



**TEKİRDAĞ İLİNDE ÜRETİMİ YAPILAN  
SERT ÇEKİRDEKLİ MEYVE AĞAÇLARINDA  
*Plum pox virus* (PPV) VE *Prunus necrotic ringspot  
virus* (PNRSV)'LERİNİN SAPTANMASI  
ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

**Mourat CHEKİM AMET**

**Yüksek Lisans Tezi**

**BİTKİ KORUMA Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Havva İLBAĞI**

T.C.  
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEKİRDAĞ İLİNDE ÜRETİMİ YAPILAN SERT ÇEKİRDEKLİ MEYVE  
AĞAÇLARINDA *Plum pox virus* (PPV) VE *Prunus necrotic ringspot virus*  
(PNRSV)'LERİNİN SAPTANMASI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Mourat CHEKİM AMET

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Havva İLBAĞI

TEKİRDAĞ-2021

Her hakkı saklıdır.

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### TEKİRDAĞ İLİNDE ÜRETİMİ YAPILAN SERT ÇEKİRDEKLİ MEYVE AĞAÇLARINDA *Plum pox virus* (PPV) VE *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV)'LERİNİN SAPTANMASI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

**Mourat CHEKİM AMET**

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Havva İLBAĞI

Tekirdağ ili ve ilçelerindeki sert çekirdekli meyve üretimini olumsuz yönde etkileyen *Plum pox virus* (PPV) ve *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) hastalıklarını saptamak amacıyla 2018 yılı Haziran ve Temmuz aylarında sürvey çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sürvey çalışmalarında Tekirdağ ili merkez Süleymanpaşa ilçesinden 71 adet yaprak örneği, Şarköy ilçesinden 30, Muratlı ilçesinden 25, Çorlu ilçesinden 19 ve Malkara ilçesinden 13 adet yaprak örneği olmak üzere toplam 158 adet yaprak örneği toplanmıştır. Böylece mozaik, nekrotik ve klorotik lekeler, damar bantlaşması ve şekil bozuklukları sergileyen 76 adet kiraz, 35 adet erik, 28 adet şeftali, 19 adet kayısı yaprak örneklerinde PPV ve PNRSV'nin varlığı Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) testi ile araştırılmıştır. Ayrıca halkalı leke ve damar bantlaşması belirtileri sergileyen kiraz yaprak örneklerinde *Plum pox virus* (PPV), Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) testi ile araştırılmıştır. DAS-ELISA testi sonuçlarına göre 16 adet örneğin PPV ile 4 adet örneğin ise PNRSV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. RT-PCR test sonuçlarına göre kiraz yaprak örneklerinde PPV saptanmamıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda %10.13 oranında PPV ile enfeksiyon oranı saptanırken, PNRSV ile enfeksiyon oranı %2.53 olarak tespit edilmiştir. Her iki virüsün neden olduğu ildeki toplam enfeksiyon oranı ise %12.66 olarak bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** DAS-ELISA, RT-PCR, PNRSV, PPV, Sert çekirdekli meyve

2021, 49 sayfa

## ABSTRACT

MSc. Thesis

INVESTIGATION on DETECTION of *Plum pox virus* (PPV) and *Prunus necrotic leafspot virus* (PNRSV) in STONE FRUIT GROWING AREAS in TEKIRDAG

**Mourat CHEKİM AMET**

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

Süpervisor: Prof. Dr. Havva İLBAĞI

The survey studies have been performed in June and July of 2018 to identify the *Plum pox virus* (PPV) and *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), negatively affecting stone fruit production in its districts and Tekirdag province. During the survey studies a total of 158 leaf samples, including 71 leaves from center district Süleymanpaşa, 25 samples from Muratlı district, 19 samples from Çorlu district, 13 samples from Malkara district were collected. Thus, symptomatic leaf samples exhibiting mosaic, necrotic and chlorotic local spots, vein banding, and leaf deformations symptoms of sweet cherry (76), plum (35), peach (28), apricot (19) were tested for the presence of PPV and PNRSV by Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA). Moreover, infected sweet cherry leaf samples showing ring spot and vein banding symptoms were tested by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). DAS-ELISA test results showed that the infections of PPV and PNRSV, on 16 and 4 leaf samples, respectively. RT-PCR test results revealed that PPV was found in none of the sweet cherry leaf samples. As a result of this study were obtained the infection rate % 10.13 of PPV, while PNRSV had an infection rate as % of 2.53. The total infection rate in the Tekirdag province for both viruses were found % 12.66.

**Key words:** DAS-ELISA, PNRSV, PPV, RT-PCR, Stone fruit

2021, 49 pages

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÇİZELGE DİZİNİ</b> .....	<b>iv</b>
<b>ŞEKİL DİZİNİ</b> .....	<b>v</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b> .....	<b>vi</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>vii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	<b>6</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	<b>15</b>
3.1. MATERYAL .....	15
3.1.1. Sürvey Çalışmaları .....	15
3.1.2. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması .....	16
3.1.3. DAS-ELISA Testinde Kullanılan Materyaller .....	16
3.1.4. RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) Testinde Kullanılan Materyaller .....	16
3.2. YÖNTEM .....	18
3.2.1. Arazi Gözlemleri ve Enfekteli Bitki Materyalinin Elde Edilmesi .....	18
3.2.2. Serolojik Test Yöntemi (DAS-ELISA Testi) .....	19
3.2.3. Moleküler Test Yöntemi (RT-PCR Testi) .....	23
3.2.3.1. Total Nükleik asit Ekstraksiyonu .....	23
3.2.3.2. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Testi .....	24
3.2.3.2.1. Complementer DNA (cDNA) Sentezi .....	24
3.2.3.2.2. Polymerase Chain Reaction (PCR) Testi .....	24
3.2.3.3. %2'lik Agaroz Jelin Hazırlanması .....	25
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI</b> .....	<b>26</b>
4.1. Arazi Çalışmalarına İlişkin Bulgular .....	26
4.2. DAS-ELISA Test Sonuçları .....	32
4.3. RT-PCR Test Sonuçları .....	33
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	<b>35</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	<b>39</b>
<b>7. EKLER</b> .....	<b>45</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>49</b>

## ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 1.1. 2018 yılında Dünya'daki sert çekirdekli üretim alanı ve miktarları (Anonim, 2018a).....	2
Çizelge 1.2. 2018 yılı Türkiye'deki sert çekirdekli meyve üretim alanı ve miktarları (Anonim,2018b).....	3
Çizelge 3.1 Tekirdağ ili sert çekirdekli meyve üretim alanlarından toplanan örneklerin alındığı yer, çeşit adı ve örnek adedi .....	18
Çizelge 3.2. PPV hastalığının PCR ile çoğaltımında uygulanan sıcaklık aralıkları .....	25
Çizelge 4.1. Tekirdağ ili sert çekirdekli meyve üretim alanlarında DAS-ELISA test yöntemiyle saptanan viral hastalık etmenleri .....	33



## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 3.1. Tekirdağ ili ve ilçelerinde sürvey çalışmalarının gerçekleştirildiği alanlar.....	15
Şekil 3.2. Porselen havanlarda enfekteli bitkilerden elde edilen bitki ekstraktları.....	21
Şekil 3.3. DAS-ELISA testinde ELISA platelerinin yıkanması işlemi .....	22
Şekil 4.1. Tekirdağ ili Çorlu ilçesi bir ev bahçesindeki erik ağacından alınan yapraklardaki halkalı leke simptomlarının görünümü .....	26
Şekil 4.2. Tekirdağ ili Çorlu ve Muratlı ilçesinde erik yapraklarındaki halkalı leke ve damar bantlaşması simptomları.....	27
Şekil 4.3. Tekirdağ ili Muratlı ilçesinde erik yapraklarındaki halkalı leke simptomları .....	27
Şekil 4.4. Süleymanpaşa ilçesi Naip köyünde kiraz yapraklarında klorotik lokal lekelerin görünümü .....	28
Şekil 4.5. Tekirdağ Nusratlı köyündeki kiraz bahçesinden alınan yapraklarda halkalı leke ve klorotik leke simptomları .....	28
Şekil 4.6. Süleymanpaşa ilçesi Barbaros mahallesindeki kiraz yapraklarındaki karakteristik lokal lekeler, mozaik ve damar bantlaşması belirtileri .....	29
Şekil 4.7. Tekirdağ ili merkeze bağlı Naip köyünden alınan kiraz yapraklarında tipik sistemik simptomlar .....	29
Şekil 4.8. Şarköy ilçesinde kayısı yapraklarında tipik damar bantlaşması simptomlarının görünümü .....	30
Şekil 4.9. Muratlı ilçesinden alınan kayısı yaprak örneklerinde halkalı lekeler ve damarlar arası renk değişikliklerinin görünümü (soldaki sağlıklı yaprak) .....	30
Şekil 4.10. DAS-ELISA testinde pozitif reaksiyon veren örneklerin görünümü.....	32

## SİMGELER VE KISALTMALAR

BSA	Bovine serum albümin
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik asit
DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich-ELISA
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
g	Gram
HCl	Hidroklorik asit
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum dihidrojen Fosfat
KCl	Potasyum klorür
lt	Litre
mg	Miligram
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum Klorür
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
nm	Nanometre
NaCl	Sodyum Klorür
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sodyum Karbonat
NaHCO <sub>3</sub>	Sodyum bikarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	Disodyum hidrojen fosfat
NaN <sub>3</sub>	Sodyum azid
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PBST	Fosfat Tampon Çözeltisi
PPV	<i>Plum Pox Virus</i>
PNRSV	<i>Prunus necrotic ringspot virus</i>
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
Taq	Taq polimeraz



## TEŞEKKÜR

Bu araştırma konusunun belirlenmesinde, tezimin hazırlanmasında ve bana her konuda rehberlik eden danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Havva İLBAĞI'na, Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇITIR'a, çalışmalarım esnasında vermiş olduğu destekten dolayı Tekirdağ Bağcılık Araştırma İstasyonu M¼d¼rl¼đ¼ personeli Sayın Dr. Lerzan ÖZT¼RK'e, sonsuz teőekk¼rlerimi sunarım. Eğitim hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen beni yetiştiren her zaman yanımda olan aileme en içten teőekk¼rlerimi sunarım. Tez çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen kardeşim gibi bildiğim kuzenim ve aynı zamanda meslektaşım olan Ziraat M¼hendisi Mesut CHEKİM AHMET'e teőekk¼r ederim.

Mourat CHEKİM AMET  
Ziraat M¼hendisi

## 1. GİRİŞ

Türkiye, iklim kuşağındaki konumu itibarıyla meyve yetiştiriciliği açısından üstün ekolojik avantajlara sahiptir. Farklı iklim koşullarına sahip olması nedeniyle de ülkenin değişik bölgelerinde birçok meyve türü, çok eski yıllardan beri yetiştirilmektedir. Dünyada mevcut gen merkezlerinden hem Yakınoğu ve hem de Akdeniz havzası içinde yer alan Türkiye, birçok tür ve çeşidin gen merkezi konumundadır. Bu durum ekolojik koşulların meyve yetiştiriciliğine uygun olması nedeniyle de avantaj sağlamaktadır. Nitekim, bugün dünya üzerinde kültürü yapılan 138 meyve türünden çoğunluğu ılıman iklim meyve türleri olmak üzere, tropik ve subtropik meyve türleri de dahil olmak üzere 80'den fazla tür ülkemizde yetiştirilebilmektedir. Türkiye'de eski yıllardan beri elma, armut, ayva, fındık, antep fıstığı, kestane, badem, vişne, kiraz, erik, üzüm, nar, zeytin gibi birçok meyve türü yetiştirilmektedir. Kültürü yapılan meyve türleri dışında alıç, üvez, kuşburnu, keçiboynuzu, melengiç, buttum, idris, iğde, kızılılık, dut gibi birçok yabancı meyveye de rastlanmaktadır. Eski yıllarda meyvecilik birden fazla türün bir arada bulunduğu, geniş aralıktaki mesafelerle dikilen bahçelerde yapılmaktadır. Kullanılan çeşitlerin bir kısmı yerel çeşitler olup, verimi düşük olan ancak bazı meyve özellikleri ile ön plana çıkan çeşitlerdir. Bunun yanında çok uzun yıllar, bütün dünyada kullanılan bazı yabancı çeşitlerin de yetiştiriciliği yapılmaktadır. Ülkemizde görülen büyük tür zenginliğinin yanında yine büyük bir çeşit bolluğu ile de karşılaşmaktadır. Nitekim elmada çeşit sayısı 500'ü, armutta 600'ü, erikte 200'ü, şeftalide 100'ü ve üzümde 1200'ü aşmıştır (Ağaoğlu, 1987). Ülkemiz, bahçe kültürünün beşiğı olması nedeniyle çeşitli meyvelerin üretim ve işletmelerinin oluşturulmasına da olanak sağlamaktadır. Örneğın şeftali denince Bursa, kayısı denince Malatya, incirde Aydın, çekirdeksiz üzümde Manisa, fıstıkta Antep ve Urfa, narda Urfa, fındıkta Ordu ve Giresun illeri dünya piyasalarında ürünleri ile birlikte birer kalite sembolü olarak bilinirler. Meyvelerin yetiştirilmesinde iklim faktörü önemli rol oynamaktadır. Tropikal iklim meyveleri kış sıcaklığının 0 °C'ye düşmesi halinde donarlar. Subtropikal iklim meyveleri 0 °C'nin altındaki sıcaklıklara bir ölçüde dayanabilmektedir. Turunçgil meyveleri -2 °C'de dondukları halde, ağaçlar -10 °C'ye kadar dayanabilirler. Zeytin ve incirler de -10 °C'ye kadar dayanabilirler. İlıman iklim meyveleri daha düşük sıcaklıklara dayanabilirler. Elma ve armut dinlenme döneminde buldukları kış aylarında sıcaklığın -30 °C'ye kadar düşmesinden dahi zarar görmezler. Şeftali ise -20 °C'ye kadar dayanabilir (Anameriç, 1986). Erik kültürü üzerine bilgiler 2000 yıl öncesine dayanmaktadır. Genel olarak eriğın anavatanı Anadolu, Hazar Denizi civarı ve Kafkasya olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, Anadolu erik için de önemli bir gen kaynağını oluşturmaktadır (Özbek, 1978; Özvardar ve Önal, 1990). Erik'te çeşit seçimi ile ilgili

