



**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TOHURLUK PATATES YUMRULARINDA PATATES İĞ YUMRU
VİROİDİ (POTATO SPINDLE TUBER VIROID)' NİN SAPTANMASI**

Corc HURİGİL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
HAZİRAN-2015**



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TOHUMLUK PATATES YUMRULARINDA PATATES İĞ YUMRU
VİROİDİ (POTATO SPINDLE TUBER VIROID)' NİN SAPTANMASI

Corc HURİGİL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
HAZİRAN-2015

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TOHUMLUK PATATES YUMRULARINDA PATATES İĞ YUMRU
VİROİDİ (POTATO SPINDLE TUBER VIROID)' NİN SAPTANMASI

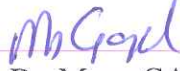
CORC HURİGİL
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Hayrettin OCAKVERDİ danışmanlığında hazırlanan bu tez 27/06/2015 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hayrettin OCAKVERDİ

Başkan



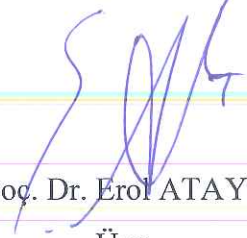
Doç. Dr. Mona GAZEL

Üye



Yrd. Doç. Dr. Fatih Mehmet TOK

Üye



Doç. Dr. Erol ATAY

Üye



Yrd. Doç. Dr. Hayri BABA

Üye

Kod No:

Doç. Dr. Okan ŞENER

Enstitü Müdür V.

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 tabidir.

27.06.2015

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Corc HURİGİL

ÖZET

TOHUMLUK PATATES YUMRULARINDA PATATES İĞ YUMRU VİROİDİ (POTATO SPINDLE TUBER VIROID)' NİN SAPTANMASI

Farklı patates çeşitlerinde (Agria, Marfona, Hermes, Russet burbank, Granola) ve ayrıca üreticilerin kendi ürettikleri tohumluk yumrularında Patates iğ yumru viroidi (PSTVd)'nin varlığını Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi kullanılarak saptamak amacıyla bu çalışma yürütülmüştür.

Yapılan bu çalışmada iki farklı ekstraksiyon yöntemi ile toplam 398 yumru ekstrakte edilmiştir. "Silica capture" yöntemi ile yapılan ekstraksiyonlarda nanodrop spektrofotometre ile yapılan ölçümlerde ekstraktın içinde RNA miktarının çok az ve kalitesiz olduğu gözlenirken, LiCl yöntemi ile yapılan ekstraksiyonlarda elde edilen RNA'ların çok iyi kalitede olmamasına rağmen PCR yapılabilecek düzeyde ve kalitede RNA miktarının olduğu saptanmıştır.

Ekstrakte edilen RNA'ların PSTVd'ine karşı testlemelerinde iki farklı primer çifti (PSTVd1/PSTVd2 ve 3H1/2H1) kullanılmıştır. PCR ürünleri %1-1,5 agaroz jelde elektroforez işlemi ile görsel hale getirilmiştir. Her iki primer çifti ile yapılan RT-PCR testleri sonucunda testlenen tüm yumrular negatif olarak saptanmıştır.

2015, 30 Sayfa

Anahtar kelimeler: Patates, PSTVd, RNA, RT-PCR

ABSTRACT

DETECTION OF POTATO SPINDLE TUBER VIROID IN SEED POTATO

This study was conducted to detect *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) method in different potato cultivars (Agria, Marfona, Hermes, Russet burbank, Granola) and also in seed tuber producing by growers.

In this study total 398 tuber was extracted by using two different extraction methods. RNA amount was measured by nanodrop spectrophotometer. According to “Silica capture” extraction method, RNA quantity has low quality and was not enough. In LiCl extraction method, although RNA’s havent a good quality but RNA quantity has found enough and quality for making PCR.

Extracted RNA’s were tested for PSTVd with two different primer (PSTVd1/PSTVd2 and 3H1/2H1) pairs. PCR product were visualized by 1-1.5% agarose gel. According to RT-PCR analysis made with two primers, all tested tubers were found PSTVd free.

2015, 30 Pages

Key Words: Potato, PSTVd, RNA, RT-PCR

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamın her aşamasında hiçbir desteğini ve yardımını benden esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Hayrettin OCAKVERDİ ve mükemmel bir çalışma ortamı sağlayıp araştırmalarımnda bana yol gösteren Doç. Dr. Mona GAZEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, laboratuvar çalışmalarımnda zamanını ayırıp bana yardım eden Ziraat Mühendisi Kıvılcım SARI ile Ziraat Yüksek Mühendisi Ece DEĞER'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Son olarak tez çalışmalarımın yoğun olduğu dönemlerde moral ve motivasyon konusunda bana destek olan kemik müzik grubu üyeleri Cem DOĞUM, Sezar SABAGİL ve David KİL'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	VII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
3. MATERYAL ve YÖNTEM	12
3.1. Bitki Materyali	12
3.2. Moleküler Çalışmalar	12
3.2.1. Patates Yumrularından Toplam Nükleik Asit İzolasyonu	12
3.2.1.1. Silica Capture Yöntemi ile RNA Ekstraksiyonu	12
3.2.1.2. LiCl Yöntemi ile RNA Ekstraksiyonu	13
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri	13
3.2.2.1. Revers Transkripsyon	13
3.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	14
3.2.2.3. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi : Jel Elektroforez	14
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	16
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	20
KAYNAKLAR	22
ÖZGEÇMİŞ	26
EKLER	27
EK.1. Silica capture RNA ekstaksiyonunda kullanılan çözeltiler ve içerikleri	27
EK.2. LiCl yönteminin kimyasalarının hazırlanışı	29
EK.3. Agaroz jel elektroforez	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	PSTVd ile infekteli patates bitkilerinde gözlenen dikine büyüme simptomları.	9
Şekil 2.2.	Patates yumrularında PSTVd enfeksiyonu sonucu gözlenen yumru simptomları	9
Şekil 4.1.	Patates yumrularından (A: 260, B:268 ve C:255 numaralı) Silica capture yöntemi ile izole edilen RNA'ların spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm sonuçları	16
Şekil 4.2.	Patates yumrularından (A:9, B:21 ve C:23 numaralı) LiCl yöntemi ile izole edilen RNA'ların spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm sonuçları	17
Şekil 4.3.	3H1/2H1 primerleri kullanılarak yapılan PCR analizi sonucunun agaroz jeldeki görüntüsü	18
Şekil 4.4.	PSTVd1/PSTVd2 primerleri kullanılarak yapılan PCR analizi sonucunun agaroz jeldeki görüntüsü.....	18

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Viroidlerin sınıflandırılması	7
Çizelge 2.2.	Bazı viroidlerin zarar oluşturdukları konukçu bitkiler	8
Çizelge 3.1.	Patateslerde enfeksiyon yapan Patates iğ yumru viroidinin (PSTVd) PCR analizlerinde kullanılan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri	14

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	Santigrat derece
Da	Dekar
mg	Miligram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
gr	Gram
µg	Mikrogram
NaCl	Sodyum klorür
NaI	Sodyum iyodür
ng	Nanogram
nm	Nanometre
M	Molar
mM	Mili molar

KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
BME	β-mercaptoethanol
bp	baz çifti
cDNA	Komplementer DNA
d ₂ H ₂ O	Çift distile su
DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich–Enzyme Linked Immunosorbent Assay
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
EtBr	Ethidium Bromid
ETOH	Ethanol
IgG	Immunogamma Globulinler
LiCl	Lityum klorür
M.Ö	Milattan Önce
OD	Optik Densite
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonükleik Asit
RNase	Ribonükleaz
rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
RT	Revers Transcription

SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TAE	Tris asetat EDTA
TE	Tris EDTA
UV	Ultraviyole
V	Volt

1. GİRİŞ

Çeşitli yönlerden faydalanma ve kullanma özelliğine sahip bulunan patates bir çapa bitkisidir. Amerika'nın keşfine kadar bilhassa Güney Amerika'da yerliler tarafından yenilen ve bilinen bu bitki, İspanyollar tarafından Avrupa'ya getirilmiş ve bilahare dünyanın diğer yerlerine yayılmıştır. Zhukovsky'e (1933) göre, Anadolu'da patatesin 1853 yıllarında kullanılmaya başlandığı ve XIX. Yüzyılın sonlarında yetiştirildiği, eski dünyanın her yerinde olduğu gibi ilk anlarda Türkiye'de de pek yavaş yayıldığı ve ilk kültürünün Akovada (Sakarya nehri vadisinde), Karadeniz boğazı yakınlarında, Adapazarı civarında yapıldığı bildirilmektedir (Şenol, 1970).

Patates (*Solanum tuberosum* L.), ülkemizde en çok yetiştirilen ve tüketimi en fazla olan sebzelerden birisidir. Ayrıca, patates nişastası, bazı sanayi dalları için önemli bir hammadde durumundadır. Diğer taraftan patates, hayvan yemi olarak da önem taşımaktadır (Özbek, 1984).

Cramer'e (1967) göre dünyada bitki koruma tedbirlerinin iyi uygulanmaması sonucu 129 milyon 188 bin ton her yıl patates ürünü kaybolmaktadır. Bunun %32.3 hastalıklar, %9.7 sini zararlılar ve % 6,9 da yabancı otlar teşkil etmektedir. Yabancı otlardan meydana gelen zararlanma miktar olarak 16 milyon 535 bin ton patates demektir (Özer, 1977).

