali kullanılmak suretiyle kolaylıkla ortadan kaldırılabileceğini göstermiştir.

6. KAYNAKLAR

- Akbaş, B., Değirmenci, K., 2010. First report from Turkey of European plum line pattern caused by apple mosaic virus. *Plant Disease*, 94 (5), 641.
- Akbaş, B., Değirmenci, K., Çiftçi, O., Kaya, A., Yurtmen, M., Uzunoğulları, N., Çelik, N., Türkölmez, Ş., 2011. Update on Plum pox virus distribution in Turkey. *Phytopathologia Mediterranea* 50,75-83.
- Al Rwahnih, M., Turturo C., Minafra, A., Saldarelli, P., Myrta, A., Pallas, V., Savino, V., 2004. Molecular variability of Apple chlorotic leaf spot virus in different hosts and geographical regions. *Journal of Plant Pathology*, 86, 117-122.
- Aneliya, B., 2005. Preliminary Results of The Study on The Spread Of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV) In Different Fruit Tree Species In Kyustendil Region of Bulgaria. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 33(1), 82-86.
- Anonim, 2008. Ziraî Mücadele Teknik Talimatları. Tarım Ve Köyîşleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Ankara Cilt 4, s 83.
- Anonim, 2011. <http://www.tuik.gov.tr>. Erişim tarihi: 03.10.2011
- Anonymous, 2011a. Food and Agriculture Organization of The United Nations. <http://faostat.fao.org>. Erişim tarihi: 03.10.2011
- Anonymous, 2011b. Plum Pox Potyvirus. <http://www.eppo.org/QURANTINE/virus/Plum> Erişim tarihi: 03.10.2011
- Aparicio, F., Myrta, A., Di Terlizzi, B., Pallas, V., 1999. Molecular Variability Among Isolates of PNRSV from Different *Prunus* spp. The American Phytopathology Society, 89(11), 991-999.
- Azeri, T., 1994. Detection of virus diseases of stone fruits in Aegean region of Turkey. *Proceedings of 9th Congress of Mediterranean Phytopathological Union*. p 511-513. Kuşadası, Aydın.
- Bachman, E.J., Scott, S.W., Xin, G.E., Vance, V.B., 1994. The complete nucleotide sequence of prune dwarf ilarvirus RNA3: implication for coat protein activation of genome replication in ilarviruses. *Virology*, 201(1), 127-131.
- Baloğlu, S., Özaslan, M., Posluoğlu, N., Yılmaz, M.A., 1995. Adana ve Tarsus bölgesinde yetiştiriciliği yapılan erik ve şeftali ağaçlarında erik şarka virüsü (Plum pox virus) 'nün ELISA testi ile aranması. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 343-345s, Adana.

- Baumgartnerova H., 1996. First findings of plum pox virus in walnut trees (*Juglans regia* L.) Acta Virologica, 40(1), 59-60.
- Belcr, O., Acikgoz, S., 2005. Determining of some virus diseases using the ELISA test in olive nurseries and olive trees in the region of Aegean and Marmara. Adnan Menderes Universitesi. Journal Agricultural Science, 2, 79-84.
- Bock, K.R., 1967. Strains of Prunus necrotic ringspot virus in hop (*Humulus lupulus* L.). Annals of Applied. Biology, 59(3), 437-446.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim Van Dillen, P.M.E., Van Der Noordaa, J., 1990. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. J. Clin. Microbiol., 28, 495-503.
- Brunt, H.A., Crabtree, K., Dallawitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L., 1996. Viruses of plants. CAB International, Wallingford.
- Clark, M.F., Adams, A.N., Thresh, J.M., Casper, R., 1976. The detection of plum pox and other viruses in woody plants by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Acta Horticulturae, 67, 51-57.
- Clark, M.F., Adams, A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34, 475-48.
- Cole, A., Mink, G.I., Regev, S., 1982. Location of Prunus necrotic ringspot virus on pollen grains from infected almond and cherry trees. Phytopathology, 72, 1542-1545.
- Crescenzi, A., d'Aquino, L., Comes, S., Nuzzaci, M., Piazzola, P., 1997. Characterization of the Sweet Cherry Isolate of Plum Pox Potyvirus. Plant Disease, 81, 711-714.
- Çağlayan Yıldızgördü, K., Hurigil, H., 1996. Virus Diseases of Peach Trees in Hatay Province. The Journal of Turkish Phytopathology, 25 (1-2), 65-69.
- Çağlayan, K., Kölber, M., Polat, A.A., Sertkaya, G., Ulubaş, Ç., Krizbai, L., Ember, I., Voigt, E., 2004. Plum Pox Virüsü'nün (PPV) Türkiye ve Macaristan İzolatlarının Moleküler Tekniklerle Teşhisi ve PPV'ye Dayanıklı Yerli Kayısı ve Erik Çeşitlerinin Belirlenmesi. TÜBİTAK Tarım Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Grubu. Proje No:Togtag-Macar 2001/2
- Çağlayan, K., Gazel, M., Ulubaş, Ç., 2008. Phytosanitary Status Of Cherry Trees In The East Mediterranean Region Of Turkey. V. International Cherry Symposium. Acta Horticulture, 795, 919-924.