yapılan ilk çalışmada 22 yerli ve yabancı erik çeşitlerinin farklı fenolojik ve pomolojik özellikleri belirlenmiş, değerlendirme şekilleri, olgunlaşma tarihleri, verim ve kaliteleri gözetilerek Marmara Bölgesi için R.C.Violet ve Giant (sofralık), R.C Verte (sofralık ve konservelik), Stanley (sofralık ve kurutmalık), d'Agén ve Köstendil (kurutmalık) ümitvar çeşitler olarak belirtilmiştir (Onur, 1973). Prunus cinsine giren şeftali *Prunus persica* Stokes (Batsch) içerisinde başlıca üç kültür formu bulunmaktadır. Bunlar tüylü, tüsüz ve domates şeftalisi (Özbek, 1978; Eriş ve Barut, 2000) türleridir. Kiraz (*Prunus avium* L.), yabancı çeşit olarak Toroslarda, Doğu Toroslarda ve Kuzey Anadolu dağlarında çok sayıda kiraz ağaçları bulunmaktadır (Özbek, 1978). Kayısı, Ülkemizde yetiştirilen ve ihraç edilen meyve türlerinden biridir. Anadolu, kayısının esas anavatanı olmamasına karşılık en az iki bin yıldan beri bu topraklarda tarımı yapılmasından ötürü çok zengin genetik zenginliğe ulaşmıştır. Gerek üretim ve gerekse dışsattım kapasitesi yönünden Türkiye'nin önemli ürünlerinden biridir (Asma, 2000). Ülkemizde çok yağışlı Karadeniz bölgesi hariç hemen hemen her yerde kayısı ağacına rastlanmakla birlikte kurutmalık kayısı tarımı daha çok Malatya, Elazığ, Sivas (Gürün) ve Kahramanmaraş (Elbistan) illerinde, sofralık kayısı üretimi ise Mersin, Antalya, Isparta'yı kapsayan Akdeniz Bölgesi'nde yoğunlaşmıştır (Asma, 2011).

Türkiye'nin 2017-2018 dönemi yıllık meyve üretim rekoltesi sert ve yumuşak çekirdekli meyveler olarak yumuşak çekirdekli meyve üretimi 4 321 890 ton, sert çekirdekli meyve üretimi ise 2 660 066 ton olarak gerçekleşmiştir (Anonim, 2019).

Çizelge 1.1. 2018 yılında Dünya'daki sert çekirdekli meyve ağaçları toplam üretim alanı ve miktarları (Anonim, 2018a)

Ülke	Alan (ha)	Üretim miktarı (ton)
<b>Türkiye</b>	84.087	639.564
<b>ABD</b>	34.398	312.430
<b>Özbekistan</b>	12.161	172.035
<b>Şili</b>	30.170	155.935
<b>İran</b>	17.024	137.268
<b>İtalya</b>	29.156	114.798
<b>İspanya</b>	27.368	106.584

Türkiye, toprak, iklim ve bitki gen kaynakları bakımından çok zengin bir ülkedir. Anadolu'nun uygun ekolojik koşullarında çok sayıda meyve ve sebzenin yetiştirilerek ihraç edilmektedir. Ülkemiz gerek üretim miktarı, gerekse meyve tür ve çeşit sayısı bakımından dünyanın önemli meyve üreticisi ülkeleri arasında yer almaktadır.

Çizelge 1.2. 2018 yılı Türkiye'deki sert çekirdekli meyve üretim alanı ve miktarları (Anonim, 2018b)

<b>Şehir</b>	<b>Alan (ha)</b>	<b>Üretim miktarı (ton)</b>
<b>İzmir</b>	119.865	57.892
<b>Manisa</b>	96.533	47.348
<b>Konya</b>	70.987	68.204
<b>Bursa</b>	60.109	52.235
<b>Isparta</b>	53.319	36.275
<b>Afyonkarahisar</b>	43.493	41.043
<b>Denizli</b>	35.439	24.868
<b>Niğde</b>	26.190	27.012
<b>Amasya</b>	25.751	36.444
<b>Çanakkale</b>	16.952	20.906
<b>Diğer İller</b>	292.228	227.337
<b>Toplam</b>	840.866	639.564

Kültür bitkilerinin çoğunda olduğu gibi sert çekirdekli meyve ağaçlarında da virüs hastalıklarından dolayı zararlar meydana geldiği ve ürün kaybı oluştuğu bildirilmektedir. Bugüne kadar sert çekirdekli meyve ağaçlarını etkileyen 150'den fazla virüs, viroid, fitoplazma; göz ve kalem aşısı ile taşınabilen virüs ve virüs benzeri hastalık etmeni rapor edilmiştir (Dunez, 1990). Sert çekirdekli meyvelerdeki ekonomik öneme sahip önemli virüs hastalıklarından, PPV ilk kez Bulgaristan'da 1900'lü yılların başlarında saptanmış ve hızla yayılarak tüm sert çekirdekli meyveleri tehdit etmeye başlamıştır. Karantina listelerinde büyük bir öneme sahip olan şarka hastalığı hakkında dünyada çok sayıda çalışma yapılmıştır. (OEPP/EPPO, 1983). Potyviriidae familyası, *Potyvirus* cinsinin bir mensubu olan *Plum pox virus* (PPV), 750x15 nm

boyutlarında esnek ipliksi formda virionlara sahiptir. Tek parçalı, pozitif (+) duyarlı yaklaşık 9800 nükleotid içeren RNA genomu, VPg genomla ilişkili 5' nükleotid kısmına kovalent bağlı bir viral protein ve 3' ucunda poly (A) kuyruğu içermektedir. PPV genomu üzerinde farklı fonksiyon ve işlem yeteneğine sahip proteinleri şifreleyen alt bölgeler bulunmaktadır. Genom bisistronik olup büyük bir açık okuma bölgesinden (ORF) oluşur ve yaklaşık 355 kDa ağırlığında bir tek poliproteini kodlamaktadır. Bu proteinler P1, HCPro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa-VPg, NIaPro, NIb ve CP'dir (Garcia vd., 1994; Laín, Riechmann ve Garcia, 1989; Maiss Timpe vd., 1989). PPV; meyve ağaçlarında, yaprak ve meyvelerde gözlenen çarpıcı belirtilere neden olduğu gibi aynı zamanda ağaçları zayıf düşürerek ömrünü de kısaltmaktadır. Semptomlar çeşit, yaş ve sıcaklığa göre çok değişkenlik göstermektedir. Farklı PPV ırk ve izolatları, hastalık şiddeti ve belirti oluşumunda değişiklikler göstermektedir. PPV, deneysel olarak birçok tür ve çeşitten yabancı bitkiye mekanik olarak taşınmasına rağmen bahçe içerisindeki yayılımı veya taşınması tam olarak belirlenmemiştir. Ancak bahçe koşullarında bazı yaprak biti türleri *Brachycaudus helicyrsii*, *Brachycaudus cardui*, *Myzus persicae*, *Phorodon humuli* tarafından etkin bir şekilde non-persistent bir davranışla taşınmaktadır. Bununla birlikte, duyarlı *Prunus* türlerine aşı yoluyla taşındığı gibi mekanik yolla taşınmanın gerçekleştirildiği çok geniş bir konukçu çevresi bulunmaktadır. Şarka hastalığının belirtileri, duyarlı konukçu bitkiye, çevre şartlarına ve özellikle iklim koşullarına ve ağacın yaşına bağlı olarak değişebilmektedir (Gildow vd., 2004; Manachini, Casati, Aliverti ve Cinanni, 2004). Serolojik reaksiyonları, moleküler ve biyolojik özelliklerine göre ırklara ayrılmaktadır. Buna göre PPV'nün Dünya'da (D) Dideron (Kerlan ve Dunez, 1979), (M) Marcus (Kerlan ve Dunez, 1979), El Amar (Wetzel vd., 1991), (C) Cherry (Nemchinov ve Hadidi, 1998), (Rec) Recombinant (Glasa vd., 2004), (W) Winona (James ve Varga, 2005) ve (T) Turkey (Serçe vd., 2009) olarak saptanmış ve tanılanmış 7 ayrı ırkı bulunmaktadır. Son zamanlarda Cherry Russian (Glasa vd., 2012) ve Ancestor Marcus (Palmisano vd., 2012) olmak üzere iki ayrı ırkı daha tanılanmıştır. Şarka hastalığının Türkiye'deki varlığı ise ilk kez Şahtiyancı (1969) tarafından Edirne ilinde yetiştirilen eriklerde saptanmıştır. Bu hastalık yayıldıktan sonra kontrolü oldukça zor bir hastalıktır. Hastalığın kontrolü ve önlenmesi için bahçe sürveylerinin yapılması, sertifikalı üretim materyali, yaprak bitleri ile mücadele, bahçe ve fidanlıklarda enfekteli ağaçların imha edilmesine yönelik mücadele yöntemlerini içermektedir. PPV kontrolü için en iyi metot, sıkı karantina önlemleri yanında sert çekirdekli meyve türleri bakımından izoleli bölgelerde yeni kurulmakta olan fidanlık ve tesislere virüsün girişinin önlenmesi şeklindedir.

Sert çekirdekli meyve ağaçlarının bir diğer önemli viral hastalık etmeni *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), meyve ağaçlarında zarara neden olan ekonomik açıdan önemli bir virüs hastalığı olup, meyve yetiştiriciliğinin yapıldığı tüm alanlarda görülmektedir. *Prunus*'un kültürü yapılan tüm tür ve çeşitlerinin hastalık etmeninin en az bir veya daha fazla ırkına duyarlı oldukları bilinmektedir (Neyland, Gilmer ve Moore, 1976). PNRSV'nin, Bromoviridae familyasına bağlı Ilarvirus cinsine mensup bir tür olduğu, izometrik partiküllerinin yaklaşık olarak 23-27 nm arasında değişen çapta ve tek sarmal ssRNA molekülü içeren bir virüs olduğu bildirmiştir (Ong, 1987). Tüm genom boyutu 8.056 Kb olup, üç segmentten oluşmaktadır. Uzunlukları; RNA1 için 3.662 Kb, RNA2 için 2.507 Kb ve RNA3 için ise 1.887 Kb'dir. Virüs aşı ve dolayısıyla aşı gözü ile taşınır, mekanik olarak taşınmaz ancak tohum ve polenle taşınabilmektedir. Bilinen bir vektörü yoktur. Türkiye'de Nekrotik halkalı leke virüs hastalığı (*Prunus necrotic ringspot virus*: PNRSV) ilk olarak 1974 yılında Afyon ilindeki vişne ve kirazlarda tespit edilmiştir (Kurçman, 1974). Yürektürk (1984) Marmara bölgesinde Bilecik, Bursa, İzmit, Sakarya, İstanbul ve Tekirdağ illerinde 1976-1982 yılları arasında yürüttüğü çalışmalar sonunda az sayıda şeftali, erik ve kayısılarında PPV tespit etmiştir. Kiraz da dahil olmak üzere sert çekirdekli meyvelerde sistemik hastalıklara neden olan PNRSV'nin tohum ve polen ile yayıldığı, bu yayılma şeklinin adı geçen virüsün meyve bahçelerinde çok hızlı bir şekilde yayılmasına neden olduğunu ileri sürmüşlerdir (George ve Davidson, 1963). Virüsün genel belirtileri; yapraklarda klorozlar, nekroz, yaprak deformasyonu ve gelişme geriliği olarak sıralanmıştır. Klorozların halka, çizgi, bant, leke ya da mozaik görünümünde olabilecekleri rapor edilmiştir. Ayrıca yapraklar, gözler ve dallar üzerinde nekrotik alanlar oluşabileceğini bildirilmiştir (Neyland vd., 1976).

Bu tez çalışmasında Tekirdağ ilinde sert çekirdekli meyve ağaçlarında verim ve kalite kayıplarına neden olan *Plum pox virus* (PPV) ve *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV)'lerinin sebep oldukları virüs hastalıklarının bulunuşu ve yaygınlık durumları DAS-ELISA ve RT-PCR test yöntemi ile araştırılmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sert çekirdekli meyve ağaçlarının önemli bir hastalığı olan *Plum pox virus* (PPV)'ün neden olduğu Şarka hastalığı ilk kez 1910 yılında Makedonya'da erik ağaçlarında daha sonra 1915 yılında Bulgaristan'da yine erik ağaçlarında gözlenmiştir. Ancak Şarka hastalık etmeninin bir virüs türü olduğu ise 1932 yılında Atanasoff tarafından rapor edilmiştir. PPV daha sonra kayısı (1933), şeftali (1961) ve vişnede (1980) saptanmıştır. 1932 ve 1960 yılları arasında Bulgaristan'dan Yugoslavya, Macaristan, Romanya, Cezayir, Çekoslovakya, Almanya ve Rusya'ya yayıldığı tespit edilmiştir. Hastalığın Batı Avrupa'da görülmesinden sonra Almanya, Avusturya ve Hollanda'da saptanmış ve hızla İsviçre, Yunanistan, İngiltere, Türkiye, Fransa, İtalya, Belçika, İspanya, Portekiz, Mısır, Suriye'ye yayılmış ve sonunda Kıbrıs'da da tespit edilmiştir. 1990 yılından sonra Şili, Amerika, Ürdün, Hindistan ve Kanada'da rapor edilmiştir (Gildow vd., 2004; Glasa vd., 2012).

PPV Şarka hastalığının Türkiye'deki varlığı ise ilk kez Şahtiyancı (1969) tarafından Edirne ilinde yetiştirilen eriklerde saptanmıştır. Ardından Kurçman (1973) Ankara ilinde yetiştirilen erik ağaçlarından *P. persica* GF-305 üzerine kabuk aşılama ile PPV'nin varlığını rapor etmiştir. Yürektürk (1984) ise Marmara Bölgesinde 1976-1982 yılları arasında gerçekleştirdiği çalışmada şeftali, erik ve kayısı ağacında PPV enfeksiyonunun varlığını rapor etmiştir.