Patates, yumrularıyla üretilen bir kültür bitkisi olduğu için bu kültür bitkisinde enfeksiyona neden olan virüsler tohumluk yumrular ile yıldan yıla, yıl içerisinde de mekaniksel olarak ya da vektörlerle taşınıp hızlı bir şekilde yayılarak (Jones, 1988; Bostan ve ark., 2006) tohumluğun çok kısa sürede yozlaşmasına neden olmakta, genelde üç yıldan sonra aynı tohumluğun kullanılması durumunda ise enfeksiyon oranındaki artışa bağlı olarak verimde önemli kayıplar meydana gelmektedir (Spiegel ve Martin 1993; Slack 1995). Diğer yandan virüsler bitkilerdeki metabolizma faaliyetleri ile çok sıkı bir ilişki içerisinde olduğu için virüs hastalıklarının doğrudan kimyasal mücadele ile kontrol edilmesi de mümkün olmamaktadır (Walkey, 1991). Bu nedenle virüs hastalıklarından kaynaklanan verim kayıplarının önlenmesinde virüslerden arı tohumluk kullanımı büyük önem taşımaktadır.

Yapılan çalışmalarda 25'den fazla virüsün ve bir viroidin doğal olarak patatesi enfekte ettiği (Salazar, 1996) ancak bu virüslerden çoğunun sınırlı bölgeler içerisinde kaldığı, sadece patates X virüsü (PVX), patates yaprak kıvrılma virüsü (PLRV), patates

S virüsü (PVS) ve patates Y virüsünün (PVY) dünya genelinde şiddetli enfeksiyonlara sebep olarak, önemli verim kayıplarına neden oldukları kaydedilmiştir (McDonald, 1984; Hooker, 1986; Shukla ve ark., 1994; Salazar, 1996; Brunt, 2001). Üstelik tarla içerisinde enfeksiyon kaynağı mevcut olduğu sürece bu virüslerden bazıları mekaniksel olarak bazıları vektörlerle ya da her iki şekilde de taşınarak kısa süre içerisinde patates bitkisi aynı anda bu virüslerden bir kaçının enfeksiyonuna maruz kalmaktadır (McDonald, 1984; Singh, 1999).

Kültür bitkilerinde ekonomik zarar oluşturan viroidler 20. yy. ortalarına kadar birçok araştırmacı tarafından klasik olarak bitki virüsleri olarak düşünülmekteydi (Bitters, 1952; Salibe, 1965; Weathers ve ark., 1967). Ancak 1967 yılında patates iğ yumru hastalığına neden olan etmenin virüs olmadığı ve yeni bir patojen grubu olan viroidler tarafından oluşturulduğu belirlenmiştir (Diener ve Raymer, 1967). Bu araştırmacılar hastalıklı patateslerde yaptıkları çalışmalarda virüs partikülleri yerine, hücrede serbest olarak bulunan düşük moleküler ağırlığa sahip RNA'lar izole etmişlerdir. Böylece ilk defa protein mantoya sahip olmayan, virüslerden farklı, küçük molekülü, tek sarmallı RNA'lardan oluşan patojenleri tanımlamak için viroid terimi kullanılmaya başlanmıştır.

Viroidler çoğaltma materyali ile taşınan, ısıya son derece dayanıklı olan RNA'dan meydana gelen en küçük bitki patojenleridir. En küçük virüs genomundan daha küçük olan viroidlerin 246-375 nükleotide sahip olup, canlılar aleminde sadece çiçekli bitkilerde zarar oluşturduğu bildirilmektedir (Riesner ve Gross, 1985). Ancak insanlarda karaciğer enfeksiyonlarına neden olan ve Hepatit B virüsünün varlığında meydana gelen Hepatit D hastalığı etmeninin orijini netlik kazanmamış olup viroid olduğu yönünde görüşler mevcuttur (Anonim, 2007).

Viroidlerin dünya'da yaygın bir şekilde bulunduğu ve önemli ekonomik kayıplar oluşturduğu bildirilmiştir. Özellikle hindistan cevizi, avokado ve patatesteki viroid etkisi nedeni ile önemli verim kayıplarının meydana geldiği bildirilmiştir. En küçük viroid olan, 246 nükleotide sahip Coconut Cadang Cadang Viroidi (CCCVd)'nin 1982 yılında Filipinler'de 30 milyondan fazla hindistan cevizi ağacını öldürdüğü ve her yıl yaklaşık 500.000 ağacın viroid enfeksiyonları nedeni ile yok olduğu rapor edilmiştir (Hanold ve Randles, 1991). Viroidlerin öldürücü, şiddetli, orta şiddetli, değişebilen, bodurluk oluşumu gibi zarar şekillerinin bulunduğu, bunların da ürün ve kalite kaybına neden olduğu tespit edilmiştir (Randles, 2003).

Bu çalışmanın amacı, ülkemizde kullanılan önemli patates çeşitlerinden Agria, Marfona, Hermes, Russet burbank, Granola ve ayrıca üreticilerin kendi ürettikleri tohumluk yumrularda Patates ię yumru viroidi (PSTVd)'nin varlığının Revers Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile belirlenmesidir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Viroidler ilk kez 1967 yılında patatesten daha önce bir virüs hastalığı olarak düşünülen Patates İğ Yumru simptomunu gösteren yumrulara ortaya koyulmuştur. Hastalık araştırıldığında aslında hastalığın bir virüs hastalığı olmadığı, virüsten daha düşük moleküler ağırlığa sahip, protein manto içermeyen infektiföz ribonükleik asitlerden (RNA) kaynaklandığı bulunmuştur. Bu RNA'ları tanımlamak için ilk kez viroid terimi kullanılmıştır (Diener ve Raymer, 1967).

HSVd' nin 1968 yılında Japonya'da şerbetçi otu yetiştirilen alanlarda % 60' a varan bulaşıklara sebebiyet verdiği rapor edilmiştir (Yamamoto ve ark., 1973). PSTVd' nin genelde bodurluk oluşturarak % 40-45 ürün kaybına neden olduğu ve bu viroidin şiddetli ırklarında ürün kaybının % 64 oranına ulaştığı bildirilmiştir (Singh, 1988). Ülkemizde ise Doğu Akdeniz bölgesinde turunç üzerine üretilen turunçgillerde simptom gözükmemekle birlikte yoğun olarak CEVd ile bulaşık olduğu ve *Citrus cachexia viroid* (CCaVd)'inin mandarin çeşitlerinde ekonomik ölçüde zarar oluşturduğu bildirilmiştir (Güllü, 1989; Önelge, 1994). *Hop latent viroid* (HLVd)' inin İngiltere' de bazı ticari şerbetçi otu üretim alanlarında % 90' a varan hastalık oluşturduğu tespit edilmiştir (Barbora ve ark., 1990).

Viroidler ısıya son derece dayanıklı olan RNA' dan oluşan en küçük bitki patojenleridir. Viroidler 246-399 nükleotide sahip olup en küçük virüs genomundan daha küçük çiçekli bitki zararlılarıdır (Singh, 1998).

Yapılan bazı deneysel çalışmalarda PSTVd; avocado (*Persea americana*) (Querci ve ark., 1997), tatlı salatalık (*Solanum mericatum*) ve Avustralya yerli domatesinde tespit edilmiştir (Behjatnia ve ark., 1996). Ayrıca birkaç önemli solanaceous bitkileri PSTVd'nin konukçusudur. Bunlar; patates, domates ve patlıcandır. Bu konukçuların yanı sıra altın çilekte de olduğu rapor edilmiştir (Ward ve ark., 2010, Verhoeven ve ark., 2009). PSTVd; deneysel olarak toplamda 31 familyaya ait 94 bitki türünde tespit edilmiştir (Jeffries, 1998).

Viroidlerin birçok konukçuya mekanik ve çoğaltma materyali ile taşındığı bildirilmiş, ayrıca viroidlerin polen, tohum ve böceklerle düşük oranda da olsa taşındığı ortaya konulmuştur (Diener, 1987; Hull, 2002). Son taksonomik çalışmalarda viroidlerin iki familyaya ayrıldığı, bunların *Pospiviroidae* ve *Avsunviroidae* familyaları olduğu bildirilmiştir (Çizelge 1).

PSTVd'nin çoğu türünün hafiften şiddetliye doğru simptomlara neden olduğu rapor edilmiştir. Şiddetli simptomlara neden olan PSTVd türleri yumru kök hasadında %65'e kadar kayıba yol açtığı gözlenmiştir (Salazar, 1989). PSTVd'nin domates hasadında etkisi belgelenmemiş olup, hasatta ürünün yok edilmesine yol açan hastalıklar kaydedilmiştir (Mumford ve ark., 2003).

Viroidlerin ekonomik ürün kayıpları oluşturduğu bildirilen bazı bitkiler patates, bağ, turunçgil, Hindistan cevizi, şerbetçiotu, domates, avokado, şeftali, elma, armut, patlıcan ve krizantemdir (Çizelge 2.2). Bazı viroidler geniş bir konukçu spektrumuna sahiptir. Örneğin, *Hop stunt viroid*'i (HSVd), *Carnabaceae*, *Vitaceae*, *Cucurbitaceae*, *Rosaceae* ve *Rutaceae*; *Turunçgil exocortis viroid*'i (CEVd) *Rutaceae*, *Vitaceae*, *Compositae* ve *Solanaceae* familyalarındaki bir çok türde enfeksiyona neden olmaktadır (Singh ve ark., 2003).

