

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI



KULLANIMA HAZIR İZOTERMAL TANI KİTLERİNİN
PLUM POX VIRUS (PPV) TANISINDAKİ
PERFORMANSLARI

BİTKİ KORUMA YÜKSEK LİSANS TEZİ

KHALID RASOOLY

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. ALİ ÇELİK

BOLU, ARALIK - 2024

KABUL VE ONAY SAYFASI

Khalid RASOOLY tarafından hazırlanan “**KULLANIMA HAZIR İZOTERMAL TANI KİTLERİNİN PLUM POX VİRUS (PPV) TANISINDAKİ PERFORMANSLARI**” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Bitki Koruma Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliğiyle kabul edilmiştir. 24/12/2024

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Doç.Dr. Ali ÇELİK
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Göksel ÖZER
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Doç. Dr. Şerife TOPKAYA
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu ve Şablonuna uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin Turnitin adlı programında enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %30'u geçmemektedir.

KHALID RASOOLY

ÖZET

KULLANIMA HAZIR İZOTERMAL TANI KİTLERİNİN PLUM POX VIRUS (PPV) TANISINDAKİ PERFORMANSLARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KHALID RASOOLY

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI

BİTKİ KORUMA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ.DR.ALİ ÇELİK)

BOLU, ARALIK - 2024

X + 40 sayfa

Sert çekirdeklilerin en önemli hastalıklarından birisi olan Plum pox virus (PPV), 1917 yılında yapılan ilk tespitinden bu yana dünyada bir çok araştırmaya konu olmuştur. Bu çalışmada DOSA Bilgi ve Bilişim Teknolojileri Ltd. Şti. tarafından PPV'nin izotermal koşullar altında tanısı için geliştirilen kolorimetrik ve gerçek zamanlı tanı kitlerinin PPV tespitindeki performansları araştırılmıştır. Yerli olanaklar ile geliştirilen ve bu çalışmaya konu olan izotermal tanı kitleri bünyelerinde özel primer setlerini de içermenin verdiği bir avantaj ile direkt enfekteli bitki RNA'sının reaksiyona alınmasına olanak sağlamaktadır. Ayrıca bu çalışmada kullanılan izotermal tanı kitleri PPV için 65 °C sıcaklık ve 60 dk süre ile başarılı bir amplifikasyona olanak sağlarken, çapraz testlerde kullanılan potansiyel konukçu genomlarında ve ortak enfeksiyon sergileyebilen virüsler ile etkileşim sergilememiştir. Araştırmaya konu edinilen kolorimetrik ve gerçek zamanlı tanı kitlerinin sırasıyla [10⁻⁴ ve 10⁻⁵ ng/µL] PPV RNA'sı tespit hassasiyeti yakalayarak bu hususta istenen değerlere ulaştığı değerlendirilmektedir. Performansları araştırılan izotermal tanı kitleri Türkiye'de yaygın olarak bulunan PPV-M, D ve T ırkları için başarılı bir amplifikasyona olanak tanımıştır. Bu kitlerin, özellikle düşük laboratuvar donanımına sahip alanlarda ve saha koşullarında uygulanması teşvik edilmelidir. Başarıyla geliştirilen ve optimize edilen bu izotermal tanı platformunun, diğer önemli bitki virüslerinin tespitine uyarlanması, Türkiye ve benzeri tarım bölgelerinde viral hastalıkların kontrolü için stratejik bir avantaj sağlayabilir.

ANAHTAR KELİMELER: PPV, İzotermal, LAMP, Kit.

ABSTRACT

PERFORMANCE OF READY-TO-USE ISOTHERMAL DETECTION KITS IN PLUM POX VIRUS (PPV) DETECTION

MASTER THESIS

KHALID RASOOLY

BOLU ABANT IZZET BAYSAL UNIVERSITY

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

PLANT PROTECTION DEPARTMENT

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. ALI CELİK)

BOLU, DECEMBER 2024

X + 40 pages

Plum pox virus (PPV), one of the most significant diseases affecting stone fruit trees, has been extensively studied worldwide since its initial detection in 1917, with various diagnostic approaches explored. This study investigates the performance of colorimetric and real-time diagnostic kits developed by DOSA Information and Communication Technologies Ltd. for detecting PPV under isothermal conditions. These isothermal diagnostic kits, developed and optimized with domestic resources, stand out as highly practical diagnostic tools, leveraging an advantage of containing proprietary primer sets that enable direct testing of RNA from infected plants, independent of existing isothermal methods. In this study, the isothermal diagnostic kits enabled successful amplification of PPV at 65°C within 60 minutes, without cross-reaction with potential host genomes or other viruses that could co-infect. The colorimetric and real-time diagnostic kits demonstrated detection sensitivities of [10⁻⁴ and 10⁻⁵ ng/μL] of PPV RNA, respectively, meeting the desired standards for PPV detection. These kits also facilitated effective amplification of PPV-M, D, and T strains, commonly found in Turkey. The application of these kits, especially in field settings and areas with limited laboratory infrastructure, should be encouraged. This successfully developed and optimized isothermal diagnostic platform could also be adapted for the detection of other significant plant viruses, offering a strategic advantage in managing viral diseases in agricultural regions such as Türkiye.

KEYWORDS: PPV, Isothermal, LAMP, Kit.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	ix
TEŞEKKÜR.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Dünya’da PPV’nin Güncel Durumu ve Yöntemleri ile İlgili Çalışmalar ...	7
1.2. Türkiye’de PPV’nin Durumu ve Tespiti Yöntemleri ile İlgili Çalışmalar	11
1.3. LAMP Yöntemi ve Bitki Patolojisinden Uygulama Örnekleri	17
2. MATERYAL VE YÖNTEM	22
2.1 Virüs Kaynağı.....	22
2.2. RNA İzolasyonu	22
2.3. DNase I Uygulaması	23
2.4. PPV’nin İzotermal Tanısı için Kullanılan Kitleri.....	23
2.5. İzotermal Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi	24
2.6. Başlangıç Reaksiyonu	25
3. BULGULAR	26
3.1. RT-LAMP Başlangıç Test Bulguları	26
3.2. RT-LAMP Tanı Kitlerinin Spesifiklik ve Duyarlılık Analiz Sonuçları	27
4. TARTIŞMA.....	30
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	33
6. KAYNAKLAR.....	34

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 2.1.** Çalışmada test edilen DOSA Bilgi ve Bilim Teknolojileri Biological Development & Research tarafından geliştirilen kullanıma hazır izotermal tanı kitleri- (a. Kolorimetrik, b. Gerçek zamanlı). 24
- Şekil 3.1.** Başlangıç LAMP reaksiyonu bulguları. a. 65 °C’ de 60 dk inkubasyon süresi ile başlangıç reaksiyonu sonucunda kolorimetrik teste yönelik görsel değerlendirme b. Agaroz jel elektroforezi görüntüsü ve pozitif örneklerde merdiven benzeri bantlaşma c. Gerçek zamanlı RT-LAMP sonucunda 20 ve 22. dakikada amplifikasyona işaret eden doyum eğrileri (1; kit pozitif kontrol, 2; PPV-D RNA’sı, 3. kit negatif kontrol). 26
- Şekil 3.2.** Geliştirilen kitlerin spesifiklik analizleri. a. 60 dk’lık reaksiyon sonucunda PPV-D RNA’sının yer aldığı 1 no’lu tüpte gözlenen renk değişimi, b. Gerçek zamanlı LAMP ile PPV-D ile enfekteli 1 no’lu örnekte görülen amplifikasyona yönelik doyum eğrisi, c. Amplifikasyonları doğrulayan agaroz jel elektroforezi görüntüleri (2; şeftali DNA, 3; erik DNA, 3; kayısı DNA, 4; badem DNA, 5; PNRSV RNA, 6; PDV RNA, 7; Kit negatif kontrol, 8; Su kontrol. Gerçek zamanlı RT-LAMP testi 2 tekerrürlü yürütülmüştür). 27
- Şekil 3.3.** Kullanılan tanı kitlerinin hassasiyet düzeyleri. A. Kolorimetrik reaksiyonda oluşan amplifikasyonlara ait görsel, b. Gerçek zamanlı kit ile elde edilen doyum eğrileri. c. Amplifikasyonlara yönelik agaroz jel görüntüleri (Sırasıyla 1-8 arası 10^{-10} - 10^{-6} dilüsyon serileri kullanılmış olup, gerçek zamanlı RT-LAMP testinde örnekler iki tekerrürlü alınmıştır). 28
- Şekil 3.4.** PPV-D (1 ve 2), M (3 ve 4) ve T (5 ve 6) ırklarının geliştirilen izotermal tanı kiti ile tespiti a. kolorimetrik reaksiyon sonucu üç ırk için gözlenen renk değişimi, b. Gerçek zamanlı LAMP testi ile gözlemlenen doyum eğrileri, c. agaroz jel elektroforezi görüntüleri, 7,kit negatif kontrol, 8, su kontrol). 29

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1. Ülkemizin'nin sert çekirdekli meyve üretimi (Ton),.....2



KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

µL	: Mikrolitre
ApMV	: Apple Mosaic Virus
ACSLV	: Apple Chlorotic Leaf Spot Virus
CLRV	: Cherry Leaf Roll Virus
DMV	: Dahlia Mosaic Virus
DAS-ELISA:	Double Antibody Sandwich- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
Gr	: Gram
LAMP	: Loop-mediated Isothermal Amplification
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
PCFVd	: Pepeer Chat Fruit Viroid
PDV	: Prune Dwarf Virus
PLMVd	: Peach Latent Mosaic Pelamo Viroid
PNRSV	: Prunus Necrotic Ring Spot Virus
PPV	: Plum pox virus
RNA	: Ribonükleik Asit
RTBV	: Rice Tungro Basiliiform Virus
TeMV	: Telosma Mozaic Virus
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
RT-PCR	: Revers Transcription-Polymerase Chain Reaction
TYLCV	: Tomato Yellow Leaf Curl Virus
WYMV	: Wheat Yellow Mosaic Virus

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmanın her aşamasında yardımını hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak çalışmanın tamamlanmasında büyük katkısı olan, akademik ve mesleki alanda gelişme kaydetmemde büyük emeği geçen değerli tez danışmanım sayın Doç. Dr. Ali ÇELİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunmak istiyorum.

Bu çalışmanın sürecinde yaygın olan PPV ırklarının izotermal koşullar altında tanısı için yerli tanı kitlerini hazırlayan ve kullanımımıza sunan DOSA Bilgi Teknolojileri Ltd. Şti.'ne ayrıca teşekkür ederim.

Ayrıca Viroloji Laboratuvarı olanaklarını ve bilimsel kaynaklarını paylaşan Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi'ne teşekkürlerimi borç bilirim.

Eğitim öğretimimin her aşamasında ve hayatımın her alanında bana fedakarlık eden, sabırla yardımlarını esirgemeyen ve her zaman destek olan aileme ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Khalid RASOOLY

1. GİRİŞ

Türkiye, bahçe bitkileri üretiminde genetik kaynakları, çevre özellikleri ve yetiştirme yöntemleri açısından dünya çapında önemli bir konuma sahiptir. Türkiye, pek çok sert çekirdekli meyve çeşidinin (*Prunus* spp.) hem doğal olarak yetişen hem de ekonomik olarak üretilen bir ülke olup, yetiştirilen meyveler gündelik tüketimde ve tarımsal dış ticarete önemli rol oynamaktadır (Uzun vd., 2018). Sert çekirdekli meyveler insan sağlığında geniş kullanım alanlarına sahip olmaları ve satış talebi yüksek olan ürünler olmaları nedeniyle üretimleri devamlı artmaktadır (Uzun vd., 2018). Ancak tüketicilerin sert çekirdekli meyve tercihlerinin bölgelere göre değişkenlik göstermesi sebebiyle hasattan depolamaya, tüketiciye kadar devam eden sürecin sıklıkla gözetilmesi gerekmektedir (Hale vd., 2014). Ekonomik olarak yetiştirilen ürünler arasında erik, şeftali, kiraz, vişne, kayısı ve nektarin en çok bilinenleridir (Uzun vd., 2018). Meyve yetiştiriciliğinde *Prunus* cinsine ait sert çekirdekli meyveler globa önemli bir ürün grubunu temsil etmekte olup, ülkemiz ise dünya çapında önemli bir sert çekirdekli meyve üreticisi ve ihracatçısı konumundadır (Temur Çınar, 2019).

Sert çekirdekli meyve çeşitleri Türkiye'nin farklı yerlerinde, farklı yoğunluklarda üretilmektedir. Örnek olarak kuru kayısı üreticiliğinde Malatya ve çevresi, ülkemiz ve dünya için en önemli durumda iken, sofralık ve erkenci kayısı yetiştiriciliğinde Mut ve çevresi, şeftali yetiştiriciliğinde ise Bursa ve çevresi, Kemalpaşa, Akşehir ve Ulukışla bölgeleri ise kiraz yetiştiriciliği açısından önemli alanlarıdır (Koç, 2010). Son zamanlarda ekime yeni alanlar tahsis edilmekte ve yetiştiricilik yapılan bölgeler giderek genişlemektedir. Ülkemizin bölgeleri, özellikle Doğu Akdeniz Bölgesi, çevresel özellikleri nedeniyle erken sofralık sert çekirdekli meyve yetiştiriciliği açısından önemli bir fırsata sahiptir ve bu fırsat son dönemde değerlendirilmektedir (Koç, 2010). Bu durum aynı zamanda ekolojik koşulların meyve yetiştirmeye uygun olması nedeniyle avantajlıdır. Aslında dünyada yetiştirilen 138 meyve türünden 80'den fazlası ülkemizde yetiştirilebilmekte olup, bunların çoğu ılıman iklim meyve türleri olan tropikal ve subtropikal meyve türleridir (Amet, 2021). Tablo 1 'de (2021-2023) yılları arasında ülkemizdeki sert çekirdekli türlerinin üretim değerleri verilmiştir (TÜİK 2023).

Tablo 1.1. Ülkemizin'nin sert çekirdekli meyve üretimi (Ton), (TÜİK, 2023).

Meyve Çeşitleri	Yıllar		
	2021	2022	2023
Şeftali	891.857	1.008.185	800.336
Kayısı	800.000	803.000	750.000
Vişne	183.757	176.770	211.291
Kiraz	689.834	656.041	736.791
Erik	332.533	348.750	355.132
Zardali	17.522	20.832	16.575

Sert çekirdekli meyvelerdeki şeker glikoz, fruktoz ve sakaroz formunda bulunmakta olup bunlar arasında en yüksek şeker içeriği %11,6 oranında kirazda, %10,5 oranında ise kayısıda bulunmaktadır. Sert çekirdekli meyveler malik asit açısından zengin olup olgunlaşma zamanı uzadıkça suda çözünen kuru madde miktarı da artmaktadır (Özcan, 2020). Sert çekirdekli meyvelerin hasat edilebilmesi için çözünebilir katı madde, hamur sertliği, kabuk ve hamur rengi, meyve suyu içeriği ve fenolikler benzeri birtakım özellikleri karşılaması gerekmektedir (Duru vd., 2022).

Oldukça yaygın yetiştiriciliği yapılan sert çekirdekli meyvelerde hastalığa ve ürün kaybına yol açabilecek pek çok biyotik ve abiyotik faktör bulunmaktadır (Baş, 2017). Sert çekirdekli meyve yetiştirilen alanlarda verimi sınırlayan en önemli faktörler şüphesiz biyotik hastalık nedenleridir. Sert çekirdekli meyve üretimini kısıtlayan fungal hastalıklarından bazıları kök çürüklüğü (*Armillaria* spp), yaprak lekesi (*Cladosporium carpophilum*), monilya (*Monilinia fructigena*), şeftalide yaprak kıvrıcıklığı (*Taphrina deformans*), beyaz çürüklük (*Botryosphaeria dothidea*), külleme (*Sphaerotheca pannosa*), sert çekirdekli meyvelerde çürüklük (*Phytophthora* spp.) (Çelik, 2020), sitospora kanseri (*Cytospora* spp.), eriklerde cep hastalığı (*Taphrina pruni*), erik pası (*Tranzschelia pruni-spinosea*), meyvelerde çil (*Wilsonomyces carpophilus*) (Kaplan vd., 2008), kök kanseri (*Agrobacterium tumefaciens*), bakteriyel yaprak lekesi (*Xanthomonas campestris* pv. *pruni*) ve bakteriyel kanser (*Pseudomonas* spp.) gibi bakteriyel hastalıklar olarak bilinmektedir (Çelik, 2020).