- Çağlayan, K., Ulubaş, Ç., Gazel, M., Kaya, K., Cengiz, F.C., 2011. Sert Çekirdekli Meyve Bahçelerinde Plum Pox'ın Epidemiyolojisine Yönelik Ön Bulgular. Türkiye 4. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, KSÜ, FP 106, 496s, Kahramanmaraş.
- Çevik, B., Kaymak, S., Erkiş, G., Çağlayan, K., Candresse, T., 2007. Eğirdir Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Erik Koleksiyonlarında Şarka Virüsünün Yaygınlığının Belirlenmesi. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri. SDÜ yayınları, 342s. Isparta.
- Çevik, B., Yardimci, N., Çulal-Kılıç, H., 2011. Detection of Viruses Infecting Stone Fruits in Western Mediterranean Region of Turkey. The Plant Pathology Journal, 27(1), 44-52.
- Dal Zotto, A., Nome, S.F., 1999. Fluctuations of Prunus Necrotic Ringspot Virus (PNRSV) at Various Phenological Stages in Peach Cultivars. Plant Disease, 83, 1055-1057.
- Desvignes, J.C. Boye, R., 1989. Different diseases caused by chlorotic leaf spot virus on the fruit trees. Acta Horticulture, 235, 31-38.
- Diekmann, M., Putter, C.A., 1996. Stone fruits. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. 109, 111s. Roma
- Dominguez, S., Aparicio, F., Sanchez-Navarro, J.A., Cano, A., Garcia-Brunton, J., Pallas, V., 1998. Studies on the incidence of ilarviruses and apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) in apricot trees in the Murcia region (Spain) using serological and molecular hybridisation methods. Acta Horticulture, 472, 203-210.
- Dosba, F., Lansac, M., Pêcheur, G., Teyssier, B., Piquemal, J.P., Michel, M., 1986. Plum pox virus detection by ELISA technique in peach and apricot infected trees at different growing stage. Acta Horticulturae, 193, 187-191.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bull, 19, 11-15
- Dunez, J., 1988, Situation of Virus and Virus Like Diseases of Stone Fruits in the Mediterranean and Near East Region, 227-276.
- Elibüyük, İ. Ö., Erdiller, G., 1991. Ankara ilinde kayısı, erik ve şeftali ağaçlarında görülen sharka hastalığının yayılış alanlarının tespiti ve tanısı üzerinde araştırmalar. VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, Türkiye Fitopatoloji Derneği Yayınları, No. 6, 434s.
- Elibüyük, İ. Ö. Erdiller, G., 1998. Malatya İlinde Sert Çekirdeklielerde Görülen Virus Hastalıklarının Tanısı Üzerinde Yapılan Çalışmalar. VIII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, Bildiriler, Ankara, 89-94.