Viroidlerin Dünya'da yaygın bir şekilde bulunduğu ve önemli ekonomik kayıplar oluşturduğu bildirilmiştir. Viroidlerin öldürücü, şiddetli, orta şiddetli, değişebilen, bodurluk oluşumu gibi zarar şekillerinin bulunduğu, bunların da ürün ve kalite kaybına neden olduğu ortaya konulmuştur (Randles, 2003). *Coconut cadang-cadang viroid* (CCCVd) 'inin Filipinlerde 30 milyondan fazla hindistan cevizini öldürdüğü ve 500.000' den fazla ağacın her yıl bu yüzden yok olduğu bildirilmiştir (Hanold ve Randles, 1991; Randles ve Rodriguez, 2003).

Viroidlerin bilinen 30' a yakın türünün *Pospiviroidae* familyası içerisinde yer aldığı belirtilmiştir (Flores ve ark., 2005). *Pospiviroidae* familyasının tipik türünün PSTVd olduğu (Diener, 1971; Gross ve ark., 1978), çubuk benzeri yapıya sahip bulunduğu ve sekonder yapısının (Sanger ve ark., 1976; Ding ve Owens, 2003) 5 farklı yapısal bölge içerdiği bildirilmiştir. Bu bölgelerin iyi korunmuş bir merkez (C) bölge, patojenite (P) bölgesi, değişken (V) bölge, sağ (TR) ve sol (TL) terminal bölge olduğu rapor edilmiştir (Keese ve Symons, 1985, 1987; Sano ve ark., 1992; Flores ve ark., 2005).

Bazı viroidlerin ise sınırlı ya da kendilerine özgü doğal konukçulara sahip olduğu yapılan araştırmalarda ortaya konulmuştur. Örneğin GYSVd-1, GYSVd-2 ve *Australian grapevine viroid*'lerinin (AGVd) sadece *Vitaceae* familyasında bulunduğu araştırmacılar tarafından belirtilmektedir (Flores ve ark., 2005). Viroidlerin hastalık etmeni olarak düşük moleküler ağırlığa sahip, protein mantosu olmayan, tek zincir, halka formunda,

kapalı kovalent bağları bulunan ve kendi kendine replike olabilen RNA'lardan oluşan bir patojen grubu olduğu bildirilmiştir. Ayrıca viroidlerin çoğaltma materyali ile taşındığı ve ısıya son derece dayanıklı oldukları tespit edilmiştir. Araştırmacılar 246-401 nükleotid arasında değişen geniş baz çiftine sahip olduğu keşfedilen viroidleri çubuk benzeri ikincil yapıda ve sadece çiçekli bitkilerde zarar oluşturduğunu gözlemlemişlerdir (Sanger ve ark., 1976; Keese ve Symons, 1985; Flores ve ark., 2005).

Çizelge 2.1. Viroidlerin sınıflandırması (Di Serio ve ark., 2014, Flores ve ark., 2005)

Familya Pospiviroidae			
Tür Adı	Kısa adı	Nükleotid sayısı	Cins adı
<i>Potato spindle tuber viroid</i>	PSTVd	356, 359-360	Pospiviroid
<i>Chrysanthemum stunt viroid</i>	CSVd	354,356	
<i>Citrus exocortis viroid</i>	CEVd	370-375, 463	
<i>Columnea latent viroid</i>	CLVd	370, 372	
<i>Iresine 1 viroid</i>	IrVd	370	
<i>Mexican papita viroid</i>	MPVd	360	
<i>Tomato apical stunt viroid</i>	TASVd	360-363	
<i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i>	TCDVd	360	
<i>Tomato planta macho viroid</i>	TPMVd	360	
<i>Hop stunt viroid</i>	HSVd	295-303	Hustoviroid
<i>Coconut cadang-cadang viroid</i>	CCCVd	246, 287-301	Cocadviroid
<i>Coconut tinangaja viroid</i>	CTVd	254	
<i>Hop latent viroid</i>	HLVd	256	
<i>Citrus viroid IV</i>	CVd-IV	284	
<i>Apple scar skin viroid</i>	ASSVd	329-330	Apscaviroid
<i>Apple dimple fruit viroid</i>	ADFVd	306-307	
<i>Australian grapevine viroid</i>	AGVd	369	
<i>Citrus bent leaf viroid</i>	CBLVd	318	
<i>Citrus viroid III</i>	CVd-III	294, 297	
<i>Grapevine yellow speckle viroid-1</i>	GYSVd-1	366-368	
<i>Grapevine yellow speckle viroid-2</i>	GYSVd-2	363	
<i>Pear blister canker viroid</i>	PBCVd	315-316	
<i>Coleus blumei viroid-1</i>	CbVd-1	248, 250-251	Coleviroid
<i>Coleus blumei viroid-2</i>	CbVd-2	301-302	
<i>Coleus blumei viroid-3</i>	CbVd-3	361-362, 364	

Çizelge 2.1. (Devam) Viroidlerin sınıflandırması (Di Serio ve ark., 2014, Flores ve ark., 2005)

Familya Avsunviroidae			
Tür Adı	Kısa Adı	Nükleotid Sayısı	Cins Adı
<i>Avocado sunblotch viroid</i>	ASBVd	246-250	Avsunviroid
<i>Peach latent mosaic viroid</i>	PLMVd	337	Pelamoviroid
<i>Chysanthemum chlorotic mottle viroid</i>	CChMVd	399	
<i>Eggplant latent viroid</i>	ELVd	333	Elaviroid

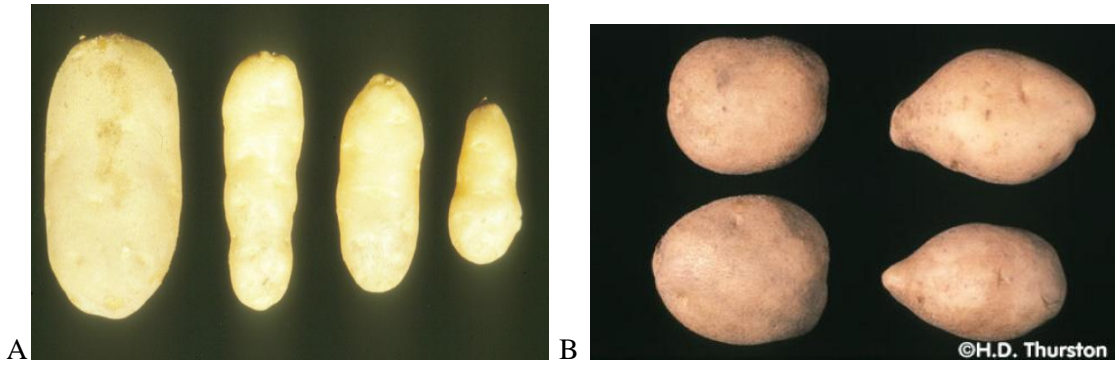
Çizelge 2.2. Bazı viroidlerin zarar oluşturdukları konukçu bitkiler (Singh ve ark., 2003)

Viroid	Ana Konukçusu	Familya	Diğer Konukçuları
HSVd	Şerbetçiotu	<i>Carnabaceae, Rosaceae, Rutaceae, Vitaceae, Cucurbitaceae</i>	Turunçgiller, bağ, hıyar, erik, şeftali, armut
CEVd	Turunçgiller	<i>Rutaceaea, Vitaceae, Compositae, Solanaceae</i>	Bakla, havuç, krizantem, patlıcan, bağ, petunya, patates, domates, kirli hanım çiçeği ,şalgam
CCCVd	Hindistan Cevizi	<i>Palmae</i>	Palmiye, <i>Buri palm, African oil palm, Manila palm, Royal palm</i>
ASBVd	Avokado	<i>Lauraceae</i>	Tarçın
PLMVd	Şeftali	<i>Rosaceae</i>	Sert çekirdeklilerden: erik, kayısı, kiraz. Yumuşak çekirdeklilerden:armut
ChCNVd	Krizantem	<i>Compositae</i>	Kasımpatı
PSTVd	Patates	<i>Solanaceae</i>	Domates, Kıbrıs kavunu, avokado
TCDVd	Domates	<i>Solanaceae</i>	<i>Nicandra physaloides, Physalis spp.</i>
GYSVd	Bağ	<i>Vitaceae</i>	

PSTVd'nin en önemli konukçusu olan patates bitkilerinde görülen genel simptomları; sürgünlerde dik büyüme, normalden daha küçük dallanmalar, sağlıklı bitkilere oranla daha küçük ve sivri yaprak oluşumu, bitkilerde cüceleşme şeklindedir. Enfekteli yumru uzar, şekli bozulur ve derin gözler oluşur. PSTVd'nin patateslerde meydana getirdiği belirtiler Şekil 2.1 ve 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.1. PSTVd ile enfekteli patates bitkilerinde gözlenen dikine büyüme simptomları. (A: © Beltsville Agricultural Research Centre, USDA), (B: © T.A. Zitter).



Şekil 2.2. Patates yumrularında PSTVd enfeksiyonu sonucu gözlenen yumru simptomları. A: sağdaki 3 patates PSTVd enfekteli soldaki ise sağlıklı yumru (© NSW Department of Agriculture), B: Sağ tarafta PSTVd ile enfekteli yumrular, solda ise sağlıklı yumrular (© H.D. Thurston).