Dallot, Gottwald, Labonne ve Quiot (2003), PPV'nin 4 grubunu tanılamışlardır. Bunlardan PPV-Dideron (PPV-D) ve PPV-Marcus (PPV-M) hem Avrupa'da en yaygın olan hem de epidemiyolojik özellikleri bakımından belirgin farklılıklar gösteren 2 temel grubu oluşturmaktadır. Bu iki grup *Prunus* spp. türlerindeki hastalık şiddeti ve özellikle yaprak biti beslenmesi sonucu şeftali bitkisini enfekte etme yeteneklerine göre farklılıklar taşıdığı bildirilmiştir.

PPV'nin varlığı Amerika Birleşik Devletleri'nin Pennsylvania eyaletinde 1999 yılında, 2000 yılında ise Kanada-Ontario'da tespit edilmiştir. 10 yıllık bir sürvey ve eradikasyon programının uygulanması ile 2009 yılında Pennsylvania'da PPV enfeksiyonunun sona erdiği ancak Ontario'da ise 2000 yılından 2008 yılına kadar enfeksiyonunun büyük ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Bu çalışmanın amacı PPV sürvey ve eradikasyon programları sayesinde sert çekirdekli meyve ağaçlarında PPV saptama yöntemlerini ne ölçüde etkilediği karşılaştırılmıştır. Bu amaçla her iki programın örnekleme zamanı ve virüsü saptama verimliliğini değerlendirmek

amacıyla simülasyon modelini geliştirmişlerdir. Pennsylvania örnekleme ve tespit protokollerinin Ontario programına göre % 40.5'e kıyasla % 71.8'lik verimliliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Pennsylvania ve Ontario PPV eradikasyon programlarındaki bazı özelliklerin PPV'nin teşhis verimliliğini etkilediğini bildirmişlerdir. Bu çalışmanın bir sonucu olarak PPV ile enfekteli ağaçların saptanmasında her iki eradikasyon programının etkinliği açısından önemli ve karşılaştırmalı sonuçlar elde edildiği rapor edilmiştir (Gougherty, Pazdernik, Kaiser ve Nutter, 2015).

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

Slovenya'da kayısı, şeftali, erik ve damson erik ağaçlarında PPV'nin varlığı DAS-ELISA, RT-PCR ve Real-time PCR yöntemleri ile araştırılmıştır. PPV'nin Mayıs ayında yaprakların enfekteli kısımlarından alınan örneklerle ve Ağustos ayının başlangıcına kadar üç teşhis metodu ile tespit edilebildiğini ancak arazi çalışmaları esnasında kullanılan DAS-ELISA ve AgriStrip testleri ile teşhisin bu dönemde gerçekleşmediği saptanmıştır. Özellikle Ağustos ayında alınan tomurcuklarda PPV'nin varlığı tespit edilmemiştir. Ancak arazi çalışmaları esnasında simptomatik örneklerde tespit edildiği ancak simptom göstermeyen örneklerde DAS-ELISA testi ve kısmen de moleküler teknikler kullanılarak yapılan testlerin negatif sonuç verdiği bildirilmiştir. Arazi çalışması esnasında kullanılan testlerin ve simptom gösteren örneklerde PPV'nin varlığının doğrulanması gerektiği ve simptom göstermeyen örneklerde ise DAS-ELISA ve diğer moleküler testlerin virüsün teşhisinde kullanılmasının yararlı olacağı bildirilmiştir (Viršček Marn, Mavrič Pleško, Altenbach ve Bitterlin, 2014).

2005 ve 2008 yıllarında Çek Cumhuriyeti'nin farklı bölgelerinde üretimi yapılan erik, myrobalan ve karaçalı ağaçlarından alınan 52 adet çiçek ve 90 adet yaprak örneklerinde PPV-D, PPV-M ve PPV-Rec ırklarının dağılımı DAS-ELISA test yöntemi ile araştırılmıştır. Monoklonal antiserumlar kullanılarak yapılan DAS-ELISA testi ile PPV-M irki kanıtlanmıştır. Ayrıca karakteristik virüs simptomları gösteren ağaçlardan alınan yaprak örneklerinde RT-PCR



test yöntemi kullanılarak PPV-D, PPV-M ve PPV-Rec ırkları saptanmıştır. % 94.6- % 100 enfeksiyon oranı ile PPV-D, % 2.3 PPV-M ırkı, % 3.1 oranında ise PPV-Rec ırkı tespit edilmiştir. Test edilen örneklerde % 95 oranında PPV-D enfeksiyonu saptanırken, PPV-M ve PPV-Rec ırklarında % 2.5 oranında bulaşıklık tespit edilmiştir. PPV-C'nin varlığı tatlı kiraz ve vişne ağaçlarında saptanmamıştır. Ayrıca kayısı ağaçlarında ise PPV-EA'nın bulunmadığı bildirilmiştir (Polák ve Komínek, 2009).

İki hiperspektral uzaktan algılama tekniği, spektral yansıtma ve klorofil floresan tekniği kullanılarak erik ağaçlarında yapraklarda gözle görülür belirtiler olmadan erken aşamada biyotik stresin etkisi Şarka hastalığının tanımlanması için kullanılmıştır. Araştırma, Bulgaristan'da yaygın olarak kullanılan bitki çeşitlerinden 'Angelina', 'Black Diamond' ve 'Mirabelle' çeşitlerinde hiperspektral yansıtma ve floresans verileri, görünür ve yakın kızılötesi spektral aralıklarda (400-1000 nm) taşınabilir, çok kanallı fiber optik spektrometre ile toplanmıştır. Sağlıklı kontrol ve enfekteli erik yapraklarının spektral verileri arasındaki farkların önemini değerlendirmek için istatistiksel ve tanımlayıcı analizler uygulanmıştır. Karşılaştırmalı analizler, bitki virolojisinde geniş çapta uygulanan serolojik testlerden DAS-ELISA ile yapılmıştır. İki uzaktan algılama tekniği ve serolojik test sonuçları arasında bulunan ilişki görünür belirtiler ortaya çıkmadan önce vejetasyonun sağlık durumu değerlendirmelerini kolaylıkla ve zarar vermeden gerçekleştirmek için hiperspektral yansıtma ve floresan tekniklerinin uygulanabilirliğini gösterdiği kanıtlanmıştır (Krezhova, Stoev, Petrov ve Maneva, 2015).

Mainardi, Gilli ve Triolo (1992) tarafından yapılan çalışmada, mikro çoğaltım yöntemlerinden sürgün ucu kültürü ile elde edilen Mr.S.2/5 erik anaçlarında PNRSV ve PPV'yi saptamak amacıyla DAS-ELISA test yöntemi kullanılmıştır. Mikro çoğaltım yöntemi ile elde edilen sürgün uçlarında yüksek enfeksiyon oranı görüldüğü ve her iki virüsün varlığını saptamada bu yöntemin serada yetiştirilen bitkilerden daha güvenilir olduğu ileri sürülmüştür. *In vitro*'da çoğaltımdan elde edilen tüm bitkilerin yüksek enfeksiyon oranına sahip olduğu ve erik anaçlarındaki sürgün ucu *in vitro* alt kültürlerinde PNRSV ve PPV'nin eradike edilemeyeceği tespit edilmiştir. İndeksleme için *in vitro* çoğaltım materyallerinin kullanımının meyve ağaçlarının sertifikasyon programlarında bazı avantajlar verebileceği bildirilmiştir.

Epidemiyolojik olarak önemli beş farklı PPV izolatının virüs bulaşıcılığı üzerine sıcaklığın, belirtilerin yoğunluğu ve *Nicotiana benthamiana*'daki virüs yoğunluğunun araştırıldığı bir başka çalışmada ise 17 °C'de beş farklı izolatta hastalık belirtilerinin

yoğunluğu ve infektivitesinde farklılığın görülmediği belirlenmiştir. Ancak yüksek sıcaklıklarda bitkide çoğalma ve bulaşma kapasitelerinde farklılıklar gözlenmiştir. 30 °C’de virüs antijen miktarının önemli ölçüde azaldığı ve sadece birkaç bitkinin enfeksiyona maruz kaldığı tespit edilmiştir. PPV rekombinat BOR-3 izolatının test edilen diğer PPV izolatlarıyla karşılaştırıldığında yüksek sıcaklıklara daha çok tolerans gösterdiği tespit edilmiştir. Böylece yüksek sıcaklıklara adaptasyonun PPV’nin epidemiyolojisinde etkili olabileceği ileri sürülmüştür (Glasa, Labonne ve Quiot, 2003).

Németh, Nyerges, Hangyál ve Kósa (2010), Macaristan’da iki botanik bahçesinde ve bir ağaç parkında binlerce odunsu bitki arasından virüs simptomları gösteren bitkilerin tür ve çeşitlerini seçerek 11 farklı virüsün varlığını ELISA testi ile araştırmıştır. 28 bitki tür ve çeşidin PPV, PDV, PNRSV, CLRV ve ASPV ile enfekteli olduklarını saptanmışlardır. PPV’nin varlığını *Prunus cerasifera Pendula*, *P. cerasifera ‘Pissardii’*, *P. landulosa*, *P. glandulosa ‘Alba Plena’*, *P. glandulosa ‘Sinensis’*, *P. japonica*, *P. sogdiana*, *P. tomentosa* (Tibet’ten) ve *P. x blireana*’ da 9 farklı tür ve çeşitte belirlemişlerdir. Ayrıca 17 tür ve çeşidin ise PDV ile enfekteli olduklarını tespit etmişlerdir.

Elibüyük (2003), 1995-2002 yıllarında Ankara ilindeki erik, kayısı ve şeftali ağaçlarının bulunduğu 10 ev bahçesinde yaptığı gözlemlerde PPV hastalığının yüksek oranda yaygın olduğunu tespit etmiştir. DAS-ELISA ve IC-RT-PCR yöntemleri kullanılarak yapılan bu çalışma sonucunda PPV’nin varlığı hastalık kaynağında % 85.7-100 iken, 500 m uzağında % 25-29,4 oranına düştüğü belirlenmiştir. PPV-M ırkının saptandığı bu çalışmada vektör *Hyalopterus pruni*’ nin PPV’nin Ankara’daki tek vektörü olduğu ilk kayıt olarak bildirilmiştir.

İlbağı, Çıtır ve Bostan (2008), 54 adet simptom gösteren *Prunus spinosa* L. çakal eriği yaprak örneklerinde *Plum pox virus* (PPV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) ve *Apple mosaic virus* (ApMV)’lerini DAS-ELISA ve RT-PCR test yöntemi ile araştırmışlardır. DAS-ELISA test sonuçlarına göre, 54 örneğin 13’ünde % 24.1 oranında PPV, 8’inde % 11.1 oranında ACLSV, 12’sinde ise % 22.2 oranında ApMV’nü tespit etmişlerdir. PPV ile enfekteli yaprak örneklerinden izole edilen *Prunus spinosa* L. izolatını RT-PCR testine tabi tutmuşlar ve PPV-M ırkının spesifik primerleri ile çoğaltılan 198 bp’lik fragmentler elde etmişlerdir. DAS-ELISA ve RT-PCR testinin sonucuna göre Tekirdağ ilindeki *Prunus spinosa* L.’da PPV-M ırkının yanı sıra ACLSV ve ApMV’nin varlığını saptadıklarını bildirmişlerdir. Yabani bir çalı türü olan *Prunus spinosa* L.’nın PPV, ACLSV ve ApMV’lerinin inokulum kaynağı olması açısından Trakya Bölgesinde yeni kurulan meyve bahçeleri için ciddi bir tehdit oluşturduğunu

bildirmişlerdir. Elde edilen bu sonuçların Türkiye'de *Prunus spinosa* L.'da saptanan PPV, ACLSV ve ApMV'nin bulunuşunun ilk kaydı olduğunu rapor etmişlerdir.

Elibüyük (2006), PPV'nin yabancı ve süs bitkilerini enfekte etme kabiliyetini incelemek üzere yaptığı bir çalışmada 5 ayrı yabancı ve doğal sert çekirdekli süs bitkisi türleri ile 24 farklı yabancı ot türünü potansiyel rezervuar kaynağı olarak araştırmıştır. PPV'nin yabancı otlarda tespit edilmediğini ancak bir adet mor kiraz eriğinde (*Prunus cerasifera* Pissardii) saptandığını bildirmiştir. Böylece PPV-M ırkını DASI-ELISA testi ile tanılamış ve IC-RT-PCR testi ile de doğrulamıştır. Ayrıca *Hyalopterus pruni*: erik unlu yaprak biti türünün PPV'nin *P. cerasifera* Pissardi'daki vektörü olarak saptamıştır. Bu çalışma, Türkiye'de sert çekirdekli meyvelerden süs bitkisi ağacı olan *P. cerasifera*'nın PPV'nin rezervuarı olduğunu ilk kaydı olarak rapor edilmiştir.

Gürcan ve Ceylan (2016), PPV ırklarını tanılamak ve genetik değişkenliğini saptamak üzere yaptıkları çalışmada enfekteli bölgelerden, uzak mesafe ve farklı lokasyonlardan aldıkları 612 örnekte PPV'yi serolojik ve moleküler yöntemlerle araştırmışlardır. 314 adet pozitif reaksiyon veren örnekte virüs türlerinin farklı ırkları arasında korunmuş bir bölge olan ve Potyvirus türleri arasında değişkenlik gösteren PPV'nin P3-6K1 gen bölgesini içeren 664 nükleotid uzunluğundaki kısmını sekanslamışlardır. Bursa ilindeki bir izolatta saptanan PPV-Rec ırkının dışında, PPV-D ve PPV-T ırklarının sınırlı bahçelerde bulunduğunu ancak PPV-M ırkının ise birçok fidanlıkta bulunduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca PPV-T ırkının Türkiye'de dominant bir ırk olduğunu da bildirmişlerdir.

Buzkan vd. (2005), Sütçü İmam Üniversitesi sert çekirdekli meyveler adaptasyon parselinde gerçekleştirdikleri sürvey çalışmaları sonucunda 183 adet kayısı örneğinde PNRSV, PPV, PDV, ApMV, ACLSV virüslerini araştırmışlar ve PPV bulaşıklık oranının % 2.73 oranında bulunduğunu bildirmişlerdir. % 13.41 oranında PNRSV, % 1.63 oranında ise PDV ve ApMV ile bulaşıklık oranı tespit etmişlerdir.