- Elibüyük, Ü., 1998. Malatya İlinde Yetiştirilen Sert Çekirdekli Meyve Alanlarındaki Virüslerin Tanılanması Üzerinde Araştırmalar. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 120s, Ankara
- Elibuyuk, İ.Ö., 2003. Natural Spread of Plum Pox Virus in Ankara, Turkey. *Journal of Phytopathology*, 151, 617-619.
- Fidan, Ü., Azeri, T., 1996. Ege Bölgesinde Elma Ağaçlarında Görülen Virüs Hastalıklarının Saptanması Üzerinde Araştırmalar. *Zirai Mücadele Araştırma Yıllığı*. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Bitki Koruma Araştırmaları Daire Başkanlığı, No: 28-29, 165. Ankara.
- Fidan, Ü., Özdemir, S., 2000. Kiraz ağaçlarında görülen virüslerin DAS-ELISA ile belirlenmesi. *Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü, Bornova/İzmir. Sonuç rapor Proje Kod No: BS/97/06/09/113.*
- Flegg, J.M., 1969. Tests with potential nematode vectors of cherry leaf roll virus. *Ann. Rep. East Malling Res. Sta.*, A52,155-157.
- Gazel, M. H., Çağlayan, K., 1998. Hatay yöresi Prunus türlerindeki virus hastalıklarının ELISA ve biyolojik yöntemlerle tanılanması. *Türkiye 8. Fitopatoloji Kongresi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Ankara*, 322-325.
- Gentkow, J., Rebenstorf, K., von Barga, S., Büttner, C., 2005. Biological and molecular characteristics of Cherry leaf roll virus (CLRV) isolates from different host plants. *Symposium on Plant Protection and Plant Health in Europe – Introduction and Spread of Invasive Species*, 227-228.
- German, S., Candresse, T., Lanneau, M., Huet, J.C., Pernollet, J.C., Dunez, J., 1990. Nucleotide sequence and genomic organization of apple chlorotic leaf spot virus. *Virology*, 179, 104–112.
- Gottwald, T.R., Avinent, L., Llàcer, G., Hermoso de Mendoza, A., Cambra, M., 1995. Analysis of the spatial spread of sharka (plum pox virus) in apricot and peach orchards in eastern Spain. *Plant Disease*, 79(3), 266-278.
- Guinchedi, L., Credi, R., Albertini, A., Colorio, G., Nicolli, C., 1977. Sensibilità Varietale dell'albicocco e di Diverse del Genere Prunus alla Virosi Vaiolatura ad Anello. Estratto da "Esperienze e Ricerche"- Nuova Serie Vol. VI.
- Guo, D., Maiss, E., Adam, G., Casper, R., 1995. Prunus necrotic ringspot ilarvirus: nucleotide sequence of RNA3 and the relationship to other ilarviruses based on coat protein comparison. *Journal of General Virology*, 76, 1073-1079.

- Gümüş, M., Hepaksoy, S., Paylan, İ.C., Eroğul, D., Erkan, S., 2007a. Sert Çekirdekli Meyve Türlerinde Sertifikalı Fidan Üretimine Yönelik Çalışmalar. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri. SDÜ yayınları, 342s. Isparta.
- Gümüş, M., Paylan, I.C., Matic, S., Myrta, A., Sipahioğlu, H.M., Erkan, S. 2007b. Occurrence And Distribution Of Stone Fruit Viruses And Viroids In Commercial Plantings Of Prunus Species In Western Anatolia, Turkey. Journal Of Plant Pathology, 89(2), 265-268.
- Gümüş, M., Paylan, İ.C., 2008. A Preliminary Survey For Viruses And Viroids Of The Western Anatolia Cherry Industry In Turkey. Acta Horticulturae, 795, 943-946.
- Hamacher, J., Quadt, A., 1991. Light- and Electron Microscopic Studies of Cherry Leaf Roll Virus (CLRV) on European Ash (*Fraxinus excelsior* L.). Journal of Phytopathology, 131, 215-226.
- Hamilton, R.I., Nichols, C. Valentina, B., 1984. Survey of Prunus Necrotic Ringspot and Other Viruses Contaminating the Exine of Pollen Collected by Bees. Can. Journal of Plant Pathology, 6, 196-199.
- Hammond, R.W., Crosslin, J.M., 1995. The complete nucleotide sequence of RNA3 of a peach isolate of prunus necrotic ringspot virus. Virology, 208, 349-353.
- Hassan, M., Myrta, A. and Polak, J. 2006. Simultaneous detection and identification of four pome fruit viruses by one-tube pentaplex RT-PCR. Journal of Virological Methods, 133(2), 124-129.
- Herranz, M. C., Sanchez-Navarro, J. A., Aparicio, F., Pallas, V., 2005. Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or 'polyprobe'. Journal of Virological Methods, 124, 49-55.
- Hong, N., Wang, G.P., 1999. The biological and biochemical characterization of apple chlorotic leaf spot virus. Acta Phytopathologica Sinica, 29, 77-81.
- Howell, W. E., Parish, C. L., Mink, G. I., 1991. In: Jones, A. L. and Aldwinckle, H. S. (Eds.). Compendium of Apple and Pear Diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, p. 77.
- Hurigil Gazel, M., 1997. Hatay Bölgesi Prunus Türlerinde Gözlenen Virüs Hastalıklarının Elisa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ve Biyolojik Yöntemlerle Tanılanması. Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 30s, Antakya.
- Ismaeil, F., Myrta, A., Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Al Chaabi, S., Chik Darwich A., Savino, V., 2003. Viruses Of Stone Fruit Trees In Syria. Option