PSTVd'inin ana konukçusu patates olmasına rağmen, etmenin patlıcan, domates, biber ve pepino gibi Solanaceae familyasına ait diğer bitkileri de doğal olarak enfekte ettiği bildirilmiştir (Lebas ve ark., 2005). PSTVd Türkiye'de ilk olarak patates yumrularında %1.2-1.8 oranında saptanmıştır (Önelge ve Bozan, 2005) ve bu sonuçlar Bostan ve ark. (2010) tarafından %0.45 bulaşma oranı ile doğrulanmıştır. Türkiye'de

farklı illerden patates, domates ve süs bitkilerinin yaprakları yanında marketlerden alınan patates yumrularında PSTVd'nin varlığı araştırılmış ve RT-PCR yöntemi ile testlenen toplam 891 örnekten 6 tanesinin PSTVd ile enfekteli olduğunu ortaya koymuşlardır (Bostan ve ark., 2010).

Ülkemizde PSTVd konusunda yapılan ilk kapsamlı çalışmada; rastgele seçilen patates yumrularında PSTVd varlığı, radyoaktif olmayan dot blot hibridizasyon ve RT-PCR testleri ile belirlenmiştir. 2010 yılı Ocak ve Şubat aylarında Türkiye'de tohumluk patates üretimi yapan farklı firmalardan, 27 patates çeşidine ait toplam 168 patates yumru örneği temin edilmiştir. PSTVd genomuna spesifik digoksisenin ile etiketli RNA probu, pSPT18 vektörüne aktarılan PCR ürününden sentezlenmiş ve dormant patates yumrularından izole edilen RNA ekstraktlarında etmen viroidi tespit etmede kullanılmıştır. Yürütülen moleküler testlerde toplam 7 numune (6 çeşit: Innovator, Lady Jo, Russet Burbank, Agria, Provento ve Konsül) PSTVd infeksiyonuna rastlanmıştır. Bazı RNA örnekleri, RT-PCR testinde pozitif sonuç vermesine rağmen, dot blot testinde hibridizasyon sinyali vermemiştir. Seçilen bir izolata ait (PSTVd-TR) genomun tamamı klonlanarak baz dizisi tespit edilmiştir (Gen Bankası Ulaşım No. HQ456944). İzolatın primer ve sekonder nükleotid yapısına uygulanan filogenetik analiz, PSTVd-TR genomunun karşılaştırıldığı diğer izolatlardan sadece birkaç nükleotid düzeyinde farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. PSTVd-TR izolatının, yakın zamanda İtalya'da *Solanum* spp.'de tespit edilen PSTVd izolatı (Gen Bankası Ulaşım No. EF459700) ile yüksek düzeyde (% 99) benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. PSTVd-TR izolatının patojenitesi Joker çeşidi domates fidelerine gerçekleştirilen mekanik inokulasyon ile belirlenmiştir. Oluşan infeksiyonun varlığı belirti göstermeyen domates fidelerine uygulanan RT-PCR testi ile doğrulanmıştır (Güner ve ark., 2012).

RT-PCR yöntemi kullanılarak, PSTVd'nin doğrudan ve çimlendirilen domates tohumlarından tespiti karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve bununla beraber elde edilen bulguların rutin karantina analizi laboratuvarlarda hızlı ve güvenilir olarak uygulanabilirliği amaçlanmıştır. Karantina analizi yapılan laboratuvarlarda hassas ve güvenilir test yöntemleri kullanılarak kısa sürede sonuç elde edilmesi istenmektedir. Tohum örneklerini çimlendirdikten sonra teste tabi tutmak; zaman, malzeme, işgücü vb. kaybı açısından sorun olabilmektedir. Bu amaçla domates tohumları, çimlendirilmeden olduğu gibi ve çimlendirildikten sonra PSTVd'nin varlığı açısından RT-PCR testine tabi

tutulmuştur. Bu testlerde adı geçen viroidin moleküler olarak tespitinde, genomun her ucuna spesifik primerler kullanılarak yaklaşık 359 bp uzunluğunda ürün oluşturan primer çifti (PSTVd-F ve PSTVd-R) kullanılmıştır. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, PSTVd'nin tespitinde, çimlendirilmeden direkt olarak tohumdan ve çimlendirilerek yapılan test sonuçlarının birbirine paralel olduğu görülmüştür (Güner ve ark., 2014).

Viroidler keşfedildikten sonra sebebi bilinmeyen bir çok hastalığın kaynağının viroid olduğu bulunmuş ve bu güne kadar yaklaşık 30 farklı viroid türü tanımlanmıştır (Çizelge 2.1) (Di Serio F ve ark., 2014).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

Ülkemizde yaygın olarak yetiştirilmekte olan Agria, Marfona, Hermes, Russet burbank ve Granola çeşitlerine ait tohumluk yumrular ve ayrıca üreticilerin kendi ürettikleri tohumluk yumrular bu çalışmada bitki materyali olarak kullanılmıştır.

3.2. Moleküler Çalışmalar

3.2.1. Patates yumrularından Toplam Nükleik Asit İzolasyonu (TNA)

Patates yumrularından toplam nükleik asit (RNA) izolasyonu için silica-capture yöntemi (Foissac ve ark. 2005) ve LiCl yöntemi (Spiegel ve ark., 1996) kullanılmıştır. Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü laboratuvarlarında yürütülmüştür. İzole edilen RNA'lar nanodrop spektrofotometre (Thermo Sci. A.B.D) ile ölçülerek kaliteli ve saf nükleik asitler PCR analizlerinde kullanılmaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.1.1. Silica Capture Yöntemi ile RNA Ekstraksiyonu (Foissac ve ark., 2005)

- Her örnek için ayrılan havanlarda patates yumrularının gözlerinden jilet yardımıyla 4-5 parça alınarak ezilmiştir.
- Daha küçük parçalara ayırmak için numuneler sıvı azotla beraber tekrar ezilmiştir.
- İyiçe ufalanan patates örneklerinin her birine 3 ml silica capture grinding buffer eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır.
- Elde edilen sıvıdan 500 µl ependorf tüpe alınıp üzerine 100 µl %10 N- lauryl sarcosyl ve 5 µl 2- mercaptoethanol eklenmiş ve yavaşça karıştırılmıştır.
- Tüpler 70 °C' lik su banyosunda ara sıra karıştırılarak 10 dakika bekletilmiştir.
- Tüpler 13.000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- Yeni ependorf tüplere santrifüj edilen tüplerin üst fazından 300 µl alınıp üzerine 150 µl %96' lık ETOH ve 300 µl 6M NaI ve 25 µl süspanse edilmiş silica eklenmiştir.
- Tüpler 10 dakika süreyle oda sıcaklığında ara sıra yavaşça karıştırılarak bekletilmiştir.
- Tüpler 1 dakika 6.000 rpm' de santrifüj edilip üst fazı dökülmüştür.

- Tüpün dibinde kalan çökelti kısmı 500 µl yıkama buffer'ı ile çözündürülmüştür.
- Tüpler 1 dakika 6.000 rpm' de santrifüj edildikten sonra üst faz dökülmüştür.
- Çökelti 500 µl yıkama buffer'ı ile çözündürülmüştür.
- Tüpler 1 dakika 6.000 rpm' de santrifüj edilip üst faz dökülmüştür.
- Çökelti birkaç dakika oda sıcaklığında bekletilerek kurutulmuştur.
- Çökelti üzerine 150 µl steril su eklenerek çözündürülmüştür.
- Tüpler 70 °C de 5 dakika bekletilmiştir.
- Tüpler 13.000 rpm de santrifüj edilmiştir.
- Tüplerin üst fazından 130 µl alınarak yeni tüplere aktarılıp -20 °C de saklanmıştır.

3.2.1.2. LiCl Yöntemi ile RNA Ekstraksiyonu (Spiegel ve ark., 1996)

- Patates yumrularının gözlerinden jilet yardımıyla 4-5 parça alınarak ezilir.
- İyice ezilen patates dokularından 0,1 gr örnek alınarak üzerine 1 ml RNA LiCl tamponu + β-mercaptoethanol (BME) karışımı eklenmiş ve iyice karıştırılarak ependorf tüplere alınmıştır (1 ml LiCl tamponu için 2 µl BME eklenir.)
- Tüpler 65 °C'de 15 dakika bekletilmiş ve üzerine eşit hacimde Potasyum asetat eklenmiştir.
- Karışım elle karıştırıldıktan sonra vortex aletinde karışımın homojen hale gelmesi sağlanmıştır. Tüpler 15 dakika buz üzerinde bekletilerek 10 dakika 15000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- Tüplerden 650 µl üst faz alınarak yeni tüplere aktarılmış ve üzerine eşit hacimde izopropanol eklenip yavaşça karıştırılmıştır.
- Tüpler -20 °C' de 1 saat bekletilmiş ve daha sonra 10 dakika 15 000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- Üst faz dökülerek çökelti 500 µl %70'lik soğuk Ethanol çözeltisi ile yıkanmış ve oda sıcaklığında 5 veya 10 dakika bekletilerek kurutulmuştur.
- Çökelti, 50 µl steril saf su ile sulandırılmış ve RNA'lar -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) Analizleri

3.2.2.1 Reverse Transkripsiyon (RT; Reverse Transcription)

PSTVD' nin testlenmesinde tek bir reaksiyon için; 2 µl Random hexamer primer 0,2 µg/ µl, 5 µl RNA ve 6 µl H₂O karışımı 65 °C'de 10 dakika tutulmuş ardından -20

°C’de 1 dakika bekletilmiştir. Tüplere 4 µl 5 x RT Buffer, 2 µl 10Mm dNTP karışımı, 0,5 µl RNase inhibitör ve 0,5 µl RT (200U/µl) eklenerek tüpler 25°C’ de 10 dakika, 55°C’ de 30 dakika, 85°C’ de 5 dakika tutulduktan sonra elde edilen cDNA’ lar 4°C’de çıkarılıp -80 °C’ de bekletilmiştir.