Trakya Bölgesi'nin 10 ilçesinden toplanan 158 badem ağacından çiçek örneği ve 260 adet yaprak örneklerine uygulanan DAS-ELISA, TAS-ELISA ve RT-PCR testlerinde *Plum pox virus* (PPV), *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV) ve *Prune dwarf virus* (PDV) virüsleri araştırılmıştır. Bölgedeki badem ağaçlarında bireysel olarak % 31.15 oranında PNRSV, % 4.23 oranında PDV, % 1.92 oranında ise PPV saptanmıştır. Ağaçların % 1.54'ünün PNRSV+PDV

ve PNRSV+PPV virüsleri ile karışık enfeksiyona sahip olduğu, toplam bulaşıklık oranının ise % 38.85 olduğu bildirilmiştir (Karabacak ve İlbağı, 2011).

İlbağı ve Çıtır (2014) tarafından yapılan bir çalışmada ise Trakya Bölgesindeki badem ağaçlarından toplanan 260 yaprak örneğinde PPV, DAS-ELISA ve RT-PCR test yöntemiyle araştırılmıştır. 5 badem ağacında PPV, 81 ağaçta PNRSV ve 11 ağaçta PDV virüsleri saptanmıştır. PPV ile enfekteli 5 badem ağacından alınan badem izolatlarının kısmi nükleotid dizileri, Gen bankasına kayıtlı 17 farklı badem izolatu ile filogenetik olarak sınıflandırılmıştır. Trakya Bölgesi badem izolatlarının, Dünyadaki diğer badem izolatları ile %75.72 - %96.87 oranında nükleotid benzerliği saptanırken, Türk izolatları arasındaki nükleotid benzerliğinin % 95.82- 96.61 olduğu belirlenmiştir. 5 Türk badem izolatlarının nükleotid ve aminoasit sekanslarının filogenetik sınıflandırmasında PPV-T izolatu ile aynı grup içerisinde yer aldığı ve böylece Türk badem izolatlarının Türkiye’de önceki çalışmalarla saptanan kayısı izolatları gibi PPV-T ırkına ait olduğunu saptamışlardır.

Bursa ilinde sert çekirdekli meyve bahçelerinde Şarka hastalığının yaygınlık durumunu belirlemek amacıyla yapılan bir başka çalışmada ise 166 adet erik, şeftali, nektarin, vişne ve badem ağaçlarında PPV’nin varlığı DAS-ELISA testi ile araştırılmış ve PPV’nin yaygınlık oranı % 24.1 olarak bulunmuştur. En yüksek PPV enfeksiyonu % 57.1 enfeksiyon oranıyla İnegöl’de bulunmuş ve bunu sırasıyla % 50.0, % 27.3, % 25.0, % 10.0 ve % 7.1 enfeksiyon oranı ile Orhangazi, Gürsu, Yenişehir, Osmangazi ve Mudanya ilçeleri izlemiştir. En yüksek PPV enfeksiyonu erikte (% 41.7) ve sonrasında nektarin (% 40) ve şeftali (% 16.5) 'de tespit edilmiştir. Kiraz ve badem ağaçlarında ise PPV saptanmadığı bildirilmiştir (Saydam, Arslan, Ersoy ve Elibüyük, 2018).

PPV hastalığı ile mücadelede, enfekteli alanların ve bu alanlardaki PPV izolatlarının saptanması amacıyla Arnavutluk, Kıbrıs, Mısır, Yunanistan, İtalya ve Türkiye’de survey çalışmaları gerçekleştirilmiştir. DAS-ELISA testi ve 5B (genel), 4DG5 (PPV-D’ye spesifik), AL (PPV-M’e spesifik), TUV ve AC (PPV-C’ye spesifik), ve EA24 (PPV-El Amar’a spesifik) monoklonal antibadiler kullanılarak 170 PPV izolatu irkları araştırılmıştır. PPV-M irki Arnavutluk, Kıbrıs, Yunanistan, İtalya ve Türkiye’de, PPV-D Arnavutluk ve İtalya’da, her iki irkin karışık enfeksiyonları Arnavutluk’taki birkaç meyve fidanlığında tespit edilmiştir. Mısır’daki iki ayrı lokasyondan alınan 7 kayısı izolatu PPV-El Amar saptanmıştır. Bilinen dört PPV serotipine (M, D, C ve El-Amar) özgü evrensel MAb5B ve MAb’lerin bir

kombinasyonu ile DAS-ELISA testinin, PPV'nin basit, hassas ve rutin tespiti ve ırklarının ayırt edilmesi için etkili olduğu bildirilmiştir (Myrta vd., 1998).

Salem, Mansour, Almusa ve Al-Nsour (2003) tarafından yapılan çalışmada badem, şeftali ve erik çeşitlerinde PNRSV'nin doğal enfeksiyonuna maruz kalan bitkinin farklı kısımlarından çiçeklerde, aktif büyüyen tomurcuklarda ve genç yapraklarda virüs enfeksiyonunun belirlenmesi için en uygun zaman olduğunu ancak yaz aylarının uygun olmadığını bildirmişlerdir. Virüs konsantrasyonundaki mevsimsel dalgalanmaların tüm çeşitlerde aynı oranda olmadığı, bu nedenle, tüm çeşitlerde tek bir örnekleme zamanının enfekteli ve sağlıklı ağaç ayırımını yapmak için yeterli olamayacağı bildirilmiştir.

Ürdün'de yetiştirilen ve virüs benzeri belirtiler gösteren sert çekirdekli meyve ağaçlarından elde edilen izolatlarda ise PNRSV izole edilmiştir. PNRSV-J'nin sınırlı sayıda deneysel konukçuya sahip olduğunu, seyreltme infektivitesinin  $10^{-2}$  ve termal inaktivasyon noktasının 57 °C olduğunu belirlemişlerdir. PNRSV-J inokulasyondan 6-8 gün sonra hasat edilen salatalık yapraklarından izole edilmiştir. Saflaştırma yönteminde antikor üretimi için yeterli virüs miktarı sağlanmış ve tavşanın immünize edilmesi yoluyla üretilen antiserumun PNRSV'ye yüksek özgüllük göstererek 1024 titreye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca IC-RT-PCR metodunun otsu ve odunsu bitki dokularında PNRSV'nin saptanmasında etkili olduğu belirlenmiştir. PNRSV'ye ait RT-PCR ürünlerinin nükleotid dizisi elde edilerek, filogenetik analizi yapılmış ve PNRSV'nin Grup I (PV32) izolatlarının bir üyesi olduğu saptanmıştır (Salem vd., 2004).

Verma, Ram ve Zaidi (2014) tarafından yapılan bir çalışmada ise *Begonia* bitkilerinin yaprak sapları *in vivo* teknikler ile 0.2 mg/l NAA ve 0.2 mg/l BAP (pH 5.8)'a maruz bırakılarak MS ortamında geliştirilmiştir. Köklendirme ortamında filizler ayrı ayrı veya kombinasyon halinde kemoterapiye (virazol, 2-tiyourasil veya 6-azaurasil) ve termoterapiye (16 saat ışık süresi için 38 °C ve 8 saat karanlık süresi için 22 °C) tabi tutulmuştur. Kemoterapi ve termoterapi ile muamele edilmiş bitkiler PNRSV'nin varlığı açısından DAS-ELISA ve RT-PCR testine tabi tutulmuştur. RT-PCR testinde 785 bp'lik bir fragment elde edilmiştir. 20 mg/l'lik bir konsantrasyonda virazolün (ELISA ve RT-PCR ile indekslenen PNRSV içermeyen bitkilerin sırasıyla % 30 ve % 20'si) diğer kimyasallara kıyasla daha etkili olduğu bulunmuştur. 25 gün süren termoterapi sonucunda PNRSV ile enfekteli olmayan bitkiler elde edilmiştir. Her ikisinin kombinasyonu sonucunda çok sayıda PNRSV'den arı bitkiler elde edildiği bildirilmiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda her üç kimyasalın da toksik olduğu

bulunmuştur. Ancak 25 günden fazla süren termoterapinin bitkinin yapraklarında kızarıklığa ve sürgünlerin ölümüne neden olduğu bildirilmiştir.

Yegül ve Baloğlu (2019), 2014 yılı vegetasyon döneminde, doğal olarak enfekteli olduğu belirlenmiş badem ağaçlarında PNRSV, PDV ve *Cherry leaf roll virus* (CLRV) virüsleri için en uygun örnek alma dönemini belirlemek üzere iki haftada bir 2 ayrı badem ve ceviz ağacından alınan yaprak örneklerini DAS-ELISA testine tabi tutmuşlardır. Her üç virüsün konsantrasyonu ilkbaharda en yüksek absorbans değerine (PNRSV için 1,891, PDV için 0,507 ve CLRV için 2,22) ulaşırken sıcaklıkların yükselmesi ile Temmuz ayından itibaren konsantrasyonun negatif absorbans değeri verdiği belirlenmiştir. Sonbaharda, ekim ayından itibaren PNRSV, PDV ve CLRV-1 izolatlarının tekrar pozitif absorbans değerlerine ulaştığı saptanmıştır. CLRV-2 izolatının ise sadece Temmuz ayı sonuna kadar pozitif sonuç verdiği ve sonraki aylarda vegetasyon sonuna kadar negatif değerlere ulaştığı bildirilmiştir. Araştırmadan elde edilen sonuçlara göre ceviz ve badem izolatlarında; PNRSV, PDV ve CLRV için en uygun örnekleme zamanının ilkbahar ayları olduğu sonucuna varılmıştır.

Ulubaş ve Ertunç (2004), Türkiye’de sert çekirdekli meyve üretiminin gerçekleştirildiği farklı bölgelerdeki meyve fidanlıkları ve bahçelerden toplanan kiraz, vişne, şeftali, nektarin, kayısı ve erik ağaçlarında PNRSV’nin varlığını DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemiyle araştırmıştır. RT-PCR testi sonucunda 51 örnekte PNRSV tespit edilirken, DAS-ELISA testinde ise 31 örnekte virüsün varlığı saptanmıştır. PCR-RFLP analizi ise restriksiyon endonukleazlar kullanılarak gerçekleştirilmiş ve filogenetik sınıflandırılması yapılmıştır. Sadece Bursa 21 izolatının PV-32 grubunun bir üyesi olduğu belirlenmiştir. PCR-RFLP sonuçlarına dayalı olarak gruplandırmada farklı coğrafik lokasyonların ortaya çıkmadığı bildirilmiştir.

Himachal Pradesh'nin şeftali üretimi yapılan bölgelerinde (Solan, Shimla ve Sirmour), 2016 yılı Nisan-Mayıs, Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında şeftali (*Prunus persica*) cv. July Elberta bitkilerinin yaprak ve meyvelerinde simptom gösteren örneklerde PNSRV’nin varlığı araştırılmıştır. Makroskobik simptomlara dayalı olarak yaygınlık yüzdesinin 1-18 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Latent bir virüs olan PNRSV’nin sadece simptomlara dayalı olarak değerlendirilemeyeceğini, bu nedenle de DAS-ELISA testinin virüsün varlığını doğrulamak için hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu ileri sürmüşlerdir (Kapoor ve Handa, 2017).

Himachal Pradesh'deki Solan, Sirmour, Shimla ve Kullu bölgelerindeki ticari şeftali yetiştiriciliği yapılan 40 şeftali bahçesinde yapılan bir başka çalışmada ise PNRSV'nin insidansı araştırılmıştır. Klorotik lekeler, nekrotik halkalar, orta damarda bantlaşma ve sürgünlerde deformasyonlar şeklinde belirtilen semptomlar gösteren ağaçlardan alınan yaprak örnekleri DAC, DAS-ELISA ve DIBA test yöntemleri ile testlenmiştir. Makroskobik gözlemlere dayalı olarak işaretlenmiş ağaçlardan alınan örnekler ELISA ve DIBA testlerinin sonuçları ile doğrulanmıştır (Kapoor ve Handa, 2018).

Paduch-Cichal ve Sala-Rejczak (2007) tarafından 2005-2006 yıllarında yapılan bir çalışmada PNRSV ile enfeksiyonun, tarlada yetiştirilen üç farklı gül çeşidi 'Ingrid Bergman' 'Mr Lincoln' ve 'Queen Elizabeth' çeşitlerinin büyüme, çiçek üretimi ve kalitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Aşılardan bir ve iki yıl sonra, çiçeklerin taze ve kuru ağırlıkları, çiçek çapı, sürgün çapı, sürgün uzunluğu, sürgün sayısı, çiçek sayısı ve çiçek yaprakları sayısının önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Semptomların gül çeşitlerinin her birinin yaprakları üzerinde belirgin şekilde görüldüğüne işaret etmişlerdir.

Suchá ve Svobodová (2010), 2006-2008 yıllarında Çek Cumhuriyeti'nin kiraz üretim alanlarındaki ticari meyve bahçelerinde ve fidanlıklardaki PNRSV ve PDV'lerinin yaygınlık oranlarını belirlemek amacıyla survey çalışmaları yapmışlardır. 1.198 kiraz ve 240 vişne ağacından toplam 1.438 yaprak örneğinde, PNRSV'nin % 6.3 enfeksiyon oranına sahip olduğu, PDV'nin ise % 10.9 oranında olduğunu bildirmişlerdir. % 22.5 oranı ile vişne ağacının yüksek oranda enfeksiyona maruz kaldığını, toplam enfeksiyon oranının ise % 17.7 olduğunu tespit etmişlerdir.

Kılıç, Yardımcı ve Gübür (2017) tarafından yapılan bu çalışmada 2012 yılında Burdur ilindeki gül yağı (*Rosa damascena* Mill.) üretim alanlarında virüs benzeri semptomlar gösteren toplam 102 gül yaprağı örneğini 8 farklı konumdan toplamışlar ve DAS-ELISA testi ile kullanarak PNRSV'nin varlığı açısından test etmişlerdir. 102 yaprak örneğinin 16'sının PNRSV ile enfekteli olduğunu saptamışlardır. DAS-ELISA testinde pozitif reaksiyon veren örnekleri *Cucumis sativus* L. cv. F1 Cemre, *Chenopodium quinoa* Wild. ve *Catharanthus roseus* L.G. Don. İndiktör bitkilerine üzerine inokule etmişler ve *Chenopodium quinoa* Wild bitkisinde klorotik lokal lezyonlar görülürken, *Cucumis sativus* L. cv. F1 ve *Catharanthus roseus* L.G. Don. bitkilerinde semptom görülmediğini bildirmişlerdir. PNRSV inokule edilen *Chenopodium quinoa* Wild bitkilerinin izolasyonu sonucu elde edilen RNA ile yapılan RT-PCR testi sonucunda 785 bp büyüklüğündeki fragmentleri elde ettiklerini bildirmişlerdir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. MATERYAL

##### 3.1.1. Sürvey Çalışmaları

Tekirdağ ili Merkez Süleymanpaşa, Şarköy, Muratlı, Malkara ve Çorlu ilçelerindeki sert çekirdekli meyve üretim alanlarındaki ve ev bahçelerindeki kiraz (*Prunus avium* L.), erik (*P. domestica* L.), şeftali (*P. persica* L.) ve kayısı (*P. armenica* L.) ağaçlarından yaprak örnekleri almak üzere 2018 yılı Haziran ve Temmuz aylarında sürvey çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda Tekirdağ ili Merkez Süleymanpaşa ilçesine bağlı Barbaros mahallesi, Nusratlı köyü ve Naip köyü, Şarköy ilçesine bağlı Çınarlı, Güzelköy ve Kirazlı köyleri, Malkara ilçesi Ibribey köyü, Muratlı ve Çorlu ilçeleri bu çalışmanın araştırma alanını oluşturmuştur.



Şekil 3.1. Tekirdağ ili ve ilçelerinde sürvey çalışmalarının gerçekleştirildiği alanlar



### 3.1.2. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması

Şekil 3.1.'de görüldüğü üzere çalışma alanını kapsayan Tekirdağ ili Merkez ilçe Süleymanpaşa, Şarköy, Malkara, Muratlı ve Çorlu ilçelerinde üretimi yapılan sert çekirdekli meyve ağaçlarında ve ev bahçelerindeki ağaçlarda karakteristik mozaik, klorotik ve nekrotik lekeler, şekil bozukluğu, damarlar arası bantlaşma ve deformasyon belirtileri gösteren yaprak örnekleri toplanmış ve fotoğrafları çekilerek kayıt altına alınmıştır. Böylece 76 adet kiraz, 35 adet erik, 28 adet şeftali, 19 adet kayısı olmak üzere toplam 158 adet semptomlu yaprak örneği etiketli polietilen torbalara konularak buz kutusu içerisinde Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Moleküler Fitopatoloji ve Viroloji Laboratuvarına getirilmiştir. Toplanan yaprak materyalleri serolojik ve moleküler testler uygulanıncaya kadar -20 °C'de çalışan derin dondurucuda muhafaza edilmişlerdir. Sürveyler esnasında toplanılan yaprak örnekleri serolojik ve moleküler testlerde materyal olarak kullanılmıştır.

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

Sürvey çalışmalarında kiraz, erik, şeftali ve kayısı ağaçlarından alınan 158 adet enfekteli yaprak örnekleri DAS-ELISA testinde materyal olarak kullanılmıştır. *Plum pox virus* (PPV) ve *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV)'lerinin poliklonal antiserumları, pozitif ve negatif kontroller (AGDIA), porselen havan ve havan eli, ELISA plate'leri, pipetler, ependorf tüpler, cam malzemeler kullanılmıştır.

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

Çalışma materyalini oluşturan kiraz (*Prunus avium* L.) ağaçlarından alınan yaprak örneklerinde *Plum pox virus* (PPV) ile enfekteli olduğundan şüphelenilen ve DAS-ELISA testinde negatif kontrollerin absorbans değerinin iki katına yakın absorbans değerleri gösteren enfekteli yaprak örnekleri RT-PCR testi için seçilmiştir. Böylece seçilen 14 adet enfekteli kiraz yaprak örnekleri PPV'nin varlığını saptamak üzere RT-PCR testinde materyal olarak değerlendirilmişlerdir. Total nükleik asit izolasyonu Foissac, Savalle-Dumas, Gentit, Dulucq ve Canderesse (2001)'nin önerdiği yöntemde kullanılan kimyasallar Invitrogen (CA, USA) firmasından temin edilmiştir. cDNA sentezi Fermentas (NY, USA) firmasından satın alınan

cDNA sentez kiti ile gerçekleştirilmiştir. PCR işlemi için gerekli olan PCR bileşenleri ise yine Invitrogen (NY, USA) firmasından temin edilmiştir.



## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. Arazi Gözlemleri ve Enfekteli Bitki Materyalinin Elde Edilmesi

Tekirdağ ilinin beş ilçesi Merkez Süleymanpaşa, Şarköy, Muratlı, Malkara ve Çorlu ilçelerindeki sert çekirdekli meyve üretim alanlarında yapılan arazi çalışmalarında simptom gösteren kiraz, erik, şeftali ve kayısı ağaçlarından yaprak örnekleri toplanmıştır. Aynı zamanda yol kenarındaki ve ev bahçelerindeki simptom gösteren kiraz, erik, şeftali ve kayısı ağaçlarından da yaprak örnekleri toplanılmıştır. Arazi çalışmalarında ağaçlarda gözlenen karakteristik sarılık, mozaik, nekrotik ve klorotik lekeler ve şekil bozuklukları şeklinde tanımlanabilecek hastalıktan dolayı verim ve kalite kayıpları gözlenmiştir. Sürvey çalışmalarında Tekirdağ ili Merkez ilçe Süleymanpaşa'dan 71 adet yaprak örneği, Şarköy ilçesinden 30, Muratlı'dan 25, Çorlu'dan 19, Malkara ilçesinden ise 13 adet enfekteli yaprak örneği olmak üzere toplam 158 adet simptom gösteren yaprak örnekleri toplanmıştır. Bu doğrultuda sürvey çalışmalarında çalışma kapsamı içerisinde yer alan beş ilçe ve köylerden alınan enfekteli yaprak örneklerinin dağılımı Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Tekirdağ ili sert çekirdekli meyve üretim alanlarından toplanan örneklerin alındığı yer, çeşit adı ve örnek adedi

Bitki Örneğinin Alındığı yer		Bitki Örneğinin Adı	Alınan Bitki Örnek Adedi
İlçe Adı	Mevki ve Köy Adı		
Süleymanpaşa	Nusratlı Köyü	Kiraz	23
Süleymanpaşa	Nusratlı Köyü	Erik	3
Süleymanpaşa	Naipköy	Kiraz	15
Süleymanpaşa	Naipköy	Erik	5
Süleymanpaşa	Naipköy	Kayısı	6
Süleymanpaşa	Naipköy	Şeftali	5
Şarköy	Çınarlı	Kiraz	9
Şarköy	Çınarlı	Erik	2
Şarköy	Çınarlı	Kayısı	3

<b>Şarköy</b>	Kirazlı	Kiraz	10
<b>Şarköy</b>	Kirazlı	Erik	1
<b>Şarköy</b>	Kirazlı	Şeftali	2
<b>Şarköy</b>	Merkez	Kayısı	2
<b>Şarköy</b>	Güzelköy	Kiraz	1
<b>Süleymanpaşa</b>	Barbaros	Kiraz	9
<b>Süleymanpaşa</b>	Barbaros	Erik	1
<b>Süleymanpaşa</b>	Barbaros	Kayısı	2
<b>Süleymanpaşa</b>	Barbaros	Şeftali	2
<b>Malkara</b>	İbribey	Kiraz	2
<b>Malkara</b>	İbribey	Erik	1
<b>Malkara</b>	İbribey	Kayısı	2
<b>Malkara</b>	İbribey	Şeftali	8
<b>Murath</b>	Merkez	Kiraz	3
<b>Murath</b>	Merkez	Erik	14
<b>Murath</b>	Merkez	Kayısı	3
<b>Murath</b>	Merkez	Şeftali	5
<b>Çorlu</b>	Merkez	Kiraz	4
<b>Çorlu</b>	Merkez	Erik	8
<b>Çorlu</b>	Merkez	Kayısı	1
<b>Çorlu</b>	Merkez	Şeftali	6
<b>Toplam</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>158</b>

### 3.2.2. Serolojik Test Yöntemi (DAS-ELISA Testi)

Sürvey alanından toplanan simptom gösteren 158 adet kiraz, erik, şeftali ve kayısı yaprak örnekleri DAS-ELISA testine tabi tutulmuştur. Toplanan yaprak örneklerinde; *Plum pox*

*virus* (PPV) ve *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) 'lerinin varlığını saptamak üzere Clark ve Adams (1977)'in temel alındığı yöntemde gerçekleştirilen Double-antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) testi, antiserumların temin edildiği AGDIA (Elkhart, Indiana–USA) firmasının önerdiği prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre;

- Kaplama tampon çözeltisi içerisinde 1/200 oranında seyreltilen  $\gamma$ -globulin, ELISA platelerinin her bir çukuruna 100  $\mu$ l konulmuş ve nemli bir kutu içerisine yerleştirilen plateler 37 °C'de çalışan inkübatörde 2 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra plateler içerisindeki sıvı boşaltılmış ve yıkama tampon çözeltisi (1x PBST) ile 2 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

- Çalışma materyali olarak toplanan kiraz, erik, kayısı ve şeftali yaprak örnekleri steril porselen havan içerisinde 1/10 oranında ekstraksiyon tampon çözeltisi eklemek suretiyle ezilmiş ve bitki özsuvarı elde edilmiştir. Cam tüpler içerisine konulan ekstraktlar karıştırılmak suretiyle ELISA platelerinin her bir çukuruna 100  $\mu$ l'lik miktarlarda ve iki tekerrürlü olacak şekilde konulmuştur (Şekil 3.2). Her bir virüse ait pozitif ve negatif kontroller de 100  $\mu$ l'lik miktarlarda ELISA platelerinin sol çukuruna iki tekerrürlü olacak şekilde yerleştirilmiş ve ELISA plateler nemli bir kutu içerisine konularak +4 °C'de bir gece inkübe edilmişlerdir. İnkübasyondan sonra bitki ekstraktları boşaltılmış ve 5 kez yıkama tampon çözeltisi (1x PBST) ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Porselen havanlarda enfekteli bitkilerden elde edilen bitki ekstraktları

- Enzimle işaretli  $\gamma$  globulin (Konjugate) 1/100 oranında konjugat tamponu ile seyreltilmiş ve 100  $\mu$ l'lik miktarlarda platelerin her bir çukuruna konulmuştur. Nemli kutu içerisine yerleştirilen plateler 37 °C'de çalışan inkübatörde 2 saat süre ile inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda plateler yıkama tampon çözeltisi (1x PBST) ile 5 kez yıkanmıştır.

- Substrat tamponu ile 1 mg/ml p-nitrophenyl phosphate 100  $\mu$ l'lik miktarlarda platelerin çukurlarına konulmuş ve 37 °C'de inkübatöre edilmişlerdir.



Şekil 3.3. DAS-ELISA testinde ELISA platelerinin yıkanması işlemi

- Sonuçlar 60-120 dakika sonunda ilk olarak görsel daha sonra da ELISA okuyucusu (Thermo-Multiskan FC)'nda 405 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri okunarak değerlendirilmiştir.

-Ancak enfekteli olduğundan şüphe edilen kiraz, erik, kayısı ve şeftali yaprak örneklerindeki virüs konsantrasyonları düşük oranlarda olduğundan plateler buzdolabında + 4 °C'de 1 gece daha bekletilmiştir. Daha sonra ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda tekrar okutularak absorbans değerleri kayıt altına alınmıştır. Negatif kontrol değerlerinin iki katından daha yüksek absorbans değerleri pozitif olarak kabul edilmiştir.

### 3.2.3. Moleküler Test Yöntemi (RT-PCR Testi)

Kiraz (*Prunus avium* L.) ağaçlarından alınan ve karakteristik virüs belirtileri sergileyen, *Plum pox virus* (PPV) ile enfekteli olduğundan şüphelenilen ve DAS-ELISA testinde negatif kontrollerin absorbans değerinin iki katına yakın absorbans değerleri gösteren 14 adet enfekteli yaprak örnekleri PPV'nin varlığını saptamak üzere RT-PCR testine tabi tutulmuştur.

#### 3.2.3.1. Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu

Virüs belirtisi sergileyen 14 adet enfekteli yaprak örneklerinin total nükleik asit ekstraksiyonları Foissac vd. (2001) tarafından önerilen yöntemle yapılmıştır. Buna göre 100 mg bitki materyali 1ml ekstraksiyon tamponu ile steril havan içerisinde ezilerek homojenize edilmiştir. Steril eppendorf tüpler içerisinde 500 µl hacimdeki özsu konularak üzerlerine 100 µl miktarlarda % 10'luk Sodium lauryl sarcosyl solüsyonu ilave edilmiş ve tüpler ara sıra sallanmak üzere 10 dakika süreyle 70 °C'de inkübe edilmişlerdir. Daha sonra 5 dakika süreyle buza daldırılan tüpler soğutulmuştur. Tüpler 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra sıvı fazın 300 µl'si daha önceden hazırlanmış eppendorf tüplere transfer edilmiş ve içerisine 150 µl ethanol, 25 µl silica süspansiyonu ve 300 µl 6 M Sodium iodine ilave edilmiştir. Karışım, sallayıcı platform üzerinde oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Tüpler 6000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı faz atılmış ve 500 µl yıkama tamponu ile oluşan pelletler yıkanmıştır. Tüpler 6.000 rpm'de 1 dakikalık santrifügasyona tabi tutulduktan sonra ikinci defa eppendorf tüplerdeki pelletler aynı hacimdeki yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Elde edilen pelletler, 150 µl RNase-free su ile çözündürüldükten sonra ve 4 dakika 70 °C'de inkübe edilmiştir. Tüpler 3 dakika 14.000 rpm de santrifüj edildikten sonra, sıvı faz yeni hazırlanan eppendorf tüplere transfer edilerek, pelletler atılmıştır. Elde edilen total nükleik asit, complementer DNA (cDNA) elde edilinceye kadar – 20 °C'de muhafaza edilmiştir.



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

#### 3.2.3.2.1. Complementer DNA (cDNA) Sentezi

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

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

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

- 4 µl 5X First strand buffer
- 1 µl Ribonukleaz inhibitör
- 2 µl dNTPs (10 mM)
- 1 µl Revers transkriptaz enzim

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

#### 3.2.3.2.2. Polymerase Chain Reaction (PCR) Testi

Tekirdağ ili ve ilçelerinden alınan 14 adet kiraz yaprak örneklerinden izole edilen cDNA'lar *Plum pox virus* (PPV)'nin varlığını saptamak üzere PCR testinde kullanılmıştır. PCR reaksiyonu için PCR tüpleri içerisine her bir örneğe ait 2.5 µl 10x Reaction buffer, 3.75 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl dNTPs (10 mM), 1.5 µl PCI (5'-TTGAGTCAAATGGRACAGTTGG-3'antisense), 1.5 µl PP3 (5'-TTATCTCCAGGARTTGGAGC-3'sense) primerleri, 0.2 µl Tag DNA polymerase enzyme (MBI Fermentas), 2 µl cDNA ve 12.55 µl RNase free su eklenerek Thermo PCR aletine (Waltham-MA, USA) yerleştirilmiştir. PPV genomunun P3 geninin 3' bölgesi 2915 ve 3750 nt arasındaki 835 nükleotidlik bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primer çifti I.D.T. (Iowa, USA) firmasından temin edilmiştir. PCR ile cDNA'nın çoğaltımı Çizelge 3.2.'de gösterilen sıcaklık aralıklarında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. PPV hastalığının PCR ile çoğaltımında uygulanan sıcaklık aralıkları

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

### 3.2.3.3. % 2'lik Agaroz Jelin Hazırlanması

2 gr Agaroz, 100 ml 1x TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu içerisinde mikrodalga fırında 3-4 dakika süreyle ısıtılmıştır. Düz bir zemin üzerindeki jel tabağına yüklenecek örnek sayısına uygun jel tarağı yerleştirilmiştir. Hazırlanan jel, jel tabağına kabarcık oluşturmayacak şekilde dikkatle dökülmüştür. 20-30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra katılaştıran jel, içerisinde 1x TAE tamponu bulunan jel tankı içerisine yerleştirilmiştir. Parafilm üzerinde 5 µl yükleme tampon çözeltisi ve 10 µl PCR ürünü konularak karıştırılmış ve jelin çukurlarına yüklenmiştir. Jelin ilk çukuruna 3 µl DNA marker (100 bp) yüklendikten sonra 100 volt'luk bir akımda 40-50 dakika süre ile elektrofoze tabi tutulmuştur.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Arazi Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Tekirdağ ilinin Merkez ilçesi Süleymanpaşa, Şarköy, Çorlu, Malkara ve Muratlı ilçelerinde sert çekirdekli meyve üretim alanlarında yapılan sürvey çalışmalarında *Plum pox virus* (PPV) ve *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV)'lerini saptamak için gözlemler yapılmıştır. Sert çekirdekli meyvelerden kiraz (*P. avium* L.), erik (*P. domestica* L.), şeftali (*P. persica* L.) ve kayısı (*P. armenica* L.) ağaçlarında sistemik hastalık belirtileri gözlenmiştir. Arazi çalışmalarında yapılan gözlemlerde bitkinin yapraklarında mozaik, klorotik lekeler, damarlar arası bantlaşma, şekil bozuklukları ve renk değişiklikleri en belirgin karakteristik belirtiler olarak gözlenmiştir.



Şekil 4.1. Tekirdağ ili Çorlu ilçesi bir ev bahçesindeki erik ağacından alınan yapraklardaki halkalı leke belirtilerinin görünümü

Çorlu ve Muratlı ilçelerindeki erik ve kayısı bahçelerinde *Plum pox virus* (PPV)'nin en karakteristik simptomlarından halkalı leke ve damar bantlaşması simptomları gözlenmiştir.



Şekil 4.2. Tekirdağ ili Çorlu ve Muratlı ilçesinde erik yapraklarındaki halkalı leke ve damar bantlaşması simptomları



Şekil 4.3. Tekirdağ ili Muratlı ilçesinde erik yapraklarındaki halkalı leke simptomları



Tekirdağ ilinin Merkez Süleymanpaşa ilçesinde kiraz üretimi açısından önemli bir konuma sahip olan Naip köyünde bazı kiraz ağaçlarında sistemik viral hastalık belirtileri dikkati çekmiştir.



Şekil 4.4. Süleymanpaşa ilçesi Naip köyünde kiraz yapraklarında klorotik lokal lekelerin görünümü



Şekil 4.5. Tekirdağ Nusratlı köyündeki kiraz bahçesinden alınan yapraklarda halkalı leke ve klorotik leke belirtileri



Şekil 4.6. Süleymanpaşa ilçesi Barbaros mahallesindeki kiraz yapraklarındaki karakteristik lokal lekeler, mozaik ve damar bantlaşması belirtileri



Şekil 4.7. Tekirdağ ili merkeze bağlı Naip köyünden alınan kiraz yapraklarında tipik sistemik belirtiler





Şekil 4.8. Şarköy ilçesinde kayısı yapraklarında tipik damar bantlaşması belirtilerinin görünümü



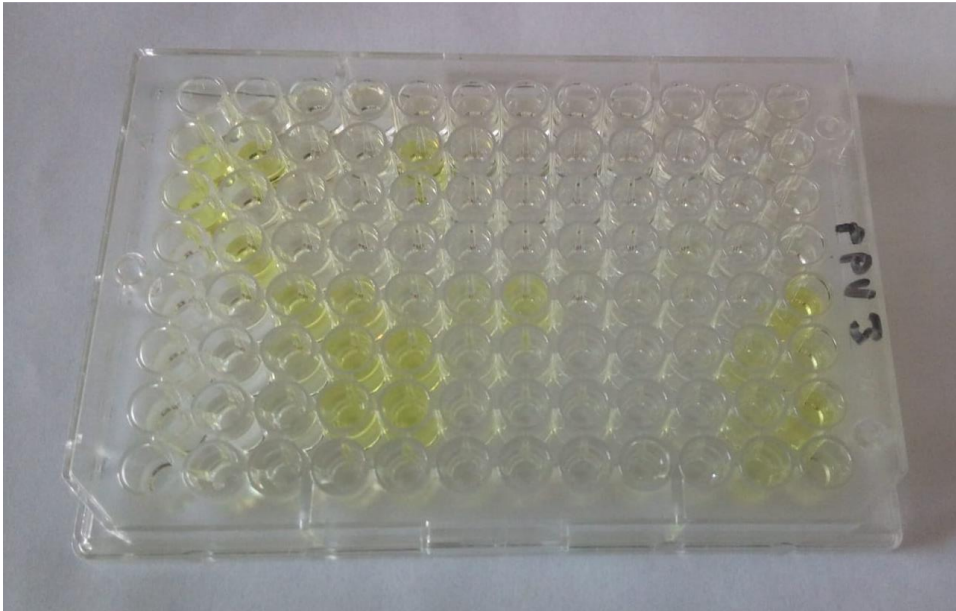
Şekil 4.9. Muratlı ilçesinden alınan kayısı yaprak örneklerinde halkalı lekeler ve damarlar arası renk değişikliklerinin görünümü (soldaki sağlıklı yaprak)

Simptom sergileyen ağaçlardaki yapraklara çok dikkatli bir şekilde bakıldığında bariz virütik belirtiler dikkati çekmiş ve bu ağaçların fotoğrafları çekilerek kayıt altına alınmıştır. Yapraklardaki bu belirtilerin yanısıra bazı ağaçlarda belirgin şekilde halkalı lekeler, mozaik, damar bantlaşması ve şekil bozuklukları erik, şeftali, kiraz ve kayısı ağaçlarında karakteristik belirtiler olarak dikkati çekmiştir. Bununla birlikte yol kenarlarında bulunan erik ve kayısı ağaçlarındaki karakteristik virüs belirtileri daha bariz bir şekilde gözlenmiştir. Özellikle Muratlı ve Çorlu ilçelerinde ev bahçeleri ve yol kenarlarındaki yaşlı ağaçların daha belirgin virüs belirtilerine sahip olduğu görülmüştür. Yeni kurulan tesislerde çok fazla dikkati çeken belirtiler gözlenmemekle birlikte bu durumun sertifikalı fidan kullanımına önem verildiğini göstermekte olup, önemli bir tarımsal üretim faaliyeti olarak dikkati çekmiştir.



#### 4.2. DAS-ELISA Test Sonuçları

Tekirdağ ili sert çekirdekli meyve üretim alanlarını oluşturan ve araştırma alanı içerisinde yer alan Merkez Süleymanpaşa ilçesinden alınan 71, Şarköy ilçesinden 30, Muratlı'dan 25, Çorlu'dan 19, Malkara ilçesinden alınan 13 adet enfekteli yaprak örneklerinde PNRSV ve PPV virüslerini saptamak amacıyla uygulanan DAS-ELISA testi sonuçlarına göre 20 adet örnek enfekteli olarak bulunmuştur. Çizelge 4.1'de görüleceği üzere 16 adet örneğin PPV ile 4 adet örneğin ise PNRSV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Tekirdağ ili Merkez Süleymanpaşa ilçesi, Barbaros mahallesinden alınan 1 adet Şeftali yaprak örneği ile Muratlı ilçesinden alınan 1 adet şeftali yaprak örneği PPV ile enfekteli bulunmuştur. Muratlı ilçesindeki kayısı ağaçlarından alınan 2 adet kayısı yaprak örneği ile Çorlu ilçesinden alınan 1 adet kayısı yaprak örneğinin PPV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, Muratlı ve Çorlu ilçesindeki erik ağaçlarından alınan 11 adet örneğin ise PPV ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte Şarköy ilçesinden alınan 1 adet kayısı, Malkara ilçesi İbribey köyü (1), Süleymanpaşa ilçesi Barbaros mahallesi (1), Çorlu ilçesinden alınan (1) birer adet kiraz yaprak örnekleri olmak üzere toplam 4 adet semptom gösteren yaprak örneğinde ise PNRSV saptanmıştır. Ayrıca, örneklerin hiçbirinde PNRSV ve PPV ile karışık enfeksiyonlar tespit edilmemiş olup her iki virüsün bireysel enfeksiyonlar oluşturduğu görülmüştür.



Şekil 4.10. DAS-ELISA testinde pozitif reaksiyon veren örneklerin görünümü

### 4.3. RT-PCR Test Sonuçları

PPV'nin tipik semptomlarını sergileyen örnekler ile DAS-ELISA testinde negatif kontrolün iki katına yakın absorbans değeri gösteren örnekler arasından seçilen toplam 14 adet kiraz yaprak örneğine uygulanan RT-PCR test sonuçlarına göre örneklerin hiçbirinde PPV tespit edilmemiştir.

Çizelge 4.1. Tekirdağ ili sert çekirdekli meyve üretim alanlarında DAS-ELISA test yöntemiyle saptanan viral hastalık etmenler

İlçe Adı	Mevki, köy adı	Meyve adı	Virüs adı			Örnek Adedi	Enfekteli Örnek adedi
			PPV	PNRSV	PNRSV+PPV		
Süleymanpaşa	Nusratlı	Kiraz				23	
	Nusratlı	Erik				3	
	Naip	Kiraz				15	
	Naip	Kayısı				6	
	Naip	Erik				5	
	Naip	Şeftali				5	
	Barbaros	Kiraz		1		9	1
	Barbaros	Kayısı				2	
	Barbaros	Şeftali	1			2	1
	Barbaros	Erik				1	
Şarköy	Çınarlı	Kiraz				9	
	Çınarlı	Erik				2	
	Çınarlı	Kayısı				3	
	Kirazlı	Kiraz				10	
	Kirazlı	Erik				1	
	Kirazlı	Şeftali				2	
	Merkez	Kayısı		1		2	1

	Güzelköy	Kiraz				1	
Muratlı	Merkez	Erik	8			14	8
	Merkez	Şeftali	1			5	1
	Merkez	Kiraz				3	
	Merkez	Kayısı	2			3	2
Malkara	İbribey	Şeftali				8	
	İbribey	Kiraz		1		2	1
	İbribey	Kayısı				2	
	İbribey	Erik				1	
Çorlu	Merkez	Erik	3			8	3
	Merkez	Şeftali				6	
	Merkez	Kiraz		1		4	1
	Merkez	Kayısı	1			1	1
<b>Toplam</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>16</b>	<b>4</b>	<b>-</b>	<b>158</b>	<b>20</b>