Sert çekirdekli meyve ağaçlarında hastalık etmenleri arasında virüs ve virüs benzeri hastalık etmenlerinin sebep olduğu verim ve kalite kayıplarının önemi

büyüktür (Baş, 2017). Bu faktörlerin taşınması ve yayılması; polen, aşı, çeşitli vektörler ve hastalıklı üretim metaryali ile olmakta ve bu viral etmenlere karşı etkin bir kimyasal mücadele yöntemi bulunmadığı için diğer hastalıklar ve zararlılarla kıyaslandığında değeri giderek artmaktadır (Baş, 2017). Sert çekirdekli meyvelerde farklı derecelerde hasar oluşturan 150'den fazla virüs ve virüs benzeri hastalık olduğunu belirlenmiştir (Koç, 2010). Bu ürün grubuna bulaşan 5 ana virüs Prune dwarf virus (PDV) (Çelik, 2020), Cherry leaf roll virus (CLRV) (Kaplan vd., 2008), Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV), Apple mosaic virus (ApMV) ve Plum pox virus (PPV) olarak sıralanabilir (Çelik, 2020).

Bu viral etmenler içerisinde yer alan PPV, başta şeftali, erik, vişne, kiraz ve kayısı dahil olmak üzere sert çekirdekli meyve ağaçlarının en önemli viral hastalık etmenidir (Garacia vd., 2014). Virüs verim ve kalitede önemli kayıplara neden olarak ürünün piyasa değerini tamamen düşürmektedir (Garacia vd., 2014). PPV özellikle kayısı, erik ve şeftalide önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hastalıklı bitkilerin meyve yoğunluğu %21-34 ve şeker %0,14-2,11 miktarında azalmış olup asitliği ise artmıştır (Nemeth, 1989). PPV genel olarak belirli şeftali çeşitlerinin yaprakları, çiçekleri ve taç yapraklarında ortaya çıkarken, aynı zamanda kayısı ve erik ağaçlarının yapraklarını, çiçeklerini ve taç yapraklarının farklı kısımlarında da semptomlara neden olur. PPV yapraklarda klorotik bantlara, dal açıklıklarına, halka şeklinde lekelenmeye ve ağaç deformasyonuna neden olur. Bu semptomlara genellikle çiçeklerde renk eksikliği eşlik eder. genellikle PPV, meyvenin pazarlanabilir değerinin düşmesine neden olur (Lopez-Moya vd., 2000). Benzer şekilde bademde PPV, meyve veriminin ve kalitesinin azalmasına neden olmakta olup deforme olmuş meyveler ve klorotik yapraklar görülebilir, belirtiler hızla maskelenmektedir (Koç, 2010).

PPV, *Potyviriidae* familyasındaki *Potyvirus* cinsinin bir üyesidir. Virüs yaklaşık 9.8-10 kb'lik pozitif duyarlı olarak tek sarmallı RNA genomu taşır. Genomun 3'-ucunda uzun bir poly(A) kuyruğu vardır ve 5'-ucuna bir protein (VPg) bağlanmıştır. Bu poliprotein yapısı, virüs genomu tarafından kodlanan 10 protein ürününe dönüştürülmüştür (Selvador vd., 2006). Genom tarafından kodlanan proteinler P3, CP, HCPor, NIa-VPg, P1, 6K1, NIaPro, 6K2, NIb ve CI proteinleridir (Köç, 2010; Çelik, 2020).

Sharka (Şarka) olarak da bilinen PPV'nin belirtileri virüsün ırkına, ortam sıcaklığına, konakçı türüne ve çeşidine bağlı olarak değişmektedir. Virüs tipik

olarak çiçekler, yapraklar ve meyveler üzerinde klorotik, çizgiler ve lekeler içeren semptomlara neden olur. Bunlar özellikle ilkbaharda yaygındır ve ayrıca meyvenin kabuğundan türetilen tohumlardaki semptomlara neden olur (Cambra vd., 2006). PPV ile enfekteli ağaçlar, belirgin lekelerin varlığı, kötü tat ve meyvelerin zamanından önce düşmesi nedeniyle pazarlanamayan meyveler üretir. Hastalığın geniş alanlara bulaşmasının en önemli nedeni yeni sert çekirdekli alanlarının tesisi için kullanılan enfekteli üretim materyalleridir. Virüs, başta bahçe içerisinde aktif rol oynayan ve kısa mesafelerde hareket eden *Myzus persicae* dahil olmak üzere farklı yaprak bitleri tarafından non-persistent bir mekanizmayla taşınır (Cambra vd., 2006).

Şu ana kadar 10 farklı PPV ırkı tanımlanmıştır (Garcia vd., 2014). Bunlar; PPV-M (Marcus), PPV-D (Dideron) (Kerlan ve Dunez, 1979), PPV-EA (El Amar) (Wetzel vd., 1991), PPV-C (Cherry) (Nemchinov vd., 1996), PPV-W (Winona) (James ve Varga, 2005), PPV-Rec (Recombined) (Glasa vd., 2004), PPV-T (Türkiye) (Serçe vd., 2009), PPV -An (Ancestor) (Palmisano vd., 2012), PPV-CR ve tanımlanan son ırk ise PPV-CV'dir (Cherry Volga) (Glasa vd., 2013). PPV-D ve PPV-M ilk kez epidemiyolojik açıdan tanımlanan iki yaygın gruptur (Kerlan ve Dunez, 1979). PPV-M Güney, Doğu ve Orta Avrupa'da sıklıkla görülür (Myrta vd., 2001). PPV-M öncelikle Yunanistan'daki şeftalilerden izole edilmiştir. Şeftalilerde varlığıyla kayısı ve eriklerde de ortaya çıkan konukçulardır. PPV-D ırkı birçok ülkede tanımlanmıştır (James vd., 2013). Avrupa'dan sonra, PPV-D Güney Amerika, Kuzey Amerika ve Japonya'da rapor edilmiştir (Roy ve Smith, 1994; Levy vd., 2000; Maejima vd., 2011). PPV-Rec, PPV-D ve M'den sonra en yaygın türdür ve Orta ve Doğu Avrupa'da yaygındır, Kanada ve Türkiye'de de tespit edilmiştir (Glasa vd., 2004; Candresse vb., 2007; Gürçan ve Ceylan, 2016b). PPV-An'ın varlığı Arnavutluk'ta belgelenmiştir (Palmisano vd., 2012). PPV-C ise Güney İtalya ve Moldova'da tanımlanmıştır (Crecenzi vd., 1997; Kalashyan vd., 1994). Rusya'da PPV-CR tespit edilmiş ve Mısır'daki kayısı ağaçlarının PPV-EA ile enfekte olduğu bulunmuştur (Wetzel vd., 1991; Glasas vd., 2013). Ayrıca Türkiye'de PPV-T (Serçe vd., 2009), PPV-W ise Avrupa ve Kanada'da bildirilmiştir (James vd., 2003; Glasas vd., 2013).

Ülkemizde PPV'nin varlığı erik ağaçlarında ilk olarak Edirne'de yaklaşık elli yıl önce (Sahtiyanci, 1969; Kurçman, 1973) belirlenmiştir. Sonra yürütülen çalışmalar ile virüs, Türkiye'nin bir çok ilinde tespit edilmiştir (Candresse vd.,

2007; Akbaş vd., 2011; Serçe vd., 2011; Ceylan vd., 2014; Gürcan ve Ceylan, 2016). Türkiye'de 10 farklı PPV ırkından sadece 4'ü (PPV-D, -M, -Rec ve T) tespit edilmiştir. Ayrıca Türkiye'de sadece İstanbul'da bulunan PPV-Mist adlı bir ırk keşfedilmiştir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, PPV-D, -M, -Rec ve -T ırklarının Türkiye'de çok uzun zamandan beri yaygın olduğunu ve büyük genetik çeşitlilik gösterdiğini, bu nedenle Türkiye'ye dahil edildiğini göstermiştir. Yapılan çeşitli çalışmalar bu dört ırkın kökeninin Türkiye olduğunu ve dört ırktan Türkiye'de PPV-T izolatları baskın olduğunu göstermektedir (Elibüyük, 2003; Serçe vd., 2009; Gürcan ve Ceylan, 2016; Gürcan vd., 2019; Teber vd., 2019; Gürcan vd., 2020; Gürcan vd., 2021; Teber vd., 2023).

PPV Türkiye'de sıkça bildirilmiş olmasına rağmen serolojik testlerin yaygın olarak kullanılması, piyasada ırk belirleyici antikorların bulunmaması ve PPV ırkı ve genetik varyantlarının pek çok bölgede bildirilmemesi nedeniyle dizi analizleri ancak son yıllarda mümkün olmuştur (Gürcan ve Ceylan, 2016b). Son yıllar'da gerçekleştirilen DNA (Deoksiribonükleik Asit) sıralama araştırmaları Türkiye'de PPV-D, M ve T ırklarının yaygın olduğunu belirlenmiştir (Gürcan ve Ceylan, 2016b). Nükleotid dizilimine dayalı olarak Çanakkale, Aydın, Kayseri, Denizli, Bursa ve Isparta illerindeki kapalı bahçelerde PPV-M izolatları tespit edilmiştir (Gürcan ve Ceylan, 2016b). Bu illerde bulunan M izolatlarının filogenetik ağaçta Avrupa M izolatları ile grup oluşturduğu görülmüş ve ayrıca Türkiye'ye benzersiz bir PPV-M popülasyonu yalnızca İstanbul'da tespit edilmiştir (Gürcan vd., 2016). Bugüne kadar tam ve kısmi genom dizilimi gerçekleştirilmiş çok sayıda Türk PPV izolatı tespit edilmiştir. Bu analizler, PPV'nin, özellikle de D ve T ırklarının genetik farklılıklarının tarihsal açıdan önemli veriler sağlamıştır (Teber vd., 2019; Gürcan vd., 2020). PPV-D ve T izolatlarının genetik farklılıklarının özellikle Trakya bölgesinde en üst düzeyde olduğu görülmüştür (Morca vd., 2022).

PPV tanısında, biyolojik yöntemlerin yanı sıra serolojik yöntemle, özellikle ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) testi ilk zamanlarda yaygın olarak kullanılmıştır (Koç, 2010). Monoklonal antikorların kullanımı sayesinde virüs ırkları arasındaki farklılıkların belirlenmesi ve teşhis edilmesi daha kolay hale gelmiştir. Özellikle D ve M ırkları, yapısal ve yapısal olmayan PPV proteinlerine karşı monoklonal antikorlar kullanılarak tespit edilebilmektedir (Koç, 2010).

ELISA testinin virüs tanısında kolay uygulanabilir ve düşük maliyetli olması, tanı için en sık tercih edilen tekniklerden biri yapmıştır. Fakat bitkideki

düşük virüs yoğunluğu ve bitki inhibitörlerinin miktarının yüksek olması bazen viral etkenlerin ELISA ile teşhis edilmesini güçleştirmektedir (Lopez Moya vd., 2000). Bu nedenle tanı için ELISA'dan daha duyarlı, moleküler hibridizasyon ve PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) gibi alternatif moleküler yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknikler sayesinde çok düşük yoğunluklarda bile ajanların doğru tanısı yapılabilmektedir (Koç, 2010). Serolojik testlere ilaveten Türkiye'nin farklı bölgelerinde farklı semptomlar gösteren farklı sert çekirdekli meyve türlerinde (kiraz, şeftali, kayısı, badem, erik, nektarin) PPV'yi tespit etmek için ELISA ve RT-PCR (Revers Transcription-Polymerase Chain Reaction) dahil olmak üzere serolojik ve moleküler teknikleri birlikte kullanılmış ve tanı yöntemleri birbirilerini doğrular nitelikte uygulanmıştır (Serçe vd., 2009; Koç, 2010; Gürcan ve Ceylan, 2016). RT-PCR yöntemine ilaveten PPV'nin kantitatif analizlerinde özellikle yaprak bitlerinde PPV'nin tespitinde başarıyla kullanılabilmektedir. RT-PCR kullanılarak SYBR Green I erime eğrisi analizi çeşitli patojenlerin tanımlanması ve test edilmesi için basit ve sağlam bir yöntem olduğu belirlenmiştir (Varga ve James 2006).

Yukarıda bahsedilen ve PPV tanısında günümüzde başarılı bir şekilde kullanılmaya devam eden yöntemlere ilaveten bu tez çalışmasına konu olan Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) tekniği, düşük miktarda DNA'nın hassas, hızlı ve yüksek amplifikasyonu için geliştirilmiş, şablon genom üzerindeki altı farklı bölgeyi tanıyan, özel olarak tasarlanmış dört primerden oluşan bir primer seti kullanılarak reaksiyonun mümkün olduğu bir test haline gelmiştir (Notomi vd., 2000). Bir LAMP reaksiyonu, 60–65 °C'de kalabilen basit bir su banyosu veya ısı bloğu ile gerçekleştirilebilir. Amplifikasyon sonuçları, agaroz jeli elektroforezi ile belirlenebilir ve amplifiye edilmiş DNA veya cDNA (Complementary Deoksiribonükleik Asit) , reaksiyon tüpünde çıplak göz veya UV ışığı altında basit gözlem yoluyla doğrulanmıştır. LAMP tekniği orijinal olarak DNA amplifikasyonu için geliştirilmiş olmasına rağmen, bir ters transkriptaz enziminin eklenmesiyle RT-LAMP adıyla viral RNA (Ribonükleik Asit) hedeflerinin amplifikasyonu için uyarlanmıştır (Varveri vd., 1987; Lain vd., 1989; Candresse vd., 1994; Martin vd., 2000; Notomi vd., 2000; Pham vd., 2005; Varga ve James, 2006; Fernandez-Soto vd., 2014; Panno vd., 2020). Ayrıca bitki virüslerinin tespitinde de bazı uygulamalar bulunmaktadır. Varga ve James (2006) PPV tespiti için RT-LAMP prosedürünü geliştirmiş ve D, M, EA, C ve W ırklarını içeren beş PPV izolatu RT-

LAMP yöntemiyle tespit edilmiştir. Ayrıca Hadersdorfer (vd. 2011), Varga ve James'in değiştirilmiş bir Blue LAMP'ını geliştirmiş ve enfekte bitki dokularından elde edilen PPV süspansiyonlarına uygulanmıştır. Türkiye'de ise Çelik ve Ertunç (2021) tarafından yürütülen bir çalışmada PPV-T için klasik RT-LAMP yöntemi geliştirilmiş ve reaksiyon sonrası eklenen bileşenler ile bulgular değerlendirilmiştir.

Son yıllarda LAMP yöntemi değişken olmayan sıcaklıklarda uyarlanabilirliği ve yüksek kapasiteli laboratuvar ekipmanı gerektirmemesi gibi özelliklerinden dolayı ticarileşme noktasında çeşitli ar-ge çalışmalarına konu edinilmiştir. Bu çalışmada yukarıda ilgili literatür ile desteklendiği üzere ülkemizde yaygın olarak bulunan PPV-D, PPV-M ve PPV-T ırklarının tek tüpte hızlı kolorimetrik ve gerçek zamanlı tespiti için kullanıma hazır olarak yerli olanaklar ile geliştirilmiş tanı kitlerinin PPV tespit performansları araştırılmıştır.

1.1. Dünya'da PPV'nin Güncel Durumu ve Tespit Yöntemleri ile ilgili Çalışmalar

ELISA testi, PCR, sekans analizi ve biyolojik testler, PPV'nin tanımlanması için genellikle tercih edilen tekniklerdir. Poliklonal 5B-IVI antikorunun kullanıma sunulması, PPV'nin saptanmasında ELISA testinin rutin kullanımını kolaylaştırmıştır (Crescen vd., 1997; Myrta vd., 1998; Cambra vd., 2006). Başka virüslerde olduğu gibi, PPV'yi tespit etmek için kılıf proteinin PCR ile amplifikasyonu yaygın olarak kullanılmaktadır (Wetzel vd., 1991; Olmos vd., 1996; Candresse vd., 1998). Viral genlerin dizi analizi, PPV'nin tespit edilmesinde en güvenilir yöntem haline gelmiştir (Bousalem vd., 1994; Candresse vd., 1998).

İndikatör bitkilerinin aşılınması yoluyla indekslenmesi, PPV tespiti için yıllar boyunca geleneksel olarak kullanılmıştır. Ancak ELISA'nın bitki virüslerine uygulanması (Clark ve Adams, 1997), çok sayıda örneğin testlenmesini mümkün kılarak teşhiste devrim niteliği kazanmıştır. Bitkilerin PPV açısından rutin olarak test edilmesi için teşhis yöntemlerinin kullanılmasıyla ilgili problemler, virüsün ağaçta düzensiz dağılımı ve translokasyonu ve aktif büyüme dönemi dışında düşük titre olarak bilinmektedir. Ek olarak, antiserumlardan elde edilen poliklonal antikorların kullanımı sıklıkla özgüllük ve dolayısıyla duyarlılık sorunları ortaya çıkarır (Cambra vd., 1994). PPV izolatlarının özgüllüğünü geliştirmek ve farklılaştırmak için farklı monoklonal antikorlar üretilmiştir (Navrati vd., 1992).

Monoklonal antikorlar tarafından tanınan farklı epitoplara karşılık gelen dizilerin lokalizasyonu denenmiştir (Candresse vd., 1998b).

Hastalığın mevcut olmadığı ülkelerdeki virüs kontrolü, bulaşmasını önlemek için karantina önlemlerine dayanmaktadır. Enfeksiyon seviyesinin düşük olduğu ve enfekte ağaçların sınırlı alanlarla sınırlı olduğu ülkelerde, eradikasyon, enfeksiyon düzeyinin düşük tutulmasını ve daha nadiren de hastalığın ortadan kaldırılmasını mümkün kılmıştır. Sharka yayılımını sınırlamak için tasarlanan herhangi bir kontrol planı (karantina prosedürleri, fidanlıklarda üretilen bitkilerin kontrolü, enfekte ağaçların yok edilmesi vs.) büyük ölçekli kullanıma uygun güvenilir tespit yöntemlerine ihtiyaç duymaktadır (Lopez-Moya vd., 2000).

Pribek vd. (2000) tarafından yürütülen bir çalışmada Macar D ve M izolatlarından toplanan kılıf protein genleri RT-PCR ile değerlendirilmiştir. Kesim profilleri, amplikonların virüs ırkına özgü enzimlerle bölünmesiyle ortaya çıkarılmıştır. Analiz, izolatların D ırkından olduğunu göstermiş ve yapılan dizileme çalışmaları, izolatların D ırkından olduğunu göstermiştir.

Dallot vd. (2003) tarafından Fransa'da yürütülen bir çalışmada 4 grup PPV belirlenmiştir. Bunlardan PPV-D ve PPV-M Avrupa'da en sık görülen epidemiyolojik nitelik açısından önemli değişkenlik gösteren iki ana takımı oluşturmaktadır. Bu 2 takım Prunus spp. özellikle yaprak bitlerinin beslenmesi sonucunda türlerin hastalık şiddetine ve şeftali bitkilerini enfekte etme yeteneklerine göre değişiklik gösterdiği rapor edilmiştir.

Kanada'da yürütülen serolojik araştırmalar sırasında elde edilen izolatin PPV-D ırkına ait olduğu belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen dizi verileri PPV-D izolatlarıyla benzerlikler göstermiştir. Bu çalışmanın sonucunda Kanada izolatları iki ayrı alt gruba ayrılmıştır (Rochon vd., 2003).

Cambra vd. (2006) tarafından yürütülen bir başka araştırmada, Fransa'da PPV-M ile enfekte ağaçlara sahip bir şeftali arazisinde yaprak biti vektörleri tarafından PPV'nin bulaşması, 7-10 senelik bir süreçte yeni semptomlar gösteren ağaçlar takip edilerek gözlemlenmiştir. Enfekte ağaçların %69-100'ünün ilk 12 m'de, %79-100'ünün ise ilk 18 m'de olduğu, virüsün yaprak bitleri tarafından 12m-75m uzaklığa kadar yayılabildiği saptanmıştır. İspanya'da yapılan benzer bir çalışma'da PPV-M ırkının doğal inokulum şartlarında 12m uzaklığa kadar yayılabildiğini bildirilmiştir.

Varveri (2006) tarafından yürütülen bir çalışmada, Yunanistan'da yapışkan tuzak yöntemi kullanılarak sahada kayısı ağaçlarında en sık görülen yaprak biti türleri *Aphis gossypii*, *Hyalopterus pruni* olmuş ve bu yaprak biti türlerinin PPV epidemiyolojisinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür.

Zagrai vd. (2008), tarafından yapılan Moldova ve Romanya'da PPV'nin varlığına yönelik araştırmalar sırasında birçok PPV izolatu elde edilmiştir. Serolojik ve moleküler çalışmalardan elde edilen sonuçlar en yaygın grubun PPV-D olduğunu göstermiştir.

Capote vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada toplam 405 Prunus bitkisi üzerinde PPV tarama analizleri yapılmıştır. RNA izolasyonu sonrasında yapılan RT-PCR ve real-time RT-PCR analizlerinin etkinlik süresi karşılaştırılmıştır. Araştırmaları sonucunda RT-PCR'nin PPV tespit duyarlılığının %93,6 olduğunu ve bu yöntemin çok sayıda örnek içeren çalışmalarda hızlı ve pratik olduğunu bildirmişlerdir

Matic vd. (2011), Mısır'dan 16 PPV izolatu toplanmış, serolojik ve moleküler yöntemlerle özellikleri oratya konulmuştur. Yapılmakta olan araştırma sonucunda izolatların tamamının PPV-EA olduğu belirlenmiştir.

Maejima vd. (2011), Moleküler bazlı epidemiyolojik modelleri ortaya çıkarmak için Japonya'daki 37 PPV izolatının tam genom dizileri belirlenmiştir. Hizalama analizi 37 izolatın PPV-D olduğunu belirlemiştir. PPV-D filogenetik analizinde Amerika Birleşik Devletleri, Kanada ve Japonya'dan gelen izolatlar aynı dalda gruplandırılmıştır.

PPV'nin mekanik olarak ve aşılama yoluyla bulaştığını gösterse de, *Prunus* konukçuları, polen veya tohumlar arasındaki temas yoluyla bulaşmadığını belirtilmiştir (Garcia vd., 2014). Hastalığın kısa mesafeli bulaşması yaprak bitleri tarafından etkili bir şekilde gerçekleştirilmektedir (Yalçın, 2014).

Gougherty vd. (2015)'e göre, PPV'nin varlığı 1999 yılında ABD Pensilvanya'da ve 2000 yılında Kanada Ontario'da tespit edilmiştir. 2009 yılında Pensilvanya'da 10 yıllık sürvey ve eradikasyon programının uygulanmasıyla PPV enfeksiyonunun sona erdiği ancak sonrasında PPV enfeksiyonu sayısının tekrar arttığı rapor edilmiştir. Ontario'da ise 2000-2008 yıllarında önemli ölçüde azalmıştır. Sert çekirdekli meyve ağaçlarında PPV sürvey ve kontrol programlarının PPV tespit yöntemlerini ne ölçüde etkilediğinin karşılaştırıldığı bu çalışmada iki programın örnekleme zamanını ve virüs tespit etkinliğini değerlendirecek bir

simülasyon modeli geliştirilmiştir. Bu çalışma, PPV ile enfekte ağaçların tespitinde her iki kontrol programının verimliliği bakımından anlamlı ve karşılaştırılabilir bulgulara ulaşıldığı sonucuna ulaşmıştır.

Nisan 2011 ile Aralık 2012 arasında Japonya'da PPV ile kontamine olmuş bir bahçede yaprak bitlerinin virüsün epidemiyolojisindeki rolünü belirlemek için haftalık olarak 50 yetişkin yaprak bitinin test edildiği bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Yaprak biti sayıları geçen yıla göre farklı olsa da, her iki yılda da tespit edilen 5 baskın tür arasında, tuzaklara en çok bağlanan türün sarmal yaprak biti (*Aphis spiraecola*) olduğu görülmüştür. PPV yayılımlarında etkili olan en sık görülen çeşitler *A. gossypii*, *A. craccivora*, *A. spiraecola* ve *Rhopalosiphum maidis*'tir. Fakat *A. spiraecola*'nın diğer çeşitlere göre daha mühim bir epidemiyolojik rol oynadığı söylenmektedir (Kimura vd., 2016).

Sert çekirdekli meyve ağaçlarının mühim bir hastalığı olan şarka, ilk defa 1910 yılında Makedonya'daki erik ağaçlarında, ardından 1915 yılında Bulgaristan'daki erik ağaçlarında görülmüştür. PPV daha sonra kiraz, kayısı ve şeftalide tespit edilmiştir. 1932-1960 yılları arasında Bulgaristan'dan Çekoslovakya, Yugoslavya, Cezayir, Macaristan, Romanya, Rusya ve Almanya'ya yayıldığı belirlenmiştir. Hastalık Batı Avrupa'da görüldükten sonra Avusturya, Almanya ve Hollanda'da da tespit edilerek hızla yayılım göstermiştir. Fransa, İsviçre, Portekiz, Yunanistan, Belçika, İngiltere, İtalya, Türkiye, İspanya, Mısır, Suriye ve sonunda Kıbrıs'ta tespit edilmiştir. 1990'dan sonra Amerika, Ürdün, Hindistan, Şili ve Kanada'da rapor edilmiştir (Amet, 2021).

Sırbistan'da virüs ve viroid hastalıklarının varlığını araştırmak için 2005'ten 2021'e kadar şeftali ve nektarin ağaçlarını incelemişlerdir. Ana şeftali yetiştirme alanlarındaki ticari meyve bahçelerinden, fidanlıklardan ve ana bloklardan örnekler toplam 482 örnek 12 (PPV, ACSLV, ApMV, PDV, vb) virüsün varlığı açısından test edilmiştir. Virüs/viroid tespit için DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-ELISA) ve moleküler RT-PCR testi kullanarak spesifik primerlerle testlenmişlerdir. Analiz, ticari meyve bahçelerinden alınan test edilen örneklerin %16,2'sinde PPV'nin varlığını doğrulamıştır. Daha sonra moleküler karakterizasyon, pozitif örneklerde PPV-M ve PPV-D ırklarının varlığını ortaya çıkarmışlardır. PLMVd, (*Peach Latent Mosaic Pelamoviroid*) enfeksiyonunun insidansı %5,9 olduğu ve toplanan örnekler arasında başka virüs tespit edilmediğini

ve bu yaptıkları çalışmada, test edilen şeftali örneklerinde virüs ve viroid enfeksiyon oranının çok düşük olduğunu bildirmişlerdir (Jevremović vd., 2022).

1.2. Türkiye’de PPV’nin Durumu ve Tespit Yöntemleri ile ilgili

Çalışmalar

Ülkemizde şarka hastalığının varlığı ilk defa Sahtiyancı (1969) tarafından Edirne ilinde yetiştirilen eriklerde tespit edilmiştir. Daha sonra Kurçman (1973) Ankara erik ağacının kabuğunu *P. persica* GF-305 üzerine aşılıyarak PPV'nin varlığını bildirmiştir. Yürektürk (1984), 1976-1982 yıllarında Marmara bölgesinde ki araştırmasında şeftali, erik ve kayısı ağaçlarında PPV enfeksiyonunun olduğunu gözlenlemiştir.

PPV, ELISA ve ISEM (İmmünosorbent Elektron Mikroskobu) ile PPV virüsün belirtilerini sergileyen kayısı ve şeftali ağaçlarını yaprak ve kabuklarında ELISA aracıyla tespit edilmiştir. Fakat *P.cerasifera* ssp. yapraklarda hafif lekelenme belirtileri sergileyen yaprak örneklerinde rastlanmamıştır. Böylece kayısı, şeftali ve *P. cerasifera*'da ELISA aracıyla PPV tespit edilmiştir. PPV şeftali, *Prunus amygdalo-persica* ve erik (cv's Carska, Cacanska lepotica) ağaçlarında ISEM yöntemiyle tespit edilmiş, belirtiler yaprak ve meyvelerde görülmüştür. Üstelik virüs PPV'nin semptomunu sergilemeyen şeftali GF 305 ve *P.cerasifera* ssp'de de tespit edilmiştir (Polak, 1989).

Ankara'da erik, kayısı ve şeftali ağaçlarının bulunmakta olduğu 10 ev bahçesinde 1995-2002 yıllar arasında PPV üzerine yapılan çalışmada hastalığın çok yaygınlaştığı tespit etmiş ve bu çalışmada DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri kullanılmıştır. Kezanan veriler değerlendirildikten sonra yedi sene içerisinde PPV virüsünün varlığını hastalığın temelinde %85,7-100'den 500m mesafede %25-29,4'e azaldığı tespit edilmiş ve bu çalışmacı bütün PPV izolatlarını tanımlanmış olup PPV-M olarak tespit edilmiş ve Ankara'da PPV'nin tek vektörünün erik yaprak bitinin (*Hyalopterus pruni*) olduğu ilk kez bulunmuştur (Elibüyük, 2003).

Ülkemizin Doğu Akdeniz bölgesindeki sert çekirdekli meyve bahçelerinden elde edilen 3'ü badem olmak üzere 48 yaprak örneğinde ELISA ve RT-PCR testleri kullanılarak 6 virüs varlığı test edilmiştir. Bazı örneklerde PPV tek başına veya karışık enfeksiyonlar olarak bulunmuştur (Sertkaya vd., 2003).

Candresse vd. (2007), tarafından 2006 yılında yapılan bir araştırmada Isparta bölgesinde PPV benzeri belirtiler gösteren bir şeftali ağacı bulunmuştur. Serolojik ve moleküler çalışmalar sonucunda bu izolatin PPV-Rec olduğu belirlenmiştir.

Koç ve Baloğlu, (2006), erik bahçeleri üzerinde gerçekleştiren araştırmada, klorotik lekelerin, meşe yapraklarındaki renk bozuklukları, şekil bozuklukları ve yapraklardaki çizgili açıklıkların PPV-M çeşitleriyle ilişkili olduğunu belirlemek için DAS-ELISA, RT-PCR ve RFLP yöntemlerini kullanarak yaptıkları çalışmada araştırmacılar, PPV'nin Çukurova bölgesinde kaydedilen ilk kayıt olduğunu bildirmektedir.

Ankara'dan toplanan 16 izolatin serolojik ve moleküler özellikleri belirlenmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde çalışma sırasında karışık enfeksiyon durumunda izolatin hem D hem de M'ye özgü monoklonal antikorlarla diğerlerinden farklı reaksiyon gösterdiği gözlemlenmiştir. Kısmi sıralama analizleri sunucunda farklı bir rekombinant türün varlığı belirlenmiştir. Ab-Tk izolatinın tüm genom sekansı keşfedildiğinde yeni bir grubun varlığı da ortaya çıkmıştır. Bu yeni türe PPV-T adı verilmiştir (Ulubaş-Serçe vd., 2009).

2007-2010 yılları arasında sert çekirdekli meyve bahçeleri ve fidanlıklardan toplanan 5762 örnek üzerinde yapılmış olan DAS-ELISA ve RT-PCR analizleri sonucunda Ege Bölgesi'nden 3, İç Anadolu'dan 22, Marmara'dan 128, Akdeniz'de 73 toplamda 226 örneğin PPV için pozitif olduğunu bildirilmiştir (Akbaş vd., 2011).

Gürcan vd. (2013) çalışmalarında Ankara, Kayseri, Aksaray, Nevşehir, Konya ve Yozgat'tan toplanan 120 örneği ELISA ve RT-PCR testleri ile analiz etmişlerdir. Kayseri, Ankara ve Konya'daki erik ve kayısı bahçelerinde PPV enfeksiyonu tespit etmişler, Nevşehir, Aksaray ve Yozgat'ta PPV enfeksiyonu olmadığını bildirmişlerdir. Kayseri'de enfeksiyonlu ağaçlarla aynı lokasyonda bulunan badem ağaçlarında herhangi bir semptom görülmediği bildirilmiş ve dolayısıyla PPV-T enfeksiyonunun genellikle kayısı ve erik ile sınırlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Kaya vd. (2012), tarafından yapılan bir çalışmada hastalığın yayılmasına etkin rol oynayan potansiyel vektörlerin ve vektör adaylarının belirlenmesini amaçlamıştır. Virüsün durumu ELISA ve RT-PCR araçlarıyla düzenli olarak gözlemlenmiştir. En çok yaprak biti popülasyonu Mayıs ayın sonlarında ortaya

Çıkarılmış olup her iki yılda da en yaygın iki vektör olarak *Aphis gossypii* ve *A. spiraecola* belirlenmiştir. Ayrıca *Myzus persicae*, *A. fabae*, *A. gossypii*, *A. spiraecola*, *Hyalopterus pruni*, *Macrosiphon euphorbia* ve *A. craccivora*'nın da PPV taşıdığı tespit edilmiştir. Moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda PPV-M'nin hem kaynak bitkide hem de nakledilen bitkilerde bulunduğu rapor edilmiştir.

İlbağı ve çıtır (2014) tarafından gerçekleştirilen araştırmada Trakya Bölgesi'ndeki badem ağaçlarından alınan 260 yaprak örneğinde PPV varlığı DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleriyle incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda 5 badem ağacında PPV belirlenmiştir. PPV enfeksiyonu taşıyan bu 5 ağaca ait izolatların kısmi nükleotid dizileri Gen Bank'ta kayıtlı 17 farklı badem izolatıyla filogenetik analizle karşılaştırılmıştır. Trakya bölgesinden elde edilen izolatların, dünyadaki diğer badem izolatlarıyla %75,72-%96,87 arasında, Türkiye içerisindeki izolatlarla ise %95,82-%96,61 oranında nükleotid benzerliği taşıdığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu 5 Türk badem izolatının nükleotid ve aminoasit dizilerinin filogenetik sınıflandırmada PPV-T izolatlarıyla aynı grupta yer aldığı , dolayısıyla bu izolatların daha önce belirlenen kayısı izolatlarında olduğu gibi PPV-T ırkına dahil olduğu belirlenmiştir.

PPV'nin Türkiye'deki ırk dağılımı ve genetik çeşitliliğini belirlemeyi amaçlayan çalışmada, daha önce virüsle enfekte olduğu tanınan sahalardan 612 hastalıklı bitki örneği derlenmiştir. 314 pozitif örnek üzerinde serolojik ve moleküler araştırma yapılmış ve birçok farklılık sergileyen P3-6K1 gen alanından 664 nükleotid boyutunda sahip dizi verisi sağlanmışır. PV-D ve PPV-T çoğunlukla sınırlı alanlarda ve şehir merkezlerine yakın bölgelerde bulunurken, PPV-M çoğunlukla ticari bahçelerde bulunmuştur. Bu çalışmada 1 adet izolatın PPV-Rec olduğu belirlenmiştir. PPV-T eşidinin Türkiye'nin şarka havuzundaki en çok görülen ırk olduğu ortaya çıkmıştır (Gürcan ve Ceylan, 2016).

Gürcan (2017) alışmasında Bursa'da tespit edilen PPV ile enfekte örneklerden elde edilen izolatları, Türkiye ve Avrupa'nın diğer bölgelerinden gelen PPV izolatlarıyla karşılaştırılmışır. Bursa ve çevresindeki 50 bahçeden toplanan 118 örnekte DASI-ELISA ve RT-PCR yöntemleriyle testin sonucuna göre, 32 bahçeden toplanan 64 örneğin PPV ile enfekte olduğu belirlenmiştir. Bu örnekler üzerinden, 664 nükleotit uzunluğundaki P3-6K1 alanı ve 969 nükleotit uzunluğundaki CT-3'UTR alanıyla birlikte, GenBank'ta kayıtlı 200 izolatla

karşılaştırılarak dizilenmiş ve incelenmiştir. 30 şeftali bahçesinden alınan 56 izolatın, Türkiye'deki bahçelerde bulunan Avrupa PPV-M izolatlarıyla eşleştiği tespit edilmiştir. Bursa'daki 2 erik bahçesinden elde edilen 8 izolatın PPV-D olduğu belirlenmiş ve bu izolatlar, Türk tipi PPV-D izolatlarıyla aynı filogenetik grupta yer almıştır. Sonuç olarak, Bursa'daki kapalı şeftali bahçelerinin Avrupa tipi PPV-M ile yoğun bir şekilde enfekte olduğu ve bu izolatların, son yıllarda PPV'nin yayılmaya başladığı Aydın, Denizli, Çanakkale, Isparta ve Kayseri illerindeki kapalı bahçelerden alınan izolatlarla yüksek genetik benzerlik gösterdiği ortaya konulmuştur.

DAS-ELISA testi kullanılarak yapılan bir çalışmada, Bursa ilindeki sert çekirdekli meyve bahçelerinde PPV varlığının tespiti amacıyla 166 adet erik, şeftali, nektarin, vişne ve badem ağacı incelenmiş ve PPV yayılma düzeyi %24,1 oranında olduğu ortaya çıkmıştır. İnegöl ilinde %57,1 PPV'nin enfeksiyon oranı görülürken, bu ilçeler sırasıyla %50,0, %27,3, %25,0, %10,0 ve %7,1 ile Orhangazi, Gürsu, Yenişehir, Osmangazi ve Mudanya ilçeleri izlemiştir. PPV'nin enfeksiyonu erikte (%41,7) tespit edilmiş ve bunu nektarin (%40) ve şeftali (%16,5) takip etmiştir. Kiraz ve badem ağaçlarında PPV'ye rastlanmadığı belirtilmiştir (Saydam vd., 2018).

Bazı dayanıklılık genlerini taşıdığı belirlenen çeşitler Şarka hastalığıyla mücadeleye yönelik düzenleme programlarında kullanılmaktadır. Hastalıkların önelenmesi için yeni dayanıklılık kaynaklar telep edilmektedir. Bu çalışmada 227 kayısı genotipi taranmış ve PPV-T'ye dayanıklılık açısından değerlendirilmiştir. 4 çeşidin (Cebir, Lifos, Karum ve Zard) hastalığa karşı direnç gösteren genler taşıdığı rapor edilmiştir. Poodle ve Fracasso'nun da hastalığa dayanıklı olduğunu tespit etmiş fakat bu iki çeşitte direnç genlerinin yokluğunu belirlenmiştir. Bu yeni genetik kaynakların düzenli çalışmaları için yararlı olacağı beklenmektedir (Gürcan vd., 2019b).

PPV-T'nin kökeni, genetik farklılıklar ve evrimsel gelişim üzerine uygulanan çalışmada filogenetik inceleme amacıyla 421 izolatın sınırlı genom dizileri ve 57 izolatın tam genom dizileri tanımlanmıştır. Çalışma, PPV-T ırkı içinde birkaç monofiletik ve bazı durumlarda coğrafi olarak sınırlı grupların varlığı ortaya çıkmıştır. Yeni tanımlanan ve farklı M-İstanbul izolatları dahil edildiğinde, PPV-T çeşitliliğinin (%0,018) PPV D ve Rec ırklarından daha yüksek, ancak M ırkından daha düşük olduğu görülmüştür bu da PPV-T için uzun bir evrim

geçmişine işaret etmektedir. Türkiye'nin Balkanlar'daki Avrupa yakası, PPV'nin ilk tanımlandığı Bulgaristan'a yakınlığı nedeniyle PPV-T izolatlarının muhtemel menşe merkezi gibi görünmektedir (Teber, 2019).

Bugüne kadar İstanbulun Avrupa yakasında PPV-M ırkının kapsamında farklı kategorilerin bulunması belirlenmiş olup, bu çalışmada Avrupa yakasından PPV ile enfekte sert çekirdekli meyve numuneleri bir araya getirilmiş ve PPV-M ırkının genetik farklılıkları araştırılmıştır. Farklı olduğu düşünülen M izolatlarının dizileri alınarak incelenmiştir. 230 sert çekirdek örneğinden 97'sinin enfekte olduğu saptanmıştır. 97 izolattan 88'inin PPV-M içerisinde farklı bir grup oluşturduğu belirlenmiştir. Bu farklı grup filogenetik olarak farklı bir grupta yer almakta ve PPV-MIs olarak adlandırılmıştır (Gürçan, 2019a).

Türkiye'de çeşitli sert çekirdekli konukçulardan PPV'nin moleküler tanımlama çalışmalarından kazanılan dizi bilgileri, patojen ırkının PPV-D olduğunu göstermektedir. Kaynak izolatlarla gerçekleştirilen mukayeseli çalışmada nükleotid benzerlikleri %92,6 ile %99,2 arasında değişmektedir (Çelik, 2020).

Türkiye'den 44 PPV-D izolatının tüm genom dizileri sağlanmıştır. Bulgular Türkiye PPV-D izolatlarının dünya çapındaki diğer PPV-D izolatlarına oldukça benzer olduğunu göstermektedir. Fakat bu çalışmada hint PPV-D izolatlarının çoğunun benzersiz gruplanmalarla yaptığı gözlemlenmiştir. İzolatlardan ikisinin PPV-T ile genetik modifikasyon yapılmış varyantların ürettiği tespit edilmiştir. İzolatların genetik çeşitliliğinin farklı bulgularla benzer düzeyde yüksek olduğu saptanmıştır. Tüm veriler bir arada değerlendirildiğinde ve PPV-D kapsamlı evrimsel geçmişi göz önüne alındığında PPV-D ırkının Türkiye kökenli olabileceği düşüncesine zemin hazırlamaktadır (Gürçan vd., 2020).

Morca vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada 2016-2019 yılları içerisinde Bolu ilinde gerçekleştirilen survey sonucunda 306 numune elde edilmiştir. PPV varlığının tespiti amacıyla örnekler öncelikle DAS-ELISA testiyle değerlendirilmiş ve yalnızca 3 şeftali örneğinin PPV ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Enfekte olmuş numuneler sonrasında P1/P2 primerleri aracılığıyla RT-PCR ile uygulanmış ve DAS-ELISA sonuçları teyit edilmiştir. Ek olarak, PPV'ye özel spesifik primerler kullanılarak ırk düzeyinde tanı konulmuştur. Bu ırk düzeyindeki teşhisler kapsamında numunenin PPV-M ırkıyla enfekte olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen PPV izolatı Bolu ilinden alınan ilk kayıttır. Bulgular, Bolu ilinde daha kapsamlı bir

araştırma yapılması ve tüm genom dizileri elde edilerek izolatların genetik çeşitliliğinin belirlenmesi gerektiğini düşündürmektedir. Enfekte olan tüm ağaçlar yok edilmiştir.

Morca vd. (2021), tarafından 2016-2019 yılları içerisinde Burdur ilinde PPV varlığının saptanmasına yönelik 47 adet sert çekirdekli meyve yaprağı örneği DAS-ELISA testi ile incelenmiş ve 2 adet şeftali örneğinin PPV ile enfekte olduğu tespit edilmiştir. PPV kılıf proteini bölgesinin 767 nükleotidlik bir bölgesini çoğaltmak için dejenere primer çiftleri tasarlanmıştır. RT-PCR ve yeni primerlerle yapılan dizi analizi ile bulunan diziler GenBank'a kaydedilmiştir. BLATn analiz sonuçları Burdur PPV izolatının PPV-M ırkı ile en yüksek benzerliğe (%99,86-%98,49) sahip olduğunu göstermiştir. Çalışma sonucunda enfekte ağaçlar imha edilerek 1 km çapında tampon bölge oluşturuldu ve incelemeler devam ederken *Prunus* türlerinin ekiminin 3 yıl süreyle yasaklanmasına karar verilmiştir.

Teber vd. (2023) tarafından yapılan bir çalışmada Türkiye'nin farklı bölgelerinden 69 PPV-M izolatının genomları dizilenmiştir. Bu yeni neredeyse tam uzunluğa sahip genom dizileri, daha önce bildirilen 21 PPV-MIs benzeri Türk dizileri ve Arnavut izolatlarından 4 dizi dahil olmak üzere küresel olarak toplanan diğer PPV-M izolatlarından 50 diziyle birlikte analiz edilmiştir. Tüm yeni PPV-M genom dizilerinde ana genomik özellikler korunmuş en büyük farklılıklar PIPO, P1 ve CP proteinlerinde tespit edilmiştir. Türk PPV-M izolatları yüksek genetik çeşitlilik sergiler ve biri yalnızca PPV-MIs izolatlarından oluşan ve ikinci sınıf daha önce açıklanan PPV-Ma ve PPV-Mb alt sınıflarından oluşan iki benzer sınıfa ayrılmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda, neredeyse Türkiye'ye özgü görünen PPV-MI'nın orijinal dağılımı ve PPV-MI ile diğer Türk PPV-M izolatlarının yüksek genetik çeşitliliği, M izolatlarının Türkiye'deki uzun bir evrimsel geçmişine işaret etmektedir ve PPV-M'nin Türkiye'ye has olacak şekilde ve bir çeşitlilik merkezi olarak konumlandığını belirtilmektedir.

Akbaş vd., (2023) tarafından yapılan bir çalışmada badem (*P. dulcis*) ve vişne (*P. ceracus*) izolatları da dahil olmak üzere beş farklı *Prunus* türünden elde edilen PPV-T ırkı izolatlarının tüm genomu, bu çalışmada tasarlanan primer çiftleri kullanılarak tam olarak dizilenmiştir. Beş izolat, GenBank'ta tam genom dizileri bulunan diğer 50 PPV-T izolatı ile hizalana ve daha sonra filogenetik ve çeşitlilik analizlerine tabi tutulmuştur. Rekombinasyon analizi, daha önceki bir çalışmada rapor edilen dört rekombinant izolatın doğrulanmasına karşın, yeni dizilenen beş

izolatla anlamlı bir sinyal tespit edilmediğini göstermiştir. Nükleotid ve amino asit filogenetik ağaçları, test edilen izolatları üç ana gruba ayırlış Balkan 1, 2 ve 3. T ırkı izolatları, aralarında yüksek nükleotid ve amino asit kimliklerini paylaşıyormuştur. Çeşitlilik analizi farklı parametreler uygulayarak P3 ve 6K1 gen dizilerinin diğer genlere göre daha fazla korunduğunu bulmuştur. Buna uygun olarak, oldukça değişken olan P1 ve CP genlerinin, diğer genlere göre sırasıyla $\omega=0.127$ ve 0.219 gibi daha zayıf saflaştırma basınçlarına maruz kaldığı bulundurmumuştur. Üç nötralite testi tüm genlere negatif değerler verilmiş bu da T ırkı popölasyonlarının genişleyen veya darboğaz seımlerine sahip olduğunu gösterilmiştir. Bilinen tek vişne izolatının genetik yapısı, diğer *Prunus* türlerinden elde edilen izolatlarla oldukça aynıymış ve bu nedenle bu çalışma, yeni konakçılardaki T ırkı çeşitliliğine ilişkin bilgilerimizi güncellemiş ve genetik çeşitlilik ile konakçı ilişkilerinin net bir resmini sunmuştur.

1.3. LAMP Yöntemi ve Bitki Patolojisinden Uygulama Örneklere

Buğday sarı mozaik virüsünün (*Wheat yellow mosaic virus*; WYMV) tespiti için bir RT-LAMP yöntemi oluşturulmuştur. RT-LAMP testi için reaksiyon koşullarını optimize etmek amacıyla Primer Explorer yazılımı kullanılarak dört primer seti tasarlanmıştır; RT-LAMP dört primer seti kullanılarak farklı zamanlarda gerçeleştirilmiştir. Agaroz jel elektroforezi, WYMV'nin primer seti 3 ile 30 dakika sonra ve diğer 3 primer seti ile 45 dakika sonra tespit edildiğini göstermiştir. Özgüllük sonuçları, testin WYMV'yi spesifik olarak çoğaltabildiğini ve hassasiyet karşılaştırması RT-LAMP'nin RT-PCR'dan 100 kat daha hassas olduğunu göstermiştir. Genel olarak, RT-LAMP yönteminin WYMV tespiti için basit, spesifik, hassas, kullanışlı ve zaman kazandıran bir yöntem olduğu görölmüştür (Zhang vd., 2011).

Li vd. (2013), tarafından yapılan bir araştırmada LAMP testinin saha örneklerinde uygulanabilirliğini göstermek için, yöntem Foc ırk 4 ile enfekte olmuş bitkiler üzerinde değerlendirilmiştir. Dört enfekte örneğin tümü LAMP ile Foc ırk 4 pozitif çıkarken, sağlıklı muz yumrularının hiçbirinde bant görölmemiştir. Bu gözlemler ayrıca görsel incelemeye dayalı olarak LAMP testi sonuçlarının jel elektroforezinden sonraki sonuçlarla ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, farklı tarlalardan toplanan 34 muzdan 34'ünde (26 enfekte muz ve 8 sağlıklı ancak

patojenle enfekte) LAMP yöntemi ile Foc ırk 4 tespit edilmiştir. Bu çalışmada toplanan örnekler için LAMP tespit oranı 34/34'tür (%100).

Endonezya'nın çeşitli bölgelerindeki pirinç tarlalarında tungro virüsünün (*Rice Tungro Tasiform Virus*; RTBV) rutin olarak izlenmesi, hastalık kontrol stratejisinin önemli bir parçası olarak gereklidir. Bu çalışmada, Tungro virüsü için bir tespit yaklaşımı olarak LAMP yöntemini geliştirmek için bir araştırma yürütülmüştür. Garut (Batı Java), Sidrap (Güney Sulawesi) ve Pesisir Selatan'dan (Batı Sumatra) tungro virüsü ile enfekte olmuş pirinç yaprağı örnekleri toplanmıştır. Tungro virüsünün spesifik nükleotid parçaları, geleneksel PCR ve LAMP-PCR ile başarıyla çoğaltılmıştır. LAMP'in duyarlılığı, geleneksel PCR'ninkinden daha yüksek olarak belirlenmiştir. LAMP kullanılarak RTBV tespiti için daha iyi sonuçlar, 63°C'de 60 dakika boyunca örnek inkübasyon koşulu ve 80°C'de 10 dakika boyunca sonlandırma reaksiyonu ile elde edilmiştir. (fu, vd., 2021).

Pepper chat fruit viroid (PCFVd), ciddi kayıplara neden olan, verimliliği, meyve kalitesini ve hatta uluslararası tohum ticaretini etkileyen en önemli domates ve biber hastalıklarından biridir. Bu çalışmada, altı primer setine dayanan PCFVd'ye özgü bir RT-LAMP tespit testi geliştirilmiş, optimize edilmiş koşullar altında, PCFVd 15 dakika içinde tespit edilebilmiştir. PCFVd'yi tespit etme duyarlılığı, prob tabanlı bir qRT-PCR ile neredeyse aynı ve mevcut RT-PCR yöntemlerinden 10-100 kat daha yüksek bulunmuştur (Tangkanchanapas vd., 2018).

Jeevalatha vd. (2018) tarafından domates sarı yaprak kıvrılması virüsü (*Tomato yellow leaf curl virus*; TYLCV) içeren DNA, enfekte domates bitkilerinin ve tek tek beyaz sineklerin toplam DNA özütlerinden LAMP ile tespit edilmiş ve çoğaltılmış ve sonuçlar, reaksiyonda beyaz bir çökeltinin oluşumunu gözlemleyerek basitçe değerlendirilmiştir. Virüs, LAMP ile kolayca tespit edilmiştir. Bir çift halka primerinin eklenmesiyle genişletilmiş olan LAMP yöntemi ile Domates yaprak kıvrılması Delhi virüsü (*Tomato Leaf Curl New Delhi Virus*; ToLCNDV) tespitinin, toplam DNA'da 0,002 pg'a kadar virüs tespit ettiği ve LAMP deneyinin PCR sonuçları kadar hassas olduğu bulunmuştur.

Potato yellow mosaic Panama virus (PYMPV), Domates yaprak kıvrılması Sinaloa virüsü (ToLCSiV) ve *Begomovirus* cinsinin (Geminiviridae familyası) Domates sarı beneklilik virüsü (TYMoV), Panama'da domatesi (*Solanum lycopersicum L.*) enfekte ettiği tespit edilen üç begomovirüs türüdür. Bu üç

begomovirüs türünün her biri için özgül üç primer çifti seti kullanılarak ayrı ayrı tespiti için LAMP testi geliştirilmiştir. Amplifikasyon ürünleri, jel elektroforezi veya reaksiyon tüpüne DNA'nın doğrudan Jel-Kırmızı boyanmasıyla görselleştirilmiştir. Panama'nın farklı üretim bölgelerinden toplanan enfekte domates bitkilerinin yaprak, gövde, çiçek, meyve ve kök gibi farklı bitki dokularından elde edilen toplam DNA içerisinde PYMPV, ToLCSiV ve TYMoV tespit edilmiştir. LAMP duyarlılığı geleneksel PCR'a yakın olmakla birlikte daha hızlı ve düşük maliyetli bulunmuştur. Dahası, üç virüs de enfekte domates bitkilerinin yaprak dokularından elde edilen özsu özütlerinden geleneksel PCR ile değil LAMP ile başarılı bir şekilde tespit edilmiştir (Herrera vd., 2018).

104 taze yaprakta üç begomo virüsün tespiti için yapılan bir saha araştırması sırasında yürütülen LAMP analizleri, örneklerin çoğunun pozitif olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, begomo virüsün evrensel primerleri kullanılarak yaygın bir tespit yöntemi olarak PCR ile doğrulanmıştır. Bu sonuçlar, florometre taşınabilir bir cihaz kullanılarak yapılan bu basit ve hızlı LAMP analizinin, saha koşullarında begomo virüslerin gerçek zamanlı tespiti için kullanılabileceğini göstermektedir (Wilisiani vd., 2019).

Dahlia mozaik virus (DMV), *Caulimoviridae* familyasındaki yaprak biti ile taşınan bir caulimovirus olup, *dahlia*'nın (*Dahlia variabilis*) önemli bir patojenidir. DMV'nin gözetimi ve yönetiminde hızlı ve hassas tanı araçlarının geliştirilmesi esastır. DMV tespiti için bir LAMP testi geliştirilmiştir. LAMP testi, DMV genomunun ters transkriptaz bölgesini hedef alır ve 60°C'lik bir sıcaklık ve 60 dakikalık bir çalışma süresinde optimumdur ve amplifikasyon floresan tespiti ve agar jel elektroforezi ile tespit edilmiştir. Test, DMV'yi 10^{-3} ng kadar düşük DNA konsantrasyonunda tespit etmiştir. Bu test, DMV'nin hızlı ve hassas bir şekilde tespit edilmesinde ve virüssüz dikim materyali üretimi yoluyla virüs insidansının azaltılmasında faydalı olacağı ifade edilmiştir (Iftikhar vd., 2020).

Lee ve Jeong, (2020), araştırmalarında RT-LAMP primerlerinin PLMVd için özgüllüğü, ACLSV ve PNRSV ile enfekte şeftali yapraklarından elde edilen toplam RNA ve negatif kontrol olarak sağlıklı şeftali yapraklarından elde edilen RNA kullanılarak incelenmiştir. Optimize edilmiş reaksiyon koşullarının duyarlılığı, PLMVd ile enfekte şeftali yapraklarından elde edilen RNA'nın 10 kat seri seyreltmeleri (100 ila 10^{-7}) kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu deneylerle üretilen RT-LAMP ürünleri, %2 agar jellerinde elektroforez kullanılarak analiz edilmiş ve

60°C, 63°C ve 66°C'de, 60 dakikalık inkübasyon nispeten yüksek ampikon konsantrasyonları üretti ve ürünler hem görsel renk değişimleri (SYBR Green I) hem de merdiven benzeri desenler üretti. Bant şekli ve yoğunluğuna göre, 63°C optimum reaksiyon sıcaklığı olarak seçilerek reaksiyon optimize edilmiştir.

Çelik ve Ertunç, (2021) tarafından yapılan çalışmalarında Varga ve James'in ters transkripsiyon Loop aracılı izotermal amplifikasyon (RT-LAMP) testi, Türkiye'deki PPV-T izolatlarının hızlı tespiti için uyarlanmış ve RT-LAMP testi, yaygın olarak *Prunus spp.*'yi enfekte eden diğer virüslerle çapraz reaksiyon göstermemiştir veya PPV-T'nin doğal konakçıları deney izotermal koşullar altında (60 °C) bir su banyosu yardımıyla 35 dakikada tamamlanabilmiştir.

(*Telosma mozaic virus*; TeMV), son yıllarda passion fruit'de bildirilen yaygın bir virüstür ve çok yüksek bir enfeksiyon oranına sahiptir. Guizhou Eyaletindeki passion fruit'in TeMV taşıdığı gerçeğini araştırmak amacıyla, TeMV'yi etkili bir şekilde tespit edebilen RT-LAMP yöntemi geliştirildi. TeMV korunaklı CP geninin nükleotid dizisine dayanarak, altı set primer tasarlanmış ve reaksiyon gerçek zamanlı türbidimetre ile taranmıştır. Optimize edilmiş RT-LAMP, TeMV için yüksek derecede özgüllük göstermiş ve duyarlılığı geleneksel RT-PCR'den 100 kat daha yüksek bulunmuştur. (Fu, vd., 2021).

Yapılan bir çalışmada RT-PCR ve RT-LAMP kullanarak solanaceous bitkilerinde altı viroidin tespitinde kullanılabilecek evrensel primerleri tasarlamak ve başarılı bir tespit protokolü geliştirmek amaçlanmıştır. Sonuçlar, bir çift dejenerat primerin, Solanaceae tohumlarından ve bitkilerinden altı *pospiviroidaein* çoğaltılması için tek adımlı bir RT-PCR'de kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Dahası, altı *pospiviroidaein* çoğaltılması için beş primer tasarlanmış ve RT-LAMP'de kullanılmıştır. Başarılı bir tespit için gereken minimum viroid RNA konsantrasyonu, viroid türüne ve tespit yöntemine bağlı olarak 1 fg ile 10 ng arasında değişiklik göstermiştir (Tseng vd., 2021).

Kolorimetrik ve real-time (cr-LAMP) analizleri, Buğday cücelik virüsünün (WDV) genomik DNA'sının kılıf protein bölgesini hedef alarak geliştirilmiştir. Pozitif LAMP reaksiyonunun çıplak gözle gözlemlenmesi için, NEB'den (New England Biolabs) WarmStart 2X Master Mix kullanılmış, burada pembe renkten sarımsı renge dönüşen renk değişimi pozitif bir sonucu göstermiştir. Amplifikasyon, bir tablete veya akıllı telefona bluetooth aracılığıyla bağlanmayla sağlayan akıllı-DART platformu (Diagenetix Inc, ABD) tarafından gerçek zamanlı

olarak izlenmiştir. LAMP analizinin tespit hassasiyeti, cr-LAMP reaksiyon koşullarının optimizasyonundan sonra geleneksel PCR'den 100 kat daha hassas olarak belirlenmiştir (Çelik ve Morca, 2021).

Yapılan bir başka çalışmada çalışmada, *Maize yellow mosaic virus* (MaYMV)'yi tespit etmek için RT-LAMP testi geliştirilmiştir. Test için betain, Mg^{2+} ve dNTP'lerin optimum konsantrasyonları sırasıyla 0 M, 1,4 mM ve 6 mM olarak belirlenmiş ve optimum reaksiyon süresi 50 dakika olarak tespit edilmiştir. (Li, vd., 2022).

Yürütülen bir başka çalışmada RT-LAMP ile ToCV ve TICV için hızlı bir tespit yöntemi oluşturmuşlar ilk olarak ToCV ve TICV'ye özgü RT-LAMP için primer setleri tasarlamış daha sonra, optimum primer setini seçerek ve RT-LAMP reaksiyonu için optimum koşulları belirleyerek, her virüs, bir domates yaprağının hastalıklı bölgesini bir kürdanla delerek, kürdanı reaksiyon çözeltisine daldırarak ve RT-LAMP reaksiyonunu gerçekleştirerek 50 dakika içinde tespit edilmiştir. İşlemin doğruluğunu doğrulamak amacıyla Endonezya'nın beş bölgesinden hastalık belirtileri gösteren 61 domates yaprağı örneği toplanmış ve örnekler için RT-LAMP sonuçları, yaygın olarak kullanılan RT-PCR ile elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak bulunmuştur (Kobayashi, vd., 2023).

Colletotrichum gloeosporioides fungusunun neden olduğu antraknoz, meyve ve sebzelerin hasat sonrası çürümesinin başlıca nedenlerinden biridir. Bu çalışmada, *C. gloeosporioides* transkript *enoyl-CoA hidrataz* (ECH) genini hedef alan *C. gloeosporioides*'in hızlı tespiti için LAMP testi geliştirilmiştir. Test, LAMP ürünlerinin pembe renkten sarıya dönüşmesine dayanarak 23 dakika içinde *C. gloeosporioides* nükleik asitinin çıplak gözle tespit edilmesini sağlamıştır (Kaur vd., 2023).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Virüs Kaynağı

Bu çalışmada kullanılan virüs izolatları BAİBÜ Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Viroloji Labratorvarın'da -20 °C'de muhafaza edilen PPV-M, PPV-T ve PPV-D ile enfekteli şeftali bitki kısımlarından oluşmaktadır. İzolatlar ve ırk çeşitliliği Çelik (2020) tarafından doğrulanmıştır.

2.2. RNA İzolasyonu

Bu çalışmada toplamda 6 (her bir ırktan 2'ser adet) enfekteli şeftali yaprağı, çarpraz reaksiyon ve özgüllük testlerinde kullanılmak üzere PPV'nin yaygın konukçuları arasında yer alan erik, şeftali, kayısı ve bademe ait bitki dokuları DNA izolasyonuna alınmıştır.

PPV'nin her üç ırkı ile enfekteli bitki dokularından ve yaygın konukçulardan RNA izole etmek için Nucleozol RNA izolasyon solüsyonu (Macherey-Nagel, Germany) kullanılmıştır. RNA izolasyonu ilgili firmanın talimatları çerçevesinde aşağıdaki sıra halinde verilen işlemler uygulanarak oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

1. Yaprak örnekleri sıvı nitrojen içerisinde havanda toz haline gelinceye kadar ezilmiş ve ezilen yaprak dokusundan 100 mg 2 mL'lik santrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.
2. Tüpteki doku örneklerine 500 µL RNA izolasyon solüsyonu eklenerek üzerine 200 µL distile su ilave edilerek iyice karıştırılmıştır.
3. Numuneleri içeren tüpler oda sıcaklığında 5 dakika tutulmuş, ardından santrifüj içerisinde 12.000 g'de en az 15 dk santrifüj edilmiştir.
4. Üst sıvıdan 500 µL 1,5 mL'lik Eppendorf tüplere alınarak üzerine eşit hacimde soğuk isopropanol ilave edilmiştir. Örnekler hafifçe çalkalanarak 12.000 g'de 10 dk tekrar santrifüje bırakılmıştır.
5. Santrifüj sonrasında üst sıvı dökülmüş ve 200 µL %70'lik ethanol ile 3 kez yıkılarak 8000 g 'de 3'er dakika santrifüj edilmiştir.
6. Santrifüjlemeden sonra, örnekler kurumaya bırakılmadan 100 µL ddH₂O içerisinde çözülerek vorteks ile hafifçe karıştırılmıştır.
7. Elde edilen total RNA'lar konsatrasyonları Denovix Ds-11 FX Nanospektrofotometre cihazı ile 260/280 ve 260/230 nm dalga boylarındaki

absorbans oranları yardımıyla ölçülerek *DNase* I uygulaması için -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

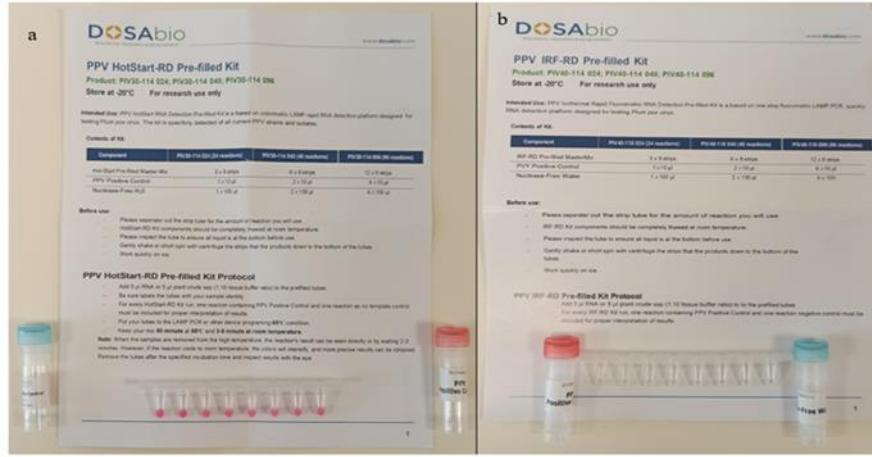
2.3. *DNase* 1 Uygulaması

Elde edilen toplam RNA’lardan genomik DNA’nın uzaklaştırılması işleminde aşağıdaki sıra izlenmiştir:

1. *DNase* 1 uygulaması, Thermo Fischer Scientific (Katalog numarası: EN0525) *DNase* I kullanılarak ilgili firmanın talimatları üzerinden hacimsel modifikasyon sonucunda 2000 ng/ μ L (final) total RNA kullanılarak gerçekleştirilmiştir.
2. Son hacim 15 μ L olacak şekilde, 2000 ng / μ L RNA, 2 μ L reaksiyon buffer (10x), 2 μ L *DNase* I ve ddH₂O (15 μ L’ye tamamlanmıştır) olacak şekilde hazırlanmıştır.
3. Hazırlanan karışım (miniPCRBio,USA) mini 16’da 37 °C’de 30 dk inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon akabinde final hacim 5 mM olacak şekilde 1,5 μ L EDTA eklenerek 65 °C’de 10 dk süre ile inkübe edilerek reaksiyon tamamlanmıştır.
5. Reaksiyon sonrası örneklerin konsantrasyonları 10 ng/ μ L olacak şekilde ayarlanarak -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

2.4. PPV’nin İzotermal Tanısı için Kullanılan Kitleri

Bu çalışmada DOSA Bilgi ve Bilim Teknolojileri Biological Development & Research tarafından geliştirilen ve PPV’nin ülkemizde yaygın olarak bulunan 3 ırkı için tek tüpte kolorimetrik ve gerçek zamanlı izotermal amplifikasyonuna olanak tanıyan tespit kitleri PPV tanısı için kullanılmıştır. Kullanıma hazır kitlerin görselleri Şekil 1’de sunulmuştur. Kullanılan tanı kiti muadillerinden farklı olarak bünyesinde PPV tanısı için kılıf protein bölgesine yönelik özel olarak tasarlanmış primer serilerini de bulundurmaktadır. Doğrudan virüs RNA’sı reaksiyona alınmak suretiyle RT-LAMP testi uygulanabilmekte ve sonuçları çıplak gözle ve gerçek zamanlı olarak değerlendirilebilmektedir.



Şekil 2.1. Çalışmada test edilen DOSA Bilgi ve Bilim Teknolojileri Biological Development & Research tarafından geliştirilen kullanıma hazır izotermal tanı kitleri- (a. Kolorimetrik, b. Gerçek zamanlı).

2.5. İzotermal Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Reaksiyonun sonuçlarının değerlendirilmesinde 3 farklı yöntem kullanılmıştır:

1. İlk olarak amplifikasyon ürünlerini gözlemlemek için pozitif sonuçta kitin olarak tanıdığı pembeden sarıya olan renk değişimlerinin çıplak gözle değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir.
2. Kullanılan diğer değerlendirme yöntemi agaroz jel elektroforezi işlemidir. Bu amaçla Gallitelli ve Minafra (1994) 'ün yöntemine göre, 100 mL TAE içinde 1,5 gr agaroz mikrodalga fırında tamamen çözülene kadar ısıtılmıştır. Yaklaşık 50 °C'ye soğutulduktan sonra jel karışımı, bir jel kutusuna (CBS Scientific) boşaltılarak ve katılaşma beklenmiştir. Katılaşmış jel, 1X konsantrasyonlu TAE tamponu içeren bir elektroforez tankına yerleştirilmiştir. 5 µL LAMP ürününü 6X yükleme boyası (Thermo Fischer Scientific,™, R0611) eklenerek ve kuyucuklara yüklenmiştir. Daha sonra ürün 120 V'de 45 dakika elektroforez yapılmış ve jel etidyum bromür (0.5 µg/mL) içerisinde boyanarak ve görüntüleme için bir jel görüntüleme cihazında (G-Box; Syngene, Cambridge, UK) analiz edilmiştir.
3. Gerçek zamanlı kitin çalışma prensibine göre amplifikasyon eğrilerinin oluşumu ve oluşma süresi 65 °C'de 60 dk süre ile ve 1 dk aralıkla okuma komutu verilen real-time PCR (LightCycler® 480; Roche, Basel, İsviçre) üzerinde gözlenmiştir.

2.6. Başlangıç Reaksiyonu

Geliştirici firmanın talimatları çerçevesinde PPV-D izolatına ait RNA ile kit tarafından temin edilen negatif ve pozitif kontroller 65 °C inkübasyon sıcaklığında ve 60 dk süre ile kolorimetrik ve gerçek zamanlı reaksiyona alınmıştır. Renk değişiminin çıplak gözle görülmesi, agaroz jel elektroforezi ve amplifikasyon doyum eğrisinin gerçek zamanlı oluşumunun gözlenmesi ile reaksiyon sonucu değerlendirilmiştir.

2.7. İzotermal Tanı Kitlerinin Spesifiklik, Duyarlılık ve Yaygın Irklarda Tespit Performansı

LAMP primerlerinin spesifikliğini belirlemek için, PPV-D RNA'sına ek olarak, PPV'nin doğal konukçuları olan şeftali, erik, kayısı ve badem DNA'ları çapraz reaksiyonun varlığı açısından test edilmiştir.

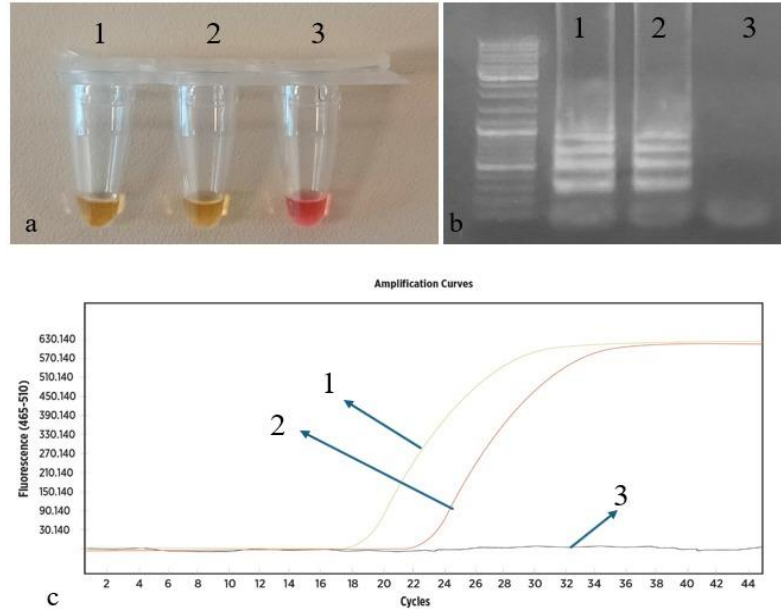
Minimum çoğalabilen nükleik asit miktarının tespiti amacıyla RNA izolasyonundan elde edilen PPV-D RNA'sı duyarlılık çalışmalarında kullanılmıştır. Bu amaçla 10 ng/μL konsantrasyondan başlayarak 6 farklı dilüsyon serisi elde edilmiştir. Elde edilen dilüsyon serileri hem kolorimetrik hem de gerçek zamanlı reaksiyonlarda kullanılmak suretiyle kitlerin hassasiyeti araştırılmıştır. Her iki kitle de amplifiye olan minimum nükleik asit miktarı yaklaşık olarak belirlenmiştir. Reaksiyon sonuçları çıplak gözle ve real-time PCR cihazında gözlemlenerek değerlendirilmiştir.

Buna ilaveten Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarı izolat havuzundan seçilen ve PPV-D, M ve T ırkları ile bulaşık olduğu bilinen örnekler iki tekerrürlü olacak şekilde tespit performans reaksiyonlarına alınmıştır.

3. BULGULAR

3.1. RT-LAMP Başlangıç Test Bulguları

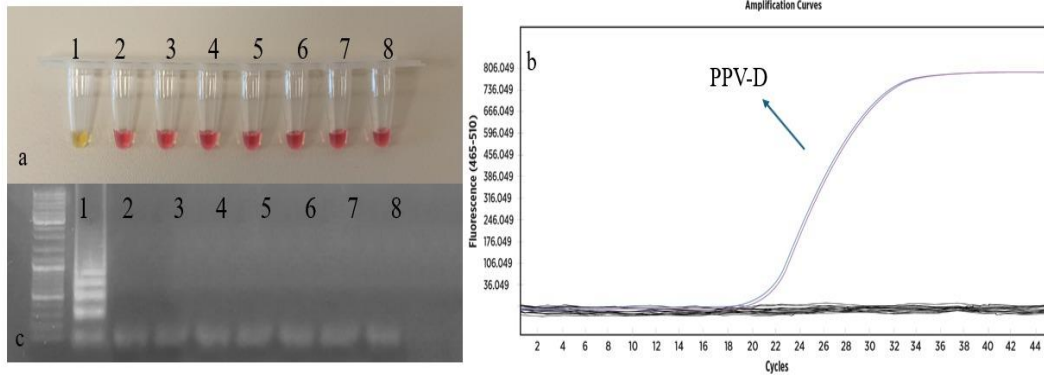
Başlangıç reaksiyonu için 10 ng/μL PPV-D RNA'sı kullanılmış, kit tarafından temin edilen pozitif ve negatif kontroller hem kolorimetrik hem de gerçek zamanlı RT-LAMP reaksiyonlarına dahil edilmiştir. Başlangıç reaksiyonu sonucunda yaklaşık 55 dk süre sonunda temin edilen kitin pozitif kontrolünde, 60 dk sonunda ise PPV-D RNA'sının yer aldığı tüpte pembeden sarıya renk değişimi olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.1a). Ayrıca pozitif amplifikasyonu doğrulayan merdiven benzeri bant görüntüsü oluşumu agaroz jel elektroforezi ile doğrulanmıştır (Şekil 3.1b). Buna ilaveten başlangıç reaksiyonu bulgularına göre gerçek zamanlı RT-LAMP sonucunda ise pozitif amplifikasyonu işaret eden doyum eğrileri yaklaşık 20. dakikada kiti tarafından temin edilen pozitif kontrolde ve 22. dakikada ise PPV-D ile enfekteli örnekte doyum eğrilerinin oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 3.1c). Bu bulgulara göre kolorimetrik test kitinin 60 dk'da renk değişimini mümkün kıldığı, gerçek zamanlı test kitinin ise 22 dk süre sonucunda PPV-D ile bulaşık örnekte amplifikasyona olanak tanıdığı sonucuna ulaşılmaktadır.



Şekil 3.1. Başlangıç LAMP reaksiyonu bulguları. a. 65 °C' de 60 dk inkubasyon süresi ile başlangıç reaksiyonu sonucunda kolorimetrik teste yönelik görsel değerlendirme b. Agaroz jel elektroforezi görüntüsü ve pozitif örneklerde merdiven benzeri bantlaşma c. Gerçek zamanlı RT-LAMP sonucunda 20 ve 22. dakikada amplifikasyona işaret eden doyum eğrileri (1; kit pozitif kontrol, 2; PPV-D RNA'sı, 3. kit negatif kontrol).

3.2. RT-LAMP Tanı Kitlerinin Spesifiklik ve Duyarlılık Analiz Sonuçları

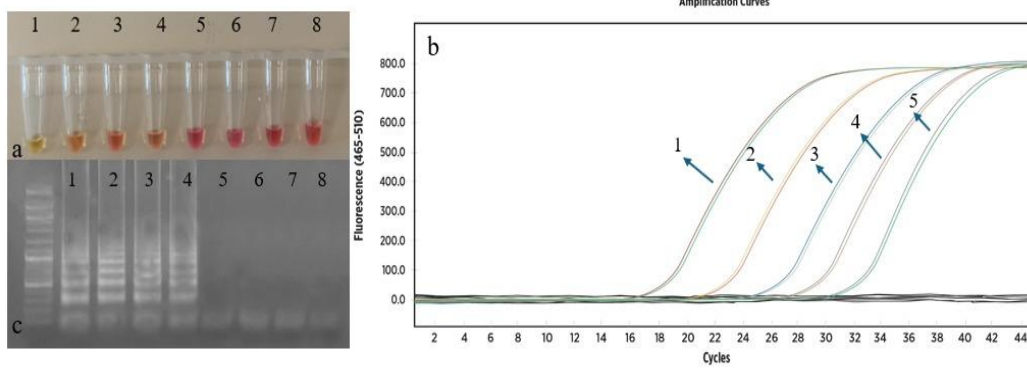
Kullanılan izotermal tanı kitlerinin spesifikliğinin test edilmesi amacıyla PPV-D ile enfekteli örneğe ilaveten, şeftali, erik kayısı, badem DNA'sı ile birlikte PDV ve PNRSV RNA'ları da 65 °C de 60 dk'lık reaksiyona alınmıştır. İnkubasyon süresinin sonunda PPV-D RNA'sının yer aldığı tüp dışında herhangi bir renk değişimi oluşmamış (Şekil 3.2a), ayrıca gerçek zamanlı RT-LAMP ile de sonuçların örtüştüğü görülmüş ve PPV-D dışında herhangi bir doyum eğrisine rastlanılmamıştır (Şekil 3.2b). Ayrıca istenmeyen amplifikasyona yönelik herhangi bir bantlaşma görülmemiştir (Şekil 3.2c). Bu bulgulara göre geliştirilen test kitlerinin PPV amplifikasyonu için oldukça spesifik başarılı olduğu ve herhangi bir çapraz reaksiyon göstermediği sonucuna ulaşılmaktadır.



Şekil 3.2. Geliştirilen kitlerin spesifiklik analizleri. a. 60 dk'lık reaksiyon sonucunda PPV-D RNA'sının yer aldığı 1 no'lu tüpte gözlenen renk değişimi, b. Gerçek zamanlı LAMP ile PPV-D ile enfekteli 1 no'lu örnekte görülen amplifikasyona yönelik doyum eğrisi, c. Amplifikasyonları doğrulayan agaroz jel elektroforezi görüntüleri (2; şeftali DNA, 3; erik DNA, 3; kayısı DNA, 4; badem DNA, 5; PNRSV RNA, 6; PDV RNA, 7; Kit negatif kontrol, 8; Su kontrol. Gerçek zamanlı RT-LAMP testi 2 tekerrürlü yürütülmüştür).

Geliştirilen tanı kitlerinin tespit düzeylerinin belirlenebilmesi amacıyla oluşturulmuş ve 10^{-10} ng/ μ L aralığında ayarlanan seyreltme serilerinin reaksiyona alınması ile kolorimetrik reaksiyon sonucunda 10^{-4} ng/ μ L PPV RNA'sının başarılı bir şekilde amplifiye edilebildiği görülürken (Şekil 3.3a), gerçek zamanlı RT-LAMP testinde ise 10^{-5} ng/ μ L yoğunluğunda kullanılan örnekte bir amplifikasyon oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 3.3b). Ancak kullanılan RNA miktarı düştükçe özellikle gerçek zamanlı kitin doyum eğrilerinin daha geç oluştuğu görülmüştür. Ayrıca istenmeyen amplifikasyona yönelik herhangi bir bantlaşma görülmemiştir (Şekil 3.3c). Buna ilaveten

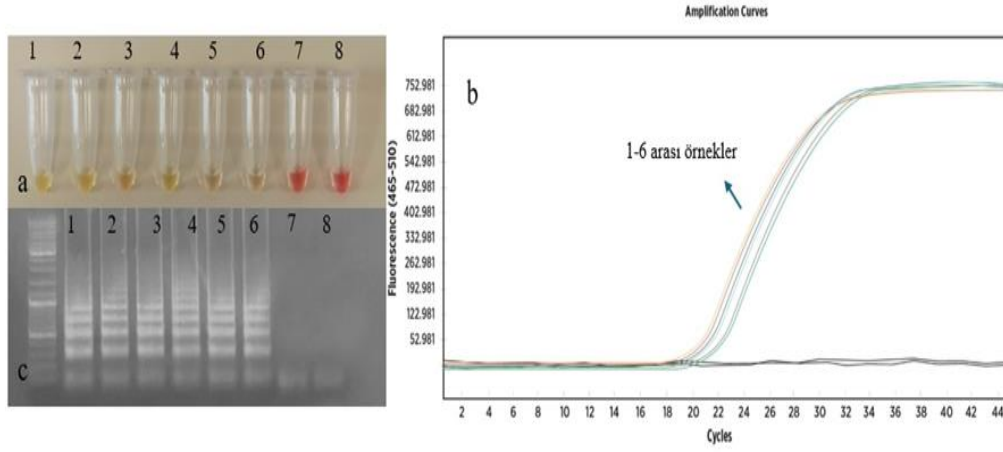
kolorimetrik reaksiyon bulgularındaki renk değişiminin RNA yoğunluğu düştükçe daha zor ayırt edilebildiği gözlenmiştir. Bu bulgulara göre kullanılan tanı kitlerinin 10^{-4} ve 10^{-5} ng/ μ L'a kadar PPV RNA'sını başarılı bir şekilde amplifiye edebildiği sonucuna ulaşılmaktadır.



şekil 3.3. Kullanılan tanı kitlerinin hassasiyet düzeyleri. A. Kolorimetrik reaksiyonda oluşan amplifikasyonlara ait görsel, b. Gerçek zamanlı kit ile elde edilen doyum eğrileri. c. Amplifikasyonlara yönelik agaroz jel görüntüleri (Sırasıyla 1-8 arası 10^{-10} - 10^{-6} dilüsyon serileri kullanılmış olup, gerçek zamanlı RT-LAMP testinde örnekler iki tekerrürlü alınmıştır).

3.3. İzotermal tanı kitlerinin PPV'nin üç ırkı ile bulaşık örneklerde test edilmesi

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Ziraat Fakóltesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarı'nda bulunan izolat havuzundan seçilen ve PPV-D, M ve T ırkları ile bulaşık olduğu bilinen 3 RNA örneği iki tekerrürlü olacak şekilde reaksiyona alınmıştır. 65 °C'de 60 dk süre ile yürütölen kolorimetrik RT-LAMP reaksiyon sonucuna göre PPV'nin 3 ırkı da başarılı bir şekilde amplifiye edilmiştir (şekil 3.4a). Ayrıca gerçek zamanlı RT-LAMP analiz bulguları sonucunda da her ırk için 22 dk'lık reaksiyon süresi sonucunda gerçek zamanlı amplifikasyona yönelik doyum eğrilerinin oluştuğu görölmektedir (şekil 3.4b). Amplifikasyonu doğrulayan jel görüntüleri elde edilmiştir (şekil 3.4c). Bu bulgulara göre geliştirilen izotermal tanı kitlerinin PPV'nin Türkiye'de yaygın olarak görölen D, M ve T ırkları için başarılı bir tespit protokolü olduğu sonucuna ulaşılmaktadır.



Şekil 3.4. PPV-D (1 ve 2), M (3 ve 4) ve T (5 ve 6) ırklarının geliştirilen izotermal tanı kiti ile tespiti a. kolorimetrik reaksiyon sonucu üç ırk için gözlenen renk değişimi, b. Gerçek zamanlı LAMP testi ile gözlemlenen doyum eğrileri, c. agaroz jel elektroforezi görüntüleri, 7,kit negatif kontrol, 8, su kontrol).

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışması *Prunus* türlerinde önemli bir viral sorun olarak uzun yıllardır çeşitli araştırmalara konu olan PPV, yani Şarka'nın izotermal tanı yöntemleri kullanılarak tespitini içermektedir. Virüs, doğal olarak kayısı, şeftali, badem, erik ve kiraz gibi sert çekirdekli meyve türlerini enfekte edebilmekte ve üretim materyali vasıtası ile geniş alanlara kolaylıkla yayılabilmektedir. Virüsün 1917 yılında yapılan ilk tespitinden bu yana farklı ülkelere yayıldığına dair birçok araştırmaya literatürde rastlamak mümkündür (Atanassov, 1932; Levy vd., 2000; Thompson vd., 2001; Spiegel vd., 2004; Navratil vd., 2005; Zotto vd., 2006; Gürcan, 2016; Gürcan ve Ceylan 2016). İlk tespitin üzerinden bir asır geçmesine rağmen, PPV yayılımı artmaya devam etmektedir. Virüsün kontrolü için hala global ve ülkesel ölçekte karantina ve eradikasyon uygulamaları uygulanmaya devam etmektedir (Akbaş vd., 2023). Bu durum PPV'i hala önemli bir sert çekirdekli viral hastalığı pozisyonunu korumasına yol açmakta ve hala bir çok araştırmaya konu edinilmesine neden olmaktadır. PPV'nin global ve Türkiye özelindeki mevcut durumu ve önemi bu tez çalışmasına konu edinilmesine neden olmuştur.

PPV tespitinde günümüze kadar çeşitli yöntemlerin uygulandığı bilinmektedir. Bu yöntemler arasında biyolojik indeksleme (Akbaş vd., 2011), ELISA, PCR ve sekanslama yöntemlerinin kullanıldığına dair çeşitli eserler mevcuttur (Gürcan ve Ceylan 2016, Akbaş vd., 2023). Varga ve James'in (2006), PPV tespiti için RT-LAMP prosedürünü geliştirdiği ve D, M, EA, C ve W gibi beş PPV izolatını RT-LAMP yöntemi ile tespit ettiği bildirilmiştir. Ayrıca Hadersdorfer vd. (2011), Varga ve James'in geliştirdiği yöntemi Blue LAMP ile modifiye ederek enfekte bitki dokularından alınan PPV süspansiyonlarına uyguladığı belirtilmiştir. Bu çalışmalara ek olarak Türkiye'de PPV havuzunda önemli bir yoğunlukta bulunan PPV-T için klasik LAMP yöntemleri üzerine araştırmalar yürütülmüştür (Çelik ve Ertunç, 2021). Yukarıda bahsedilen PPV'nin izotermal tespit çalışmalarının konu edinildiği çalışmalar, reaksiyon için dışarıdan primer setlerinin hazırlanmasını, optimize edilmesini ve agaroz jel elektororezi uygulamalarının zorunlu kılındığı araştırmalar olarak ön plana çıktığı görülmektedir. Yapılan bazı araştırmalar, bir LAMP reaksiyonu hazırlanırken ve sonuçları değerlendirilirken reaksiyon bileşenlerinin az ve sade olmasını ve tek-tüpte-değerlendirme uygulamalarının yapılmasının yanlış-pozitif sonuç verebilme ihtimallerini

düşürdüğünü göstermektedir (Sarkes vd., 2020; Çelik ve Morca, 2021; Golabi vd., 2021; Lalli vd., 2021; Peltzer vd., 2021) . Bu husus sade, kullanıma hazır ve pratik uygulamaları LAMP reaksiyonları için tercih sebebi kılmaktadır. Bu çalışmada, bu husus ile uyumlu olacak şekilde yukarıda bahsedilen çalışmalardan farklı olarak ilk kez kullanıma hazır kolorimetrik ve gerçek zamanlı tespiti olanak tanıyan olmak üzere iki adet izotermal tanı kitinin PPV tanısındaki performansı araştırılmıştır. Bu çalışmaya konu olan izotermal tanı kitleri mevcut izotermal yöntemlerden bağımsız olarak bünyesinde özel primer setlerini de içermesinin verdiği bir avantaj ile direkt PPV RNA'sını reaksiyona almak suretiyle oldukça pratik bir tespit yöntemi olarak dikkat çekmektedir.

Kullanıma hazır tanı kitlerinin geliştirilmesi ve validasyon süreçlerine yönelik farklı organizmalar ile yapılan çeşitli araştırmalara rastlamak mümkündür (Cook vd., 2015; Kaarj vd., 2018; Moehling vd., 2021; Jawla vd., 2023). Bitki patolojisinde kullanıma hazır izotermal tanı kitlerinin sayısının oldukça sınırlı olduğu bilinmektedir. Bilgimiz dahilinde literatürde AmplifyRP® Acceler8® adı verilen bir PPV izotermal gerçek zamanlı tanı kitinin (ACS 31505/0008) varlığına yönelik bilgiler bulunmaktadır. Ancak bu çalışma kapsamında ilgili ürün temin edilemediği için performans karşılaştırması yapılamamıştır.

Şüphesiz spesifiklik çalışmaları tüm yöntemlerin güvenilirliğinin kanıtlanması için önemli bir süreçtir. Bu çalışmada kullanılan izotermal tanı kitleri PPV için başarılı bir amplifikasyona olanak sağlarken, çapraz testlerde kullanılan potansiyel konukçu genomlarında ve ortak enfeksiyon sergileyebilen virüsler ile etkileşim sergilememiştir. Bu durum geliştirilen tanı kitlerinin PPV'e spesifik olduğunu göstermektedir. LAMP yöntemi Notomi vd. (2000) tarafından geliştirildiği günden bu yana oldukça hedefe spesifik bir tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır. Bitki virolojisinde yürütülen çeşitli LAMP çalışmalarının hedef organizmaya yönelik olduğu ve çapraz istenmeyen pozitif amplifikasyonlara yol açmadığını gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur (Çelik ve Ertunç, 2021, Çelik ve Morca, 2021, Çelik vd., 2024). Bu çalışma kapsamında elde edilen spesifiklik bulguları bahsi geçen çalışmalar ile benzerlik göstermekte ve LAMP tekniğinin geliştirilme amacına uygun bulgular barındırmaktadır.

Bir teşhis protokolünün tespit düzeyi hassasiyetinin yüksek olması beklenir. Bu çalışmada, araştırmaya konu edinilen kolorimetrik ve gerçek zamanlı tanı kitlerinin sırasıyla 10^{-4} ve 10^{-5} ng/ μ L PPV RNA'sı tespit hassasiyeti yakalayarak

bu hususta istenen değerlere ulaştığı değerlendirilmektedir. Araştırma bulgularımız ile uyumlu bir şekilde literatürde izotermal tanı yöntemlerinin, alternatif olarak sunulan farklı yöntemlere göre daha yüksek hassasiyete sahip olduğunu gösteren çeşitli araştırmalara rastlamak mümkündür (Zhao vd., 2015; Suzuki vd., 2016; İftikhar vd., 2020; Sarkes vd., 2020; Stehlíková vd., 2020). Elde edilen bu bulguların bu çalışmada kullanılan izotermal tanı kitlerinin oldukça yüksek tespit hassasiyetine sahip olduğunu göstermektedir.

Güçlü bir hassasiyet barındırması ve hedefe spesifik olmasının yanı sıra bir protokolün hedef organizma için kapsayıcı olması da istenen bir özelliktir. Bu çalışmada kullanılan izotermal tanı kitleri Türkiye’de bulunan PPV-M, D ve T ırkları için başarılı bir amplifikasyona olanak tanımıştır. Elde edilen bulgular PPV ile ilgili yapılan daha önceki çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (Varga ve James, 2006; Hadersdorfer vd., 2011; elik ve Ertunç, 2021). Bu kapsayıcılığa olanak tanıyan faktörün virüsün kılıf protein bölgesinin tanı için hedef bölge olarak seçilmesinden kaynaklandığı değerlendirilmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tezde, Türkiye’de yaygın olarak bulunan PPV ırklarının izotermal koşullar altında tanısına yönelik geliştirilen kolorimetrik ve gerçek zamanlı tanı kitlerinin performansları incelenmiştir. DOSA Bilgi ve Bilişim Teknolojileri Ltd. Şti. tarafından yerli olanaklarla geliştirilen bu tanı kitleri, PPV'nin hızlı ve hassas tespiti için pratik bir yöntem sunmuş, düşük maliyetli ve yüksek donanım gerektirmeyen bir alternatif olarak ön plana çıkmıştır. Araştırmada, kolorimetrik ve gerçek zamanlı kitlerin sırasıyla 10^{-4} ve 10^{-5} ng/ μ L PPV RNA’sını tespit edebilme hassasiyeti sağladığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, 65 °C’de 60 dakikada başarılı bir amplifikasyon sağlanırken, çapraz testlerde potansiyel konukçu genomları veya diğer ortak enfeksiyon gösteren virüslerle etkileşim göstermediği tespit edilmiştir. Türkiye’de yaygın olarak bulunan PPV-M, D ve T ırklarının etkin bir şekilde amplifiye edilebilmesi, bu kitlerin Türkiye için uyumlu ve etkin bir çözüm sunduğunu desteklemektedir. Bu sonuçlar ışığında şu öneriler sunulabilir:

1. Kolorimetrik ve gerçek zamanlı izotermal tanı kitleri, PPV tarama programlarında hızlı ve maliyet-etkin bir araç olarak kullanılabilir. Bu kitlerin, özellikle düşük laboratuvar donanımına sahip alanlarda ve saha koşullarında uygulanması teşvik edilmelidir.
2. Başarıyla geliştirilen ve optimize edilen bu izotermal tanı platformunun, diğer önemli bitki virüslerinin tespitine uyarlanması, Türkiye ve benzeri tarım bölgelerinde viral hastalıkların kontrolü için stratejik bir avantaj sağlayabilir.
3. Kitlerin farklı bölgelerdeki saha koşullarında doğrulama ve kalibrasyon çalışmalarının yapılması, kitlerin doğruluğunu artırmak ve yaygın kullanımını desteklemek için önemlidir.
4. Özellikle bitki virolojisi alanında çalışan teknik personelin izotermal tanı yöntemleri konusunda eğitilmesi, kitlerin etkin kullanımını artırabilir. Bu bağlamda, ilgili kamu kurumları ve özel sektör işbirliği ile eğitim programları düzenlenebilir.
5. Bu öneriler doğrultusunda, PPV ve diğer bitki patojenleriyle etkin mücadelede yerli izotermal tanı kitlerinin geliştirilmesi, Türkiye’nin tarım ekonomisine katkı sağlayacak önemli bir adım olacaktır.

6. KAYNAKLAR

(Bu tez çalışmasında Vancouver atıf sistemi kullanılmıştır).

- Amet, M. C. (2021). *Tekirdağ ilinde üretimi yapılan sert çekirdekli meyve ağaçlarında Plum pox virus (PPV) ve Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)'lerinin saptanması üzerine araştırmalar*. Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi.
- Akbaş, B., Değirmenci, K., Çiftçi, O., Kaya, A., Yurtmen, M., Uzunoğulları, N. ve Türkölmez, Ş. (2011). Update on Plum pox virus distribution in Turkey. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(1), 75-83.
- Akbaş, B., Değirmenci, K., Çiftçi, O., Kaya, A., Yurtmen, M., Uzunoğulları, N., ... & Türkölmez, Ş. (2011). Update on Plum pox virus distribution in Turkey. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(1), 75-83.
- Akbaş, B., Morca, A. F., Coşkan, S., Santosa, A. I., Çulal-Kılıç, H., & Çelik, A. (2023). First complete sequences and genetic variation of plum pox virus T strain in *Prunus dulcis* and *Prunus cerasus*. *3 Biotech*, 13(10), 332.
- Atanasoff, D. (1932). Plum pox. A new virus disease. Cook, J., Aydın-Schmidt, B., González, I. J., Bell, D., Edlund, E., Nassor, M. H., ... & Björkman, A. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. *Malaria journal*, 14, 1-6.
- BAŞ, B. (2017). *Tekirdağ ilinde plum pox potyvirus (ppv)'in doğal ve yabani konukçu türlerinin saptanması*. Yüksek lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi.
- Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Gentit, P., Caglayan, K. ve Çevik, B. (2007). First report of the presence of Plum pox virus Rec strain in Turkey. *Plant Disease*, 91(3), 331-331.
- Cambra, M., Boscia, D., Myrta, A., Palkovics, L., Navrátil, M., Barba, M., & Capote, N. (2006). Detection and characterization of Plum pox virus: serological methods. *EPPO Bulletin*, 36(2), 254-26
- Cambra, M., Capote, N., Cambra, M. A., Llácer, G., Botella, P., & López-Quílez, A. (2006). Epidemiology of sharka disease in Spain. *EPPO Bulletin*, 36(2), 271-275.
- Clark, M. F. ve Adams, A. N. (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475-483
- Çelik, A., Çakar, D., Derviş, S., Morca, A. F., Akıllı Şimşek, S., Romon-Ochoa, P., & Özer, G. (2024). New Detection Methods for Cryphonectria Hypovirus 1 (CHV1) through SYBR Green-Based Real-Time PCR and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Viruses*, 16(8), 1203.
- Çelik, A., & Morca, A. F. (2021). Development of colorimetric and real time loop-mediated isothermal amplification (cr-LAMP) assay for rapid detection of Wheat dwarf virus (WDV). *Crop Protection*, 149, 105786.
- Çelik, A., & Ertunç, F. (2021). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) of plum pox potyvirus Turkey (PPV-T) strain. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(3), 663-671.
- Çelik, A. (2020). *Bursa, Bilecik ve Bolu illerinde şeftali üretim alanlarında görülen bazı viral hastalıkların serolojik ve moleküler karakterizasyonu*. Ankara Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.

- Capote, N., Bertolini, E., Olmos, A., Vidal, E. Martínez, M. C., Cambra, M., 2009. *Direct sample preparation methods for the detection of Plum pox virus by realtime RT-PCR*. INTERNA
- Crescenzi, A., d'Aquino, L., Comes, S., Nuzzaci, M., Piazzolla, P., Boscia, D., & Hadidi, A. (1997). Characterization of the sweet cherry isolate of plum pox potyvirus. *Plant Disease*, 81(7), 711-714.
- Duru, S., Hayran, S., & Gül, A., (2022). Türkiye’de Sert Çekirdekli Meyvelerin Üretimi ve İhracatta Rekabet Gücünün Değerlendirilmesi. *Bahçe*, 51(1), 29-36.
- Dallot, S., Gottwald, T., Labonne, G., & 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.
- Elibüyük, İ. Ö. (2003). Natural spread of Plum pox virus in Ankara, Turkey. *Journal of Phytopathology*, 151(11-12), 617-619.
- Fu, X., Jiang, J., Luo, L., Du, Q., Li, X., Afandi, A., & Xie, X. (2021). Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and visual detection of Telosma mosaic virus (TeMV) in passion fruit. *Crop Protection*, 150, 105795.
- Golabi, M., Flodrops, M., Grasland, B., Vinayaka, A. C., Quyen, T. L., Nguyen, T., ... & Wolff, A. (2021). Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and on-site detection of avian influenza virus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 652048.
- Garcia, J. A., Glasa, M., Cambra, M., & Candresse, T. (2014). Plum pox virus and sharka: a model potyvirus and a major disease. *Molecular plant pathology*, 15(3), 226-241.
- Glasa, M., Prihodko, Y., Predajňa, L., Nagyová, A., Shneyder, Y., Zhivaeva, T., & Candresse, T. (2013). Characterization of sour cherry isolates of Plum pox virus from the Volga basin in Russia reveals a new cherry strain of the virus. *Phytopathology*, 103(9), 972-979.
- Glasa, M., Malinowski, T., Predajňa, L., Pupola, N., Dekena, D., Michalczyk, L., & Candresse, T. (2011). Sequence variability, recombination analysis, and specific detection of the W strain of Plum pox virus. *Phytopathology*, 101(8), 980-985.
- Glasa, M., Palkovics, L., Komínek, P., Labonne, G., Pittnerová, S., Kudela, O., & 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. *Journal of General Virology*, 85(9), 2671-2681.
- Gürçan, K., Ceylan, A., Akbulut, M., & Değirmenci, K. (2013, September). PPV-T is common in home gardens of Central Anatolia. In 2nd International Symposium on Plum Pox Virus (Vol. 3, No. 6).
- Gürçan, K., & Ceylan, A. (2016b). Strain identification and sequence variability of plum pox virus in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 40(5), 746-760.
- Gürçan, K., Ceylan, A. (2016, May). Full-genome analysis of Plum pox virus D isolates from Turkey. In III International Symposium on Plum Pox Virus 1163 (S. 75-84).
- Gürçan, K., Teber, S., & Değirmenci, K. (2016). High Sequence variability of Plum pox virus: A new divergent group of Marcus strain. *Romanian Biotechnological Letters* (kabul edildi).
- Gürçan, K. (2017). Bursa’da plum pox virus (Şarka)’ün yaygınlığının ve genetik çeşitliliğinin belirlenmesi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 32(1), 1-15.
- Gürçan, K., Teber, S., & Çağlayan, K. (2019a). Further investigation of a genetically divergent group of plum pox virus-M strain in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 101, 385-391.

- Gürcan, K., Çetinsag, N., Pinar, H., & Macit, T. (2019b). Molecular and biological assessment reveals sources of resistance to Plum pox virus-Turkey strain in Turkish apricot (*Prunus armeniaca*) germplasm. *Scientia Horticulturae*, 252, 348-353.
- Gürcan, K., Teber, S., & Candresse, T. (2020). Genetic analysis suggests a long and largely isolated evolutionary history of plum pox virus strain D in Turkey. *Plant Pathology*, 69(2), 370-378.
- Gougherty, A. V., Pazdernik, K. T., Kaiser, M. S., & Nutter Jr, F. W. (2015). Evaluation of sampling and testing efficiencies of Plum pox virus eradication programs in Pennsylvania and Ontario. *Plant Disease*, 99(9), 1247-1253.
- Hadersdorfer, J., Neumüller, M., Treutter, D., & Fischer, T. C. (2011). Fast and reliable detection of Plum pox virus in woody host plants using the Blue LAMP protocol. *Annals of Applied Biology*, 159(3), 456-466.
- Herrera-Vásquez, J. A., Puchades, A. V., Elvira-González, L., Jaén-Sanjur, J. N., Carpino, C., Rubio, L., & Galipienso, L. (2018). Fast detection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of the three begomovirus species infecting tomato in Panama. *European Journal of Plant Pathology*, 151, 243-250.
- Hale, G., Lopresti, J., Tomkins, B., Jones, R., Clark, C., Hunter, D., & White, A. (2014, August). Increasing consumer demand for fresh stone-fruit through market research in Australia. In XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: *Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes* (IHC2014): 1120 (pp. 491-498).
- Iftikhar, R., Moyo, L., & Pappu, H. R. (2020). A loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of Dahlia mosaic caulimovirus in Dahlia (*Dahlia variabilis*). *Annals of Applied Biology*, 176(2), 203-209.
- İlbağı, H., & Çıtır, A. (2014). Detection and partial molecular characterization of Plum pox virus on almond trees in Turkey. *Phytoparasitica*, 42, 485-491.
- Jevremović, D., Vasiljević, B., & Paunović, S. A. (2022, May). Viruses and viroids infecting peaches in Serbia. In *X International Peach Symposium* 1352 (pp. 495-500).
- Jeevalatha, A., Kaundal, P., Kumar, R., Raigond, B., Kumar, R., Sharma, S., & Chakrabarti, S. K. (2018). Optimized loop-mediated isothermal amplification assay for Tomato leaf curl New Delhi virus-[potato] detection in potato leaves and tubers. *European journal of plant pathology*, 150, 565-573.
- Jawla, J., Kumar, R. R., Mendiratta, S. K., Agarwal, R. K., Singh, P., Saxena, V., ... & Kumar, D. (2023). A novel paper based loop mediated isothermal amplification and lateral flow assay (LAMP-LFA) for point-of-care detection of buffalo tissue origin in diverse foods. *Journal of Food Safety*, 43(3), e13038.
- James, D., Varga, A., Thompson, D., & Hayes, S. (2003). Detection of a new and unusual isolate of Plum pox virus in plum (*Prunus domestica*). *Plant Disease*, 87(9), 1119-1124.
- James, D., & Varga, A. (2005). Nucleotide sequence analysis of Plum pox virus isolate W3174: evidence of a new strain. *Virus Research*, 110(1-2), 143-150.
- Kobayashi, M., Mashiko, T., Wilisiani, F., Hartono, S., Nishigawa, H., Natsuaki, T., & Neriya, Y. (2023). Development of a RT-LAMP assay for real-time detection of criniviruses infecting tomato. *Journal of Virological Methods*, 312, 114662.
- Kalashyan, Y. A., Bilkey, N. D., Verderevskaya, T. D., & Rubina, E. V. (1994). Plum pox potyvirus on sour cherry in Moldova. *EPPO bulletin*, 24(3), 645-649.
- Kaur, M., Ayarnah, K., Duanis-Assaf, D., Alkan, N., & Eltzov, E. (2023). Rapid and simple colorimetric detection of quiescent Colletotrichum in harvested fruit using reverse

- transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) technology. *Talanta*, 255, 124251.
- Kaarj, K., Akarapipad, P., & Yoon, J. Y. (2018). Simpler, faster, and sensitive Zika virus assay using smartphone detection of loop-mediated isothermal amplification on paper microfluidic chips. *Scientific reports*, 8(1), 12438.
- Kurçman, S. (1973). Detection of sharka virus on apricot and plum trees in Ankara. *Journal of Turkish Phytopathology*, 2, 124-129.
- Kaplan, C., Zeki, C., Çakırbay, F., Çetin, G., Öztürk, N., & Kahveci, Y. (2008). Ziraî Mücadele Teknik Talimatları (Cilt 4). *Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü*, 388.
- Koç, G. (2010). *Doğu Akdeniz Bölgesinde Sert Çekirdekli Meyvelerde Plum pox potyvirus (PPV, Sharka) 'ünün Durumunun Belirlenmesi ve Karakterizasyonu*. ÇÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.
- Koç, G., & Baloglu, S. (2006). First report of sharka in the Çukurova region of Turkey. *Journal of Plant Pathology*, S68-S68.
- Kaya, D. (2012). *Ordu il merkezi ve ilçelerinden alınan su örneklerinde kirlilik indikatörü bakterilerin ve parazitlerin moleküler yöntemlerle tespit edilmesi*. Fen Bilimleri Enstitüsü, yüksek lisans tezi.
- Kerlan, C., & Dunez, J. (1979). Différenciation biologique et sérologique de souches du virus de la sharka. *Ann. Phytopath* 11: 241-251.
- Kimura, K., Usugi, T., Hoshi, H., Kato, A., Ono, T., Koyano, S., & Tsuda, S. (2016). Surveys of viruliferous alate aphid of Plum pox virus in Prunus mume orchards in Japan. *Plant Disease*, 100(1), 40-48.
- Lee, H. J., & Jeong, R. D. (2020). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for detecting peach latent mosaic viroid in peach pollen. *Horticultural Science & Technology*, 38(6), 830-839.
- Li, B., Du, J., Lan, C., Liu, P., Weng, Q., & Chen, Q. (2013). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of Fusarium oxysporum f. sp. cubense race 4. *European Journal of Plant Pathology*, 135, 903-911.
- Li, X., Hu, W., Li, Y., Li, Y., Chen, S., & Wang, J. (2022). Development of an RT-LAMP assay for the detection of maize yellow mosaic virus in maize. *Journal of Virological Methods*, 300, 114384.
- Lalli, M. A., Langmade, J. S., Chen, X., Fronick, C. C., Sawyer, C. S., Burcea, L. C., ... & Milbrandt, J. (2021). Rapid and extraction-free detection of SARS-CoV-2 from saliva by colorimetric reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification. *Clinical chemistry*, 67(2), 415-424.
- Levy, L., Damsteegt, V., & Welliver, R. (2000). First report of Plum pox virus (Sharka disease) in Prunus persica in the United States. *Plant Disease*, 84(2), 202-202.
- Lopez-Moya, J. J., Fernández-Fernández, M. R., Cambra, M., & García, J. A. (2000). Biotechnological aspects of plum pox virus. *Journal of Biotechnology*, 76(2-3), 121-136.
- Maejima, K., Himeno, M., Komatsu, K., Takinami, Y., Hashimoto, M., Takahashi, S., & Namba, S. (2011). Molecular epidemiology of Plum pox virus in Japan. *Phytopathology*, 101(5), 567-574.
- Moehling, T. J., Choi, G., Dugan, L. C., Salit, M., & Meagher, R. J. (2021). LAMP diagnostics at the point-of-care: emerging trends and perspectives for the developer community. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 21(1), 43-61.

- Navratil, M., Safarova, D., Karesova, R., & Petrzik, K. (2005). First incidence of Plum pox virus on apricot trees in China. *Plant Disease*, 89(3), 338-338.
- Myrta, A., Boscia, D., Potere, O., Kölber, M., Németh, M., Di Terlizzi, B., & Savino, V. (2001). Existence of two serological subclusters of Plum pox virus, strain M. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 845-848.
- Morca, A. F., Coşkan, S., & Akbaş, B. (2022). *Zonguldak İlinde Plum pox virus' un Tespiti, Karakterizasyonu ve Takibi*. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi, 25(6), 1369-1377.
- Morca, A. F., Coşkan, S., & Çelik, A. (2021). Burdur ilinde Plum pox virus' un tespiti ve kısmi kılıf protein geninin moleküler karakterizasyonu. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi-KSU Journal Of Agriculture and Nature*.
- Morca, A. F., Coşkan, S., & Öncü, F. (2020). Determination and partial molecular characterization of Plum pox virus in Bolu province. *Plant Protection Bulletin*, 60(4), 59-68.
- Matic, S., Elmaghraby, I., Law, V., Varga, A., Reed, C., Myrta, A., & James, D. (2011). Serological and molecular characterization of isolates of Plum pox virus strain El Amar to better understand its diversity, evolution, and unique geographical distribution. *Journal of Plant Pathology*, 303-310.
- Nemchinov, L., Hadidi, A., Maiss, E., Cambra, M., Candresse, T., & Damsteegt, V. (1996). Sour cherry strain of plum pox potyvirus (PPV): molecular and serological evidence for a new subgroup of PPV strains. *Phytopathology*, 86(11), 1215-1221.
- Özcan, M. (2020). *Ürün Muhafazası ve Pazarlama Ders Notu*. TC Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü. 100s.
- Peltzer, D., Tobler, K., Fraefel, C., Maley, M., & Bachofen, C. (2021). Rapid and simple colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of Bovine alphaherpesvirus 1. *Journal of Virological Methods*, 289, 114041.
- Palmisano, F., Boscia, D., Minafra, A., Myrta, A., & Candresse, T. (2012). *An atypical Albanian isolate of Plum pox virus could be the progenitor of the Marcus strain*.
- Pribek, D., Palkovics, L., & Gaborjanyi, R. (2000, July). Molecular characterization of Plum pox virus almond isolate. In *XVIII International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops-Top Fruit Diseases* 550 (pp. 91-96).
- Polak, J. (1988, June). Diagnosis of Plum Pox virus in infected Symptomless trees of Apricot, Peach and Prunus Cerasifera ssp. *Myroblana by ELI International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases* 235 (pp. 299-304).
- Roy, A. S., & Smith, I. M. (1994). Plum pox situation in Europe. *EPPO Bulletin*, 24(3), 515-523.
- Rochon, D., Theilmann, J., James, D., Reade, R., Yang, L., & Upton, C. (2003). Partial molecular characterization of plum pox virus isolates occurring in Canada. *Canadian journal of plant pathology*, 25(2), 198-208.
- Sahtiyanci, S. (1969). Virus de la sharka chez le prunier. *Bulletin phytosanitaire FAO*, 17, 69.
- Sarkes, A., Fu, H., Feindel, D., Harding, M., & Feng, J. (2020). Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV). *PLoS One*, 15(6), e0230403.
- Spiegel, S., Kovalenko, E. M., Varga, A., & James, D. (2004). Detection and partial molecular characterization of two Plum pox virus isolates from plum and wild apricot in southeast Kazakhstan. *Plant disease*, 88(9), 973-979.

- Sertkaya, G., Serçe, Ç. U., & Çağlayan, K. (2003). Detection and characterization of Plum pox potyvirus (PPV) by DAS-ELISA and RT-PCR/RFLP analysis in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 27(4), 213-220.
- Saydam, C., Arslan, Ü., Ersoy, F., ve Elibüyük, İ. (2018). Sharka Hastalığının (Erik Çiçeği Virüsü) Bursa'daki Yaygınlığının Belirlenmesi. *Bitki Koruma Bülteni*, 58(1), 1 -8.
- Stehlíková, D., Beran, P., Cohen, S. P., & Čurn, V. (2020). Development of real-time and colorimetric loop mediated isothermal amplification assay for detection of *Xanthomonas gardneri*. *Microorganisms*, 8(9), 1301.
- Suzuki, R., Fukuta, S., Matsumoto, Y., Hasegawa, T., Kojima, H., Hotta, M., & Miyake, N. (2016). Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay as a simple detection method of Chrysanthemum stem necrosis virus in chrysanthemum and tomato. *Journal of virological methods*, 236, 29-34.
- Temur Çınar, C. (2019). Plum pox virus (PPV) ile inokule edilen test bitkilerinde virüs hareketinin kantitatif olarak belirlenmesi ve kayseri ilinde ppv-t ırkının epidemiyolojisinin araştırılması.
- Teber, S., Ceylan, A., Gürcan, K., Candresse, T., Ulubaş Serçe, Ç., Akbulut, M., & Akbaş, B. (2019). Genetic diversity and molecular epidemiology of the T strain of Plum pox virus. *Plant Pathology*, 68(4), 755-763.
- Tüik. (2023). Bitkisel üretim. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> adresinden 07 Kasım 2024 tarihinde alınmıştır.
- Tangkanchanapas, P., Höfte, M., & De Jonghe, K. (2018). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) designed for fast and sensitive on-site detection of Pepper chat fruit viroid (PCFVd). *Journal of virological methods*, 259, 81-91.
- Teber, S., Gürcan, K., Brevet, M., Palmisano, F., Candresse, T., & Dallot, S. (2023). High genetic diversity suggests a long evolutionary history of plum pox virus-M in Turkey. *Plant Pathology*, 72(2), 300-311.
- Thompson, D., McCann, M., MacLeod, M., Lye, D., Green, M., & James, D. (2001). First report of plum pox potyvirus in Ontario, Canada. *Plant Disease*, 85(1), 97-97.
- Uzun, A., Yaman, M., Pınar, H., Çetin, N., & Say, A. (2018). Türkiye’de ekonomik olarak yetiştiriciliği yapılan sert çekirdekli meyvelerin üretim projeksiyonu. *Bahçe*, 47, 79-83.
- Ulubaş Serçe, Ç., Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Krizbai, L., Gazel, M., & Çağlayan, 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 Research*, 142(1-2), 121-126.
- Ulubaş Serçe, Ç., Gazel, M., & Çağlayan, K. (2011). Plum pox virus streynlerinin Türkiye’ deki Dağılımı (Distribution of Plum pox virus strains in Turkey), Türkiye IV. *Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, Kahramanmaraş*, 72.
- Varveri, C., Ravelonandro, M., & Dunez, J. (1987). Construction and use of a cloned cDNA probe for the detection of plum pox virus in plants. *Phytopathology*, 77(8), 1221-1224.
- Varveri, C. (2006). Epidemiology of Plum pox virus strain M in Greece. *EPPO Bulletin*, 36(2), 276-278.
- Varga, A., & James, D. (2006). Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of Plum pox virus. *Journal of Virological Methods*, 138(1-2), 184-190.
- Yalçın, S., (2014). *Plum pox virus (PPV) T ırkının bazı biyolojik özelliklerinin belirlenmesi ve melez kayısı bitkilerinde PPV’ye dayanıklılığın moleküler markörlerle araştırılması*. Hatay, Mustafa Kemal Üni, Fen Bilimleri, Doktora tezi.

- Wilisiani, F., Tomiyama, A., Katoh, H., Hartono, S., Neriya, Y., Nishigawa, H., & Natsuaki, T. (2019). Development of a LAMP assay with a portable device for real-time detection of begomoviruses under field conditions. *Journal of virological methods*, 265, 71-76.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., Delbos, R. P., Mazyad, H., Aboul-Ata, A. E., & Dunez, J. (1991). Nucleotide sequence of the 3'-terminal region of the RNA of the E1 Amar strain of plum pox potyvirus. *Journal of General Virology*, 72(7), 1741-1746.
- Zhang, Z. Y., Liu, X. J., Li, D. W., Yu, J. L., & Han, C. G. (2011). Rapid detection of wheat yellow mosaic virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Virology journal*, 8, 1-8.
- Zhao, L. M., Li, G., Gao, Y., Zhu, Y. R., Liu, J., & Zhu, X. P. (2015). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for detecting tomato chlorosis virus. *Journal of virological methods*, 213, 93-97.
- Zagrai, L., Zagrai, I., Ferencz, B., Gaboreanu, I., Kovacs, K., Petricele, I., & Capote, N. (2008). Serological and molecular typing of Plum pox virus isolates in the North of Romania. *Journal of Plant Pathology*, S41-S46.
- Zotto, A. D., Ortego, J. M., Raigón, J. M., Caloggero, S., Rossini, M., & Ducasse, D. A. (2006). First report in Argentina of Plum pox virus causing sharka disease in Prunus. *Plant Disease*, 90(4), 523-523.