3.2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

50 µl’lik PCR karışımına 33,5 µl d₂H₂O, 5 µl 10xTaq Buffer, 1µl dNTP (10 mM), 3µl MgCl₂ (25 mM), her bir primerden (10mM) 1’er µl, 0,5 µl Taq Polymerase (5U/µl) ve 5µl cDNA eklenmiştir. Kullanılan primerler çizelge 3.1’de verilmiştir. Bu karışım 1 döngü 94 °C’de 2dk, 35 döngü 94 °C’de 30 saniye, 62 °C’de 30 saniye, 72 °C’de 45 saniye ve 1 döngü 72 °C’de 7 dakika olarak programlanmış thermocyclere yerleştirilmiştir.

Çizelge 3.1 Patateslerde enfeksiyon yapan Patates iğ yumru viroidinin (PSTVd) PCR analizlerinde kullanılan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri

Primer Adı	Dizilim (5’-3’)	Büyükük (bp)	Referans
PSTVd1	ATCCCCGGGGAAACCTGGAGCGAAC	360	Shamloul ve ark., 1997
PSTVd2	CCCTGAAGCGCTCCTCCGAG		
3H1	ATCCCCGGGGAAACCTGGAGCGAAC	360	Shamloul ve ark., 1997
2H1	CCC TGA AGC GCT CCT CCG AG		

3.2.2.3 PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Jel Elektroforez

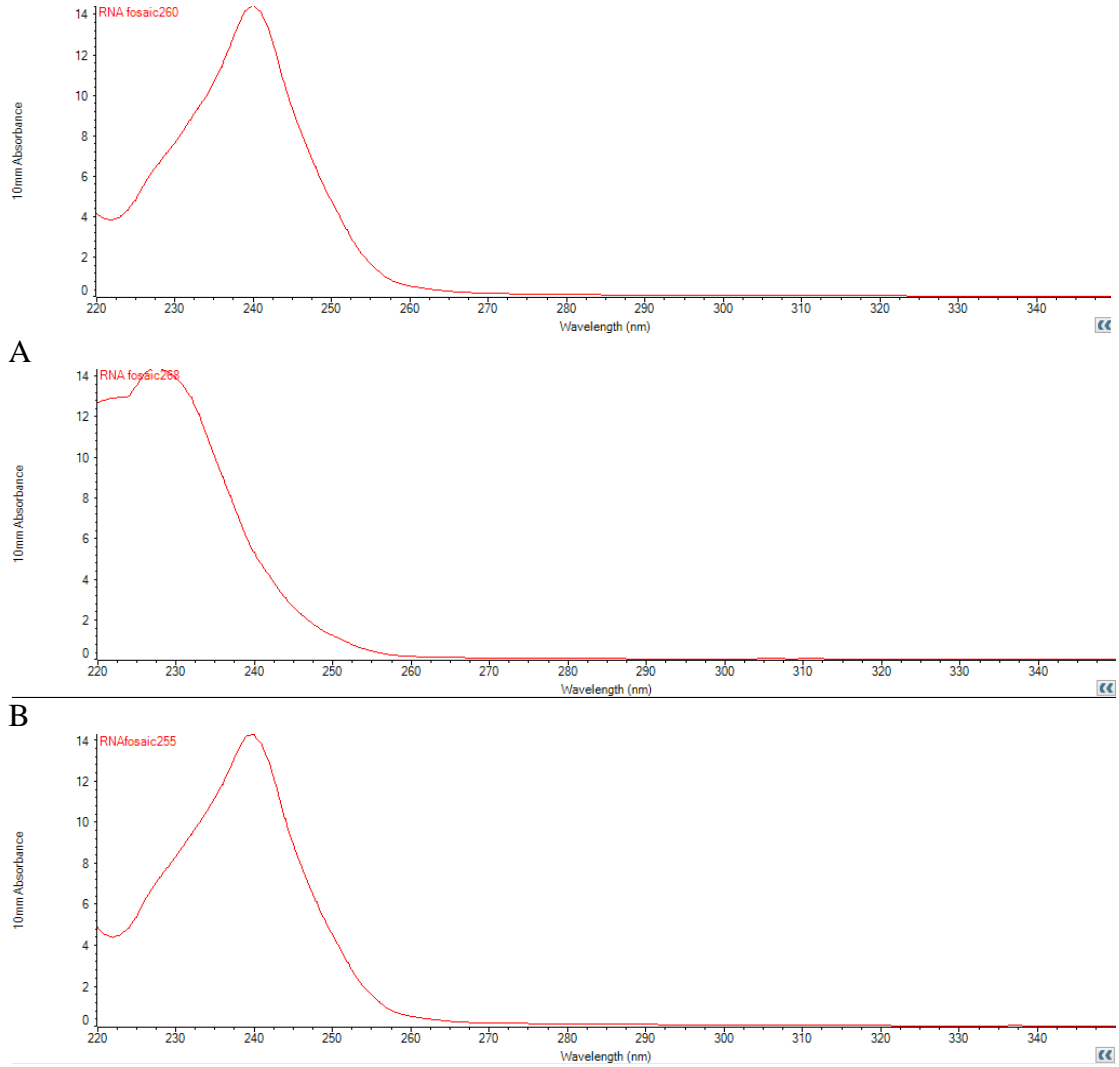
RT-PCR ürünlerinin görüntülenmesi için %1’lik Agaroz jel elektroforez işlemi yapılmıştır. 1 gr Agaroz, 100 ml 1x TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu içersinde mikrodalga fırında çözündürülüp tarak yerleştirilmiş jel tepsinine düz bir zemin üzerinde dökülerek agarozun polimerizasyonu için 20 dk süre ile bekletilmiştir. Jelin polimerizasyonundan sonra tarak dikkatli bir şekilde alınıp jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir. 1xTAE tamponu tankın içersine jeli kapatacak şekilde döküldükten sonra jel çukurlarına DNA marker ile beraber PCR ürünleri yükleme tamponu ile jel çukurlarına yüklenmiştir. Yükleme tamamlandıktan sonra elektroforez güç kaynağı ile elektroforez tankına 150 V’luk elektrik akımı 40 dakika süreyle uygulanmıştır.

Ethidium Bromid (EtBr) 0.5 µg/ml konsantrasyonda 100 ml suya karıştırılmış ve jel bu karışım içerisinde 5-6 dakika tutularak boyanmıştır. Jel UV ışıktta görüntülenip oluşan bantlara göre değerlendirilmiştir. Örnekler kullanılan pozitiflerle karşılaştırılmış bant oluşturanlar pozitif, oluşturmayanlar negatif kabul edilerek jel görüntüleme cihazında fotoğraflanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

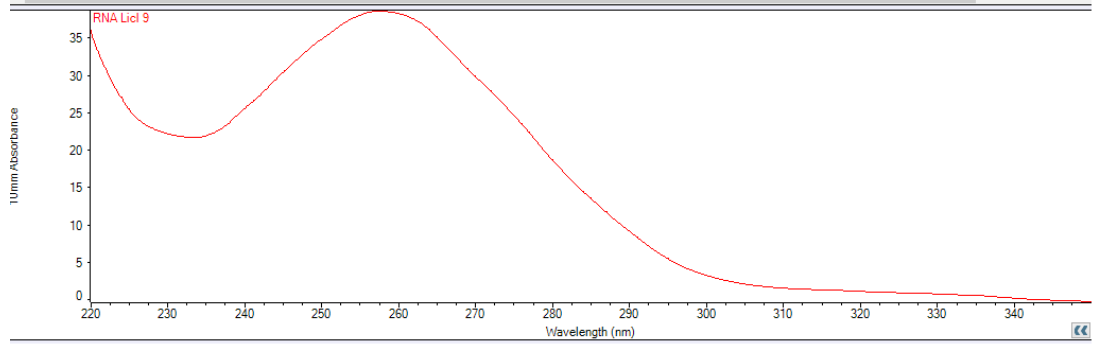
Agria, Marfona, Hermes, Russet burbank ve Granola çeşitlerine ait 311 patates yumrusu ve ayrıca üretici tarafından tohumluk olarak kullanılan ve çeşit adı bilinmeyen 87 yumru olmak üzere toplam 398 yumru iki farklı RNA ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmiştir.

Patates yumrularının RNA ekstraksiyonu amacıyla iki farklı yöntem kullanılmıştır. “Silica capture” yöntemi ile yapılan ekstraksiyonlarda nanodrop spektrofotometre ile yapılan ölçümlerde ekstraktın içinde RNA miktarının çok az ve kalitesiz olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1).