Mediterraneennes, Ser. B/n 45-Virus and Virus-like Diseases of Stone Fruits, with Particular Reference to the Mediterranean Region, 37-38.

Johansen, E., Edwards, M.C., Hampton, R.O., 1994. Seed Transmission of Viruses: Current Perspectives. *Annual Review of Phytopathology*, 32, 363-386.

Jones, A.T. 1985. Cherry leafroll virus. AAB Descriptions of Plant Viruses No. 306. Association of Applied Biologists, Wellesbourne, Warwick, UK.

Kalashyan, Y.A., N.D. Bilkey, T.D. Verderevskaya and E.V. Rubina. 1994. Plum pox potyvirus on sour cherry in Moldova. *EPPO Bull.* 24:645-649.

Kegler, H., Richter, J., Schimdt, H.B., 1966. Untersuchungen zur dentifizierung und Differenzierung des Blattrollvirus der Kirsche (Cherry leaf roll virus). *Journal of Phytopathology*, 56, 313-330.

Koç, G., Baloğlu S., 2004. Doğu Akdeniz Bölgesinde Mevcut Prunus Necrotic Ringspot Virüsünün (PNRSV) Saptanması ve Tanılanması. Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri. Samsun s167.

Kunze, L., 1988. Prune dwarf virus. In *European Handbook on Plant Diseases*, Eds.Smith, Dunez. Lelliot, Philips Blackwell Scientific Publications Ltd, London, 15-17.

Kurçman, S., 1977. Afyon ilinde vişne ve kiraz ağaçlarında görülen virüs hastalıklar üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 17(2-4), 113-149.

Labonne, G., Yvon, M., Quiot, J.B., Avinent, L., Llácer, G., 1995. Aphids as potential vectors of plum pox virus: comparison of methods of testing and epidemiological consequences. *Acta Horticulturae*, 386, 207-218.

Li, R., Mock, R., Huang, Q., Abad, J., Hartung, J., Kinard, G., 2008. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *Journal of Virological Methods*, 154, 48-55.

Lopez-Moya, J.J., Fernandez-Fernandez, M.R., Cambra, M., Garcia, J.A., 2000. Biotechnological aspects of plum pox virus. *Journal of Biotechnology*, 76, 121-136.

Mandic, B., Matic, S., Rwahnihi, M.A.L., Jelkman, W., Myrta, A., 2007. Viruses of Sweet and Sour Cherry in Serbia. *Journal of Plant Pathology*. 89 (1), 103-108.

Martelli, G.P., Candresse, T., Namba, S., 1994. Trichovirus, a new genus of plant viruses. *Archives Virology*, 134, 451-455.