Bu sonuçlar doğrultusunda % 10.13 oranında PPV ile enfeksiyon saptanırken, PNRSV ile enfeksiyon oranı % 2.53 olarak tespit edilmiştir. Her iki virüsün neden olduğu ildeki toplam enfeksiyon oranı ise % 12.66 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda Tekirdağ ili ve 5 ilçesinde üretimi yapılan sert çekirdekli meyve türlerinden kiraz, şeftali, erik ve kayısıda PPV enfeksiyon oranının PNRSV'ye göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda her iki virüsle mücadele kapsamında özellikle PPV ile enfekteli olarak tespit edilen şeftali, erik ve kayısı ağaçlarının eradike edilmesinin gerekliliği bu tez çalışmasının bir sonucu olarak önerilmektedir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Meyve yetiştiriciliğinde erik, şeftali, nektarin, kiraz, vişne ve kayısının içinde bulunduğu sert çekirdekli meyveler dünyada önemli bir ürün grubunu oluşturmaktadır. Türkiye’de mevcut ekolojik koşulların uygunluğu sert çekirdekli meyve yetiştiriciliğinin önemini gittikçe artırmakta buna bağlı olarak üretim miktarları da sürekli artış göstermektedir. Sert çekirdekli meyve türleri Türkiye’nin değişik bölgelerinde değişen yoğunlukta yetiştirilmektedir. Nitekim meyve yetiştiriciliği bakımından büyük bir potansiyele sahip olan Türkiye, birçok meyve türünün de anavatanı konumundadır. Bu nedenle de Türkiye, meyvecilik kültürü bakımından büyük bir çeşitliliğe sahiptir. Binlerce yıldır gerek yerel ve gerekse dışarıdan getirilen çeşitlerin yetiştirme materyaline eklenmesiyle bazı meyve türlerinde yüzlerce çeşit ortaya çıkmıştır (Ağaoğlu, 1987). Türkiye ekonomisi ve insan sağlığı bakımından önemi çok fazla olan sert çekirdekli meyve türlerinin yıllar itibari ile ürün dalgalanmalarındaki başlıca sebep, üretimi yapılan bölgelerde bu meyve türlerinin üretimini kısıtlayan hastalık ve zararlılardır. Türkiye’de iç ve dış karantina listesinde yer alan ve sert çekirdekli meyve ağaçlarının en önemli hastalık etmenlerinden biri olan *Plum pox virus* (PPV)’ün neden olduğu Şarka hastalığının epidemik hale gelmesi üretimi tehdit edecek en önemli etkenlerdendir. PPV’nin taşınma ve yayılmasının aşısı, polen, vektör böcekler ve hastalıklı materyaller ile kolay olmasının yanında kimyasal mücadele yönteminin de olmayışı diğer hastalık ve zararlılara göre önemlerini bir kat daha arttırmaktadır. 1910 yılında Makedonya’da erik ağaçlarında daha sonra 1915 yılında Bulgaristan’da yine erik ağaçlarında saptanan bu hastalığın virütik bir etmen olduğu 1932 yılında Atanasoff tarafından rapor edilmiştir. PPV daha sonra kayısı (1933), şeftali (1961) ve vişnede (1980) saptanmıştır. 1932 ve 1960 yılları arasında Avrupa’daki ülkelere yayılan bu hastalık dünyada birçok ülkeye yayılmış, 1990 yılında ise Şili, Amerika, Ürdün, Hindistan ve Kanada’da rapor edilmiştir. En son rapor ise ticari Japon kayısı ağaçlarında Tokyo, Japonya’da tespit edildiği bildirilmiştir (Gildow vd., 2004; Glasa vd., 2012; Palmisano vd., 2012). Şu zamana kadar bilinen 7 ırkının dışında yeni ırkları da tespit edilen bu hastalığın Türk kayısı izolatlarında saptanan ırkın PPV-T olduğu Serçe vd. (2009) tarafından rapor edilmiştir. Başta Avrupa ülkeleri olmak üzere tüm dünyada yayılma alanı bulan PPV’nin Türkiye’de bulunmasına dair ilk kayıt 1968 yılında Edirne ilindeki erik ağaçlarında Şahtiyancı (1969) tarafından rapor edilmiştir. Ardından Kurçman (1973) Ankara ilinde yetiştirilen erik ağaçlarından *P. persica* GF-305 üzerine kabuk aşılama ile PPV’nin varlığını rapor etmiştir. Yürektürk (1984) ise Marmara Bölgesinde 1976-1982 yılları arasında gerçekleştirdiği çalışmada şeftali, erik ve kayısı ağacında PPV enfeksiyonunun varlığını rapor etmiştir.

Türkiye’de günümüze kadar yapılan çalışmalarda sert çekirdekli meyve türlerinden erik, kayısı, nektarin, şeftali ve bademde saptandığı farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Elibüyük, 2003; Serçe vd., 2009; Karabacak ve İlbağı, 2011; İlbağı ve Çıtır, 2014; Gürcan ve Ceylan, 2016; Saydam vd., 2018). PPV’nin epidemiyolojisinde önemli rol oynayan doğal yabancı konukçuları ve süs ağaçlarındaki varlığı, Elibüyük (2006) tarafından Ankara ilindeki *Prunus cerasifera* Pissardii’de ve İlbağı vd. (2008) tarafından ise Tekirdağ ilinde *Prunus spinosa* L.’da saptanmıştır. Bununla birlikte yine Tekirdağ ilinde *Prunus ceracifera* Pissardi Nigra’da PPV enfeksiyonu belirlenmiştir (Baş, 2017). James ve Thomson (2005) ise PPV’yi, bazı süs bitkileri ve yabancı prunus türlerinden oluşan doğal ve deneysel ortamlardaki konukçu türlerinde araştırmışlar ve potansiyel inokulum kaynağı ve rezervuar kaynağı olan bu bitkilerle mücadelenin önemini vurgulamışlardır. Aynı şekilde Németh vd. (2010) ise odunsu birçok bitkide ve bazı süs ağaçlarında olmak üzere 9 farklı tür ve çeşitte PPV’nin varlığını rapor etmiştir. Bu tez çalışmasında Tekirdağ ilindeki sert çekirdekli meyve ağaçlarının yoğun olarak üretiminin yapıldığı 5 ilçedeki arazi gözlemleri esnasında karakteristik virüs belirtilerinden mozaik, halkalı leke, klorotik ve nekrotik lekeler, damar bantlaşması ve şekil bozukları belirtileri, bariz bir şekilde gözlenmiş olup özellikle bazı ağaçlarda verim ve kaliteyi önemli ölçüde etkilediği belirlenmiştir (Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8). Özellikle ev bahçeleri ve yol kenarlarında bulunan yaşlı ağaçların viral hastalık etmenlerinden oldukça etkilendikleri gözlenmiştir. Söz konusu bu ağaçların mücadelesi oldukça zor olan viral hastalık etmenleri için birer inokulum kaynağı oldukları dikkati çekmiştir. Nitekim iç ve dış karantina listesinde yer alan ve ekonomik açıdan önemli bir viral hastalık etmeni olan PPV’nin erik, şeftali ve kayısıda varlığı DAS-ELISA test yöntemiyle kanıtlanmıştır. DAS-ELISA test sonuçlarına göre 16 adet örneğin PPV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Belirtilen toplam 158 adet erik, kiraz, şeftali ve kayısı yaprak örneklerinin 16 adedinde saptanan PPV’nin enfeksiyon oranı % 10.13 olarak belirlenmiştir. Tekirdağ ilinde yetiştiriciliği yapılan bazı kiraz ağaçlarında PPV’nin tipik belirtilerini sergileyen kiraz yaprak örnekleri ile DAS-ELISA test sonuçlarında negatif kontrolün iki katına yakın absorban değerleri gösteren 14 yaprak örneğinin RT-PCR testi sonucunda PPV tespit edilmemiştir. Nitekim Polák ve Komínek (2009) Çek Cumhuriyeti’nin farklı bölgelerinde yaptıkları çalışmada PPV-C’nin varlığını tatlı kiraz ve vişne ağaçlarında saptanmadığını bildirmişlerdir. Nitekim şu zamana kadar Türkiye’de PPV’nin varlığı kirazda saptanmamış olmasına rağmen araştırma alanı içerisinde yapılacak daha detaylı çalışmalarla kiraz ağaçlarında PPV’nin durumunun incelenmesine gereksinim duyulmaktadır. Aynı şekilde Vıršček Marn vd. (2014) arazi çalışması esnasında kullanılan testlerin ve belirtilen örneklerde PPV’nin varlığının doğrulanması gerektiğini ve belirtilen göstermeyen

örneklerde ise moleküler testlerin virüsün teşhisinde kullanılmasını önermişlerdir. Avrupa ülkelerinde yaygın şekilde bulunan ve bu nedenle karantina listelerinde yer alan PPV'nin mücadele yollarına ilişkin birçok çalışma yapılmış olup, Glasa vd. (2003) etmenin 30 °C'de virüs antijen miktarının önemli ölçüde azaldığını, yüksek sıcaklıklara adaptasyonun PPV'nin epidemiyolojisinde etkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Mainardi vd. (1992) indeksleme için invitro çoğaltım materyallerinin kullanımının meyve ağaçlarının sertifikasyon programlarında bazı avantajlar sağlayabileceğini bildirmişlerdir. Gougherty vd. (2015) ise Amerika Birleşik Devletleri'nin Pensilvanya eyaleti ve Kanada, Ontario'da PPV ile mücadelede başarılı şekilde uygulanan sürvey ve eradikasyon metotlarını içeren PPV saptama yöntemlerini ne ölçüde etkilediği karşılaştırılmıştır. Pennsylvania örnekleme ve tespit protokollerinin Ontario programına göre % 40.5'e kıyasla % 71.8'lik verimliliğe sahip olduğunu belirlemişlerdir. Pennsylvania ve Ontario PPV eradikasyon programlarındaki bazı özelliklerin PPV'nin teşhis verimliliğini etkilediğini belirlemişlerdir. Sert çekirdekli meyve ağaçlarının diğer önemli viral hastalık etmenlerinden *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), Şarköy ilçesinde alınan 1 adet kayısı, Malkara ilçesi İbribey köyü, Süleymanpaşa ilçesi (1), Barbaros mahallesi (1), Çorlu ilçesinden alınan (1) birer adet kiraz yaprak örnekleri olmak üzere toplam 4 adet symptom gösteren yaprak örneğinde saptanmıştır. PNRSV ile enfeksiyon oranı % 2.53 olarak tespit edilmiştir. PNRSV'nin Türkiye'de varlığı ilk olarak 1974 yılında Afyon ilindeki vişne ve kirazlarda tespit edilmiştir (Kurçman, 1974). Daha sonra Yürektürk (1984), Marmara Bölgesinde Bilecik, Bursa, İzmit, Sakarya, İstanbul ve Tekirdağ illerinde saptamıştır. Yegül ve Baloğlu (2019) ise Çukurova Bölgesindeki ceviz ve badem izolatlarında PNRSV'yi saptamışlar ve en uygun örnekleme zamanının ilkbahar ayları olduğu bildirmişlerdir. Bununla Karabacak ve İlbağı (2011) Trakya bölgesi badem ağaçlarında PNRSV'nin varlığını ELISA ve RT-PCR test yöntemleri ile saptamışlardır. Ulubaş ve Ertunç (2004) ise Türkiye'de sert çekirdekli meyve üretiminin gerçekleştirildiği farklı bölgelerdeki meyve fidanlıkları ve bahçelerden toplanan kiraz, vişne, şeftali, nektarin, kayısı ve erik ağaçlarında PNRSV'nin varlığını DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemiyle saptamışlardır. Kılıç vd. (2017) Burdur ilindeki gül yağı (*Rosa damascena* Mill.) üretim alanlarında PNRSV'yi araştırarak, DAS-ELISA ve RT-PCR testi ile virüsün varlığını kanıtlamışlardır. Buzkan vd. (2005), PNRSV'nin kayısı örneklerinde % 13.41 oranında enfeksiyona neden olduğunu belirlemişlerdir. Kapoor ve Handa (2017) latent bir virüs olan PNRSV'nin sadece simptomlara dayalı olarak değerlendirilemeyeceğini, bu nedenle de DAS-ELISA testinin virüsün varlığını doğrulamak için hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ürdün'de sert çekirdekli meyve yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlarda 72 ticari meyve bahçesinden alınan 2552 adet yaprak örneğinde PNRSV'nin varlığı araştırılmış ve

testlenen örneklerin % 15'inin PNRSV ile enfekteli olduğunu bulmuşlardır. PNRSV'nin insidansının araştırıldığı bir başka çalışmada ise DAC, DAS-ELISA ve DIBA test yöntemleri ile virüsün varlığı kanıtlanmıştır (Kapoor ve Handa, 2018). PNRSV'nin badem, şeftali ve erik çeşitlerinde tespiti için en uygun zamanın ilkbahar yetiştirme sezonunda alınan çiçek ve genç yapraklar olduğunu bildirmişlerdir (Salem vd., 2003). Bu tez çalışmasının bir sonucu olarak PPV ve PNRSV virüslerinin araştırma alanı içerisinde yer alan Tekirdağ ilindeki toplam enfeksiyon oranı % 12.66 olarak bulunmuştur. Bu bağlamda PPV'nin enfeksiyon oranı PNRSV'den daha yüksek bulunmuştur. Nitekim Türkiye'de iç ve dış karantina listesinde yer alan PPV'nin mücadelesinde Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının ülkesel çapta yürüttüğü PPV ile mücadele çalışmalarında enfekteli ağaçların eradikasyonu ve hastalığın epidemik hale gelmesini önlemek için gerekli önlemler alınmasına vurgu yapılmaktadır. Bu kapsamda PPV ile enfekteli bulunan ağaçlar eradike edilmektedir. Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular sayesinde Tekirdağ ilinde yeni kurulan meyve tesislerinin PPV açısından bir tehdit oluşturmadığını göstermektedir. Ancak ev bahçeleri ve yol kenarlarında bulunan yaşlı ağaçlarda saptanan PPV'nin birer inokulum kaynağı olarak sorun oluşturduğuna işaret etmektedir. Nitekim yaprak bitleri ile yayılabilen şarka hastalığının epidemik hale gelmesini önlemek buna yönelik tedbirlerin alınmasını sağlamak bölgedeki sert çekirdekli meyve üretimi açısından son derece önemlidir.

## 6. KAYNAKLAR

- Anonim (2018a). Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO). 2018. [Online]. Erişim adresi: <https://www.fao.org>. [Erişim tarihi: 2020].
- Anonim (2018b). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). 2018. [Online]. <https://www.tarimorman.gov.tr>. [Erişim Tarihi: 2020].
- Anonim (2019). (Tarım Orman Bakanlığı. Bitkisel üretim verileri. 2019. [Online]. Erişim adresi: <https://www.tarimorman.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BUGEM>. [Erişim tarihi: 2020].
- Ağaoğlu, Y.S. (1987). Bahçe bitkileri, Ankara Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Yayın No:1009. Ankara. 281s.
- Anameriç, M. (1986). Genel meyvecilik, Tarım Orman ve Köy işleri Bakanlığı, Teşkilatlanma ve Desteklenme Genel Müdürlüğü Yayın No:4, Ankara.
- Asma, B.M. (2000). Kayısı yetiştiriciliği. Evin Ofset, Malatya. 243s.
- Asma, B.M. (2011). Her yönüyle kayısı. Uyum Ajans Ankara.
- Atanasoff, D. (1932). Plum pox a new virus disease. In Yearbook University of Sofia, University of Sofia, F.O.A. Ed. Sofia. 11,49–69.
- Baş, B. (2017). *Tekirdağ ilinde Plum pox potyvirus (PPV)'in doğal ve yabancı konukçu türlerinin saptanması*. (Yüksek Lisans Tezi), Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Buzkan, N., Oztekin, V., Demir, M., Yalcin-Mendi, Y. ve Ilgın, M. (2005). Sanitary Status of Fruit Trees with Implementation of Clean Stocks. Asian Journal of Plant Sciences, 4 (6), 660-663.
- Clark, MF. & Adams, AN. (1977). Characteristics of micro plate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. J. Gen. Virol., 34,475-483.
- Dallot, S., Gottwald, T., Labonne, G., ve Quiot J-B. (2003). Spatial pattern analysis of Sharka disease (*Plum pox virus* strain M) in peach orchards of Southern France. Phytopathology, 93(12), 1543-1552.
- Dunez, J. (1990). Virus and MLO Diseases in Stone Fruit Trees. IAM Bari Italy.



- Elibüyük, İ.Ö. (2003). Natural spread of *plum pox virus* in Ankara, Turkey. *Journal of Phytopathology*, 151,617-619.
- Elibüyük, İ.Ö. (2006). Detection of *plum pox virus* in ornamental *Prunus cerasifera*. *Phytoparasitica*, 34(4), 347-352.
- Eriş, A. ve Barut, E. (2000). Ilıman iklim meyveleri – I. Uludağ Üniv. Ziraat Fak. Ders Kitabı No:6, Bursa, 226 s.
- Foissac, X., Savalle-Dumas. L., Gentit, P., Dulucq, M.J. ve Candresse, T. (2001). Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Capillo and Faveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulturae*, 357,52-59.
- Garcia, JA., Riechmann JL., Lain S, Martin MT., Guo H. ve Simon L. (1994). Molecular characterization of *Plum pox potyvirus*. *EPPO Bulletin*, 24,543–553.
- George, J.A. & Davidson, T.R. (1963). Pollen Transmission of Necrotic Ringspot Virus and Sour Cherry Yellows Viruses from Tree to Tree. *Can. J. Plant Sci.* 43, 276-288.
- Gildow, F., Damsteegt, V., Stone, A., Schneider, W., Luster, D. ve Levy, L. (2004). Plum pox in North America: identification of aphid vectors and a potential role for fruit in virus spread, *Phytopathology*, 94, 868–874.
- Glasa, M., Labonne, G. ve Quiot, JB. (2003). Effect of temperature on *Plum pox virus* infection. *Acta Virologica*, 47(1), 49-52.
- Glasa, M., Palkovics, L., Komínek, P., Labonne, G., Pittnerová, S., Kúdela, O., Candresse, T. ve Šubr, Z. (2004). Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of plum pox virus (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup, *J. Genet. Virol.*, 85, 2671–2681.
- Glasa, M., Prichodko, Y., Zhivaeva, T., Shneider, Y., Predajna, L., Šubr, Z. ve Candresse, T. (2012). Complete and partial genome sequences of the unusual *Plum pox virus* (PPV) isolates from sour cherry in Russia suggest their classification to a new PPV strain. In *Book of Abstracts: International Conference on Virus and Other Transmissible Diseases of Fruit Crops (ICVF)*, June 3–8, Rome, Italy, p:37.
- Gougherty, A.V., Pazdernik, K.T., Kaiser, M.S., ve Nutter, F.W. (2015). Jr. Evaluation of sampling and testing efficiencies of the *Plum pox virüs* eradication programs in Pennsylvania and Ontario. *Plant Dis.*, 99,1247-1253.

- Gürcan, K. ve Ceylan, A. (2016). Strain identification and sequence variability of *plum pox virus* in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 40,746-760.
- İlbağı, H., Çıtır, A., Bostan, H. (2008). *Prunus spinosa* L. A natural wild host of some important fruit viruses in Tekirdağ, Turkey. *Proceedings of the Twentieth International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops, Fruit Tree Diseases, Antalya, Turkey. Acta Horticulturae*, 781, 33-36.
- İlbağı, H., ve Çıtır, A. (2014). Detection and partial molecular characterization of *Plum pox virus* on almond trees in Turkey. *Phytoparasitica*, 42(4), 485-491.
- James, D. & Thomson, D. (2005). Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: ornamental and wild prunus species. *OEPP Bulletin*, 36 (2), 222–224.
- James, D. & Varga, A. (2005). Nucleotide sequence analysis of *Plum pox virüs* isolate W3174: Evidence of a new strain. *Virus Research*, 110,143-150.
- Kapoor, S. & Handa, A. (2017). Serological Evidence for the Presence of *Prunus Necrotic Ring Spot Virus* in Stone Fruits with Particular Reference to Peach *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6 (7), 4078-4083.
- Kapoor, S & Handa, A. (2018). ELISA and DIBA- Efficient tools for indexing peach against *Prunus necrotic ringspot virus*. *The Pharma Innovation Journal*, 7(10), 536-540.
- Karabacak, M, ve İlbağı, H. (2011). Description and detection of almond virus disease in the Trakya region of Turkey. *The Journal of Turkish Phytopathology*, (1-3), 33-39.
- Kerlan, C. & Dunez, J. (1979). Differentiation biologique et s'erologique de souches du virus de la sharka. *Annales de Phytopathol.*, 11, 241–250.
- Kılıç, H.Ç., Yardımcı, N. ve Gübür, Ş. (2017). Serological, biological and molecular detection of *Prunus necrotic ringspot virus* on *Rosa damascena* Mill. in Turkey. *Acta Scientiarum Polonorum - Hortorum Cultus.*, 16 (1),145-150.
- Krezhova, D., Stoev, A., Petrov, N. ve Maneva, S. (2015). Application of remote sensing techniques for the identification of biotic stress in plum trees caused by the *Plum pox virus* *Folia Hort.*, 27 (2), 99-106.
- Kurçman, S. (1973). Nachweis des sharka-virus an aprikosen und pflaumenbaumen Aumenbaumen içinde Ankara. *Journal of Turkish Phytopathology*, 2, 124-129.

- Kurçman, S. (1974). Viruskrankheiten der krischen in Afyon. Journl of Turkish Phytopathology, (3)1-2,67-75.
- Lain, S., Riechmann, JL. ve Garcia, JA. (1989). The complete nucleotide sequence of *Plum pox potyvirus* RNA. Virus Res.,13,157–172.
- Mainardi, M., Gilli, G. ve Triolo, E. (1992). Detection of *Prunus necrotic ring spot virüs* and *Plum pox virüs* in shoot tip cultures of Mr.S. 2/5 Plum rootstock Adv. Hort. Sci., 6, 173-175.
- Maiss, E., Timpe, U., Briske, E., Jelkmann, W., Casper, R., Himmler, G., Mattanovich, D. ve Katinger, HWD. (1989). The complete nucleotide sequence of *Plum pox virus* RNA. J. Gen. Virol., 70, 513–524.
- Manachini, B., Casati, P., Aliverti, I. ve Cinanni, L. (2004). Transmission of PPV–M to *Prunus persica* by *Brachycaudus schwartzi* and *Phorodon humuli* (Hem. Aphididae). J.Appl. Entomol., 128,677–680.
- Myrta, A., Di Terlizzi, B., Boscia, D., Caglayan, K., Gavriel, I., Ghanem, G., Varveri, C. ve Savino, V. (1998). Detection and serotyping of Mediterranean *Plum pox virus* isolates by means of strain-specific monoclonal antibodies. Acta Virol., 42(4),251-3.
- Nemchinov, L. & Hadidi, A. (1998). Spesific oligonucleotide primers for the direct detection of *Plum pox virus*-cherry group. Journal of Virological Methods,70, 231-234.
- Németh, M., Nyerges, K., Hangyál, R. ve Kósa, G. (2010). Surveying viruses on ornamental trees and shrubs in two Hungarian botanical gardens and an arboretum. Julius-Kühn-Archiv, (427), 293-299.
- Neyland, G., Gilmer, R.M. ve Moore J.D. (1976). Fruit diseases and non infectious disorders of stone fruits in north america. U.S.D.A. Agric. Handbk., 437,104-132.
- OEPP/EPPO, (1983). Data sheets on quarantine organisms No. 96, *Plum pox virus*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 13(1).
- Ong, C.A. (1987). Seperation and characterization of nucleoprotein components of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates. PhD Thesis. Washington State University, Pullman, U.S.A.
- Onur, S. (1973). Yerli ve yabancı Erik Çeşitlerinin Seçimi. Yalova Bahçe Kültür Araş. Dergisi, 12 (2), 35-42.

- Özbek, S. (1978). Özel meyvecilik (kışın yaprağını döken meyve türleri), Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No:128, Ders Kitabı 11, Adana, 485 s.
- Özvardar, S. ve Önal, K. (1990). Erik yetiştiriciliği, Tav Yayınları, No:23, Yalova, 64 s.
- Paduch-Cichal, E. & Sala-Rejczak, K. (2007). The effect of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) on growth and flowering of three field-grown rose cultivars. *Phytopathol. Pol.*, 44, 27–35.
- Palmisano, F., Boscia, D., Minafra, A., Myrta, A. ve Candresse, T. (2012). An atypical Albanian isolate of *Plum pox virus* could be the progenitor of the Marcus strain. In Book of 34 abstracts: International conference on virus and other transmissible diseases of fruit crops (ICVF) Rome, Italy, June 3–8. p:33.
- Polák, J. & Komínek, P. (2009). Distribution of *Plum pox virus* strains in natural sources in the Czech Republic. *Plant Protect. Sci.*, 45,144–147.
- Salem, N. Mansour, A. Al-Musa, A. ve Al-Nsour, A. (2003). Incidence of *Prunus necrotic ringspot virus* in Jordan. *Phytopathologia Mediterranea*, 42, 275-279.
- Salem, N., Mansour, A. Al-Musa, A. Al-Nsour, A. ve Hammond, R. (2004). Identification and partial characterization of *Prunus necrotic ringspot virus* on stone fruits in Jordan. *Journal of Plant Pathology*, 86(1),85-90.
- Saydam, C., Arslan, Ü., Ersoy, F., ve Elibüyük, İ.Ö. (2018). Determination of prevalence of sharka disease (*Plum pox virus*) in Bursa. *Bitki Koruma Bülten*, 58(1),1-7.
- Serçe, C.U., Candresse, T., Svanella–Dumas, L., Krizbai, L., Gazel, M. ve Caglayan, K. (2009). Further characterization of a new recombinant group of *Plum pox virus* isolates, PPV-T, found in orchards in the Ankara province of Turkey. *Virus Res.*,142, 121–126.
- Suchá J. & Svobodová L. (2010). Incidence of *Prune dwarf virus* and *Prunus necrotic ring spot virus* in orchards of sweet and sour cherry in the Czech Republic. *Hort. Sci. (Prague)*, 37,118–120.
- Şahtiyancı, S. (1969). Virus de la sharka chez le prunier. *Bulletin Phytosanitaire. FAO*, 17, 69. 2020).
- Ulubaş, Ç. ve Ertunç, F. (2004). The Occurrence and Molecular Characterization of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates Occuring in Turkey. *J. Phytopathology*, 152, 498-502.

- Verma, N., Ram., R. ve Zaidi, A.A. (2014). In vitro production of *Prunus necrotic ringspot virus*-free begonias through chemo- and thermotherapy. *Soil and Tillage Research*, 103(2), 239-247.
- Viršček Marn, M., Mavrič Pleško, Ā., Altenbach, D. ve Bitterlin, W. (2014) Sensitivity of field tests, serological and molecular techniques for *Plum pox virus* detection in various tissues. *Acta agriculturae Slovenica*, 103(1),129-13.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., Delbos, RP., Mazyad, H., Aboulata, AE. ve Dunez, J. (1991). Nucleotide sequence of the 3'-terminal region of the RNA of the Elamar strain of *Plum pox potyvirus*. *J.Gen.Virol.*, 72,1741–1746.
- Yegül, M. ve Baloğlu, S. (2019). Ceviz ve bademde *Prune dwarf virus*, *Prunus necrotic ringspot virus* ve *Cherry leaf roll virus* yoğunluklarının mevsimsel değişimi. *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 34 (1), 61-68.
- Yürektürk, M. (1984). Marmara bölgesinde sert çekirdekli meyvelerde görülen Sharka virüs hastalığı üzerinde araştırmalar. Atatürk Bahçe Kùltürleri Araş. Enst. s. 37.

## EK 1

### DAS-ELISA Testlerinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

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

NaCl	8,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	2,9 g
KCl	0,2 g
NaN <sub>3</sub>	0,2 g

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PBST	1 litre
BSA	2 g
Congo Red	40 mg

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

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

Diethanolamine	97 ml
NaN <sub>3</sub>	0,2 g

97 ml Diethanolamine 1 litre saf su içerisine ilave edildikten sonra 0,2 g NaN<sub>3</sub> eklenmiş ve pH: 9.8'e ayarlanmıştır. Çözelti +4 °C'de saklanmış ve kullanılmadan önce pH kontrol edilmiştir.

## EK 2

### Toplam Nükleik Asit Ekstraksiyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

#### 1. Ekstrasyon Tampon Çözeltisi (Grinding Buffer) pH:5.6-5.8

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

Guanidine Thiocyanate	23.64 g
NaOAc	1.36 g
EDTA	0.465 gr
KOAc	4.9 g
PV-40	1.25 g
2-ME (Mercaptoethanol)	% 1

CH<sub>3</sub>COOH ile pH ayarlanmıştır. Otoklav ile steril edilmiştir. Çalışma süresince ezme tamponu 4 °C'de saklanmıştır. % 1'lik Mercaptoethanol ekstraksiyondan hemen önce eklenmiştir. Ekstrasyon tamponu 50 ml'ye göre hazırlanmıştır.

#### 2. Silika Süspansiyonu pH:2.0

Silica (Sigma % 12)	60 g
---------------------	------

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

#### 3. Sodyum İyodid Solusyonu (NaI)

Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	0.74 g
NaI (Sigma S8379)	36 g

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



#### **4. Yıkama Tampon Çözeltisi (Washing Buffer 1X)**

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

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