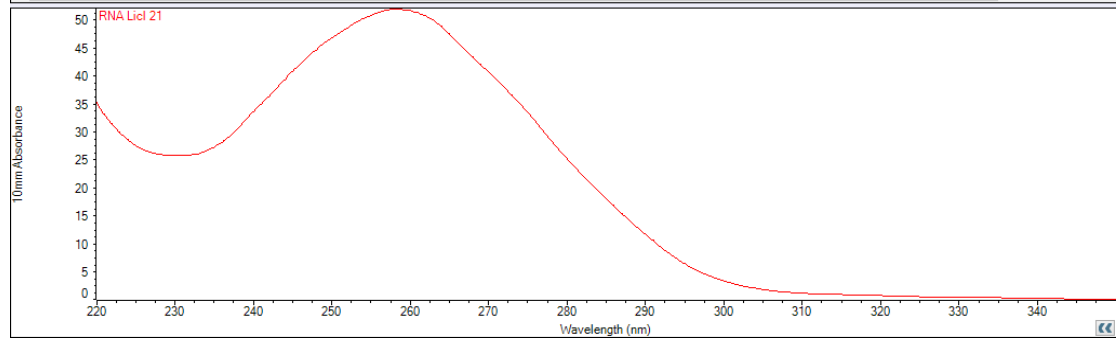


C
Şekil 4.1 Patates yumrularından (A: 260, B:268 ve C:255 numaralı) Silica capture yöntemi ile izole edilen RNA'ların spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm sonuçları

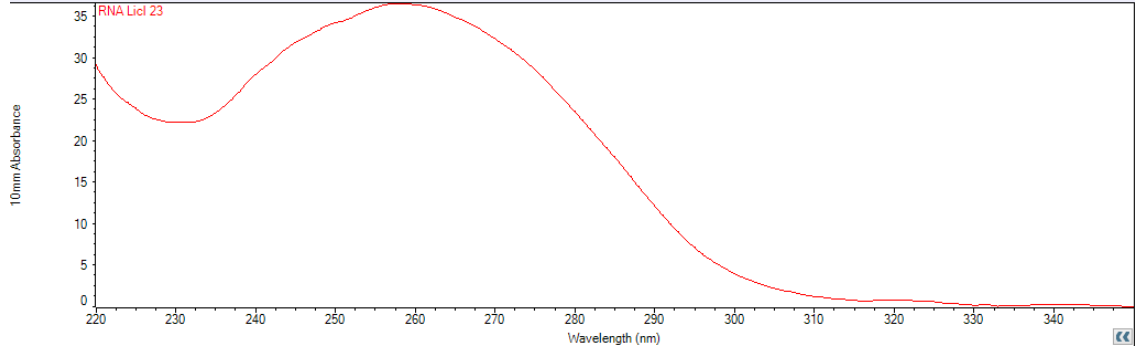
LiCl yöntemi ile yapılan RNA ekstraksiyonlarında yapılan nanodrop ölçümlerinde ise RNA'ların çok iyi kalitede olmamasına rağmen PCR yapılabilecek düzeyde ve kalitede RNA miktarının olduğu saptanmıştır (Şekil 4.2).



A



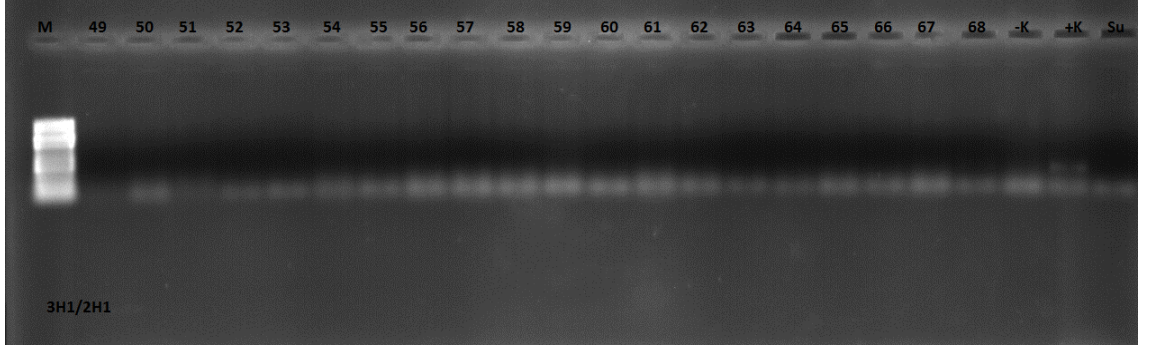
B



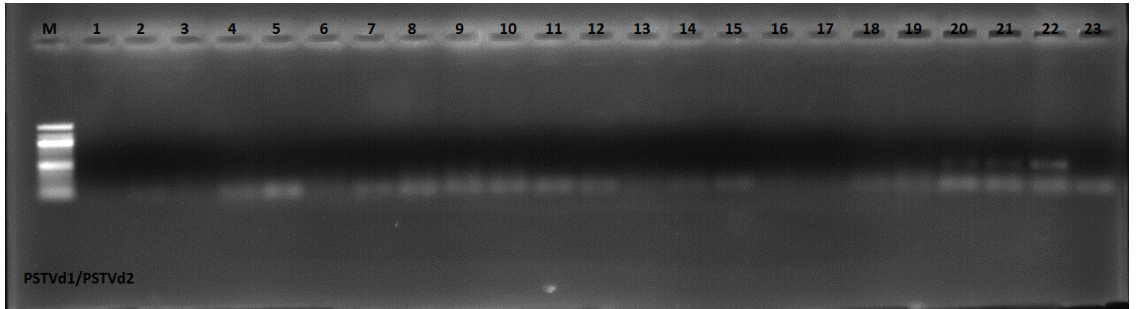
C

Şekil 4.2 Patates yumrularından (A:9, B:21 ve C:23 numaralı) LiCl yöntemi ile izole edilen RNA'ların spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm sonuçları

Ekstrakte edilen RNA'ların PSTVd'ine karşı testlemelerinde 3H1/2H1 ve PSTVd1/PSTVd2 primer çiftleri kullanılmıştır. PCR ürünleri %1-1,5 agaroz jelde elektroforez işlemi ile görsel hale getirilmiştir. Her iki primer çifti ile yapılan RT-PCR testleri sonucunda tüm yumrular negatif olarak saptanmıştır (Şekil 4.3 ve 4.4).



Şekil 4.3 3H1/2H1 primerleri kullanılarak yapılan PCR analizi sonucunun agaroz jeldeki görüntüsü. 49-62: Marfona patates çeşidine ait yumrular, 63-68: Agria patates çeşidine ait yumrular.-K: Negatif kontrol, +K: Pozitif kontrol, Su: Su kontrol.



Şekil 4.4 PSTVd1/PSTVd2 primerleri kullanılarak yapılan PCR analizi sonucunun agaroz jeldeki görüntüsü. 1-18: Hermes patates çeşidine ait yumrular, 19: Negatif kontrol, 20: Pozitif kontrol sulandırılmamış, 21: Pozitif kontrol 1/10 sulandırılmış, 22: Pozitif kontrol 1/100 sulandırılmış, 23: Su kontrol.

Yapılan bu çalışma kapsamında testlenen Agria, Marfona, Hermes, Russet burbank ve Granola çeşitlerine ait 311 patates yumrusu ve ayrıca üretici tarafından tohumluk olarak kullanılan ve çeşit adı bilinmeyen 87 yumru PSTVd açısından negatif bulunmuştur. Ülkemizde patateslerde PSTVd'inin saptama çalışmaları son yıllarda başlamış olup Önelge ve Bozan (2005), patates yumrularında PSTVd'ini %1.2-1.8 oranında saptanmış ve bu sonuçlar Bostan ve ark. (2010) tarafından %0.45 bulaşma oranı ile doğrulanmıştır. Etmenin ülkemizde çok düşük oranlarda bulunduğu

bildirilmiştir (CABI/EPPO, 2012; Bostan ve ark., 2010; EPPO, 2014). Ülkemizde PSTVd konusunda yapılan ilk kapsamlı çalışmada; rastgele seçilen 27 patates çeşidine ait toplam 168 patates yumru örneği içinde toplam 7 örnekte (6 çeşit: Innovator, Lady Jo, Russet Burbank, Agria, Provento ve Konsül) PSTVd enfeksiyonu saptanmış olup bazı RNA örnekleri, RT-PCR testinde pozitif sonuç vermesine rağmen, dot blot testinde hibridizasyon sinyali vermemiştir. Bu da bitkilerin testlenmesinde kullanılacak yöntemin önemini göstermektedir (Güner ve ark., 2012).

Tohumluk patates yumrularının üretimde kullanılmadan önce mutlak surette testlenerek patojenden arı yumru kullanılması verim ve kalitede önemli ölçüde artış sağlayacaktır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemizde patates yetiştiriciliği bütün bölgelerde yapılmaktadır. Bu çalışmada farklı patates çeşitlerinde (Agria, Marfona, Hermes, Russet burbank, Granola) ve ayrıca üreticilerin kendi ürettikleri tohumluk yumrularında *Patates iğ yumru viroidi* (PSTVd)'nin varlığını saptamak amacıyla Reverse-Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi kullanılmıştır.

Yapılan bu çalışmada iki farklı ekstraksiyon yöntemi ile toplam 398 yumru ekstrakte edilmiştir. “Silica capture” yöntemi ile yapılan ekstraksiyonlarda nanodrop spektrofotometre ile yapılan ölçümlerde ekstraktın içinde RNA miktarının çok az ve kalitesiz olduğu gözlenirken, LiCl yöntemi ile yapılan ekstraksiyonlarda elde edilen RNA'ların çok iyi kalitede olmamasına rağmen PCR yapılabilecek düzeyde ve kalitede RNA miktarının olduğu saptanmıştır.