- Marini, D.B., Gibson, P.G., Scott, S.,W., 2008. The complete nucleotide sequence of an isolate of apple chlorotic leaf spot virus from peach (*Prunus persica* (L.) Batch). Archives Virology, 153, 1003-1005.
- Mathews, R. E. F., 1993. Diagnosis of Plant Virus Diseases. CRS Press, N.W., Boca Raton, Florida. 374 p.
- Megahed, E.S., Moore, J.D., 1967. Differential Mechanical Transmission of Prunus Viruses from Seed of Various Prunus spp. and from Different Parts of the Same Seed. Phytopathology, 57, 821.
- Menzel, W., Jelkmann, W., Maiss, E., 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. Journal of Virological Methods, 99, 81-92.
- Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V., Martelli, G.P., 2003. Virus diseases affecting the Mediterranean stone fruit industry: a decade of surveys. Virus and Virus-like Diseases of Stone Fruits, with Particular Reference to the Mediterranean Region, 15–23.
- Myrta, A., Savino, V., 2008. Virus And Virus-Like Diseases Of Cherry In The Mediterranean Region. Acta Horticulturae V. International Cherry Symposium, 795, 891-896.
- Navrátil, M., Šafářová, D., Gadiou, S., Fránová, J., Kučerová, J., Talacko, L., 2008. The Partial Molecular Characterization Of Plum Pox Virus Infecting Sweet Cherry Trees In The Czech Republic. Acta Horticulturae, 781, 203-208.
- Nemeth, M., 1986. Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 47 p.
- Nemeth, M., 1994. History and importance of plum pox in stone-fruit production. EPPO Bull. 24, 525-536.
- Nyland, G., Gilmer, R.M., Moore, J.D., 1976. Prunus Ringspot Group, In: Virus Diseases and Noninfectious Disorders of Stone Fruits in North America. U.S. Dep. Agric. Handb, pp 104-132 .
- Ogawa, J.M., Zehr, E.I., Bird, G.W., Ritchie, D.F., Uriu, K., Uyemoto, J.K., 1995. Compendium of Stone Fruit Diseases. APS Press, 98 pp., USA.
- Ong, C.A., 1987. Separation and Characterization of Nucleoprotein Components of Prunus Necrotic Ringspot Virus Isolates. PhD Thesis. Washington State University, Pullman.
- Ozturk, MO., Sipahioglu, H.M., Ocak, M., Usta, M., 2008. Cherry leafroll virus in *Juglans regia* in the Lake Van basin of Turkey. Journal of Plant Pathology, 90, 75-79.

- Özkan, M., Kurçman, S., 1976. Orta Anadolu Elma Bahçelerinde Görülen Virüs Hastalıkları. Bitki Koruma Bülteni, 16(2), 106-115.
- Öztekin, V., 2006. KSÜ Sekamer Koleksiyon Parselindeki Badem Ağaçlarında Virüs Hastalıklarının Serolojik Teşhisleri ve Kontrol. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 43s, Kahramanmaraş.
- Pallas, V., Sanchez-Navarro, J.A., Canizares, M.C., 1998. Molecular diagnostic techniques and their potential role in stone fruit certification schemes. In: Di Terlizzi, B., Myrta, A. and Savino, V. (eds.). Option Mediterraneennes, Ser. B/n 19. Stone fruit viruses and certification in the Mediterranean countries: problems and prospects. pp. 191–208.
- Parakh, D.R., Shamloul, A.M., Hadidi, A., Scott, S.W., Waterworth, H.E., Howell, H.E., Mink, G.I., 1995. Detection of Prune dwarf Ilarvirus from infected fruits using reverse transcription-polymerase chain reaction. Acta Horticulturae, 386, 421-430.
- Paylan, İ.C., 2006. İzmir İli Kiraz Üretim Alanlarında Görülen Virüs Hastalıklarının Belirlenmesi Üzerinde Araştırmalar. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 73s, İzmir.
- Petrzik, K., Lenz, O., 2002. Remarkable variability of apple mosaic virus capsid protein gene after nucleotide position 141. Archives of Virology, 147, 1275-1285.
- Polak, Z., Zieglerova, J., 1997. Spontaneous occurrence of apple mosaic virus in some forest and ornamental woody species. In: Proc., XIVth Slovak and Czech Plant Protection Conference, Nitra 1997, 87-88.
- Rana, T., Chandel, V., Hallan, V., Zaidi, A.A., 2009. Molecular evidence for the presence of Apple chlorotic leaf spot virus in infected peach trees in India. Scientia Horticulturae, 120, 296-299.
- Ravelonandro, M., Varveri, C., Delbos, R., Dunez, J., 1988. Nucleotide sequence of the capsid protein gene of plum pox potyvirus. Journal of General Virology, 69, 1509-1516.
- Rott, M.E., Jelkman, W., 2001. Characterization and Detection of Several Filamentous Viruses of Cherry: Adaption of An Alternative Cloning Method (DOP-PCR), and Modification of An RNA Extraction Protocol. Eur. J. Phytopathol., 107, 411-420.
- Rowhani, A., Maningas, M.A., Lile, L.S., Daubert, S.D., Galino, D.A., 1995. Development of a detection system for viruses of wood plants based on PCR analysis of immobilized virions. Phytopathology, 85, 347-352.