Ekstrakte edilen RNA'ların PSTVd'ine karşı testlemelerinde iki farklı primer çifti (PSTVd1/PSTVd2 ve 3H1/2H1) kullanılmıştır. PCR ürünleri %1-1,5 agaroz jelde elektroforez işlemi ile görsel hale getirilmiştir. Her iki primer çifti ile yapılan RT-PCR testleri sonucunda tüm yumrular negatif olarak saptanmıştır.

Ülkemizde birkaç araştırmacı tarafından yürütülen çalışmalarda PSTVd çok düşük oranlarda bulunmuştur. Yapılan bu çalışmada ise testlenen toplam 398 patates yumrusunun PSTVd açısından negatif bulunması bu viroidin ülkemizde bulunmadığı anlamına gelmemelidir. Tohumluk olarak kullanılacak materyalin mutlaka testlenmesi ve temiz materyalin kullanılması gerekmektedir.

Bilindiği üzere viroid hastalıklarının bir kimyasal mücadelesi bulunmamaktadır. Patateslerde sorun olan PSTVd hastalıklı yumruların üretimde kullanılmasıyla ve mekanik olarak taşınmaktadır. Bu yüzden gerek yurtdışından ithal edilen yumruların gerek üreticilerin kendi ürettikleri yumruların mutlak süretle viroidden ari olması hastalığın kontrolünde önem taşımaktadır.

Patatesin yumru ve vejetatif yolla çoğaltılması, hastalık ve zararlıların tohumla daha kolay taşınmasına, tohumluk kaitesinin daha hızlı bozularak verim ve kalitede önemli düşüş olmasına neden olmaktadır. Patates üretiminin verimli ve sürdürülebilir olması için tohumluk materyalin mutlaka virüs ve viroid gibi etmenlerden ari olması gerekmektedir. Bu nedenle patates yumrularının ithalatında karantina analizi yapılan laboratuvarlarda hassas ve güvenilir test yöntemleri kullanılarak PSTVd'e karşı mutlak

surette testlenmesi gerekmektedir. Tohumluk patates yumrularının gerek viroid gerekse diğer viral, fungal ve bakteriyel hastalıklar açısından temiz olması sağlıklı ve ekonomik üretim yapılabilmesi için mutlaka gereklidir.

KAYNAKLAR

- Anonim, 2015. www.kcom.edu/faculty/chamberlain/Website/Lects/PRIONS.HTM. Erişim tarihi: 10.04.2015
- Barbora, D.J., Morton, A. and Adams, A.N., 1990. Assessment of UK. Hops for the occurrence of hop latent and hop stunt viroids. **Ann. Appl. Biol.** 116: 265-272.
- Behjatnia, S. A. A., Dry, I. B., Krake, L. R., Conde, B. D., Connelly, M. I., Randles, J. W. & Rezaian, M. A., 1996. New potato spindle tuber viroid and tomato leafcurl geminivirus strains from a wild *Solanum* sp. **Phytopathology**, 86, 880–886.
- Bitters, W.P., 1952. **Exocortis Disease of Citrus California Agriculture**, 6, 5-6.
- Bostan, H., Guclu, C., Ozturk, E., I, Ozdemir., Ilbagi, H., 2006. Influence of aphids on the epidemiology of potato virus diseases (PVY, PVS and PLRV) in the high altitude areas of Turkey, Pakistan. **Journal of Biological Sciences**, 9(4), 759-765. doi:10.3923/pjbs.2006.759.765.
- Bostan, H., Gazel, M., Elibuyuk, I.O., Caglayan, K., 2010. Occurrence of pospiviroid in potato, tomato and some ornamental plants in Turkey. **African Journal of Biotechnology**, 9: 2613-2617.
- Brunt, A. A., 2001. The main viruses infecting potato crops, *In*: Loeben-stein, G., P.H. Berger, A.A. Brunt, and R.H. Lawson (eds), virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, pp. 65-67
- CABI/EPPO, 2012. Potato spindle tuber viroid. [Distribution map]. **Distribution Maps of Plant Diseases**, No.April. Wallingford, UK: CABI, Map 729 (Edition 2).
- Cramer, H.H., 1967. **Pflanzenschutz Nachrichten "Bayer"** 20-1.
- Di Serio F ve ark., 2014. Current Status of Viroid Taxonomy. **Archives of Virology**, 159:3467-3478.
- Diener, T. O., and Raymer, W.B., 1967. **Potato Spindle Tuber Virus: A Plant Virus with Properties of Nucleic Acid Science**, 158:378-381.
- Diener, T.O., 1971. Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid III. Subcellular location of PSTVd-RNA and the question of whether virions exist in extracts or *in situ*, **Virology**, Jan; 43(1): 75-89.
- Diener, T.O., 1987. The viroids. **Plenum Publishing Corporation**, New York. 344.
- Ding, B. and Owens, R.A., 2003. Movement. *In*: Viroids A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik, Eds. Csiro Publishing: Australia. Pages 49-55.
- EPPO, 2014. PQR database. Paris, France: European and Mediterranean Plant Protection Organization. <http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>. Erişim tarihi: 05.11.2014
- Foissac, X., Svanella-Dumas, L., Gentit, P., Dulucq, M.J., Marais, A. ve Candresse C. 2005. Polyvalent degenerate oligonucleotides reverse transcription-polymerase chain reaction: a polyvalent detection and characterization tool for Trichoviruses, Capilloviruses, and Foveaviruses. **Phytopathology**. 95 (6): 617-625.
- Flores, R., Randles, J.W., and Bar-Joseph, M., 2005. www.thesis.library.adelaide.edu.au/uploads/approved/adt. Erişim tarihi: 07.03.2015
- Gross, J.H., Domdey, H., Loslow, C., Jank, P. Raba, M., Alberty, H., and Sanger, H.L., 1978. Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. **Nature**, 273: 203-208.

- Güner, U., Sipahioglu, M.H., Usta, M., 2012. Incidence and genetic stability of *Potato spindle tuber pospiviroid* in potato in Turkey. **Turk J Agric For** 36 353-363 © TÜBİTAK doi:10.3906/tar-1103-54.
- Güner, U., Sipahioglu, M.H., Erkan, S., 2014. Domates Tohumlarında Potato Spindle Tuber Pospiviroid (PSTVd)'in RT-PCR Yöntemi ile Tespiti, **Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi**, 3-5 Şubat 2014, Antalya.
- Güllü, M., 1989. Doğu Akdeniz Bölgesi Navel grubu portakal ve Satsuma mandarin ağaçlarında yaygın virüs ve virüs-benzeri hastalıkların sörveyi ve indekslenmesi üzerine çalışmalar. **Çukurova Üniv. Fen Bil. Enst., Doktora tezi**, Adana, Türkiye, 266s.
- Hanold, D., ve Randles, J.W., 1991. Coconut Cadang Cadang Disease and Its Viroid Agent. **Plant Disease**, 75:330.
- Hooker, W.J., 1986. Compendium of Potato Diseases. **American Phytopathological Society Press.**, St. Paul, Minnesota, 125p.
- Hull, R., 2002. Matthews plant virology (4th. edition). **Academic press: San Diego, CA.**
- Jeffries, C., 1998. FAO/IPGRI Technical Guidelines for safe movement of germplasm. No 19. **Potato**. (ISBN 92-904-390-6).
- Jones, E.D., 1988. A current assessment of *in vitro* culture and other rapid multiplication methods in North America and Europe. **Am. Potato J.**, 65: 209-220.
- Keese, P., ve Symons, R.H., 1985. Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. **Proc. Natl. Sci. USA**, 82: 4582-4586.
- Keese, P., ve Symons, R.H., 1987. Physical-chemical properties: molecular structure. In: **The viroids**. T.O. Diener, ed. Plenum Pres: New York. 37-62 p.
- Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J. 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Edition. **Cold Spring Harbor Laboratory (CSH)**, New York, 545.
- McDonald, J. G., 1984. Viruses associated with mosaic symptoms in Russet Burbank potato. **Can. J. of Plant Path.** 6: 224-226.
- Mumford R.A., Jarvis B., Skelton A., 2003. The first report of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) in commercial tomatoes in the UK. **The British Society for Plant Pathology; New Disease Reports** www.bspp.org.uk/ndr/jan2004/2003-68.asp. Erişim tarihi: 02.02.2015
- Önelge, N., 1994. Biological Indexing and Biochemical Studies on Citrus Viroids. **Ph. D. thesis. University of Cukurova**, Adana, Turkey, 109 s.
- Özbek, H., 1984. Aphid'lerin patates tohumluğu yetiştirme yerinin seçimindeki önemi. **Türk. Bit. Kor. Derg.** (1984), 8: 111-119
- Özer, Z., 1977. Patates kültüründe yabancıotlar ve kimyasal mücadelesi. **Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 8: 4, 95-106 Erzurum.
- Querci M., Owens R., Bartolini I., Lazarte V., Salazar L.F., 1997. Evidence for heterologous encapsulation of *Potato spindle tuber viroid* in particles of potato leafroll virus. **Journal of General Virology** 78, 1207-1211.
- Randles, J.W., 2003. **Viroids**. Economic Impact of Viroid Diseases pp. 3-11.
- Randles, J.W., ve Rodriguez, M.J.B., 2003. **Coconut cadang-cadang viroid**. in: Viroids A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik, Eds. Csiro Publishing: Australia Pages 233-242.
- Riesner, D., ve Gross, H.J., 1985. **Viroids**. Annual Reviews of Biochemistry 54: 531-

564.