- Rebenstorff, K., Candresse, T., Dulucq, M.J., Büttner, C., Obermeier, C., 2006. Host species-dependent population structure of a pollen-borne plant virus, Cherry leafroll virus. *Journal of Virology*, 80, 2453-2462.
- Saade, M., Aparicio, F., Sanchez-Navarro, J., Herranz, M.C., Myrta, A., Di Terlizzi, B., Pallas, V., 2000. Simultaneous detection of the three ilarviruses affecting stone fruit trees by nonisotopic molecular hybridization and multiplex reversetranscription polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 90, 1330-1336.
- Sahtiyancı, Ş., 1968. Virus de la Sharka Chez le Prunier. *Bulletin Phytosanitaire FAO*, 17 (3).
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Ehrlich, H.A., Arnheim, N., 1985. Enzymatic Amplification of β - globulin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Cell Anemia. *Science*, 230, 1350-1354.
- Sanchez-Navarro, J.A., Aparicio, F., Rowhani, A. and Pallas, V. 1998. Comparative analysis of ELISA, nonradioactivemolecular hybridisation and PCR for the detection of prunus necrotic ringspot virus in herbaceous and Prunus hosts. *Plant Pathology*, 47(6), 780-786.
- Sanchez-Navarro, J.A., Aparicio, F., Herranz, M., Minafra, C., Myrta, A., Pallas, V., 2005. Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR. *Eur. Journal of Plant Pathology*, 111, 77-84.
- Sato, K., Yoshikawa, N., Takahashi, T., 1993. Complete nucleotide sequence of the genemo of an apple isolate of apple chlorotic leaf spot virus. *Journal of General Virology*, 74, 1927-1931.
- Sertkaya, G., Caglayan, K., Ulubas, C., 2004. Detection Of Some Viruses Of Stone Fruits In Mother Plant Blocks In Eastern Mediterranean Region Of Turkey. *Acta Horticulturae*, 657, 127-132.
- Sertkaya, G., 2008. Serological Detection Of Some Viruses In Cherry Rootstocks In The Eastern Mediterranean Region Of Turkey. *Acta Horticulturae*, 795, 939-942
- Sipahioglu, H.M., Myrta, A., Abou-Ghanem, N., Di Terlizzi, B., Savino, V., 1999. Sanitary status of stone fruit trees in East Anatolia (Turkey) with particular reference to apricot. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 29, 439-442.
- Sipahioglu, H.M., Demir, S., Polat, B., Akköprü, A., Usta, M., 2004. Van ve Civarında Sert Çekirdekli Meyve Ağaçlarında Tespit Edilen Viral ve Fungal Hastalıklar. *YYÜ Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 14(2), 133-139.

- Sipahioğlu, H.M., Usta, M., Ocak, M., 2006. Use of dried high-phenolic laden host leaves for virus and viroid preservation and detection by PCR methods. *Journal of Virological Methods*, 137, 120-124.
- Sipahioğlu, H.M., Usta, M., Ocak, M., 2007. Virüsten Ari Sert Çekirdekli Meyve Fidanı Üretimi. TUBİTAK Proje No:TOVAG 1050641.
- Smith, I.M., Dunez, J., Philips, D.H., Lelliot, R.A., Archer, S.A., 1998. *European Handbook of Plant diseases*, Blackwell Scientific Publ., 583p.
- Spiegel, S., Tam, Y., Maslenin, L., Kolber, M., Nemeth, M., Rosner, A., 1999. Typing prunus necrotic ringspot virus isolates by serology and restriction endonuclease analysis of PCR products. *Annals of Applied Biology*, 135(1), 395-400.
- Sutic, D.D., Ford, R.E., Tosic, M.T., 1999. *Handbook of plant virus diseases*. CRC Press. London, NewYork, Washington.
- Torrance, L., 1981. Use of Forced Buds to Extend the Period of Serological Testing in Surveys for Fruit Tree Viruses. *Plant Pathology*, 30, 213-216.
- Turgut, O., 2008. Türkiye’de Turunçgil Tristeza Virüs Hastalığının Mevcut Durumunun Serolojik Ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 51s, Adana.
- Ulubaş, Ç., Ertunç, F. 2004. RT-PCR Detection and Molecular Characterization of Prunus necrotic ringspot virus Isolates Occurring in Turkey. *Journal of Phytopathology*, 152, 498–502.
- Ulubaş, Ç., Ertunç, F., 2005. Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV) Status in Turkey and Sensitive Detection Using Advanced Techniques. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 29, 251-257.
- Ulubas Serce, Ç., Rosner, A., 2006 . Molecular typing of Turkish Apple chlorotic leaf spot virus isolates based on partial coat protein gene. *Phytopathologia Mediterranea*, 45, 117–125.
- Ulubaş Serçe., Ç., Ertunç, F., Öztürk, A., 2009. Identification and Genomic Variability of Prune dwarf virus Variants Infecting Stone Fruit Trees in Turkey. *Journal of Phytopathology*, 157(5), 298-305.
- Uludağ, Y., 2007. Batı Akdeniz Bölgesi’nin Önemli Elma Yetiştiriciliği Yapılan Yörelerinde Bazı Virüs Hastalıklarının ELISA ve RT-PCR Yöntemiyle Tanılanması, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 48s, Antakya.

- Usta, M., Sipahioğlu, H.M., Polat, B., 2005. Comparison of DAS-ELISA and RT-PCR Methods for the Detection of Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV). *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi*, 15(2), 153-158.
- Uyemoto, J.K., Asai, W.K., Luhn, F., 1992. Ilarviruses: Evidence for Rapid Spread and Effects on Vegetative Growth and Fruit Yields of Peach trees. *Plant Diseases*, 76, 71-74.
- Varveri, C., Bem, F., 1995. Viruses of stone and pome-fruit mother-tree plantations in Greece. *Acta Horticulturae*, 386, 431-438.
- Vaskova, D., Petrzik, K., Karesova, R., 2000. Variability and molecular typing of the woody-tree infecting PNRSV. *Archives Virology*, 145, 699-709.
- Vunsh, R.A., Roster, A., Stein, A., 1991. Detection of bean yellow mosaic virus in gladioli corms by the polymerase chain reaction. *Annals of Applied Biology*, 119, 289-294.
- Yardimci, N., Eryiğit, H., 2005. New record of Apple mosaic virus on apple cultivars in south-west Turkey. *Australasian Plant Pathology*, 34, 603.
- Yıldızgördü, K.Ç., Çalı, S., 1994. Occurrence and detection of virus and virus-like diseases of plum and apricot trees in the eastern Mediterranean area. *Proceedings of 9th Congress of Mediterranean Phytopathological Union*, p 551-553, Kuşadası, Aydın.
- Youssef, S.A., Shalaby, A.A., Mazyad, H.M., Hadidi, A., 2002. Detection and identification of prune dwarf virus and plum pox virus by standard and multiplex rt-pcr probe capture hybridization (RT-PCR-ELISA). *Journal of Plant Pathology*, 84(2), 113-119.
- Yurtmen, M., Spiegel, S., Maslenin, L., Yılmaz, M.A., Rosner, A., 2002. Assessing the applicability of transcript conformation polymorphism for differentiation among Prunus necrotic ringspot virus isolates. *Phytopathologia Mediterranea*, 41, 92-98.
- Yürektürk, M., 1984. Studies on Plum Pox of Stone Fruit Trees Growing in Marmara Region. Publication of Atatürk Horticulture Research Institute, 37.
- Zeki, C., 1991. Elma Bahçelerinde Entegre Mücadele Teknik Talimatı. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, 8s. Ankara.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Yusuf ÖZTÜRK

Doğum Yeri ve Yılı: Kadınhanı, 10.05.1977

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Selçuklu Lisesi, 1994

Lisans: Selçuk Üniversitesi, 2000

Yüksek Lisans:

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Hadim İlçe Tarım Müdürlüğü, 2005-2008

Meyvecilik Araştırma İstasyonu Müdürlüğü, 2008-

Yayınları (SCI ve diğer makaleler)

1- İşci, M., Kaymak, S., Atasay, A., Pektaş, M., Şenyurt, H., Öztürk, Y., Aksu, M., 2009. Eğirdir (Isparta) koşullarında Elma İçkurdu [*Cydia pomonella*(L.) Lep. : Tortricidae] mücadelesinde çiftleşmeyi engelleme yönteminin etkinliğinin belirlenmesi, Türkiye 3. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, Van s;57.

2- Kaymak, S., İşci, M., Pektaş, M., Öztürk, Y., Şenyurt, H., 2009. QA (Quince A) ve Çöğür Anaçlarına Aşılı Bazı Armut Çeşitlerinde Memeli Pas Hastalığı(*Gymnosporangium fuscum* D.C.)'na karşı Reaksiyonlarının Belirlenmesi, Türkiye 3. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, Van s;229.

3- Kaymak, S., Özgönen, H., Boyraz, N., İşci, M., Öztürk, Y., Şenyurt, H., 2011. Elma Kara Lekesi Hastalığı (*Venturia inaequalis* (CKE) Wint.)'a Karşı Bazı Fungusların In vitro ve In vivo'da Antifungal Etkilerinin Belirlenmesi, Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 28-30 Haziran 2011 Kahramanmaraş.s;339.

4- Öztürk, Y., Çevik, B., Kaymak, S., 2011. Isparta ili Kiraz Üretim Alanlarında Erik cücelik virüsünün (Prune dwarf virus, PDV) Serolojik ve Moleküler Yöntemlerle Teşhisi ve Kılıf Protein Gen Dizilimlerinin Belirlenmesi, Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 28-30 Haziran 2011 Kahramanmaraş.s;399.

5- Dolunay, E.M., Köse, E., Kelen, M., Öztürk, Y., Kaymak, S., Şenyurt, H., 2011. 0900 Ziraat Kiraz (*Prunus avium* L.) Çeşidinde Kiraz Sineğine(*Rhagoletis cerasi*) Karşı Kullanılan Bazı Tarımsal İlaçların Kalıntı Düzeylerinin Belirlenmesi, Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 28-30 Haziran 2011 Kahramanmaraş.s;235.



6- Gargin, S., Öztürk, Y., 2011.Bazı Üzüm Çeşitlerinin Bağ Mildiyösüne (*Plasmopara viticola* (Berk.et Curt.)) Karşı Hassasiyetlerinin Belirlenmesi, Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 28-30 Haziran 2011 Kahramanmaraş. S;378.

7- İşçi, M., Kaymak, S., Şenyurt, H., Öztürk, Y., Atasay, A., Pekteş, M., Özongun, Ş., 2011. Eğirdir (Isparta) Koşullarında Elma içkurdu [*Cydia pomonella* (L.) Lepidoptera: Tortricidae] Mücadelesinde Çiftleşmeyi Engelleme Yönteminin İnsektisitlerle Kombine Uygulanması Üzerine Bir Araştırma, Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 28-30 Haziran 2011 Kahramanmaraş.s;33.