- Salazar, L.F., 1989. Potato spindle tuber viroid. In 'Plant Protection and Quarantine Vol 2. Selected Pests and Pathogens of Quarantine Significance'. (Ed RP Kahn) pp.155-167. (CRC Press Inc.).
- Salazar, L.F. 1996. Potato Viruses and Their Control. **CIP**, Lima. 214 pp.
- Salibe, A.A., 1965. A Quick Field Test for Xyloporosis Virus. In. Proc. 3rd Conf. IOCV, Univ. **Of Flo Pres Gainesville**. 108-113.
- Sänger, H.L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H.J., ve Kleinschmidt, A.K., 1976. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 73: 3852-3856.
- Sano, T., Candresse, T., Hammond, R.W., Diener, T.O., ve Owens, R.A., 1992. Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 89: 10104-10108.
- Shamloul A.M., Hadidi A, Zhu S.F., Singh R.P., Sagredo B., 1997. Sensitive detection of potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. **Canadian Journal of Plant Pathology** 19, 89-96.
- Shukla, D.D., Ward, C.W., Brunt, A.A., 1994. The Potyviridae. **Cambridge Universty Press**. Cambridge.
- Singh, R.P., 1988. Occurrence, diagnosis and eradication of the potato spindle tuber viroid in Canada. **Viroids of plant and their detection. International Seminar**, 12-20 August 1986. Warsaw, Poland. Pp. 37-50.
- Singh R.P., 1998. Viroids twenty-fi ve years later: personal reflections. n: Topics in Tropical Virology (Eds. DN Black, DD Shukla, N Rishi). **Malhotra Publishing House, New Delhi**, pp. 131-152.
- Singh, R.P., 1999. A solvent-free, rapid and simple virus RNA-release method for otato leafroll virus detection in aphids and plants by reverse transcription polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods**, 83: 27-33.
- Singh, R.P., Ready, K.F.M., and Nie, X., 2003. Biology. In: Viroids A. Hadidi, R., Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik, Eds. **Csiro Publishing**: Australia. Pages 30-49.
- Slack, S.A., 1995. Potato viruses with some implications for production and processingin the United States: a history of problems and solutions. **Summa Phytopathologica**, 21: 273-275.
- Spiegel, S., ve Martin, R.P., 1993. Improved detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers and micro tubers by the polymerase chain reaction and ELISA. **Ann. Appl. Biol.** 121: 493-500.
- Spiegel, S., S. W. Scott, V. Bowman-Vance, Y. Tam, N. N. Galiakparov ve A. Rosner, 1996. Improved detection of Prunus necrotic ringspot virus by the polymerase cahain reaction. **European Journal of Plant Pathology**,102: 681-685.
- Şenol, S., 1970. Türkiye Ziraatında Patatesin Önemi, Yeri ve Gelişme İmkanları. **Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, cilt:1, sayı:3.
- Verhoeven, J.ThJ, Botermans M, Roenhorst JW, Westerhof J & Meekes ETM., 2009. First report of *Potato spindle tuber viroid* in Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) from Turkey and Germany. **Plant Disease** 93, 316.
- Walkey, D.G.A., 1991. **Applied Plant Virology**. St. Edmundsbury Press, Bury St. Edmunds, Suffolk, USA, 338p.
- Ward, L.I., Tang,J., Veerakone, S., Quinn, B.D., Harper, S.C., Delmiglio, C. ve Clover,

- G.R.G., 2010. First Report of *Potato spindle tuber viroid* in Cape Gooseberry (*Physalis peruviana*) in New Zealand. **Plant Disease** 94: 479
- Weathers, L.G., Green, F.C., ve Harjung, M. K., 1967. Transmission of Exocortis Virus of Citrus to Herbaceous Plants. **Plant Disease**, 51: 868-871.
- Yamamoto, H., Kagami, Y., Kurokawa, M., Nishimura, S., ve Kubo, 1973. Studies on hop stunt disease in Japan. **Rep. Res. Lab. Brew. Co.**, 16: 49.
- Zhukovsky, 1933. Türkiyenin Zirai bünyesi. *Leningrad. T. Şeker Fab. A.Ş.*

ÖZGEÇMİŞ

1988 Yılında Antakya' da doğdum. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimimi Antakya'da tamamladım. 2006 Yılında Eskişehir Anadolu Üniversitesi Biyoloji bölümünü kazanıp 2012 yılında mezun oldum. Öğrencilik dönemimde ProGen A.Ş.' de 2011 yılının temmuz ayında 1 aylık staj programına katıldım. Stajımı yaparken aynı anda lisans tezi uygulamalarımı da ProGen şirketinde yaptım. Ardından 2012 yılının eylül ayında Mustafa Kemal Üniversitesi Biyoloji bölümü Ekoloji Ana Bilim dalında yüksek lisansa başladım. O tarihten itibaren hala da devam eden kuyumculuk mesleğini devam ettirirken ek olarak da haftanın 2 günü sahne alıyordum.

EKLER

EK 1. Silica capture RNA ekstaksiyonunda kullanılan çözeltiler ve içerikleri

Ezme tamponu (Grinding Buffer) (100 ml)

Guanidine Thiocyanate (4.0 M)	11.8 gr
0.5 M EDTA pH: 8.0 (25mM)	5 ml
5 M KOAc pH: 7.5 (1.0MM)	20 ml
3 M NaOAc pH: 5.2 (0.2M)	6.6 ml
PVP 40 (% 2.5)	0.25 gr

Yıkama Tamponu

10 mM Tris-HCl, pH: 7.5
0.5 mM EDTA
50 mM NaCl
% 50 Ethanol (EtOH)

0.5 M EDTA, pH 8.0

100 ml d₂H₂O' da 0.0145 gr EDTA eritilmiş ve pH'sı NaOH pelletleri ile 8.0'a ayarlanmıştır. Otoklav edilerek oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

5 M NaOAc, pH 5.2

60 ml d₂H₂O' da 29.445 gr NaOAc çözüldürülmüş, glacial asetik asid damlatılarak pH 6.0'a ayarlanmış ve suyla 100 ml'ye tamamlanmıştır.

NaI Solüsyonu

40 ml d₂H₂O' da 0.75 gr Na₂SO₃ çözüldürülmüş ve 36 gr NaI eklenerek karıştırılmıştır. Solüsyon karanlık ortamda +4°C'de muhafaza edilmiştir.

10 mM Tris-HCl, pH:7.5

80 ml d_2H_2O ' da 0.121 gr trizma base çözüldürülmüş ve HCl eklenerek pH dengelenmiştir. suyla 100 ml'ye tamamlanıp otoklav edilmiş ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir

50mM NaCl

0.29 gr NaCl 50 ml d_2H_2O 'ya tamamlanacak şekilde çözüldürülmüştür.

Resüspanse silica

60 gr silica üzerine 500 ml d_2H_2O eklenmiş, karışımın çökmesi için 24 saat beklenmiştir. Üst fazın 470 ml'si dökülüp üzerine 500 ml d_2H_2O eklenmiş ve çökmesi için 5 saat beklenmiştir. Karışımın üst fazından 440 ml alınıp, 60 ml çamurlu kısım atılmış ve karışım HCl ile pH 2.0 ayarlanarak ve otoklav edilip +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

EK 2. LiCl yönteminin kimyasalarının hazırlanışı

RNA LiCl ezme tamponu (100 ml)

1 M Tris HCl pH: 8-8.5	20 ml
% 10 SDS	15 ml
4 M LiCl	7.5 ml
0.5 EDTA	2 ml
Sodium deoxychloride acid	1 gr
Nonidet P40	1 ml

% 10 SDS (100 ml)

10 gr SDS bir miktar d₂H₂O'da çözündürülüp üzeri 100 ml d₂H₂O'ya tamamlanmıştır

5 M KoAc (100 ml)

29.445 gr KoAc 60 ml d₂H₂O'da çözündürülüp Glacial acetic acid damlatılarak pH'sı 6'ya ayarlanmış ve 100 ml'ye tamamlanmıştır.

EK 3. Agaroz jel elektroforez (Maniatis ve ark., 1982)

TAEX50 (100 ml)

0.5 M EDTA pH:8	10 ml
0.6 Glacial acetic acide	5.71 ml
Trizma base	24.2 gr

Çözelti 100 ml d₂H₂O'ya tamamlanıp otoklav edilmiş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

PCR ürününün yükleme ortamı (15 ml 6X stok için)

Bromophenol blue	15 ml
Glycerol	18 gr
TAEX50	6 ml

Hazırlanan ortam -20 °C'de saklanmıştır.

Ethidium Bromide çözeltisi (1 mg/ml 200 ml stok için)

0.5XTAE	200 ml
Ethidium bromide	200 µl

Koyu renkli bir kap içinde karanlık ortamda oda sıcaklığında saklanmıştır. 5-10 kullanımdan sonra çözelti tazelenmiştir.

%1 Agarose Jel Elektroforezi

1 gr agaroz, 100 ml 0.5XTAE içinde mikrodalga fırında eritilmiştir. Yaklaşık 40°C sıcaklığa geldikten sonra, elektroforez ünitesinin jel tepsisine dökülüp taraklar yerleştirildikten sonra agarozun donması beklenmiştir (15-20 dakika). 0.5XTAE ortamı içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir.