

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI



**SAMSUN İLİ TRABZON HURMASI (*Diospyros kaki* L.)
BAHÇELERİNDE PERSIMMON CRYPTIC VIRUS
ENFEKSİYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Sena ÇANKAYA

Danışman
Prof. Dr. Miray SÖKMEN

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.ZRT.1904.22.012 proje numarası ile desteklenmiştir

SAMSUN
2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Sena ÇANKAYA tarafından, Prof. Dr. Miray SÖKMEN danışmanlığında hazırlanan “SAMSUN İLİ TRABZON HURMASI (*Diospyros kaki* L.) BAHÇELERİNDE PERSIMMON CRYPTIC VIRUS ENFEKSİYONUNUN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 27/01/2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Miray SÖKMEN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bitki Koruma Ana Bilim Dalı		☒ Kabul
			☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Nazlı D. KUTLUK YILMAZ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bitki Koruma Ana Bilim Dalı		☒ Kabul
			☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Ana Bilim Dalı		☒ Kabul
			☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi?

Evet ☐

Hayır ☒

03 /01/ 2023

Sena ÇANKAYA

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: SAMSUN İLİ TRABZON HURMASI (*Diospyros kaki* L.)
BAHÇELERİNDE PERSIMMON CRYPTIC VIRUS ENFEKSİYONUNUN
ARAŞTIRILMASI

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 03/01/2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : %16

Tek kaynak oranı : %5

03/01/2023

Prof. Dr. Miray SÖKMEN

ÖZET

SAMSUN İLİ TRABZON HURMASI (*Diospyros kaki* L.) BAHÇELERİNDE PERSIMMON CRYPTIC VIRUS ENFEKSİYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Sena ÇANKAYA

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Bitki Koruma Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans, Ocak/2023

Danışman: Prof. Dr. Miray SÖKMEN

Trabzon hurması (*Diospyros kaki* L.), ilkbaharda geç çiçeklenen subtropikal bir meyve türüdür. Trabzon hurmasında günümüze kadar 8 virüs türü belirlenmiştir. Bu virüsler arasında Persimmon cryptic virus (PeCV) *Partitiviridae* familyası, *Deltapartitivirus* cinsine ait bir virüs türüdür. Virüsün çift sarmallı RNA (dsRNA) ve iki parçalı genom yapısı (RNA-1 ve RNA-2) bulunmaktadır. Ticari bir antiserumu bulunmadığından, PeCV'nin tanısında moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Bu çalışmada, PeCV'nin tanısında dsRNA izolasyonu ve ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) yöntemlerinin uygulanabilirliği araştırılmıştır.

Samsun ili Çarşamba ilçesinde Trabzon hurması yetiştiriciliğinin yapıldığı 2 adet bahçeden 2021 yılında 14 adet semptomlu ve 14 semptomsuz yaprak örneği alınmıştır. Toplanan yaprak örneklerinden viral dsRNA'lar izole edilmiştir. dsRNA izolasyonunda 0.5 g, 1 g ve 1.5 g olmak üzere 3 farklı yaprak ağırlığı kullanılmıştır. PeCV kapsid protein bölgesine özgü primer çifti kullanılarak, tek aşamalı RT-PCR yöntemi virüsün tanısı için uygulanmıştır. Çalışmada sadece 1.5 g yaprak ağırlığı kullanılarak izole edilen dsRNA örneklerinden RT-PCR yönteminde sonuç alınmıştır. Dört PeCV izolatından bir tanesinin (Çar-Eğri-13) kapsid protein geninin önemli bir bölümünün (994 bp) nükleotit dizisi elde edilmiştir. BLASTn analizi Çar-Eğri-13 izolatının hem nükleotit hem de amino asit dizisi bakımından İtalya'da belirlenen PeCV SSPI izolatı (HE805114) ile %99.69 benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur.

Sonuç olarak, bu çalışmada virüsün hem semptomlu hem de semptomsuz yaprak örneklerinde tespit edilebildiği ve kullanılan yaprak dokusu miktarının PeCV dsRNA'larının izolasyonunda önemli olduğu belirlenmiştir. Yöntemin ekonomik olması sebebiyle, gelecekte Trabzon hurması anaç, kalem ve fidanlıklarının sertifikasyon amaçlı test edilmesinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Persimmon, PeCV, dsRNA izolasyonu, RT-PCR

ABSTRACT

INVESTIGATION ON PERSIMMON CRYPTIC VIRUS INFECTION IN PERSIMMON (*Diospyros kaki* L.) ORCHARDS IN SAMSUN PROVINCE

Sena ÇANKAYA

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Plant Protection

Master, January/2023

Supervisor: Prof. Dr. Miray SÖKMEN

Persimmon (*Diospyros kaki* L.) is a subtropical fruit species that blooms late in the spring. Eight virus species have been identified on persimmon so far. Among these viruses, Persimmon cryptic virus (PeCV) is a member of the genus *Deltapartitivirus* in the family *Partitiviridae*. Its genome has double-stranded RNA (dsRNA) with two segmented structures (RNA-1 and RNA-2). Since a commercial antiserum of PeCV is not available, molecular methods are used for its diagnosis. In this study, the possibility of applying dsRNA isolation method and the use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in the identification of PeCV were investigated.

Fourteen asymptomatic and fourteen symptomatic leaf samples were taken from two persimmon orchards in Carsamba district of Samsun province in 2021. Viral dsRNAs were isolated from the collected leaf samples. Three different leaf weights (0.5 g, 1 g and 1.5 g) were used in dsRNA isolation. One-step RT-PCR has been applied in PeCV identification using a primer pair specific for its capsid protein region. In this study, an amplification product was only obtained from dsRNA samples of 1.5 g leaf weight. Out of four PeCV isolate, the important portion (994 bp) of capsid protein nucleotide sequences of one isolate (Çar-Eğri-13) was obtained. BLASTn analysis showed that the isolate Car-Eğri-13 had 99.69% nucleotide and amino acid identity with SSPI isolate (HE805114), which had 100% query coverage, identified in Italy.

As a result, it was determined that PeCV was detectable in both symptomatic and asymptomatic leaf samples, and the amount of leaf tissue used was important for isolation of PeCV dsRNAs. Also, since this method is highly economical, it is recommended for testing the source of persimmon plant materials (rootstock, scion, and seedling) for certification purposes in the future.

Key words: Persimmon, PeCV, dsRNA isolation, RT-PCR

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmanın belirlenmesi, hazırlanması ve yürütülmesi aşamasında yaptığı katkıların yanı sıra, akademik hayatım boyunca gösterdiği hoşgörü ve desteği ile benden hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen bu günlere gelmemde büyük bir emeği olan danışmanım Prof. Dr. Miray SÖKMEN' e en içten teşekkürü bir borç bilirim. Bu tez çalışmasında desteklerini esirgemeyerek katkı sağlayan Prof. Dr. Nazlı Dide Kutluk YILMAZ' a ve Prof. Dr. Sevilhan MENNAN' a teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasına PYO.ZRT.1904.22.012 proje numarası ile destek veren Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi' ne ayrıca teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca, yardımlarını eksik etmeyen Abdul Razak AHMED' e teşekkür ederim.

Tez çalışmamda her zaman yanımda olan değerli aileme ve ailemin bir parçası olarak görmekte olduğum dostum Sude AKMAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sena ÇANKAYA

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	7
2.1. <i>Partitiviridae</i> Familyası	7
2.2. Cryptic Virüs Kavramı	9
2.4. Cryptic Virüslerin Konukçularında Oluşturdukları Simptomlar	11
2.5. Cryptic Virüslerin Taşınması	11
2.5.1. Tohumla taşınma	11
2.5.2. Mekanik olarak bitki özsuğu ile taşınma	13
2.5.3. Aşı yoluyla taşınma	13
2.5.4. Vektör ile taşınma	13
2.5.5. Küsküt ile taşınma	13
2.6. Trabzon Hurmasında Enfeksiyon Oluşturan Virüs ve Viroid Türleri	13
2.6.1. Persimmon virus A (PeVA)	14
2.6.2. Persimmon virus B (PeVB)	15
2.6.3. Passiflora latent virus (PLV)	15
2.6.4. Persimmon ampelovirus (PAmpV)	15
2.6.5. Persimmon polerovirus (PPolV)	15
2.6.6. Persimmon waikavirus (PWaiV)	15
2.6.7. Persimmon cryptic virus (PeCV)	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Trabzon Hurması Yaprak Örnekleri	19
3.1.2. dsRNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler	19
3.1.3. Agaroz Elektroforez Jel Yönteminde Kullanılan 1XTBE Tamponu	19
3.1.4. Test Bitkileri	20
3.2. Yöntem	21
3.2.1. Survey ve Örneklerin Alınması	21
3.2.2. Persimmon cryptic virus' ün Mekanik İnokulasyon Yöntemi ile Taşınmasının Araştırılması	22
3.2.3. dsRNA İzolasyon Yöntemi	23
3.2.4. Tek Aşamalı Reverse-Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Yöntemi ile PeCV' nin Kılıf Protein (CP) Gen Bölgesinin Çoğaltılması	25
3.2.5. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi	27
3.2.6. PeCV' nin Kılıf Protein (CP) Bölgesinin Nükleotid Dizisinin Elde Edilmesi	28
3.2.7. PeCV İzolatlarının Moleküler Filogenetik İlişkisi	28
4. BULGULAR	30
4.1. Surveyler ve Örneklerin Toplanması	30
4.2. Trabzon Hurması Yapraklarından dsRNA' ların İzolasyonu	31
4.3. Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Yöntemi ile Persimmon cryptic virus (PeCV)' ün Belirlenmesi	32
4.4. PeCV' nin Bitki Öz Suyu ile Mekanik Olarak Taşınma Çalışmaları	35
4.4.1. Test Bitkilerinin Mekanik İnokulasyonu	35

4.4.2. Test Bitkilerinden dsRNA İzolasyonu ve RT-PCR Yöntemi ile PeCV Enfeksiyonunun Araştırılması.....	38
4.5. PeCV İzolatlarının Kapsid Protein (CP) Bölgesinin Nükleotit Dizisinin Elde Edilmesi	46
4.6. Persimmon cryptic virus Çar-Eğri-13 İzolatının Kapsid Protein Bölgesinin Sekans Verilerinin Analizi	48
4.7. Persimmon cryptic virus Çar-Eğri-13 izolatının moleküler filogenetik analizi	50
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ.....	55
KAYNAKÇA.....	56
EKLER	61
ÖZ GEÇMİŞ.....	62



SİMGELER VE KISALTMALAR

bp	: Baz çifti
CP	: Kapsid protein
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dsRNA	: Çift sarmallı Ribonükleik asit
FAO	: Food and Agriculture Organization
ICTV	: Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi
Kb	: Kilobaz
mM	: Milimolar
NCBI	: National Centre for Biotechnology Information
nm	: Nanometre
nt	: Nükleotit
°C	: Santigrat derece
PeCV	: Persimmon cryptic virus
RdRp	: RNA-dependent RNA polimeraz
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RT-PCR	: Ters Transkriptaz-Polimeraz zincir reaksiyonu
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Trabzon hurmasında erkek çiçek ve meyve yapısı	2
Şekil 1.2. Türkiye’de Trabzon hurması üretimi yapılan iller.....	4
Şekil 2.1. <i>Penicillium stoloniferum virus S</i> (Gammapartitivirus Cinsi, Partitiviridae familyası) partiküllerinin elektron mikroskop görüntüsü (ICTV, 2018)	7
Şekil 2.2. <i>Penicillium stoloniferum virus S</i> (PsV-S) replikasyon modeli. Virüs partikülleri RdRp enziminin (kırmızı daire) bir veya iki kopyasını içerir. dsRNA (siyah çizgi) kapsid proteinini (CP), diğer dsRNA (kırmızı çizgi) RdRp’yi kodlar. Pozitif zincir kesikli çizgi, negatif zincir düz çizgi ile gösterilmiştir. Her virüs partikülü içerisinde, RdRp enzimi negatif zinciri kalıp olarak kullanarak pozitif zinciri sentezler. Yeni pozitif zincir partikülde kalır, orjinal parental pozitif zincir partikülden serbest bırakılır ve konukçu hücre ribozomunda CP’yi ve RdRp’yi sentezler veya yeni virüs partikülü içerisine yerleşir. Burada da pozitif sarmal üzerinden RdRp’nin negatif zinciri sentezlediği kanısı yaygındır. L1 ve L2 partiküllerinin, ikili dsRNA molekülü içeren P1 ve P2 partiküllerinden oluştuğu düşünülmektedir (ICTV , 2018).	8
Şekil 2.3. A) 29-32 nm çapında ve B) 37-38 nm çapındaki partiküllerin elektron mikroskop görüntüsü	9
Şekil 2.4. Persimmon cryptic virus’ün iki parçalı genom yapısı (Morelli vd.,2015).....	16
Şekil 2.5. Persimmon cryptic virus’ün Trabzon hurması yaprağında oluşturduğu damar nekrozu (Chiumenti vd., 2015).....	17
Şekil 3.1. Samsun ili (A) Çarşamba ilçesinde (B) örnek alınması planlanan köyler. Harita B’de siyah daire sembolü Yukarıdikencik, kırmızı üçgen Kemer, sarı kare Eğrikum köylerini göstermektedir.....	22
Şekil 3.2. dsRNA izolasyon yöntemi aşamalarının şematik görüntüsü	25
Şekil 3.3. PeCV’nin kapsid protein bölgesinin RT-PCR ile çoğaltılmasında kullanılan primerlerin pozisyonları	26
Şekil 4.1. Örnekleme yapılan Trabzon hurması bahçeleri ve PeCV-benzeri yaprak belirtileri. A) Çarşamba-Yukarı Dikencik Durakbaşı Köyü’ne ait Trabzon hurması fidanlılığı B) Çarşamba-Eğrikum Çayvar Köyü’ne ait Trabzon hurması bahçesi C) Trabzon hurması yaprağının alt ve D) Üst kısımlarında görülen yaprak yan damarlarında nekroz belirtisi	31
Şekil 4.2. CryKaF ve CryNeR primerleri ve Trabzon hurması yapraklarından izole edilen dsRNA’lar kullanılarak uygulanan Tek Aşamalı (One-Step) Reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonuna ait %1’lik agaroz jel elektroforez sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog : SM0314, Promega), M2: 100 bp DNA Ladder (Katalog no: 07-11-00050, Solis BioDyne), 1: 0.5 gr belirtilmeli Çar-Yuk 4 izolatu, 2: 0.5 gr belirtilsüz Çar-Yuk 10 izolatu.....	33
Şekil 4.3. CryKaF ve CryNeR primerleri ve dsRNA’lar kullanılarak elde edilen One-Step RT- PCR amplifikasyon ürünlerine ait %1’lik Jel Elektroforez Sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), M2: 100 bp DNA Ladder (Katalog no: 07-11-00050, Solis BioDyne), 1: 1.5 gr belirtilmeli Çar-Eğri 3 izolatu, 2: 1.5 gr belirtilsüz Çar-Eğri 13 izolatu, 3: 1 gr belirtilmeli Çar-Yuk 5/6 izolatu	33
Şekil 4.4. CryKaF ve CryNeR primerleri kullanılarak elde edilen One-Step RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait %1’lik agaroz jel elektroforez sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), M2: 100 bp DNA Ladder (Katalog no:	

07-11-00050, Solis BioDyne), 1: 1.5 gr simptomlu Çar-Yuk 1 izolatu, 2: 1.5 gr simptomuz Çar-Yuk 7 izolatu.....	34
Şekil 4.5. Trabzon hurması yapraklarından izole edilen dsRNA'lar kullanılarak elde edilen One-Step RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait %1'lik agaroz jel elektroforez sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), M2: 100 bp DNA Ladder (Katalog no: 07-11-00050, Solis BioDyne), 1: 1.5 gr simptomlu Çar- Eğri 6 izolatu, 2: 1.5 gr simptomuz Çar-Eğri 16 izolatu, 3: 1.5 gr simptomuz Çar-Yuk 13 izolatu	34
Şekil 4.6. Biber "Kandil Dolma" çeşidinin PeCV ile mekanik inokulasyondan 4 hafta sonra görüntüsü	35
Şekil 4.7. Börölce "Sırma" çeşidinin PeCV ile mekanik inokulasyondan 4 hafta sonra görüntüsü	36
Şekil 4.8. Fasulye "Magnum" çeşidinin inokulasyondan 4 hafta sonra görüntüsü	36
Şekil 4.9. <i>Nicotiana glutinosa</i> bitkisinin PeCV ile mekanik inokulasyondan 4 hafta sonra görüntüsü	37
Şekil 4.10. <i>Nicotiana rustica</i> bitkisinin PeCV ile mekanik inokulasyondan 4 hafta sonra görüntüsü	37
Şekil 4.11. Hıyar (<i>Cucumis sativus</i> L.) bitkisinin PeCV ile mekanik inokulasyondan 4 hafta sonra görüntüsü	38
Şekil 4.12. CryKaF ve CryNeR primerleri kullanılarak elde edilen Tek aşamalı RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait %1'lik agaroz jel elektroforez sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), 1: Börölce bitkisinin inokule edilen yapraklarından elde edilen dsRNA, 2: Börölce bitkisinin üst yapraklarından elde edilen dsRNA, 3: <i>Nicotiana glutinosa</i> bitkisinin inokule edilen yapraklarından elde edilen dsRNA, 4: <i>N. glutinosa</i> üst yapraklarından elde edilen dsRNA, 5: Hıyar bitkisinin inokule edilen yapraklarından elde edilen dsRNA, 6: Hıyar bitkisinin üst yapraklarından elde edilen dsRNA, 7: Pozitif kontrol olarak kullanılan Çar-Eğri 3 izolatına ait dsRNA	39
Şekil 4.13. CryKaF ve CryNeR primerleri kullanılarak elde edilen One-Step RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait % 1'lik agaroz jel elektroforez sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), 1: Fasulye bitkisinin inokule edilen yapraklarından elde edilen dsRNA, 2: Fasulye bitki sinin üst yapraklarından elde edilen dsRNA, 3: Biber bitkisinin inokule edilen yapraklarından elde edilen dsRNA, 4: Biber bitkisinin üst yapraklarından elde edilen dsRNA, 5: <i>N. rustica</i> bitkisinin inokule edilen yapraklarından elde edilen dsRNA, 6: <i>N. rustica</i> bitkisinin üst yapraklarından elde edilen dsRNA, 7: Pozitif kontrol olarak kullanılan Çar-Eğri 3 izolatına ait dsRNA	40
Şekil 4.14. CryKaF ve CryNeR primerleri kullanılarak elde edilen One-Step RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait % 1'lik agaroz jel elektroforez sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), 1: <i>N. rustica</i> -2 (üst yaprak)'dan elde edilen dsRNA, 2: <i>N. glutinosa</i> -2 (üst yaprak)'dan elde edilen dsRNA, 3: Pozitif kontrol olarak kullanılan Çar-Eğri 13 izolatına ait dsRNA	41
Şekil 4.15. CryKaF ve CryNeR primerleri kullanılarak elde edilen One-Step RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait % 1'lik agaroz jel elektroforez sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), 1: <i>N. rustica</i> -2 (1: 3 seyreltilmiş) dsRNA örneği, 2: <i>N. glutinosa</i> -2 (1:5 seyreltilmiş) dsRNA örneği, 3: Pozitif kontrol olarak kullanılan Çar-Eğri 13 izolatına ait dsRNA örneği.....	41

Şekil 4.16. İkinci mekanik inokulasyon çalışmasında inokulum kaynağı olarak kullanılan Trabzon hurması yaprağının A) üst ve B) alt yüzeyinde görülen yaprak yan damarlarında nekroz simptomsu	42
Şekil 4.17. A) Hıyar bitkisinin PeCV ile mekanik inokulasyondan 3 hafta sonra genel görüntüsü B) PeCV ile inokule edilen kotiledon yaprakları.....	43
Şekil 4.18. A) Sağlıklı <i>Nicotiana rustica</i> bitkisi B) <i>N. rustica</i> bitkisinin PeCV ile mekanik inokulasyondan 3 hafta sonra görüntüsü	43
Şekil 4.19. Börülce “Sırma” çeşidinin PeCV ile mekanik inokulasyondan 3 hafta sonra görüntüsü. İnokulen edilen (A) ve edilmemiş (B) olan bitkilerin üst yaprakları....	43
Şekil 4.20. <i>Nicotiana glutinosa</i> (A) ve <i>N. Benthamiana</i> (B) bitkilerinin PeCV ile mekanik inokulasyondan 3 hafta sonra görüntüsü	44
Şekil 4.21. CryKaF ve CryNeR primerleri kullanılarak elde edilen One-Step RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait %1’lik agaroz jel elektroforez sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), 1: Sağlıklı börülce bitkisinden elde edilen dsRNA, 2: İnokule edilen börülce bitkisinin üst yapraklarından elde edilen dsRNA, 3: <i>Nicotiana glutinosa</i> bitkisinin inokule edilen yapraklarından elde edilen dsRNA, 4: <i>N. glutinosa</i> üst yapraklarından elde edilen dsRNA, 5: Çar-Yuk 13 izolatına ait dsRNA (pozitif kontrol).....	44
Şekil 4.22. CryKaF ve CryNeR primerleri kullanılarak elde edilen One-Step RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait %1’lik agaroz jel elektroforez sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), 1: Sağlıklı <i>Nicotiana benthamiana</i> bitkisi, 2: İnokule edilen <i>N. benthamiana</i> bitkisinin ü üst yapraklarından elde edilen dsRNA, 3: <i>Nicotiana rustica</i> bitkisinin inokule edilen yapraklarından elde edilen dsRNA, 4: <i>N. rustica</i> bitkisinin üst yapraklarından elde edilen dsRNA, 5: Hıyar bitkisinden elde edilen dsRNA 6: Çar-Yuk 13 izolatına ait dsRNA (pozitif kontrol)	45
Şekil 4.23. CryKaF ve CryNeR primerleri kullanılarak elde edilen One-Step RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait %1’lik agaroz jel elektroforez sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), 1: İnokule edilen börülce bitkisinin üst yapraklarından elde edilen dsRNA (1:50 seyreltilmiş), 2: <i>Nicotiana glutinosa</i> bitkisinin üst yapraklarından elde edilen dsRNA (1:50 seyreltilmiş) 3: Hıyar bitkisinin yapraklarından elde edilen dsRNA (1:100 seyreltilmiş)	45
Şekil 4.24. PeCpF ve PeCpR primerleri ve Trabzon hurması yapraklarından elde edilen dsRNA’lar kullanılarak elde edilen One-Step RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait %1’lik agaroz jel elektroforez sonucu. 1: Çar-Eğri 3 izolatı, 2: Çar-Eğri 13 izolatı, M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega)	46
Şekil 4.25. PeCpF ve PeCpR primerleri ve Trabzon hurması yapraklarından elde edilen dsRNA’lar kullanılarak elde edilen One-Step RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait %1’lik agaroz jel elektroforez, M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), 1: Çar-Yuk-1 izolatı 2: Çar-Yuk-7 izolatı.....	47
Şekil 4.26. PeCpF ve PeCpR primerleri ve Trabzon hurması yapraklarından elde edilen dsRNA’lar FIREPol® DNA Polimeraz enzimi kullanılarak elde edilen PCR ürünlerine ait %1’lik agaroz jel elektroforez, M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), 1: Çar-Yuk-1 izol izolatı (1:10 sulandırılmış PCR ürünü) 2: Çar-Yuk-7 izolatı (1:10 sulandırılmış PCR ürünü)	48
Şekil 4. 27. Mega 11 Programında Neighbor-Joining Yöntemi kullanılarak PeCV izolatlarının ve bazı cryptic virus izolatlarının kapsid protein gen bölgesi (CP) nükleotit dizi analizine göre filogenetik ilişkileri. Bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri 1000 olarak seçilmiş ve %50’ nin altındaki değerler ağaçta yer almamıştır. Referans izolatları ait bilgiler Tablo 3.6’ da yer almaktadır.	51

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Trabzon Hurmasının Besin Değerleri (Türkomp, 2022).	3
Tablo 1.2. Dünya Trabzon hurması üretiminin ülkelere göre dağılımı (FAO, 2020)	3
Tablo 1.3. Türkiye’de Trabzon hurmasının son 4 yıldaki üretim miktarları (TÜİK, 2021)	4
Tablo 1.4. Türkiye’de Trabzon hurması üretiminin önemli olduğu iller (TÜİK, 2021)	5
Tablo 2.1. <i>Partitiviridae</i> familyasında yer alan virüs cinslerinin konukçu grupları	8
Tablo 2.2. Antiserumu Elde Edilmiş Olan Cryptic Virüsler (Boccardo vd., 1987)	10
Tablo 2.3. Bazı Cryptic Virüsler ve Konukçuları (Boccardo vd., 1987)	12
Tablo 2.4. Trabzon Hurmasında Enfeksiyon Oluşturan Viroid Türleri	14
Tablo 2.5. Trabzon Hurmasında Enfeksiyon Oluşturan Virüsler	14
Tablo 2.6. Trabzon hurmasında Persimmon cryptic virus enfeksiyonu belirlenen ülkelerin listesi.....	17
Tablo 3.1. Mekanik İnokulasyonda Kullanılan Test Bitkileri	20
Tablo 3.2. Samsun İli Çarşamba İlçesinde Trabzon Hurması Kapama Bahçe Üretim Alanları ve Alınması Planlanan Örnek Sayıları.....	21
Tablo 3.3. PeCV-Kapsid Protein (CP) Geninin RT-PCR Yöntemi ile Çoğaltılmasında Kullanılan Primerler	26
Tablo 3.4. Tek Aşamalı RT-PCR Reaksiyon Karışımının İçeriği.....	27
Tablo 3.5. PeCV’nin Tanımlanması ve Kapsid Protein Gen Bölgesinin Çoğaltımı için Kullanılan Tek aşamalı RT-PCR koşulları.....	27
Tablo 3.6. Filogenetik Analizde kullanılan PeCV izolatları	29
Tablo 4.1. Samsun İli Çarşamba İlçesinde Örnek Alınan Trabzon Hurması Kapama Bahçe Üretim Alanları ve Toplanan Örnek Sayıları	30
Tablo 4.2. Trabzon Hurma Yaprak Örneklerine ait Toplam RNA Konsantrasyonları ve A260/280 Değerleri	32
Tablo 4.3. dsRNA İzolasyonunda Kullanılan Simptomlu/Simptomsuz Örnek Miktarları ve RT-PCR Sonuçları.....	32
Tablo 4.4. Test Bitkilerinden Elde Edilen RNA konsantrasyonları ve A260/A280 oranları.	39
Tablo 4.5. FIREPol® DNA Polimeraz enzimi protokolü için kullanılan reaksiyon karışımı	47
Tablo 4.6. FIREPol® DNA Polimeraz enzimi protokolü için kullanılan PCR koşulları.....	47
Tablo 4.7. Persimmon cryptic virus Çar-Eğri 13 İzolatının Nükleotit Blast Analiz Sonuçları.	49
Tablo 4.8. Persimmon cryptic virus Çar-Eğri 13 İzolatının Amino Asit Blast Analiz Sonuçları.....	50

1. GİRİŞ

Farklı iklim koşullarına sahip bir ülke olması, anavatanı Anadolu olmayan birçok meyve türünün Türkiye’de yetişmesini mümkün kılmaktadır. Bu meyvelerden biri, anavatanı Çin olan Trabzon hurması (*Diospyros kaki* L.)’dır. Çin’den diğer ülkelere yayılan Trabzon hurmasının, Türkiye’ye ilk defa Trabzon ilinden giriş yaptığı düşünülmektedir (Özcan, 2005).

Ebenales takımının *Ebenaceae* familyasına ait olan *Diospyros* cinsinin 4 önemli türü bulunmaktadır (Kitagawa ve Glucina, 1984). Bunlar;

Diospyros kaki L.: Anavatanı Çin’dir. Trabzon hurması çeşitlerinin tümünü içermektedir. Taze ve işlenmiş olarak tüketilmektedir.

Diospyros lotus L.: Anavatanı Çin’dir. Anaç ve tanen kaynağı olarak kullanılmaktadır.

Diospyros virginiana L.: Anavatanı Güney Amerika’dır. Taze ve işlenmiş olarak tüketilmekte ve anaç olarak kullanılmaktadır.

Diospyros oleifera Cheng.: Anavatanı Çin’dir. Tanen kaynağı olarak kullanılmaktadır (Onur, 1990).

Trabzon hurmasının (*Diospyros kaki* L.) cins ismi Antik Yunanca’da “Tanrının Meyvesi”, tür adı ise Japonca’da “Hurma” anlamına gelmektedir. Trabzon hurması dünyanın önemli bir bölümünde ‘‘Kaki’’ olarak adlandırılırken, Amerika’da ‘‘Persimmon’’ olarak bilinmektedir (Yönel vd., 2008). Ülkemizde ise Cennet meyvesi, Amme, Aşılı uvaz, Hurma, Laz hurması, Japon hurması, Akdeniz hurması gibi değişik isimler verilmektedir (Onur, 1990).

Trabzon hurması, kazık kök ve az miktarda saçak kök sistemine sahiptir. Ağaç boyu 8-12 m arasında değişiklik gösterebilmektedir. Yaprakları düz kenarlı olup, oval veya sivri şekillidir. Yaprak sapı kısadır. Sonbaharda yaprakları turuncu- kırmızı renge dönüştüğünden süs bitkisi olarak da tercih edilmektedir. Kışın yapraklarını döken bir ağaçtır. Çiçek yapısı, erdişi veya erselik (dişi ve erkek organını birlikte içeren) çiçek, dişi ve erkek çiçek olmak üzere 3 tiptir (Onur, 1990; Özcan, 2018). Dişi çiçekler, bir yıllık yan dallar üzerinde yaprak koltuklarında bulunmaktadır. Erkek çiçekler ise sürgünlerin yaprak koltuklarında tekli, ikili ve üçlü salkım şeklinde bulunmaktadır

(Şekil 1.1). Erselik çiçekler genellikle erkek çiçekler arasında üçlü çiçek salkımının orta kısmında oluşmaktadır. Meyve veriminde dişi çiçekler önemli olup, erselik çiçeklerin etkisi önemsizdir.

Trabzon hurması çeşitlerine göre meyve şekilleri; konik, yuvarlak ve basık olabilmektedir. Meyveleri, turuncu veya turuncu-kahverengi-kırmızımsı renktedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Trabzon hurmasında erkek çiçek ve meyve yapısı

Meyvelerinin çekirdekli ve çekirdeksiz olma durumu, dölleme şekillerine bağlıdır. Hasat döneminde yenilebilme durumuna göre meyveler iki gruba ayrılır:

1- Meyve eti buruk olan çeşitler: Hasat döneminde buruk olup, yeme uygunluğuna getirildikten sonra tüketilmektedir.

2- Meyve eti buruk olmayan çeşitler: Hasat döneminde sert olup, tüketilebilmektedir (Kitagawa ve Glucina, 1984).

Trabzon hurması, sindirim sistemi ve kalp-damar hastalıklarına faydalı, yüksek tanen barındırmasıyla bağışıklık sistemini güçlendirmede, mide gastritini önlemede, bağırsak iltihabını iyileştirmede, ishali önlemede, kansızlık ve vitamin eksikliğinin giderilmesinde olumlu etkilere sahiptir (Karadeniz, 2004).

Trabzon hurması birçok besin ögesi bakımından, özellikle A vitamini ve potasyumca zengin bir meyve türüdür (Tablo 1.1). Ayrıca meyve eti içinde damar şeklinde lifler barındırmaktadır ve diyet lifi olarak adlandırılan bu lifler sindirilmemesine rağmen sindirim sisteminin rahat çalışması için oldukça önemlidir (Cemeroğlu vd., 2001).

Tablo 1.1. Trabzon Hurmasının Besin Değerleri (Türkomp, 2022).

Besin Değeri	100 gramda (Ortalama)
Kalori	71 kcal
Karbonhidrat	15.30 g
Lif	6.61 g
Protein	0.66 g
Yağ	0.08 g
Kolesterol	0.0 mg
A vitamini	21 RE
C vitamini	8.9 mg
Potasyum	159 mg
Kalsiyum	12 mg
Demir	0.25 mg

Trabzon hurması, ilkbaharda geç çiçeklenen subtropikal bir meyve ağacıdır. Bu ağaçlar geç çiçeklendiği için ilkbahar donlarından etkilenmez. Bununla birlikte kışın yaprağını dökerek, -12°C ve bazı çeşitleri -18°C'ye kadar düşük sıcaklıklara dayanabilir (Onur, 1990).

Trabzon hurmasının başta Çin, Kore, Japonya olmak üzere dünyanın değişik bölgelerinde üretimi yapılmaktadır (Tablo 1.2). Türkiye üretim miktarı bakımından dünyada 8. sıradadır.

Tablo 1.2. Dünya Trabzon hurması üretiminin ülkelere göre dağılımı (FAO, 2020)

Ülkeler	Üretim (Ton)
Çin	3.342.059
Kore	198.817
Japonya	193.200
Azerbaycan	185.247
Brezilya	158.687
Özbekistan	105.122
Tayvan	69.708
Türkiye	60.661
İran	30.244
İsrail	21.908
Nepal	2.574
Yeni Zelanda	1.895
Avustralya	736
Şili	679
Meksika	198

Türkiye'nin hem iç bölgelerindeki illerinde hem de deniz kenarındaki illerinde Trabzon hurması yetiştiriciliği yapmak mümkündür (Şekil 1.2). Ülkemizde, Trabzon hurması üretimi çok eskiden beri yapılıyor olsa da henüz istenilen seviyeye

ulaşılmamıştır. Ancak yıllara göre üretim miktarı sürekli artış göstermektedir (Tablo 1.3) (TÜİK, 2021).



Şekil 1.2. Türkiye’de Trabzon hurması üretimi yapılan iller

Tablo 1.3. Türkiye’de Trabzon hurmasının son 4 yıldaki üretim miktarları (TÜİK, 2021)

Yıllar	Üretim (Ton)
2017	38.043
2018	46.676
2019	51.371
2020	60.661

En son 2020 yılında Türkiye’de 60.661 ton Trabzon hurması üretimi elde edilmiştir (TÜİK, 2021). Adana, Adıyaman, Mersin, İzmir illeri toplam üretimin %50’ den fazlasını gerçekleştirmektedir (Tablo 1.4).

Samsun ilinde, kapama bahçe şeklinde Trabzon hurması üretimi sadece Çarşamba ilçesinde yapılmaktadır. Çarşamba ilçesi sınırları içerisinde toplam 103.5 dekarlık alanda, 694 ton üretim elde edilmiştir (TÜİK, 2021).

Tablo 1.4. Türkiye’de Trabzon hurması üretiminin önemli olduğu iller (TÜİK, 2021)

İller	Üretim miktarı (Ton)
Adana	13.802
Adıyaman	8.089
Mersin	7.260
İzmir	4.580
Yalova	4.150
Denizli	3.523
Hatay	2.853
Çanakkale	2.257
Bursa	2.112
Kahramanmaraş	1.878

Trabzon hurmasında görülen hastalık ve zararlılar nedeniyle verim kayıpları meydana gelmektedir. Bakteriyel ve fungal hastalıkların yanı sıra Trabzon hurmasında son zamanlarda viral etmenlerin de hastalık oluşturduğu tespit edilmiştir. Trabzon hurmasında günümüze kadar 5 viroid (Citrus viroid VI, Apple fruit crinkle viroid, Persimmon latent viroid, Persimmon viroid ve Persimmon viroid 2) (Nakaune ve Nakano, 2008; Owens vd., 2012; Ito vd., 2013; Ruiz-Garcia vd., 2017; King vd., 2018) ve 8 virüs türü (Persimmon virus A, Persimmon latent virüs, Persimmon virus B, Passiflora latent virus, Persimmon ampelovirus, Persimmon polerovirus, Persimmon waikavirus ve Persimmon cryptic virus) (Ito vd., 2013; King vd., 2018; Cho vd., 2020; Ito ve Sato, 2020; Morelli vd., 2014; Morelli vd., 2015) belirlenmiştir. Bu virüsler arasında, Trabzon hurması kriptik virüsü (Persimmon cryptic virus; PeCV) ilk olarak İtalya’nın Apulia bölgesinde saptanmıştır (Morelli vd., 2015). Daha sonra Türkiye’de ilk kez, Dünya’da ise ikinci olarak Samsun ilinde bir bahçede belirlenmiştir (Morelli ve Arli-Sökmen, 2016).

PeCV, *Partitiviridae* familyası, *Deltapartitivirus* cinsine ait bir virüs türüdür. PeCV partikülleri, izometrik şekilli ve 30 nm çapındadır (Morelli vd., 2012). Virüsün çift sarmallı RNA (dsRNA) ve iki parçalı genom yapısı bulunmaktadır. RNA1, replikasyondan sorumlu bölgeyi (RdRp) içerirken, RNA2 ise kılıf proteininden (CP) sorumlu bölgeyi kodlamaktadır (Morelli vd., 2015). Virüsün günümüzde ticari bir antiserumu bulunmadığından, serolojik olarak teşhisi ve tanısı mümkün değildir. Bu nedenle tanılamada moleküler yöntemler kullanılmaktadır.

Deltapartitivirus cinsi üyeleri konukçularında genellikle latent (simptomsuz) enfeksiyon oluşturmaktadır (Morelli vd., 2015). PeCV de enfekteli bitkilerin yapraklarında simptomsuz veya simptomsuz olarak bulunabilmektedir. Simptomsuz ağaçlarda, özellikle yan damarlarda nekroz şeklinde simptomlar gözlenebilmektedir.

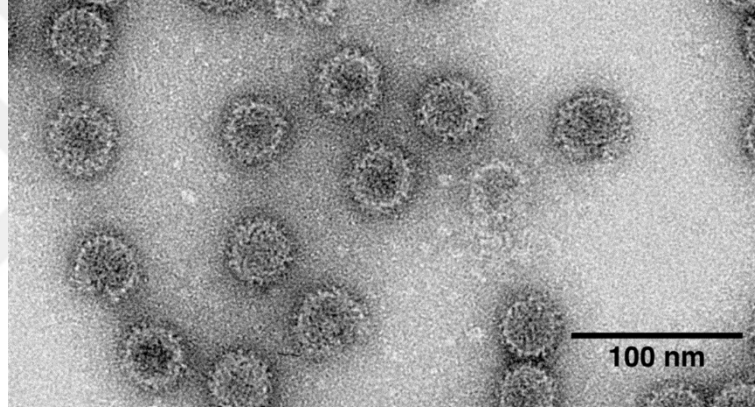
Bu tez çalışmasında, Samsun ilinde kapama bahçe olarak Trabzon hurması üretimi yapılan alanlarda, PeCV'nin tanısı, bulaşıklık durumu ile moleküler ve biyolojik özelliklerinin belirlenmesi, dsRNA izolasyonu ve RT-PCR yöntemlerinin PeCV tanısında uygulanabilirliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. *Partitiviridae* Familyası

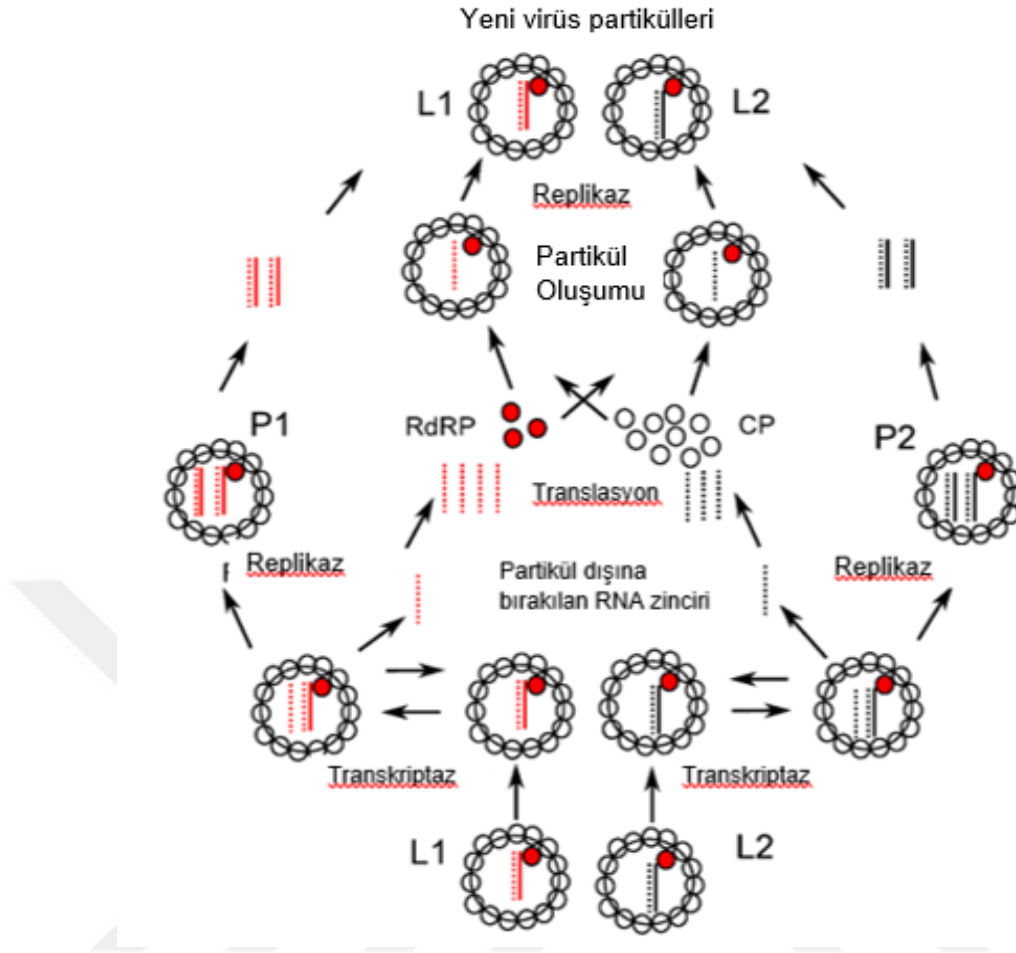
Partitiviridae familyasına ait virüs türleri, yaklaşık 25-43 nm çapında izometrik membransız (zarflı olmayan) partiküllere sahiptir (Şekil 2.1). Genom yapısı, çoğunlukla iki, bazen üç parçalı linear 1.4-2.4 kbp büyüklüğünde çift sarmal RNA (dsRNA) içerir ve her bir dsRNA ayrı partikül içerisine yerleşmiştir. Yüz yirmi adet kapsid protein (CP) birimi bir araya gelerek, virüs parikülünün kapsid kısmını meydana getirir (Ochoa vd., 2008). Bir veya iki molekül replikaz (RdRp; RNA-dependent RNA polimeraz) enzimi her bir partikül içerisine paketlenmiştir (Nibert vd., 2014). Bazı partitivirüsler ilave satellit veya hatalı (defective) dsRNA molekülleri içerir.



Şekil 2.1. *Penicillium stoloniferum virus S* (*Gammapartitivirus* Cinsi, *Partitiviridae* familyası) partiküllerinin elektron mikroskop görüntüsü (ICTV, 2018)

Aynı virüs türünde her iki dsRNA'nın 5'ucundan ilk 7-20 nükleotidlik bölge oldukça konservatif özelliktedir. *Partitiviridae* familyasında replikasyon sitoplazmada gerçekleşir. *Penicillium stoloniferum virus S*'ün konukçu hücrede replikasyon aşamaları Şekil 2.2'de örnek olarak verilmiştir.

Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV) tarafından, *Partitiviridae* içine dahil edilmiş olan virüs türleri 5 cinse (*Alphapartitivirus*, *Betapartitivirus*, *Gammapartitivirus*, *Deltapartitivirus*, *Cryspovirus*) ayrılmıştır. Yeni virüslerin keşfedilmesiyle birlikte bu familyadaki üye sayısı artmaktadır. *Partitiviridae* familyasında cins düzeyinde taksonomik olarak ayrılmış 45 virüs türü bulunurken, cinsi belirli olmayan 15 tür virüs mevcuttur. *Partitiviridae* familyasındaki cinsler konukçu grubuna göre ayrılmıştır (Tablo 2.1). Bu familya; konukçuları fungus, bitki ve protozoa olan virüs türlerini içermektedir (Nibert vd., 2009).



Şekil 2.2. *Penicillium stoloniferum* virus S (PsV-S) replikasyon modeli. Virüs partikülleri RdRp enziminin (kırmızı daire) bir veya iki kopyasını içerir. dsRNA (siyah çizgi) kapsid proteinini (CP), diğer dsRNA (kırmızı çizgi) RdRp'yi kodlar. Pozitif zincir kesikli çizgi, negatif zincir düz çizgi ile gösterilmiştir. Her virüs partikülü içerisinde, RdRp enzimi negatif zinciri kalıp olarak kullanarak pozitif zinciri sentezler. Yeni pozitif zincir partikülde kalır, orjinal parental pozitif zincir partikülden serbest bırakılır ve konukçu hücre ribozomunda CP'yi ve RdRp'yi sentezler veya yeni virüs partikülü içerisine yerleşir. Burada da pozitif sarmal üzerinden RdRp'nin negatif zinciri sentezlediği kanısı yaygındır. L1 ve L2 partiküllerinin, ikili dsRNA molekülü içeren P1 ve P2 partiküllerinden oluştuğu düşünülmektedir (ICTV , 2018).

Tablo 2.1. *Partitiviridae* familyasında yer alan virüs cinslerinin konukçu grupları

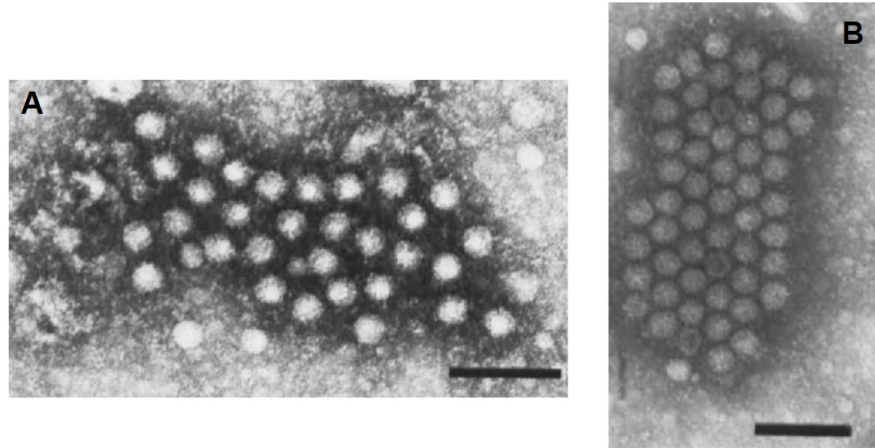
Cins	Bitkiler	Fungus	Protozoa
<i>Alphapartitivirus</i>	+	+	
<i>Betapartitivirus</i>	+	+	
<i>Gammapartitivirus</i>		+	
<i>Deltapartitivirus</i>	+		
<i>Cryspovirus</i>			+

2.2. Cryptic Virüs Kavramı

Partitiviridae familyasında bitki bünyesinde simptom oluşturmada veya hafif simptom oluşturarak varlığını sürdüren virüs türleri bulunmaktadır. Bu tür virüsler, Cryptic virüsler veya Cryptovirus'ler olarak da adlandırılırlar (Nibert vd., 2014). Bitkilerde saptanan Cryptic virüsler, ilk olarak 1960-1970 yılları arasında belirlenmiş ve *Partitiviridae* familyasında sınıflandırılmıştır (Fauquet vd., 2005).

Cryptic virüsler, *Partitiviridae* familyası içerisinde yer aldıkları için genel özellikleri birbirlerine benzemektedir. Cryptic virüslerin partikülleri küçük izometrik şekilli olup, çaplarına göre iki gruba ayrılmaktadır:

- a) 29-32 nm çapında olan virüsler,
- b) 37-38 nm çapında olan virüsler (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. A) 29-32 nm çapında ve B) 37-38 nm çapındaki partiküllerin elektron mikroskop görüntüsü

Cryptic virüslerin kılıf proteinleri oldukça immünojeniktir. Bu yüzden istenilmeyen serolojik çapraz reaksiyonlara ve yanlış tanımlamalara neden olabilir (Luisoni vd., 1987). Cryptic virüsler, bitki bünyesinde genel olarak düşük konsantrasyonlarda bulunduklarından dolayı saflaştırılmaları zordur. Antiserum üretiminde kullanılan virüsün oldukça saf elde edilmesi önemli olduğu için çoğu Cryptic virüslerin antiserumu bulunmamaktadır. Diğer bazı Cryptic virüslerin ise antiserumu elde edilmiştir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Antiserumu Elde Edilmiş Olan Cryptic Virüsler (Boccardo vd., 1987)

Virüs	Kısaltma	Referans
Alfalfa cryptic virus	ACV	Torino vd., Yayınlanmadı
Beet cryptic virus	BCV	Kassanis vd., 1977
Carnation cryptic virus	CarCV	Lisa vd., 1981
Hop trefoil cryptic virus	HTCV	Torino vd., Yayınlanmadı
Ryegrass cryptic virus	RGCV	Luisoni ve Milne, 1981
Vicia cryptic virus	VCV	Kenten vd., 1981
White clover cryptic virus 1	WCCV-1	Boccardo vd., 1985
White clover cryptic virus 2	WCCV-2	Boccardo vd., 1985
White clover cryptic virus 3	WCCV-3	Torino vd., Yayınlanmadı

Cryptic virüsler, geçmişte mikovirüsler ile karıştırılmışlardır. Ancak daha sonra bitki dokularında yeni Cryptic virüslerin bulunmasıyla bunların mikovirüsler ile ilişkili olmadığı anlaşılmıştır. Boccardo vd. (1985), White clover cryptic virus 1 ve 2 (WCCV-1 ve WCCV-2)' yi içeren bitkilere yüksek seviyede sistemik-kontakt fungusit uygulaması yapmışlardır. Fungisit uygulaması sonucunda bitki bünyesinde virüs konsantrasyonunun azalmadığını belirlemişlerdir. Ayrıca, sterilize edilmiş tohumların fidelerinde de aynı sonuca ulaşmışlardır. Böylelikle, WCCV-1 ve WCCV-2'nin fungus ile ilişkili olmadan bitkiyi enfekte ettiği saptanmıştır. Bu çalışma, Cryptic virüsler ve mikovirüslerin birbirlerinden farklı olduğunu gösteren ilk çalışmadır.

2.3. Cryptic Virüslerin Konukçuları

Cryptik virüslerin, konukçuları ile parazit ilişkiden ziyade kommensal veya mutualistik ilişki kurdukları gözlenmiştir (Rossinck, 2008). Bundan dolayı, birçoğu konukçularında ekonomik açıdan önemli bir hastalık oluşturmadıkları için Cryptic virüslere çok fazla araştırma önceliği verilmemiştir.

Cryptic virüsler genellikle bulundukları konukçularına göre isim almaktadırlar. Birçok farklı bitki türlerinde Cryptic virüslerin var olduğu bilinmektedir. Ayrıca bir konukçuda birden fazla Cryptic virus türü bulunabilmektedir (Tablo 2.3).

2.4. Cryptic Virüslerin Konukçularında Oluşturdukları Simptomlar

Simptom, virüs ve konukçu bitki arasındaki etkileşim sonucunda oluşmaktadır. Ancak bazı bitki virüsleri konukçularında simptomsuz olarak bulunabilmektedir. Simptomsuz enfeksiyonlar genel olarak latent enfeksiyon olarak da adlandırılmaktadır.

Cryptic virüsler, bitkilerde genellikle simptomsuz olarak bulunabildikleri gibi, bazı durumlarda simptom meydana getirebilmektedirler. Örneğin, Beet cryptic virus (BCV) enfekte ettiği şekerpancarı fidelerinin bazılarının bodur kalmasına, geçici hafif yaprak klorozuna ve 12 haftalık fidelerde daha küçük kök oluşumuna neden olmuştur (Kassanis vd., 1978).

Rose cryptic virus 1 (RoCV1), asimptomatik enfeksiyon oluşturabilmesinin yanı sıra yapraklarda beneklenme, leke ve nekroz meydana getirebilmektedir. Ancak bu gözlemlenen simptomların test sırasında tespit edilemeyen virüslerden de kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Milleza vd., 2013).

Pittosporum cryptic virus 1 (PiCV1)'in, yıldız çalısı bitkisinde klorotik damar bantlaşmasına neden olduğu belirlenmiştir (Abou Kubaa vd., 2019).

2.5. Cryptic Virüslerin Taşınması

2.5.1. Tohumla taşınma

Cryptic virüsler, yüksek oranda tohum yoluyla bulaşırlar. Bitkide bulunan hem dişi organın hem de erkek organın cryptic virüs ile bulaşık olması durumunda, oluşacak olan yeni nesil fide %100 enfekteli olabilir.

BCV %42-%90 (Kassanis vd., 1977; White ve Woods, 1978); VCV %50-%75 (Kenten vd., 1978); CarCV %85-%100 (Lisa vd., 1981); WCCV-1 %35-%74 ve WCCV-2 %15-%41 (Boccardo vd., 1985) oranlarında tohumla taşınabilmektedir.

Tablo 2.3. Bazı Cryptic Virüsler ve Konukçuları (Boccardo vd., 1987)

Virüs Türü	Konukçu	Cins	Referans
Alloteropsis cryptic virus 1 (AICV1)	<i>Alloteropsis semialata</i>	-	Jo ve Cho, 2020
Amaranthus cryptic virus 1 (AICV1)	<i>Amaranthus tuberculatus</i>	-	Jo ve Cho, 2020
Beet cryptic virus 1 (BCV1)	<i>Beta vulgaris</i>	<i>Alphapartitivirus</i>	Natsuaki vd., 1986
Beet cryptic virus 2 (BCV2)	<i>Beta vulgaris</i>	<i>Deltapartitivirus</i>	Natsuaki vd., 1986
Beet cryptic virus 3 (BCV3)	<i>Beta vulgaris</i>	<i>Deltapartitivirus</i>	Xie vd., 1993
Cannabis cryptic virus (CanCV)	<i>Cannabis sativa</i>	<i>Betapartitivirus</i>	Ziegler vd., 2011
Carrot cryptic virus (CaCV)	<i>Daucus carota</i>	<i>Alphapartitivirus</i>	Natsuaki vd., 1983
Citrullus lanatus cryptic virus (CiCV)	<i>Citrullus lanatus</i>	<i>Deltapartitivirus</i>	Xin vd., 2017
Crimson clover cryptic virus 2(CCCV2)	<i>Trifolium incarnatum</i>	<i>Betapartitivirus</i>	Lesker vd., 2013
Cucumis melo cryptic virus (CmCV)	<i>Cucumis melo</i>	<i>Deltapartitivirus</i>	Zhan vd., 2019
Fig cryptic virus (FCV)	<i>Ficus carica</i>	<i>Deltapartitivirus</i>	Elbeaino vd., 2011
Helianthus cryptic virus 1 (HCV1)	<i>Helianthus niveus</i>	-	Jo ve Cho, 2020
Hop trefoil cryptic virus (HTCV)	<i>Medicago lupulina</i>	<i>Betapartitivirus</i>	Luisoni vd., 1987
Lomandra cryptic virus 1 (LCV1)	<i>Lomandra longifolia</i>	<i>Deltapartitivirus</i>	Jo ve Cho, 2020
Mulberry cryptic virus 1 (MuCV1)	<i>Morus alba</i>	-	Skelton vd., 2018
Pepper cryptic virus 1 (PCV-1)	<i>Capsicum annuum</i>	<i>Deltapartitivirus</i>	Sabanadzovic vd., 2011
Pepper cryptic virus 2 (PCV-2)	<i>Capsicum annuum</i>	<i>Deltapartitivirus</i>	Sabanadzovic vd., 2011
Pyrus pyrifolia cryptic virus (PpCV)	<i>Pyrus pyrifolia</i>	<i>Alphapartitivirus</i>	Osaki ve Sasaki, 2017
Raphanus sativus cryptic virus 4 (RsCV-4)	<i>Raphanus sativus</i>	<i>Alphapartitivirus</i>	Svanella-Dumas vd., 2018
Red clover cryptic virus 2 (RCCV-2)	<i>Trifolium pratense</i>	<i>Betapartitivirus</i>	Boccardo vd., 1983
Rosa multiflora cryptic virus (RMCV)	<i>Rosa multiflora</i>	-	Salem vd., 2008
Spinach cryptic virus 1 (SpCV-1)	<i>Spinacia oleracea</i>	<i>Alphapartitivirus</i>	Park ve Hahn, 2017
Vicia cryptic virus (VCV)	<i>Vicia faba</i>	<i>Alphapartitivirus</i>	Abou-Elnasr vd., 1985
White clover cryptic virus 1 (WCCV-1)	<i>Trifolium repens</i>	<i>Alphapartitivirus</i>	Boccardo vd., 1985
White clover cryptic virus 2 (WCCV-2)	<i>Trifolium repens</i>	<i>Betapartitivirus</i>	Boccardo vd., 1985

2.5.2. Mekanik olarak bitki özsuyu ile taşınma

Mekanik taşınma ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda, Cryptic virüslerin bitki özsuyu ile bulaşmasının pek mümkün olmadığı belirtilmiştir. Örneğin; Beet cryptic virus (BCV)'ün şeker pancarı bitkisine mekanik inokulasyon yoluyla bulaştırılamadığı saptanmıştır (Kassanis vd., 1997).

Lisa vd. (1980), Carnation cryptic virus (CarCV)'ün karanfil dahil 6 adet Caryophyllaceae familyasında yer alan bitkiye ve 8 adet diğer test bitkilerine mekanik inokulasyon yöntemiyle bulaştırılamadığını belirtmişlerdir.

2.5.3. Aşı yoluyla taşınma

Cryptic virüslerin aşı yoluyla taşınması konusu tam olarak bilinmemekle birlikte, yapılan bazı çalışmalarda bazı türlerin aşı ile taşındığı görülmektedir. Örneğin; Vitis cryptic virus (VCV) ile enfekte olmuş asma tomurcukları, 2 yaşında VCV içermeyen asma fidelerine aşılanmıştır. Daha sonra RT-PCR ile VCV'nin aşı yoluyla taşınabileceği doğrulanmıştır (Xudong ve Ren, 2022).

2.5.4. Vektör ile taşınma

Cryptic virüslerin taşınmasında etkili olan vektör türleri belirlenmiş değildir. Kassanis vd. (1977), Beet cryptic virus (BCV)'ün *Myzus persicae* ile taşınmadığını bildirmişlerdir. Vicia cryptic virus (VCV) (Kenten vd., 1978) ve Carnation cryptic virus (CarCV) (Lisa vd., 1980) türlerinin de yaprak bitleri ile taşınmadığı saptanmıştır. Bunun yanı sıra, Cryptic virüslerin fungus, nematod gibi diğer muhtemel vektörlerle taşınması araştırılmamıştır. Bu yüzden diğer vektörler ile taşınma potansiyeli bulunduğu için bu konuda çalışmalar yapılmalıdır.

2.5.5. Küsküt ile taşınma

Yapılan çalışmalar sonucunda, Cryptic virüslerin küsküt ile bulaşmadığı belirlenmiştir. Örneğin, Kassanis vd. (1977), Beet cryptic virus (BCV)'ün; Kenten vd. (1979) ve Abou-Elnasr vd. (1985), Vicia cryptic virus (VCV)'ün küsküt ile taşınmadığını bildirmişlerdir.

2.6. Trabzon Hurmasında Enfeksiyon Oluşturan Virüs ve Viroid Türleri

Günümüze kadar Trabzon hurmasının, Citrus viroid VI (CVd- VI), Apple fruit crinkle viroid (AFCVd), Persimmon latent viroid (PLVd) ve Persimmon viroid

(PeVd), Persimmon viroid 2 (PeVd 2) olmak üzere toplam 5 viroid tarafından enfekte edildiği belirlenmiştir (Nakaune ve Nakano, 2008; Owens vd., 2012; Ito vd., 2013; Ruiz-Garcia vd., 2017; King vd., 2018) (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. Trabzon Hurmasında Enfeksiyon Oluşturan Viroid Türleri

Viroid Türü (Kısaltması)	Cinsi	Familyası
Citrus viroid VI (CVd- VI) (Sinonim: Citrus viroid OS)	<i>Apscaviroid</i>	<i>Pospiviroidae</i>
Apple fruit crinkle viroid (AFCVd)	<i>Apscaviroid</i>	<i>Pospiviroidae</i>
Persimmon latent viroid (PLVd) (Sinonim: Persimmon viroid)	<i>Apscaviroid</i>	<i>Pospiviroidae</i>
Persimmon viroid (PeVd)	<i>Apscaviroid</i>	<i>Pospiviroidae</i>
Persimmon viroid 2 (PeVd 2)	<i>Apscaviroid</i>	<i>Pospiviroidae</i>

Diğer taraftan Trabzon hurmasında şu ana kadar sekiz virüs türü belirlenmiştir. Bunlar, Persimmon virus A (PeVA), Persimmon latent virus (PeLV), Persimmon virus B (PeVB), Passiflora latent virus (PLV), Persimmon ampelovirus (PAmpV), Persimmon polerovirus (PPoIV), Persimmon waikavirus (PWaiV) ve Persimmon cryptic virus (PeCV)'tür (Ito vd.,2013; King vd., 2018; Cho vd., 2020; Ito ve Sato, 2020; Morelli vd, 2014; Morelli vd., 2015) (Tablo 2.5).

Tablo 2.5. Trabzon Hurmasında Enfeksiyon Oluşturan Virüsler

Virüs Türü (Kısaltması)	Cins	Familiya
Persimmon virus A (PeVA)	<i>Cytorhvirüsovirus</i>	<i>Rhabdoviridae</i>
Persimmon latent virus (PeLV)	<i>Carlavirus</i>	<i>Betaflexiviridae</i>
Persimmon virus B (PeVB)	<i>Olivavirus</i>	<i>Closteroviridae</i>
Passiflora latent virus (PLV)	<i>Carlavirus</i>	<i>Betaflexiviridae</i>
Persimmon ampelovirus (PAmpV)	<i>Ampelovirus</i>	<i>Closteroviridae</i>
Persimmon polerovirus (PPoIV)	<i>Polerovirus</i>	<i>Luteoviridae</i>
Persimmon waikavirus (PWaiV)	<i>Waikavirus</i>	<i>Secoviridae</i>
Persimmon cryptic virus (PeCV)	<i>Deltapartitivirus</i>	<i>Partitiviridae</i>

2.6.1. Persimmon virus A (PeVA)

Rhabdoviridae familyası içerisinde yer alan PeVA, Trabzon hurması için bu familyaya ait ilk virüs türüdür. Bu virüsün, negatif özellikte tek sarmal RNA içeren, *Cytohabdovirus* cinsine ait olduğu belirlenmiştir.

Ito vd. (2013), sekans analizi sonucunda, Japonya’da Trabzon hurması sürgün uçlarında bozukluk görülen ağaçların PeVA ile enfekteli olduğunu ilk olarak belirlemişlerdir.

2.6.2. Persimmon virus B (PeVB)

PeVB, *Closteroviridae* familyasına ait *Olivavirus* cinsi içerisinde yer almaktadır. Bu virüs, pozitif özellikte tek sarmal RNA içermektedir.

Ito vd. (2015), Trabzon hurması yaprak dokusunda yaptıkları çalışmada, PeVB’ nin dört farklı varyanttan oluşabileceğini öne sürmüşlerdir.

2.6.3. Passiflora latent virus (PLV)

PLV, *Betaflexivirade* familyasına ait *Carlavirus* cinsinin bir üyesidir. Bu virüs pozitif özellikte, tek sarmal RNA içermektedir.

Cho vd. (2020), Kore’de Trabzon hurması yetiştiriciliği yapılan bahçelerde mozaik, kıvrılma ve nekroz içeren 21 ağacın PLV ile enfekteli olduğunu saptamışlardır.

2.6.4. Persimmon ampelovirus (PAmpV)

Closteroviridae familyasına ait *Ampelovirus* cinsi içerisinde yer alan PAmpV, pozitif özellikte tek sarmal RNA içermektedir.

Ito ve Sato (2020), zayıf gelişim gösteren 20 adet Trabzon hurması ağacının ve iyi gelişim gösteren 14 ağacın dört tanesinin PAmpV ile enfekteli olduğunu RT-PCR yöntemi ile belirlemişlerdir.

2.6.5. Persimmon polerovirus (PPolV)

PPolV, *Luteoviridae* familyası içerisinde yer alan pozitif özellikte tek sarmal RNA içeren bir virüs türüdür. Bu virüsün, *Polerovirus* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Ito ve Sato (2020), zayıf gelişen 20 adet Trabzon hurması ağacının ve iyi gelişen 10 ağacın PPolV ile enfekteli olduğunu RT-PCR yöntemi ile saptamışlardır.

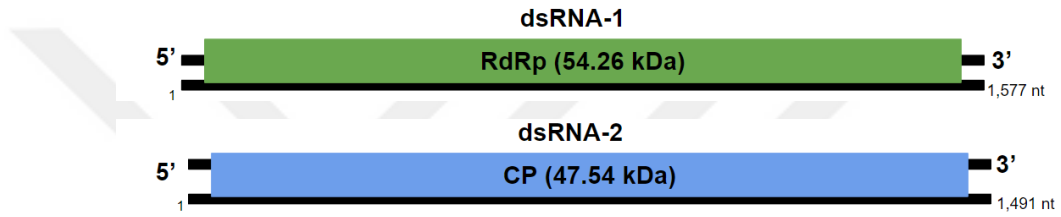
2.6.6. Persimmon waikavirus (PWaiV)

PWaiV, *Secoviridae* familyasına ait *Waikavirus* cinsi içerisinde yer alan bir virüs türüdür. Bu virüsün, pozitif tek sarmal RNA içerdiği belirlenmiştir.

Ito ve Sato (2020), zayıf gelişim gösteren 11 adet Trabzon hurması ağacının PWaiV ile enfekteli olduğunu RT-PCR yöntemi ile belirlemişlerdir.

2.6.7. Persimmon cryptic virus (PeCV)

Persimmon cryptic virus (PeCV) *Partitiviridae* familyası, *Deltapartitivirus* cinsine ait bir virüs türüdür. PeCV partikülleri, izometrik şekilli ve 30 nm çapındadır (Morelli vd., 2012). Virüsün çift sarmallı RNA (dsRNA) ve iki parçalı genom yapısı bulunmaktadır. Bu iki parçalı genomik yapı monosistroniktir. 1.510 bp'lik RNA1 replikasyondan sorumluyken (RdRp), 1.491 bp'lik RNA2 ise kılıf proteininden (CP) sorumlu bölgeyi kodlamaktadır (Morelli vd., 2015) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Persimmon cryptic virus'ün iki parçalı genom yapısı (Morelli vd.,2015)

PeCV'nin günümüzde ticari bir antiserumu bulunmadığından, serolojik olarak teşhisi ve tanısı mümkün değildir. Bu nedenle tanımlamada moleküler yöntemler kullanılmaktadır.

PeCV enfekteli bitkilerin yapraklarında simptomlu veya simptomsuz olarak bulunabilmektedir. Simptomlu ağaçlarda özellikle yaprak yan damarlarında nekroz şeklinde belirtiler gözlemlenmektedir (Şekil 2.5).

PeCV, dünyada ilk olarak İtalya'nın Apulia bölgesinde Trabzon hurmasında Morelli vd., (2012) tarafından tespit edilmiştir. PeCV'nin sınırlı sayıda ülkede görülmeye başladığına dair ilk raporlar bulunmaktadır (Tablo 2.6).

Morelli vd. (2015), inokulum kaynağı olarak simptom gösteren Trabzon hurması yaprağından izole ettikleri PeCV'ü birkaç konukçuya inokule etmişlerdir. Takiben 4 haftalık bir gözlem yapmışlardır. Bu konukçular üzerinde hiçbir simptome rastlamamışlardır. Bunun sonucunda, PeCV'nin mekanik olarak taşınmadığını ve taşınmanın horizontal bir şekilde gerçekleştiğini belirtmişlerdir.



Şekil 2.5. Persimmon cryptic virus'ün Trabzon hurması yaprağında oluşturduğu damar nekrozu (Chiumenti vd., 2015)

Tablo 2.6. Trabzon hurmasında Persimmon cryptic virus enfeksiyonu belirlenen ülkelerin listesi

Ülke	Yıl	Referans
İtalya	2012	Morelli vd.
Türkiye	2016	Morelli ve Arlı-Sökmen
Kore	2016	Cho vd.
İspanya	2017	Ruiz-García vd.
Güney Amerika	2018	Gregory vd.
Kuzey Makedonya	2019	Jevremović vd.

Samsun ili Çarşamba ilçesinde bulunan Trabzon hurması bahçesinde yürütülen bir çalışmada, ağaçların yaprak damarlarında nekrotik çizgilenme şeklinde virüs-benzeri semptomlara rastlanmıştır. Bu semptomlu ağaçlardan hem yaprak hem de sürgün örneği alınmıştır. Alınan örnekler PeCV'nin RNA-2 tarafından kodlanan kılıf protein bölgesine özgü primer çifti kullanarak RT-PCR yöntemi ile test edilmiştir. Agaroz jel elektroforez yöntemi sonucunda, beklenen büyüklükte (144 bp) DNA fragmenti elde edilmiştir. Elde edilen PCR ürünü, pSC-A-amp/kan vektörüne klonlanmış ve sonrasında PeCV' nin kısmi baz dizisi elde edilmiştir. Çalışma sonucunda, BLAST analizi ile Samsun izolatının İtalyan izolatı SSPI (HE805114) ile %96 oranında nükleotit düzeyinde benzerliğe sahip olduğu ortaya konulmuştur (Morelli ve Arlı-Sökmen, 2016).

Cho vd. (2016), Kore'de PeCV ve PeVA'nın varlığını belirlemek için ticari olarak Trabzon hurması üretimi yapılan bahçelerden toplam 77 adet ağaç incelemişlerdir. İki adet nekrozlu yaprak, 1 adet mozayikli yaprak ve 74 adet semptomsuz yaprak örneği toplamışlardır. dsRNA izolasyonu ve gen-spesifik primerler kullanarak uygulanan RT-PCR sonucunda, 67 örneğin PeCV, 11 örneğin

PeVA ve 9 örneğin hem PeCV hem de PeVA ile enfekteli olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmada elde edilen izolatlar BLAST analizi ile karşılaştırıldığında, %99 oranında İtalyan PeCV izolatı SSPI (HE805114) ve %98 oranında Japon PeVA izolatı (AB735628) ile benzerlik gösterdiklerini saptamışlardır.

Ruiz-García vd. (2017), İspanya'nın Akdeniz bölgesinde bulunan Trabzon hurması ağaçlarından 5 adet semptomlu ve 5 adet semptomsuz örnek alıp analiz etmişlerdir. RT-PCR için PeCV'nin spesifik primerlerini (CryKaF ve CryNeR) (Morelli vd., 2015) kullanmışlardır. Dokuz örnekte RNA polimeraz ve kılıf proteinine karşılık gelen sırasıyla 608 ve 593 bp'lik bölgeyi çoğaltıp, nükleotid dizilerini elde etmişlerdir. Ayrıca BLAST analizi ile İspanya izolatlarının, İtalyan izolatının RNA polimeraz geni ile %99,8 ve kılıf protein geni ile %99,2 oranında genetik benzerlik gösterdiğini ortaya çıkarmışlardır.

Gregory vd. (2018), Güney Amerika'nın Georgia Eyaletinde bulunan Telfair bölgesinde yer alan Trabzon hurması ağaçlarından toplanan 10 örneği, farklı patojenlere karşı PCR yöntemiyle analiz etmişlerdir. Bu patojenler içerisinde Persimmon cryptic virus, *Xylella fastidiosa*, Apple fruit crinkle viroid, Persimmon viroid 1, Persimmon viroid 2, Citrus viroid VI, Persimmon latent virus ve Persimmon virus A yer almaktadır. PeCV'yi analiz etmek için virüse özgü primerler (Morelli vd., 2015) kullanarak RT-PCR yöntemini uygulamışlardır. RT-PCR sonucunda, 8 örneğin *X. fastidiosa* ve 10 örneğin çalışmada araştırılan bütün patojenler ile enfekteli olduğunu tespit etmişlerdir.

Jevremović vd. (2019), Kuzey Makedonya'nın güneydoğusundaki Valandova'daki Trabzon hurması bahçelerindeki ağaçların yapraklarında damar nekrozu ve damar aralarında sararmaya neden olan etmeni belirlemek amacıyla çalışmışlardır. Beş ağaçtan 4 adet semptomlu ve 1 adet semptomsuz yaprak örneği toplamışlardır. CTAB yöntemi (Li, vd., 2008) ile taze yapraklardan dsRNA'ları izole etmişlerdir. PeCV'ye özgü primerler (Morelli vd., 2015; Cho vd., 2016) kullanılarak uygulanan RT-PCR sonucunda, semptomlu örneklerin tamamında PeCV tespit edilirken, semptomsuz örnekte tespit edilmemiştir. Elde edilen nükleotid dizilerinin, GenBank veritabanında bulunan 6 PeCV izolatı ile yüksek düzeyde (%96,5-100) benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Kuzey Makedonya izolatlarının, İspanya izolatları ile en yüksek (%100) nükleotid dizilimine sahip olduğu belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Trabzon Hurması Yaprak Örnekleri

Samsun ili Çarşamba ilçesinde bulunan Trabzon hurması kapama bahçelerinde PeCV-benzeri simptom sergileyen ağaçlar ile simptom gözlenmeyen ağaçlardan Yöntem 3.2.1'deki gibi alınan yaprak örnekleri, çalışmanın ana materyalini oluşturmuştur.

3.1.2. dsRNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

I. Lysis Buffer

200 mM (2.422 gr) Tris, 500 mM (2.922 gr) NaCl, 10 mM (0.203 gr) MgCl₂, 3 gr SDS, 10% (10 ml) Ethanol ve 1% (1 ml) 2-mercaptoethanol

Yukarıdaki kimyasallar (ethanol ve 2-mercaptoethanol hariç) 80 ml saf su içerisinde karıştırıldıktan sonra otoklav içerisinde 121°C'de 20 dk boyunca sterilize edilmiştir. Daha sonra bu karışımın içerisine ethanol ve 2-mercaptoethanol ilave edilerek kullanılıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

II. 1xSTE

10 mM (0.121 g) Tris, 10mM (0.827 ml) HCl, 100 mM (0.584 g) NaCl, 1 mM (0.037 g) EDTA

Yukarıdaki kimyasallar 100 ml saf su içerisinde çözülmüş ve pH: 8.0 olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu karışım otoklavda steril edilmiştir.

III. %16 Ethanol İçeren STE

Daha önceden hazırlanan ve steril edilen 1xSTE tampon çözeltisinden 42 ml alınarak, üzerine 8 ml absolute ethanol ilave edilmiştir.

3.1.3. Agaroz Elektroforez Jel Yönteminde Kullanılan 1XTBE Tamponu

Aşağıdaki kimyasallar 1 lt saf su içerisinde çözülmüş ve otoklavda 121 °C'de 20 dakika steril edilmiştir.

89 mM (10.8 g) Tris base, 89 mM (5.5 g) Boric acid, 2 mM (0.337 g) EDTA

3.1.4. Test Bitkileri

PeCV izolatlarının orijinal konukçusu olan Trabzon hurması dışında, başka konukçulara laboratuvar koşullarında mekanik olarak bulaştırılıp bulaştırılmadığının belirlenmesi amacıyla çeşitli test bitkileri kullanılmıştır (Tablo 3.1). Bu bitkilerin tohumları, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji laboratuvarından temin edilmiştir.

Tablo 3.1. Mekanik İnokulasyonda Kullanılan Test Bitkileri

Bilimsel Adı	Türkçesi
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	Tütün
<i>N. rusticia</i> L.	Tütün
<i>Vigna unguiculata</i> L.	Börülce
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fasulye
<i>Capsicum annuum</i> L.	Biber
<i>Cucumis sativus</i> L.	Hıyar

A. Tütün (*Nicotiana glutinosa* L., *N. rusticia* L.)

Tütün, bitki sistematğinde Solanaceae (Patlıcangiller) familyasında, *Nicotiana* cinsine ait olan, genellikle yıllık olarak yetişen bir bitkidir (Kishore, 2014). Anavatanı Amerika Kıtası'dır. Dünya genelinde 70'ten fazla bilinen tütün türü bulunmaktadır.

B. Börülce (*Vigna unguiculata* L.)

Börülce, Leguminosae (baklagiller) familyasının Papilionacea (kelebek çiçekliler) alt familyasında yer alan tek yıllık bir bitki türüdür. Börülcenin anavatanı Güney Asya, Hindistan ve Afrika'dır (Ehlers ve Hall, 1997). Bu çalışmada kullanılan börülce çeşidi Sırma'dır.

C. Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)

Fasulye, Fabaceae familyasının bir üyesidir (Nwokolo, 1996). Anavatanı Güney Amerika Kıtası'dır. Dünyada fasulyenin 230 civarında türünün olduğu ve bunların 20 adedinin insan beslenmesinde kullanıldığı, en fazla yetiştiriciliği yapılan türün ise *Phaseolus vulgaris* olduğu bilinmektedir (Günay, 2005). Bu çalışmada Magnum Fasulye çeşidi kullanılmıştır.

D. Biber (*Capsicum annuum* L.)

Biber, Solanaceae (Patlıcangiller) familyasında yer alan *Capsicum* cinsinin bir üyesidir (Andrews, 1999). Tek yıllık bir bitki türüdür. Anavatanı Amerika Kıtası olarak bilinmektedir. Bu çalışmada Kandil Dolma biber çeşidi kullanılmıştır.

E. Hıyar (*Cucumis sativus* L.)

Hıyar, Cucurbitaceae (Kabakgiller) familyasına ait olup tek yıllık bir bitki türüdür (Tatlıoğlu, 1993). Anavatanı Hindistan'dır.

3.2. Yöntem

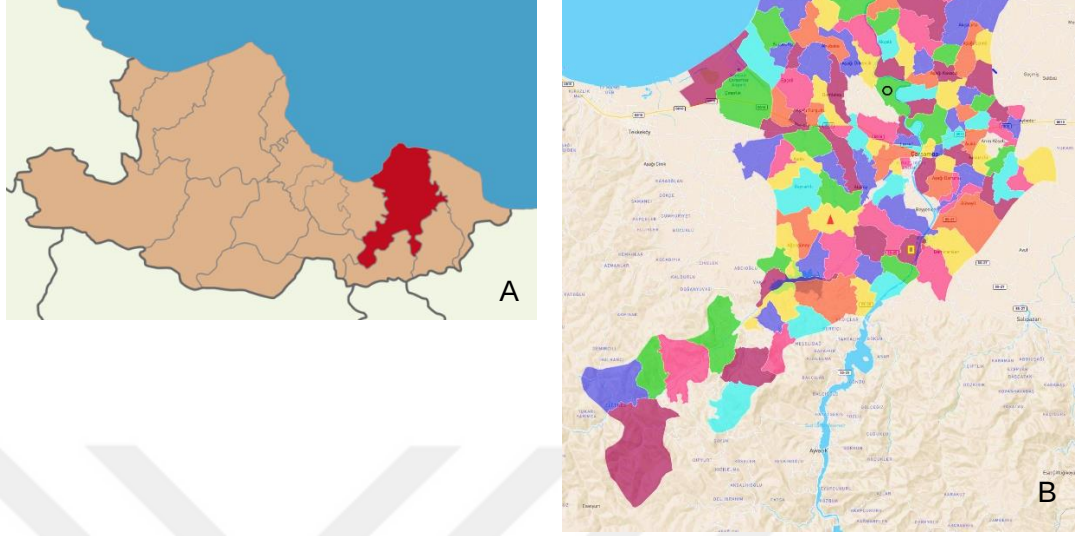
3.2.1. Survey ve Örneklerin Alınması

Survey çalışması, Samsun İl Tarım ve Orman Müdürlüğü'nün 2020 verilerine göre planlanmıştır. Çalışma başlangıcında, 2020 yılı verilerine göre Samsun ilinde Trabzon hurması üretiminin yapıldığı 4 adet kapama bahçeye gidilerek survey yapılması ve örnek alınması öngörülmüştür. Bahçelerin üretim alanları ve alınması planlanan örnek sayıları Tablo 3.2'de ve Çarşamba ilçesinde örnek alınması planlanan köylerin lokasyonları Şekil 3.1'de verilmiştir. Trabzon hurması yetiştiriciliği yapılan kapama bahçelere 2021 yılı vejetasyon döneminde gidilerek PeCV-benzeri symptom gösteren ve symptomsuz ağaçlardan yaprak örnekleri toplanmıştır. Surveyler sırasında, yaprak örneklerinin ağacın farklı yönlerine ait dallardan alınmasına dikkat edilmiştir. Örnekler ayrı ayrı etiketlenerek polietilen torbalara yerleştirilmiş ve Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarında buzdolabında +4°C'de en fazla 1 hafta muhafaza edilmiştir. Daha sonra örnekler sıvı nitrojen yardımıyla mikrosantrifüj tüpü içerisinde ezilmiş ve dsRNA ekstraksiyon işlemine kadar -80°C'de saklanmıştır.

Tablo 3.2. Samsun İli Çarşamba İlçesinde Trabzon Hurması Kapama Bahçe Üretim Alanları ve Alınması Planlanan Örnek Sayıları

Köy	Alan (da)	Örnek Sayısı	
		Symptomlu	Symptomsuz
Yukarı Dikencik	9	5	5
	4		
Kemer	5.5	3	3
Eğrikum	85	10	10
Toplam	103.5	18	18
Genel Toplam		36	

*Örnekleme yapılacak köy ve alan bilgileri 2020 yılında Samsun İl Tarım ve Orman Müdürlüğü'nden elde edilmiştir.



Şekil 3.1. Samsun ili (A) Çarşamba ilçesinde (B) örnek alınması planlanan köyler. Harita B’de siyah daire sembolü Yukarıdikencik, kırmızı üçgen Kemer, sarı kare Eğrikum köylerini göstermektedir

3.2.2. Persimmon cryptic virus’ün Mekanik İnokulasyon Yöntemi ile Taşınmasının Araştırılması

PeCV’nin mekanik olarak taşınma çalışmalarında kullanılan test bitkilerinin (Tablo 3.1) tohumları, 4 tekrerrür olacak şekilde steril torf içeren 7 cm çapındaki plastik kaplara ekilmiş ve daha sonra kontrollü (25°C gündüz, 20°C gece ve 14 saat fotoperyot) iklim odasına yerleştirilmiştir. Test bitkilerine haftanın 3 günü (Pazartesi/Çarşamba/Cuma) olmak üzere su verilmiştir.

PeCV izolatlarının bitki öz suyu ile taşınma durumunu incelemek ve biyolojik karakterizasyonu için Trabzon hurması yetiştiriciliği yapılan Yukarı Dikencik/Durakbaşı Köyüne 2022 yılı vejetasyon döneminde gidilmiş, inokulum kaynağı olarak kullanılmak üzere simptomlu ağaçlardan taze yaprak örnekleri alınmıştır. Yaprak dokuları steril havan içerisinde %0,1 Sodyum sülfat (Na_2SO_3) ve %0.2’lik 2-mercaptoethanol içeren fosfat tampon çözeltisinde (%1 K_2HPO_4) 1:5 oranında (1 gr yaprak: 5 ml çözelti) sulandırılarak homojenize edilmiştir. Elde edilen bitki öz suları, 400 mesh’lik karborandum tozu (Silikon Carbide, SIGMA) ile tozlanmış sağlıklı test bitkilerinin yapraklarına 2 tekrerrürlü olacak şekilde inokule edilmiştir. Biber ve tütün bitkileri 4-6 yapraklı dönemdeyken, fasulye bitkileri primer

yaprak döneminde, hıyar ve börülce bitkileri ise kotiledon yapraklı dönemde virüs ile inokule edilmiştir. İnokule edilen bitkilerin yaprakları musluk suyu altında yıkanmış ve daha sonra bitkiler iklim odasına (25°C gündüz, 20°C gece ve 14 saat fotoperyot) yerleştirilmiştir. Test bitkilerinin yaprakları, dört hafta boyunca haftalık olarak simptom bakımından kontrol edilmiştir.

3.2.3. dsRNA İzolasyon Yöntemi

Surveyler sırasında alınan simptomlu ve simptomsuz Trabzon hurması yaprakları, dsRNA izolasyonu için en uygun örnek miktarının belirlenmesi amacıyla 0.5 gr, 1 gr ve 1.5 gr olmak üzere 3 farklı ağırlıkta örnek grubuna ayrılmıştır.

Ayrıca, PeCV ile enfekteli yaprak örnekleri kullanılarak, mekanik olarak inokule edilen test bitkilerinin (Tablo 3.1) yapraklarından dsRNA'lar izole edilmiştir. Uygulama için yaprak örneği alınmadan önce test bitkilerinin fotoğrafları çekilmiştir. Test bitkilerinin inokule edilen yapraklarından ve inokule edilmemiş olan üst yapraklarından ayrı ayrı 1.5 gr örnek alınarak dsRNA izolasyonunda kullanılmıştır.

Bu çalışmada, Khabbazi vd. (2017)'nin dsRNA izolasyon yöntemi modifiye ederek aşağıdaki şekilde uygulanmıştır

Uygulama Basamakları:

- Her biri 0.5 g olan ve daha önceden sıvı nitrojende ezildikten sonra -80°C'de saklanan yaprak dokuları (Bölüm 3.1.1), 2 ml mikrosantrifüj tüpü içerisinde 2 ml lysis buffer (Bölüm 3.1.2.) yardımıyla ve steril ekstraksiyon çubuğu ile homojenize edilmiştir (Şekil 3.2).
- Homojenize edilen sıvı 2 ml'lik steril mikrosantrifüj tüpüne 1 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır.
- Mikrosantrifüj tüpleri 10 sn vortex (Isolab) ile karıştırılıp 37°C'de ısıtıcı blokta (Benchmark) 10 dk inkübe edilmiştir.
- Daha sonra karışıma 1:1 oranında kloroform ilave edilip, 11.300 rpm'de 20 dk +4°C'de santrifüj edilmiştir.
- Üstte kalan sıvı faz yeni bir tüpe aktarılmıştır ve tüpün içerisine 1:1 oranında tekrardan kloroform ilave edilip, 7 dk 11.300 rpm'de +4°C'de santrifüj edilmiştir. (Bu basamak doku parçalarının uzaklaştırılması için tekrar edilebilir).
- Üstte kalan sıvı faz yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 0.2 ml absolute ethanol ilave edilmiştir (1 ml supernatant için 0.2 ml absolute ethanol ilave edilir). Elde edilen

karışım alt-üst edilerek karıştırılmıştır ve takiben tüpler 11.300 rpm'de +4° C'de 5 dk santrifüj edilmiştir.

- Santrifüj sonrası her bir tüp için 15 mg selüloz fibers (Katalog no: C6288, Sigma Aldrich, ST. Louis, MO, USA) ölçülerek tüplere aktarılmıştır. Tüpler güçlü bir şekilde karıştırılıp oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. [Khabbazi vd. (2017)'de bu aşamada, dsRNA'ları absorbe edebilmek için Selüloz fibers yerine Whatman Selüloz CF-11 kullanılmıştır. Ancak artık dünyada CF-11 üretimi mevcut olmadığından dolayı, bu çalışmada dsRNA'ları absorbe etmek için Sigma'nın Selüloz fibers'i kullanılmaya çalışılmıştır].

- Selüloz fibers ilave edilip inkübe edildikten sonra örnekler 11.300 rpm'de +4°C'de 7 dk santrifüj edilmiştir.

- Santrifüjü takiben, üstte kalan sıvı kısım dökülerek uzaklaştırılmış ve 1 ml yıkama çözeltisi (%16 ethanol içeren 1xSTE buffer (Bölüm 3.1.2.) ilave edilip, tüpler alt-üst edilerek iyice karıştırılmıştır.

- Daha sonra örnekler 11.300 rpm'de +4°C'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üstte kalan sıvı kısım dökülerek peletten uzaklaştırılmış ve yıkama işlemi tekrar edilmiştir.

- Pelet 150 µl 1xSTE (Bölüm 3.1.2.) ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakılmıştır.

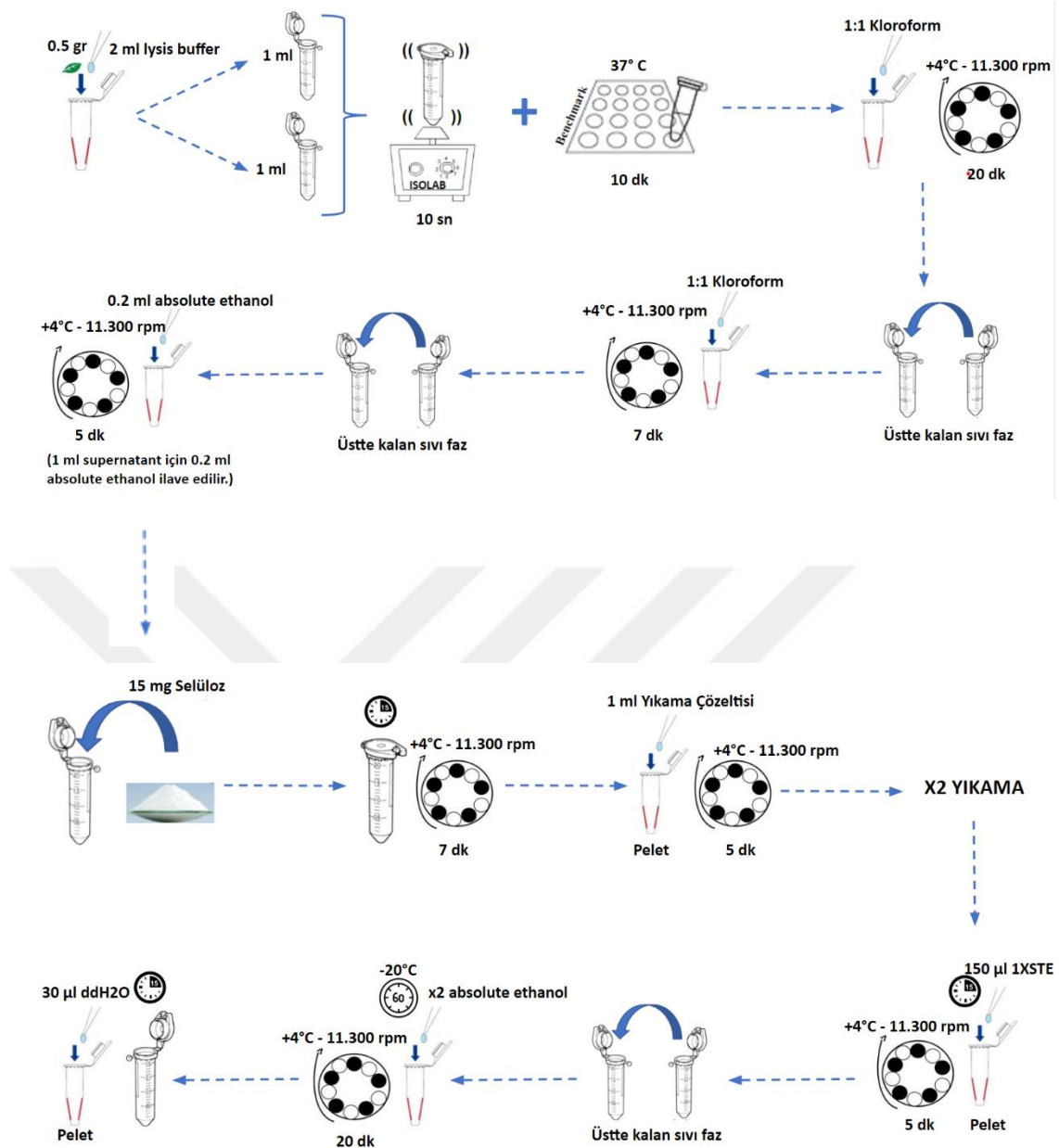
- Daha sonra tüpler 11.300 rpm'de +4°C'de 5 dk santrifüj edilmiş ve üstteki sıvı faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Bu aşamada başlangıçta 0.5 gr yaprak dokusu örneği kullanıldığı için 0.5 gr, 1 gr ve 1.5 gr olacak şekilde örnekler tek tüp içerisine toplanmıştır (0.5 gr için 2 tüp, 1 gr için 4 tüp ve 1.5 gr için 6 tüp birleştirilmiştir).

- Tek tüpe toplanan örneğe, hacminin 2 katı olacak şekilde absolute ethanol ilave edildikten sonra -20° C'de 1 saat inkübe edilmiştir.

- Tüp içerisindeki dsRNA'nın çöktürülmesi için örnekler +4°C'de 11.300 rpm'de 20 dk boyunca santrifüj edilmiştir.

- Tüp içerisinde oluşan pelet, 15 dk oda sıcaklığında kapağı açık bir şekilde kurumaya bırakılmıştır.

- En son aşamada pelet 30 µl RNase içermeyen ddH₂O ile çözülmüş ve örneklerin toplam RNA konsantrasyonları Implen Marka nanospektrofotometrede ölçülmüştür. Daha sonra örnekler, kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. dsRNA izolasyon yöntemi aşamalarının şematik görüntüsü

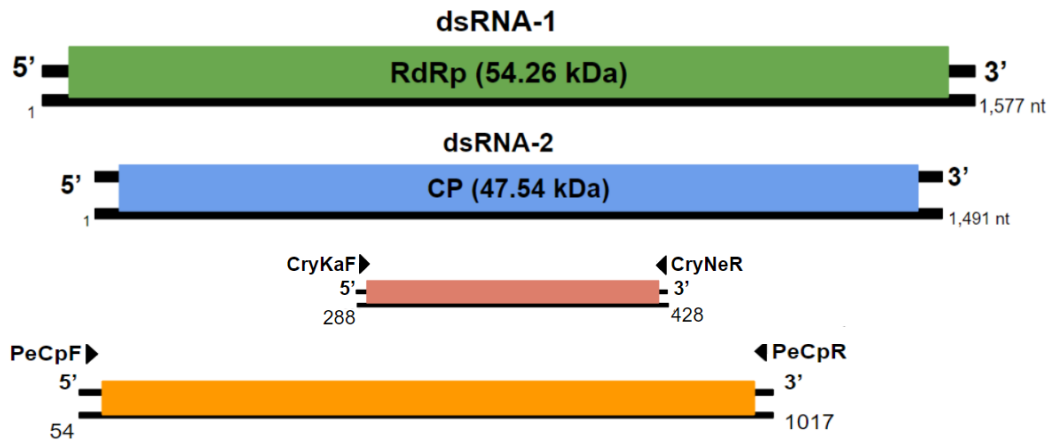
3.2.4. Tek Aşamalı Reverse-Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Yöntemi ile PeCV'nin Kılıf Protein (CP) Gen Bölgesinin Çoğaltılması

dsRNA izolasyonu tamamlanmış olan örneklerde, PeCV'nin varlığını moleküler düzeyde tespit edebilmek için tek aşamalı RT-PCR yöntemi uygulanmıştır. RT-PCR ile PeCV'nin dsRNA-2 tarafından kodlanan kapsid protein (CP) genine özgü olan bir çift primer (CryKaF ve CryNeR), örneklerdeki PeCV bulaşıklığının belirlenmesi için kullanılmıştır (Tablo 3.3). Bu primer dizisi, PeCV'nin CP bölgesinin sadece 144 bp büyüklüğündeki kısmını çoğaltabilmektedir. Çalışmanın ikinci aşamasında, kapsid

protein bölgesine özgü daha büyük bir bölgeyi çoğaltabilen bir çift primerin kullanılmasına geçilmiştir. PeCV ile bulaşık olduğu saptanan örneklerden 4 tanesi seçilerek, ikinci bir primer çifti (PeCpF ve PeCpR), PeCV kapsid protein gen bölgesinin (1491 bp) önemli bir bölümünün (994 bp) çoğaltılması için kullanılmıştır (Tablo 3.3.). Çalışmada kullanılan primerlerin bağlanma pozisyonları Şekil 3.3’de verilmiştir.

Tablo 3.3. PeCV-Kapsid Protein (CP) Geninin RT-PCR Yöntemi ile Çoğaltılmasında Kullanılan Primerler

Primer Kodu	Özellik	Baz dizisi (5’.....3’)	Literatür	Ürün Büyüklüğü (bp)
CryKaF	Sense	ACGTCCACGACCGATTGTGC	Morelli vd., 2014	144
CryNeR	Antisense	ACGAAGACACGTAACACGCAG TGG		
PeCpF	Sense	TTCCAATGGCAGACCAAGG	Cho vd., 2016	994
PeCpR	Antisense	GTCCGATACTCTGCTGCTCC	Bu çalışma	



Şekil 3.3. PeCV'nin kapsid protein bölgesinin RT-PCR ile çoğaltılmasında kullanılan primerlerin pozisyonları

CP bölgesi için tek aşamalı Qiagen One Step RT-PCR protokolü denenmiştir. CP bölgesi için 10 µl PCR reaksiyon içeriği aşağıdaki karışımdan oluşturulmuştur (Tablo 3.4). RT-PCR bileşenlerini karıştırmadan önce dsRNA'lar, 80°C'ye ayarlanmış ısıtıcı blokta (Benchmark) 5 dk boyunca ön denatürasyon işlemi için inkübe edilmiştir. Hemen sonra buz içerisine konularak soğutulmuştur.

PeCV CP bölgesinin amplifikasyonu için uygulanan reaksiyon basamakları, sıcaklıklar ve döngü sayıları Tablo 3.4'te verilmiştir. Reaksiyonlar MJ Mini PCR Thermocycler (Bio-Rad) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.4. Tek Aşamalı RT-PCR Reaksiyon Karışımının İçeriği

Reaksiyon Karışımı	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
RNase-free H ₂ O	3.375	
5× QIAGEN One Step RT-PCR tamponu*	2	
dNTP Mix (10 mM)	0.4	Herbir dNTP için 400 µM
Primer (sense)	0.6	0.1 µM
Primer (antisense)	0.6	0.1 µM
QIAGEN One Step RT-PCR Enzim Mix	0.4	
RNase inhibitör (Thermo-40 U/ µl)	0.125	
Toplam	10	

* 5 × QIAGEN One Step RT-PCR tamponu toplam 12,5 mM MgCl₂ içerir.

Tablo 3.5. PeCV'nin Tanınması ve Kapsid Protein Gen Bölgesinin Çoğaltımı için Kullanılan Tek aşamalı RT-PCR koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
cDNA sentezi	50°C	30 dk	1
İlk denatürasyon	95°C	15 dk	1
Denatürasyon	94°C	1 dk	35
Primer bağlanma	58°C (CryKaF CryNeR)	1 dk	35
	52 °C (PeCpF-PeCpR)	45 s	
Uzama	72°C	1 dk 30 sn	35
Son uzama	72°C	10 dk	1

3.2.5. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi

RT-PCR amplifikasyonundan sonra örneklerin analizi için %1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Öncelikle 50 ml'lik 1XTBE tampon çözeltisi içerisine 0.5 g agaroz ilave edilmiştir. Daha sonra mikrodalga fırın içerisinde şeffaf bir görüntü elde edilinceye kadar ısıtılarak erimesi sağlanmıştır. Karışım elle tutulabilecek düzeydeki sıcaklığa gelinceye kadar soğumaya bırakılmıştır. Sonra içerisine PCR sonucu oluşan bantların ultraviyole (UV) ışığında görüntülenebilmesi için 2.5 µl ethidium bromür (10 mg/ml) ilave edilmiş ve hafifçe karıştırılmıştır. Jel tabağına uygun tarak yerleştirilerek hazırlanan agaroz bu tabağın içerisine dökülerek 30 dk boyunca polimerize olması için bekletilmiştir. Daha sonra jel tabağı elektroforez tankı (Biorad) içerisine yerleştirilmiş

ve tarak jelden dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır. Yerleştirilen jelin üst kısmını geçecek şekilde elektroforez tankının içerisine 1XTBE tampon çözeltisi eklenmiştir.

PCR’de çoğaltılan DNA ürünlerinin jel içerisinde ilerlemesine yardımcı olmak amacıyla örnekler yüklem öncesi 6XTriTrack DNA Loading Dye (Thermo Scientific™) ilave edilmiştir. PCR reaksiyonundan 8 µl alınarak içerisine 2 µl 6X TriTrack DNA Loading Dye ilave edilmiştir. Karışım pipet yardımıyla alınarak jelde bulunan kuyulara yüklenmiştir. Çoğaltılan DNA parçalarının boyutunu tespit etmek için örneklerin başındaki kuyuya 1 kb DNA Ladder (Katalog no: SM0314, Promega) ve sonundaki kuyuya 100 bp’lik DNA Ladder (Katalog no: 07-11-00050, Solis BioDyne) yüklenmiştir. Elektroforez tankının (Biorad) güç kaynağının bağlantısı sağlanarak PCR reaksiyon ürünleri horizontal elektroforez cihazında 85 V’da 1 saat koşturulmuştur. Takiben jel görüntüleme cihazında (Biorad) PCR ürünleri incelenmiş ve jeldeki ürünlerin görüntüleri fotoğraflanmıştır.

3.2.6. PeCV’nin Kılıf Protein (CP) Bölgesinin Nükleotid Dizisinin Elde Edilmesi

Bölüm 3.2.4’te çoğaltımı sağlanan ve beklenen büyüklükte ürün veren dört örneğe ait RT-PCR ürünleri, sekans hizmeti sağlayan yurt içindeki bir firmaya (BM Laboratuvar Sistemleri, Ankara) nükleotid dizi analizi için gönderilmiştir. Hizmet alımı kapsamında baz dizileri, Sanger Dizileme Yöntemi ile elde edilmiştir. Sekans analizi sonrasında PeCV izolatlarının ileri ve geri yönlü primer dizileri ile elde edilen ham sekans sonuçları MEGA 11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programında ClustalW (Thompson vd., 1994) yöntemi kullanılarak hizalanmıştır. Ayrıca her iki yöndeki (forward ve reverse) okumaya ait sekans verilerinin konsensus dizileri, GenBankası (NCBI; National Center for Biotechnology Information) internet kaynağından (www.ncbi.nlm.nih.gov) indirilen diğer PeCV izolatlarına ait sekans verileri ile BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizine tabi tutularak kıyaslanmıştır.

3.2.7. PeCV İzolatlarının Moleküler Filogenetik İlişkisi

Sekans analizinden sonra PeCV izolatına ait düzgün okunan kısımlar alınarak elde edilen konsensus dizileri ve NCBI’den indirilen PeCV izolatlarının nükleotit dizileri ClustalW (Thompson vd., 1994) yöntemi ile çoklu dizi hizalamasına tabi tutulmuştur. Daha sonra MEGA 11 (Tamura vd., 2021) yazılımında yer alan Neighbor-

Joining yöntemi (Saitou ve Nei, 1987) kullanılarak ve izolatların evrimsel uzaklıkları Maximum Composite Likelihood yöntemi (Tamura vd., 2004) ile hesaplanarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Filogenetik analizde 10 PeCV izolatına ve 7 diğer Cryptic virüse ait sekans verisi kullanılmıştır. Bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değeri olarak 1000 alınmıştır (Felsenstein, 1981).

Tablo 3.6. Filogenetik Analizde kullanılan PeCV izolatları

GenBank Kayıt No	İzolat Adı	Ülke	Kaynak
KT962117	Samsun S3	Türkiye	Morelli ve Arli-Sokmen, 2016
LC427233	Persimmon	Kore	Lee vd., Yayınlanmadı
MF804511	FuyuTCGA4	Güneydoğu ABD	Gregory vd., Yayınlanmadı
MK931292	MK-PeCV-4	Kuzey Makedonya	Jevremovic ve Paunovic, 2019
MK722176	MK-PeCV-1	Kuzey Makedonya	Jevremovic ve Paunovic, 2019
KX352444	Algemesi	İspanya	Ruiz-Garcia vd., Yayınlanmadı
HE805114	SSPI	İtalya	Morelli vd., 2015
AB968365	KO	Kore	Cho vd., Yayınlanmadı
MW767387	-	ABD	Bahder vd., Yayınlanmadı
MH898511	Cho	Kore	Jo ve Cho, Yayınlanmadı
BK013323	China	Çin	Sidharthan vd., 2021
MH898488	Won	Kore	Jo ve Cho, 2018
MK731958	BCV2-JKI 1825732	Almanya	Gaafar vd., 2019
NC_040484	MCV2	Brezilya	Vasconcelos vd., Yayınlanmadı
MG542621	Neapolitan	ABD	Safari ve Roossinck, Yayınlanmadı
LC325818	Tur	Türkiye	Yoon vd., Yayınlanmadı

4. BULGULAR

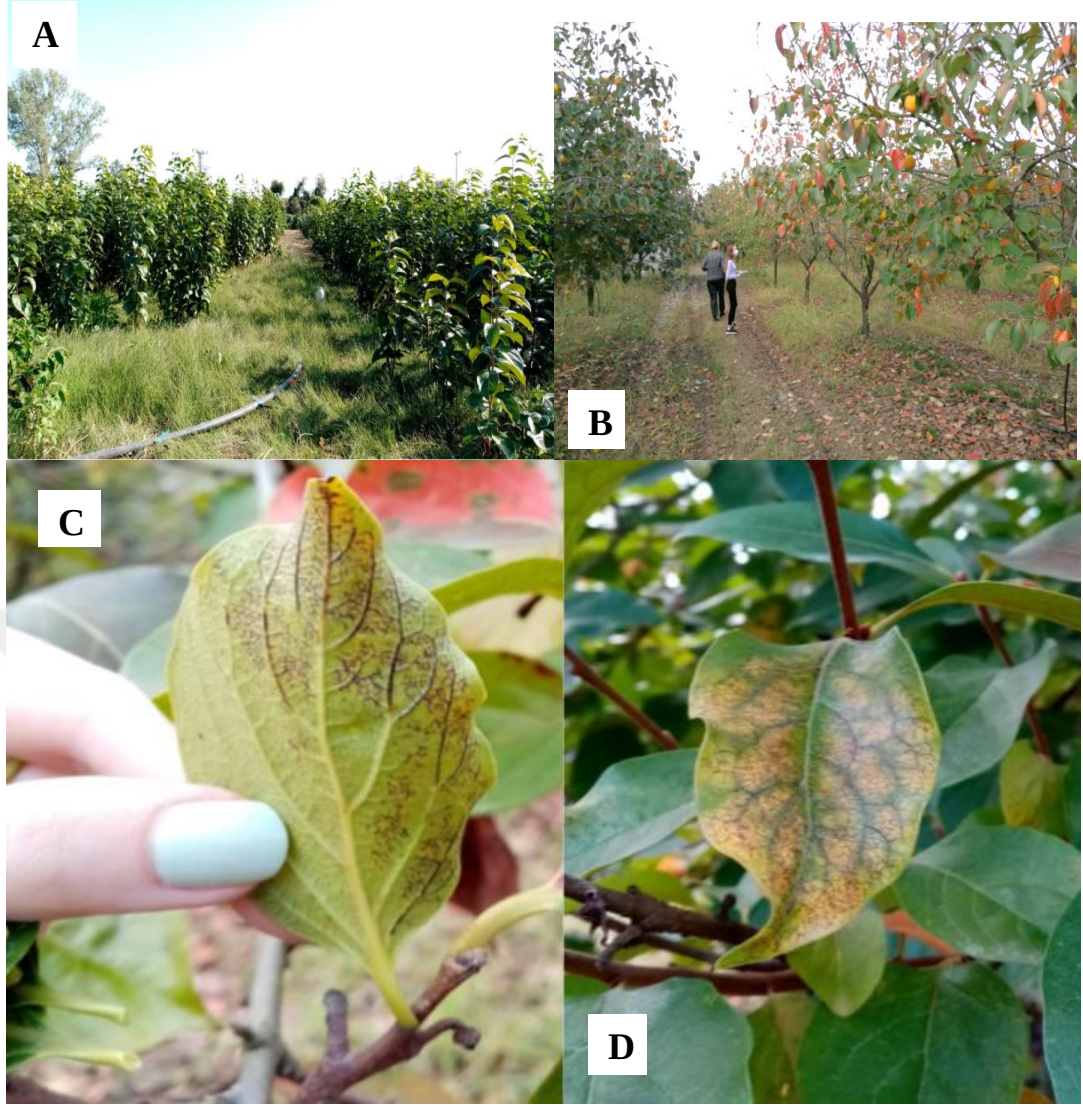
4.1. Surveyler ve Örneklerin Toplanması

Çalışma başlangıcında, 2020 yılı Samsun İl Tarım ve Orman Müdürlüğü verilerine göre Çarşamba ilçesinde Trabzon hurması üretiminin yapıldığı 4 adet kapama bahçeye gidilerek survey yapılması ve örnek alınması planlanmıştır. Ancak 2021 yılındaki survey çalışmaları sırasında Çarşamba ilçesinde Yukarı Dikencik ve Kemer köylerinde yer alan 2 bahçedeki Trabzon hurması ağaçlarının sökülerek, yerine fındık bitkilerinin dikildiği gözlenmiştir. Bu nedenle, Çarşamba ilçesi Yukarıdikencik ve Eğrikum köylerinde yer alan sadece iki adet kapama Trabzon hurması bahçesinde survey çalışmaları gerçekleştirilebilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Samsun İli Çarşamba İlçesinde Örnek Alınan Trabzon Hurması Kapama Bahçe Üretim Alanları ve Toplanan Örnek Sayıları

Örnekleme Yapılan Köy	Alan (da)	Örnek Sayısı	
		Simptomlu	Simptomsuz
Yukarı Dikencik/Durakbaşı	16	7	7
Eğrikum/Çayvar	18.5	7	7
Toplam	34.5	14	14
Genel Toplam			28

Survey çalışmaları sırasında, Trabzon hurması bahçelerinde vejetasyon döneminde PeCV-benzeri simptom gösteren ve simptomsuz ağaçlardan yaprak örnekleri toplanmıştır. Simptom sergileyen ağaçlarda yaprak yan damarlarında nekroz gözlenmiştir (Şekil 4.1). Surveye dahil edilen bahçelerden 14 simptomlu ve 14 simptomsuz olmak üzere toplam 28 örnek alınmıştır. Her bahçeye ait toplanan örnekler çalışmada kullanılmak üzere laboratuvara getirilmiş ve dsRNA izolasyonu ve bitki öz suyu ile mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 4.1. Örnekleme yapılan Trabzon hurması bahçeleri ve PeCV-benzeri yaprak belirtileri. A) Çarşamba-Yukarı Dikencik Durakbaşı Köyü'ne ait Trabzon hurması fidanlığı B) Çarşamba-Eğrikum Çayvar Köyü'ne ait Trabzon hurması bahçesi C) Trabzon hurması yaprağının alt ve D) Üst kısımlarında görülen yaprak yan damarlarında nekroz belirtisi

4.2. Trabzon Hurması Yapraklarından dsRNA'ların İzolasyonu

dsRNA izolasyonu, hem PeCV-benzeri belirtiler gösteren hem de belirtisiz Trabzon hurması ağaçlarının yapraklarından üç farklı yaprak ağırlığı (0.5 gr, 1 gr, ve 1.5 gr) kullanılarak Yöntem 3.2.3'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra dsRNA izolasyon işleminin başarısı hakkında fikir elde edebilmek için nanospektrofotometre ile toplam RNA konsantrasyonları belirlenmiştir. Örnekler için RNA konsantrasyonları ve A260/A280 oranları Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Trabzon Hurma Yaprak Örneklerine ait Toplam RNA Konsantrasyonları ve A260/280 Değerleri

Örnek Kodu	Konsantrasyon (µg/ml)	A260/280
Çar-Yuk 4	0.76	1.727
Çar-Yuk 10	-*	-
Çar-Yuk 5/6	-	-
Çar-Yuk 1	4.24	2.083
Çar-Yuk 7	2.60	2.097
Çar-Eğri 3	-	-
Çar-Eğri 13	-	-

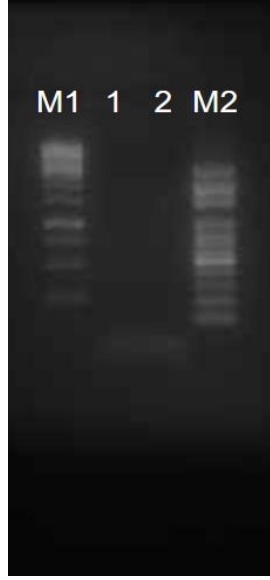
* Ölçüm değeri vermedi.

4.3. Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Yöntemi ile Persimmon cryptic virus (PeCV)'ün Belirlenmesi

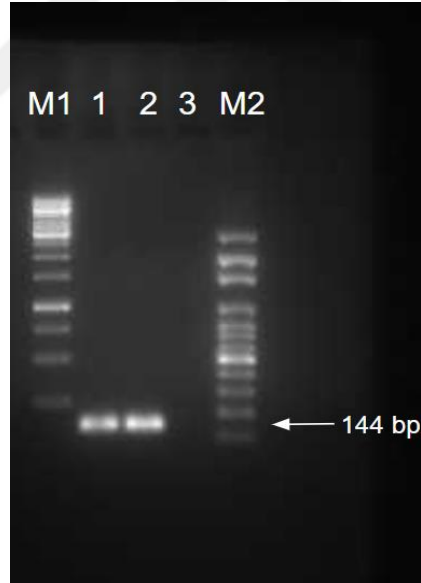
PeCV'nin kapsid protein (CP) gen bölgesinin çoğaltımı için, ilk aşamada gene özgü primerler (CryKaF ve CryNeR) (Tablo 3.3) kullanılmıştır. RT-PCR yönteminin uygulanması sonucunda, 0.5 g ve 1 g yaprak örneği kullanılarak elde edilen dsRNA örnekleri (Çar-Yuk 4, Çar-Yuk 10 ve Çar-Yuk 5/6) ile herhangi bir PCR ürünü elde edilememiştir (Tablo 4.3) (Şekil 4.2, 4.3). Sadece 1.5 g olan hem semptomsuz hem de semptomlu yaprak örnekleri ile gerçekleştirilen RT-PCR sonucunda yeterli miktarda (144 bp) amplifikasyon ürünü gözlenmiştir (Tablo 4.3) (Şekil 4.3, 4.4, 4.5).

Tablo 4.3. dsRNA İzolasyonunda Kullanılan Semptomlu/Semptomsuz Örnek Miktarları ve RT-PCR Sonuçları

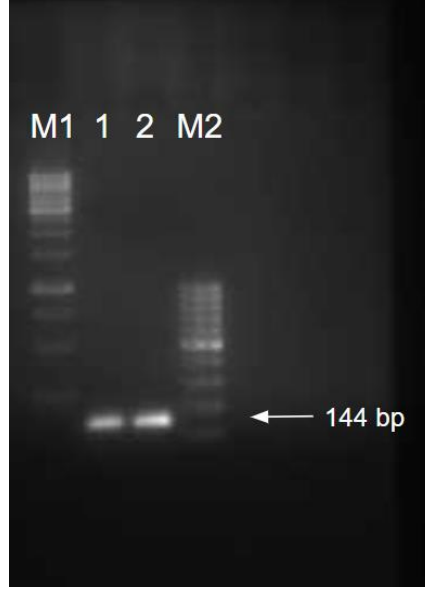
PeCV İzolatları	Semptom	Örnek Miktarı	RT-PCR Ürün
Çar-Yuk 4	+	0.5 gr	-
Çar-Yuk 10	-	0.5 gr	-
Çar-Yuk 5/6	+	1 gr	-
Çar-Yuk 1	+	1.5 gr	+
Çar-Yuk 7	-	1.5 gr	+
Çar-Yuk 13	-	1.5 gr	+
Çar-Eğri 3	+	1.5 gr	+
Çar-Eğri 6	+	1.5 gr	+
Çar-Eğri 13	-	1.5 gr	+
Çar-Eğri 16	-	1.5 gr	+



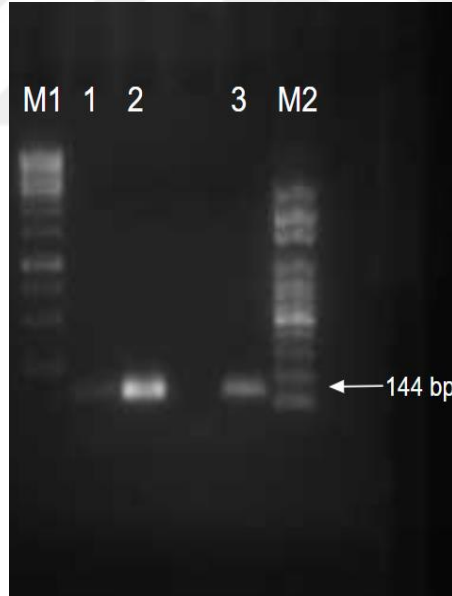
Şekil 4.2. CryKaF ve CryNeR primerleri ve Trabzon hurması yapraklarından izole edilen dsRNA'lar kullanılarak uygulanan Tek Aşamalı (One-Step) Reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonuna ait %1'lik agaroz jel elektroforez sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog : SM0314, Promega), M2: 100 bp DNA Ladder (Katalog no: 07-11-00050, Solis BioDyne), 1: 0.5 gr simptomsuz Çar-Yuk 4 izolatu, 2: 0.5 gr simptomsuz Çar-Yuk 10 izolatu



Şekil 4.3. CryKaF ve CryNeR primerleri ve dsRNA'lar kullanılarak elde edilen One-Step RT- PCR amplifikasyon ürünlerine ait %1'lik Jel Elektroforez Sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), M2: 100 bp DNA Ladder (Katalog no: 07-11-00050, Solis BioDyne), 1: 1.5 gr simptomsuz Çar-Eğri 3 izolatu, 2: 1.5 gr simptomsuz Çar-Eğri 13 izolatu, 3: 1 gr simptomsuz Çar-Yuk 5/6 izolatu



Şekil 4.4. CryKaF ve CryNeR primerleri kullanılarak elde edilen One-Step RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait %1'lik agaroz jel elektroforez sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), M2: 100 bp DNA Ladder (Katalog no: 07-11-00050, Solis BioDyne), 1: 1.5 gr simptomsuz Çar-Yuk 1 izolatu, 2: 1.5 gr simptomsuz Çar-Yuk 7 izolatu



Şekil 4.5. Trabzon hurması yapraklarından izole edilen dsRNA'lar kullanılarak elde edilen One-Step RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait %1'lik agaroz jel elektroforez sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), M2: 100 bp DNA Ladder (Katalog no: 07-11-00050, Solis BioDyne), 1: 1.5 gr simptomsuz Çar- Eğri 6 izolatu, 2: 1.5 gr simptomsuz Çar-Eğri 16 izolatu, 3: 1.5 gr simptomsuz Çar-Yuk 13 izolatu

4.4. PeCV'nin Bitki Öz Suyu ile Mekanik Olarak Taşınma Çalışmaları

4.4.1. Test Bitkilerinin Mekanik İnokulasyonu

PeCV ile bulaşık olduğu belirlenen Çarşamba ilçesine ait Yukarı Dikencik/Durakbaşı'nda yer alan Trabzon hurması bahçesinden 2022 yılında taze simptomlu yaprak örnekleri alınmış ve inokulum kaynağı olarak kullanılmıştır. Simptomlu yapraklardan elde edilen bitki öz suyu farklı familyalardaki bitki türlerine inokule edilerek, PeCV'nin mekanik olarak taşınma durumu ve PeCV'ye herhangi bir konukçu reaksiyonunun olup olmadığı araştırılmıştır. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nde muhafaza edilen bazı test bitkilerinin tohumları biyolojik karakterizasyon çalışmalarında kullanılmıştır (Tablo 3.1).

Test bitkileri yaklaşık 2-4 yapraklı döneme geldiğinde (bitki türüne göre tohum ekiminden 10 gün- 1 ay sonra) PeCV Çar-Yuk 14 izolatu ile inokule edilmiştir. İnokule edilen test bitkileri kontrollü iklim odasına yerleştirilmiş ve haftada birkaç defa makroskopik olarak incelenmiştir. Test edilen bütün bitkilerin ne inokule edilen yapraklarında ne de inokule edilmemiş üst yapraklarında virüs-benzeri symptom gözlenmemiştir (Şekil 4.6-Şekil 4.11).



Şekil 4.6. Biber “Kandil Dolma” çeşidinin PeCV ile mekanik inokulasyondan 4 hafta sonra görüntüsü



Şekil 4.7. B r lce ‘‘Sirma’’  eşidinin PeCV ile mekanik inokulasyondan 4 hafta sonra görüntüsü



Şekil 4.8. Fasulye ‘‘Magnum’’  eşidinin inokulasyondan 4 hafta sonra görüntüsü



Şekil 4.9. *Nicotiana glutinosa* bitkisinin PeCV ile mekanik inokulasyondan 4 hafta sonra görüntüsü



Şekil 4.10. *Nicotiana rustica* bitkisinin PeCV ile mekanik inokulasyondan 4 hafta sonra görüntüsü



Şekil 4.11. Hıyar (*Cucumis sativus* L.) bitkisinin PeCV ile mekanik inokulasyondan 4 hafta sonra görüntüsü

4.4.2. Test Bitkilerinden dsRNA İzolasyonu ve RT-PCR Yöntemi ile PeCV Enfeksiyonunun Araştırılması

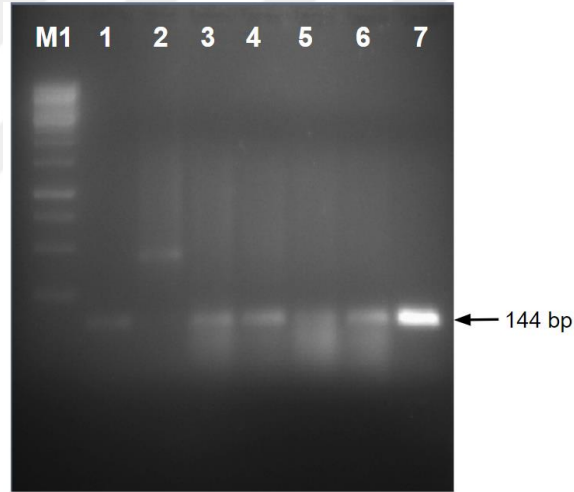
PeCV'nin diğer Cryptic virüsler gibi konukçularında zaman zaman latent enfeksiyon oluşturması nedeniyle, test bitkilerinden dsRNA izolasyonu yapılarak PeCV enfeksiyonu kontrol edilmiştir. Test bitkilerinin inokule edilen yapraklarından ve inokule edilmemiş olan üst yapraklarından ayrı ayrı 1.5 gr yaprak dokusu kullanılarak dsRNA izolasyonu Yöntem 3.2.3'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. dsRNA izolasyonu sonrasında, bitki örneklerinden elde edilen toplam RNA konsantrasyonları ve A260/A280 oranları nanospektrofotometre ile ölçülmüştür (Tablo 4.4).

Test bitkilerinden izole edilen dsRNA'lar PeCV'nin kapsid protein bölgesinin çoğaltılması için kullanılmıştır. Bu çalışmada tanı primeri olarak kullanılan CryKaF ve CryNeR primerleri ile tek aşamalı RT-PCR yöntemi (Yöntem 3.2.4) uygulanmıştır. Börülce bitkisinin inokule edilen yapraklarından elde edilen dsRNA'lar ile beklenen büyüklükte (144 bp) amplifikasyon ürünü gözlenmiş, ancak sistemik yapraklarından elde edilen dsRNA örneği ile PCR ürünü elde edilememiştir (Şekil 4.12). Diğer taraftan *Nicotiana glutinosa* ve hıyar bitkilerinin hem inokule edilen hem de sistemik yapraklarından elde edilen dsRNA'lar ile 144 bp büyüklükte amplifikasyon ürünleri gözlenmiştir (Şekil 4.12).

Tablo 4.4. Test Bitkilerinden Elde Edilen RNA konsantrasyonları ve A260/A280 oranları

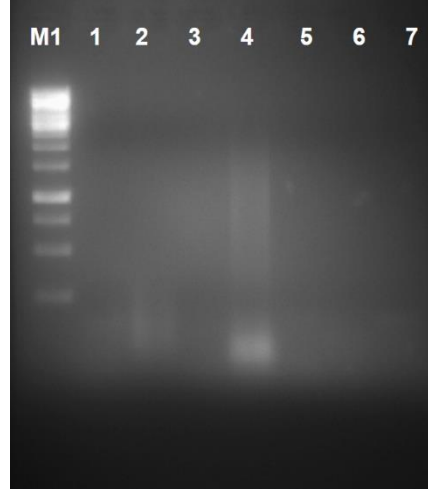
Örnek İzolatları	Konsantrasyon (µg/ml)	A260/A280
Biber- 1*	158	1.669
Biber- 2*	370	1.298
<i>N. glutinosa</i> - 1	112	1.671
<i>N. glutinosa</i> - 2	114	1.946
Fasulye (Magnum)- 1	12.8	1.488
Fasulye (Magnum)- 2	535	2.033
Börülce (Sırma)- 1	7.2	1.385
Börülce (Sırma)- 2	68	1.650
<i>N. rustica</i> - 1	6.8	1.545
<i>N. rustica</i> - 2	36	1.957
Hıyar- 1	422	1.545
Hıyar- 2	465	1.583

* 1: inokule edilen yaprak, 2: sistemik yaprak



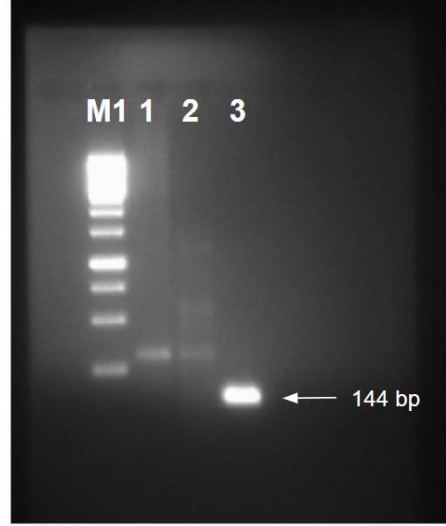
Şekil 4.12. CryKaF ve CryNeR primerleri kullanılarak elde edilen Tek aşamalı RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait %1'lik agaroz jel elektroforez sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), 1: Börülce bitkisinin inokule edilen yapraklarından elde edilen dsRNA, 2: Börülce bitkisinin üst yapraklarından elde edilen dsRNA, 3: *Nicotiana glutinosa* bitkisinin inokule edilen yapraklarından elde edilen dsRNA, 4: *N. glutinosa* üst yapraklarından elde edilen dsRNA, 5: Hıyar bitkisinin inokule edilen yapraklarından elde edilen dsRNA, 6: Hıyar bitkisinin üst yapraklarından elde edilen dsRNA, 7: Pozitif kontrol olarak kullanılan Çar-Eğri 3 izolatına ait dsRNA

İkinci RT-PCR uygulamasında, fasulye, biber ve *N. rustica* bitkilerden elde edilen dsRNA'lar kullanılmıştır. Ancak bu bitkilerin ne inokule edilen ne de üst yapraklarından elde edilen izolatların hiçbirinde amplifikasyon ürünü gözlenmemiştir. Diğer taraftan bu reaksiyonda pozitif kontrol olarak kullanılan Çar-Eğri 3 izolatı ile de beklenen büyüklükte ürün elde edilememiştir (Şekil 4.13).



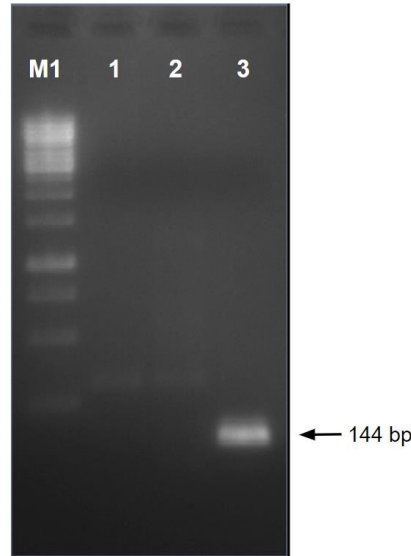
Şekil 4.13. CryKaF ve CryNeR primerleri kullanılarak elde edilen One-Step RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait % 1'lik agaroz jel elektroforez sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), 1: Fasulye bitkisinin inokule edilen yapraklarından elde edilen dsRNA, 2: Fasulye bitki sinin üst yapraklarından elde edilen dsRNA, 3: Biber bitkisinin inokule edilen yapraklarından elde edilen dsRNA, 4: Biber bitkisinin üst yapraklarından elde edilen dsRNA, 5: *N. rustica* bitkisinin inokule edilen yapraklarından elde edilen dsRNA, 6: *N. rustica* bitkisinin üst yapraklarından elde edilen dsRNA, 7: Pozitif kontrol olarak kullanılan Çar-Eğri 3 izolatına ait dsRNA

Çalışmanın bu aşamasında, *Nicotiana glutinosa*-2, *N. rustica*-2 ve pozitif kontrol olarak Çar-Eğri 13 izolatlarının kullanılmasına karar verilerek RT-PCR protokolü tekrar uygulanmıştır. Bu uygulama sonucunda, daha önceden *N. glutinosa*-2'den beklenen büyüklükte (144 bp) PCR ürünü elde edilmesine (Şekil 4.12) rağmen, bu defa bir önceki gibi doğru büyüklükte ürün gözlemlenmemiştir. Aynı şekilde *N. rustica*-2 dsRNA örneği ile de spesifik olmayan bant elde edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan Çar-Eğri 13 izolatında beklenen büyüklükte (144 bp) PCR ürünü gözlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. CryKaF ve CryNeR primerleri kullanılarak elde edilen One-Step RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait % 1'lik agaroz jel elektroforez sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), 1: *N. rustica*-2 (üst yaprak)'dan elde edilen dsRNA, 2: *N. glutinosa*-2 (üst yaprak)'dan elde edilen dsRNA, 3: Pozitif kontrol olarak kullanılan Çar-Eğri 13 izolatına ait dsRNA

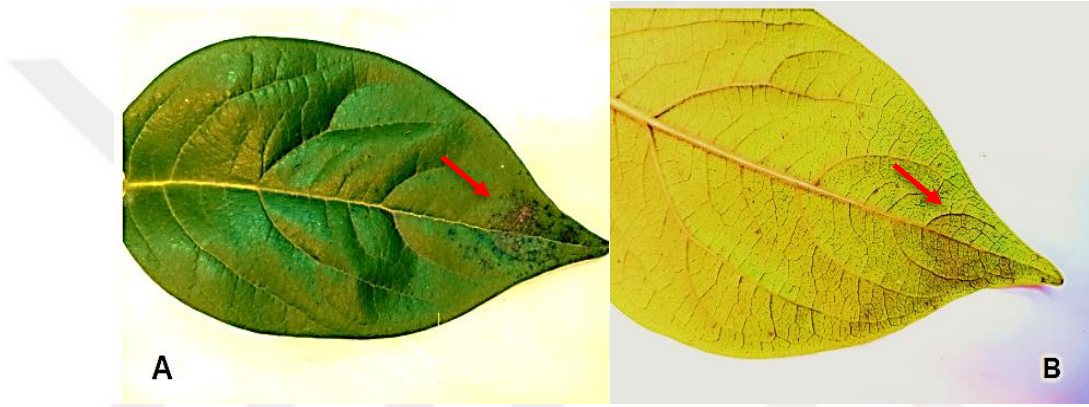
Bir sonraki RT-PCR uygulamasına geçilmeden önce, *N. glutinosa*-2 ve *N. rustica* izolatlarının konsantrasyonları (Tablo 4.4) göz önüne alınarak sulandırılmasına karar verilmiştir. *N. glutinosa*-2 ve *N. rustica*-2 izolatlarına ait dsRNA'lar sırasıyla 1:5 ve 1: 3 oranında seyreltilerek RT-PCR uygulamasında kullanılmıştır. Pozitif kontrol Çar- Eğri 13 izolatına ait dsRNA ise sulandırılmadan kullanılmıştır. Pozitif kontrol hariç diğer izolatlarda spesifik olmayan RT-PCR ürünü elde edilmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. CryKaF ve CryNeR primerleri kullanılarak elde edilen One-Step RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait % 1'lik agaroz jel elektroforez sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), 1: *N. rustica*-2 (1: 3 seyreltilmiş) dsRNA örneği, 2: *N. glutinosa*-2 (1:5 seyreltilmiş) dsRNA örneği, 3: Pozitif kontrol olarak kullanılan Çar-Eğri 13 izolatına ait dsRNA örneği

Çalışmanın bu aşamasında, RT-PCR sonucuna göre beklenen büyüklükte bant veren (Şekil 4.12) börülce, *N. glutinosa*, hıyar ve ek olarak *N. rustica*, *N. benthamiana* bitkilerinin PeCV'nin konukçusu olup olmadığını teyit edilebilmek için bu bitkilerin tohumları tekrardan 7 cm çapındaki plastik kaplara ekilmiş ve daha sonra kontrollü (25°C gündüz, 20°C gece ve 14 saat fotoperyot) iklim odasına yerleştirilmiştir.

Taze inokulum kaynağı olarak kullanılmak üzere, Trabzon hurması yetiştiriciliği yapılan Yukarı Dikencik/Durakbaşı Köyüne 2022 yılı vejetasyon döneminde tekrar gidilerek semptomlu ağaçlardan yeniden yaprak örnekleri alınmıştır (Şekil 4.16).

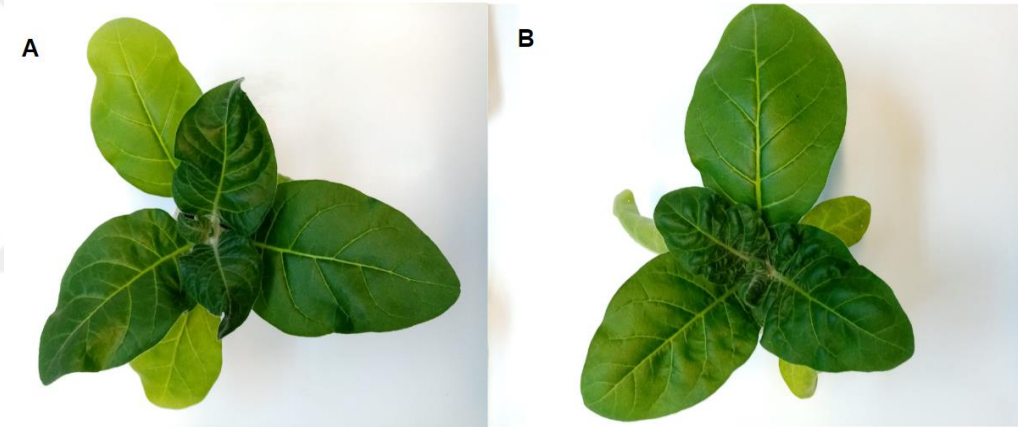


Şekil 4.16. İkinci mekanik inokulasyon çalışmasında inokulum kaynağı olarak kullanılan Trabzon hurması yaprağının A) üst ve B) alt yüzeyinde görülen yaprak yan damarlarında nekroz semptomu

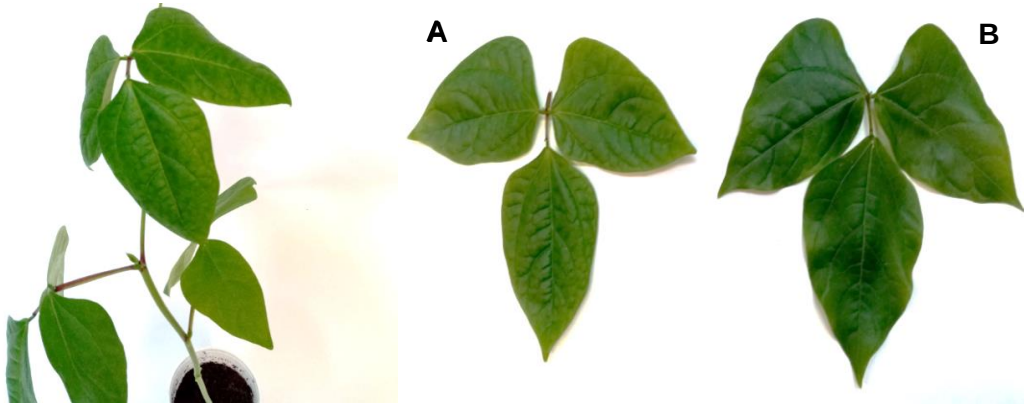
Yeni alınan semptomlu örnekler kullanılarak uygulanan inokulasyondan 3 hafta sonra test bitkilerinin görünüşleri Şekil 4.17- Şekil 4.20'de verilmiştir. İnokule edilen bitkilere Yöntem 3.2.3'te açıklandığı şekilde dsRNA izolasyon yöntemi uygulanarak PeCV enfeksiyonu kontrol edilmiştir.



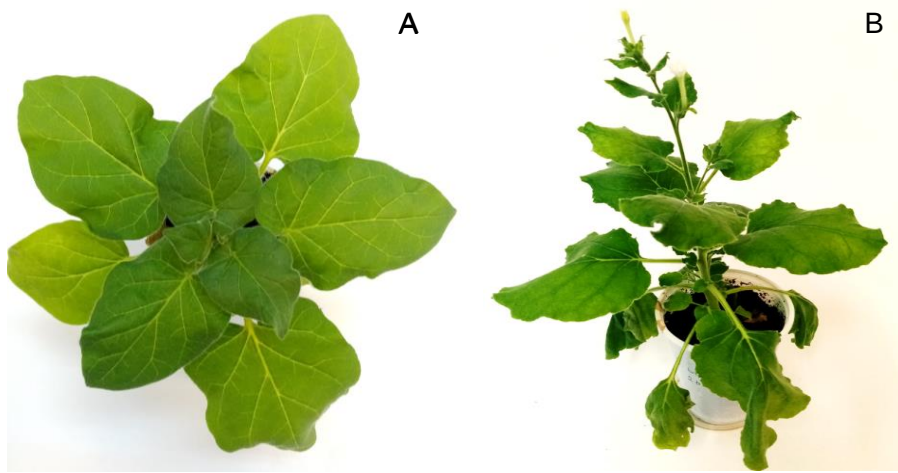
Şekil 4.17. A) Hıyar bitkisinin PeCV ile mekanik inokulasyondan 3 hafta sonra genel görüntüsü B) PeCV ile inokule edilen kotiledon yaprakları



Şekil 4.18. A) Sağlıklı *Nicotiana rustica* bitkisi B) *N. rustica* bitkisinin PeCV ile mekanik inokulasyondan 3 hafta sonra görüntüsü



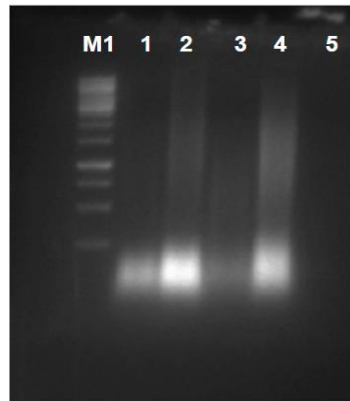
Şekil 4.19. Börölce "Sırma" çeşidinin PeCV ile mekanik inokulasyondan 3 hafta sonra görüntüsü. İnokulen edilen (A) ve edilmemiş (B) olan bitkilerin üst yaprakları



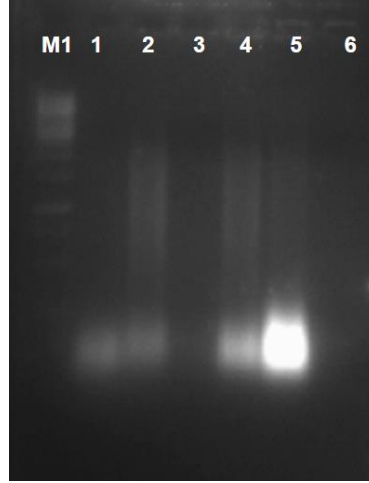
Şekil 4.20. *Nicotiana glutinosa* (A) ve *N. Benthamiana* (B) bitkilerinin PeCV ile mekanik inokulasyondan 3 hafta sonra görüntüsü

Test bitkilerinden Yöntem 3.2.3’de açıklandığı şekilde izole edilen dsRNA’lar PeCV’nin kapsid protein bölgesinin çoğaltılması için kullanılmıştır. Bu aşamada tanı primeri olarak kullanılan CryKaF ve CryNeR primerleri ile tek aşamalı RT-PCR yöntemi uygulanmıştır. Bu uygulama sonucunda, pozitif kontrol dahil örneklerin hiçbirisinde PCR ürünü gözlenmemiştir (Şekil 4.21-4.22).

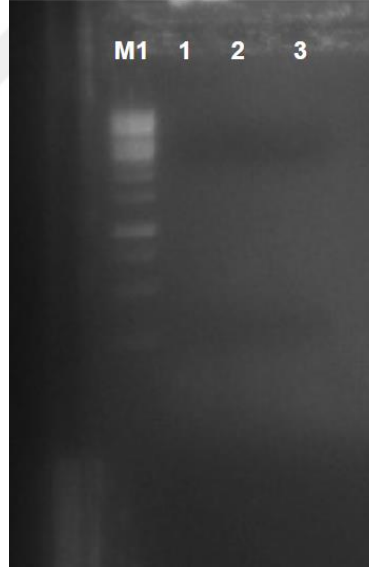
Jel elektoroferez sonuçlarına göre test bitkilerinin dsRNA konsantrasyonlarının yoğun olduğu düşünülerek seyreltilmesine karar verilmiştir. Hıyar bitkisinden elde edilen dsRNA’lar 1:100, börülce ve *Nicotiana glutinosa* bitkilerinin üst yapraklarından elde edilen dsRNA’lar 1:50 oranında sulandırılarak RT-PCR tekrar edilmiştir. Ancak bu uygulama sonrasında da sonuç alınamamıştır (Şekil 4.23).



Şekil 4.21. CryKaF ve CryNeR primerleri kullanılarak elde edilen One-Step RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait %1’lik agaroz jel elektroforez sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), 1: Sağlıklı börülce bitkisinden elde edilen dsRNA, 2: İnokule edilen börülce bitkisinin üst yapraklarından elde edilen dsRNA, 3: *Nicotiana glutinosa* bitkisinin inokule edilen yapraklarından elde edilen dsRNA, 4: *N. glutinosa* üst yapraklarından elde edilen dsRNA, 5: Çar-Yuk 13 izolatına ait dsRNA (pozitif kontrol)



Şekil 4.22. CryKaF ve CryNeR primerleri kullanılarak elde edilen One-Step RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait %1'lik agaroz jel elektroforez sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), 1: Sağlıklı *Nicotiana benthamiana* bitkisi, 2: İnokule edilen *N. benthamiana* bitkisinin ü üst yapraklarından elde edilen dsRNA, 3: *Nicotiana rustica* bitkisinin inokule edilen yapraklarından elde edilen dsRNA, 4: *N. rustica* bitkisinin üst yapraklarından elde edilen dsRNA, 5: Hıyar bitkisinden elde edilen dsRNA 6: Çar-Yuk 13 izolatına ait dsRNA (pozitif kontrol)

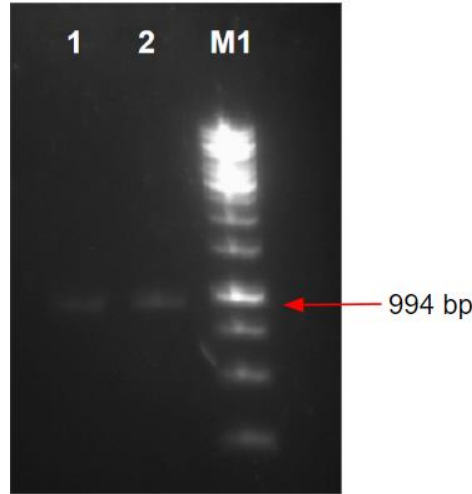


Şekil 4.23. CryKaF ve CryNeR primerleri kullanılarak elde edilen One-Step RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait %1'lik agaroz jel elektroforez sonucu. M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), 1: İnokule edilen börülce bitkisinin üst yapraklarından elde edilen dsRNA (1:50 seyreltilmiş), 2: *Nicotiana glutinosa* bitkisinin üst yapraklarından elde edilen dsRNA (1:50 seyreltilmiş) 3: Hıyar bitkisinin yapraklarından elde edilen dsRNA (1:100 seyreltilmiş)

4.5. PeCV İzolatlarının Kapsid Protein (CP) Bölgesinin Nükleotit Dizisinin Elde Edilmesi

Yöntem 3.2.3'te açıklandığı şekilde elde edilen dsRNA'lar ile kapsid protein bölgesine özgü PeCpF ve PeCpR primerleri (Tablo 3.3) kullanılarak dört PeCV izolatının (Çar-Yuk-1, Çar-Yuk-7, Çar-Eğri-3, Çar-Eğri 13) kısmi kapsid protein bölgesi (994 bp) RT-PCR yöntemi ile amplifiye edilmiştir. PeCV ile enfekteli örneklerden beklenen büyüklükte RT-PCR ürünleri elde edilmiştir (Şekil 4.24).

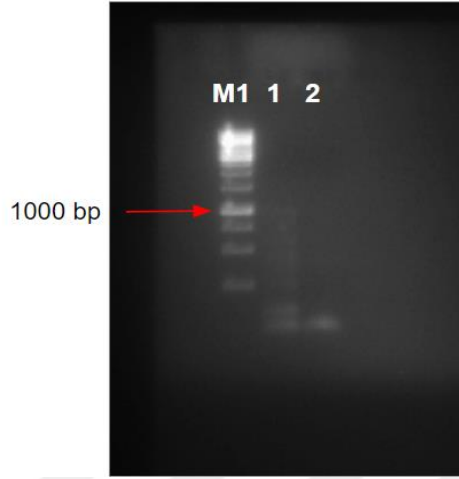
Daha sonra PCR ürünlerinden (Çar-Yuk-1, Çar-Yuk-7, Çar-Eğri-3, Çar-Eğri 13) 25'er µl ve önerilen konsantrasyonda (5 pmol) hazırlanan PeCpF ve PeCpR primerleri sekans hizmeti veren bir firmaya (BM Laboratuvar Sistemleri, Ankara) gönderilmiştir. Sanger Dizileme Yöntemine göre, ileri ve geri yönlü PCR primerleri kullanılarak elde edilen ham sekans verileri Mega 11 yazılımında (Tamura vd., 2021) analiz edilmiştir. Çar-Eğri 13 izolatı ile her iki yöndeki sekans sonuçları düzgün elde edilmesine rağmen hem ileri hem de geri primer ile bu çalışmada yer alan Çar-Yuk-1, Çar-Yuk-7 ve Çar-Eğri-3 izolatlarına ait baz dizilerinin düzgün okunamadığı gözlemlenmiştir (sonuç gösterilmedi).



Şekil 4.24. PeCpF ve PeCpR primerleri ve Trabzon hurması yapraklarından elde edilen dsRNA'lar kullanılarak elde edilen One-Step RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait %1'lik agaroz jel elektroforez sonucu. 1: Çar-Eğri 3 izolatı, 2: Çar-Eğri 13 izolatı, M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega)

Sekans dizisi elde edilemeyen Çar-Yuk-1 ve Çar-Yuk-7 örnekleri, kapsid protein bölgesine özgü PeCpF ve PeCpR primerleri (Tablo 3.3) kullanılarak ikinci defa RT-

PCR'a tabii tutulmuştur. Çar-Yuk-1 izolatu ile beklenen büyüklükte (994 bp) çok zayıf bir PCR ürünü elde edilmiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. PeCpF ve PeCpR primerleri ve Trabzon hurması yapraklarından elde edilen dsRNA'lar kullanılarak elde edilen One-Step RT-PCR amplifikasyon ürünlerine ait %1'lik agaroz jel elektroforez, M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), 1: Çar-Yuk-1 izolatu 2: Çar-Yuk-7 izolatu

Qiagen firmasının One-Step RT-PCR enziminin miktarının yetersiz olması nedeniyle bundan sonraki çalışmalara FIREPol® DNA Polimeraz enzimi kullanılarak yeni bir PCR protokolü (Tablo 4.5-4.6) ile çalışmaya devam edilmiştir.

Tablo 4.5. FIREPol® DNA Polimeraz enzimi protokolü için kullanılan reaksiyon karışımı

Reaksiyon Karışımı	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
FIREPol® DNA Polimeraz (5 U/µl)	0.1	
FIREPol® 10xBuffer B	2	1x
25 mM MgCl ₂	1.2	1.5 mM
dNTP mix (20 mM)	0.4	Her bir dNTP için 400 µM
Primer (sense)	0.6	300 nM
Primer (antisense)	0.6	300 nM
Template DNA	1	
RNase-free H ₂ O	14.1	
Toplam	20	

Tablo 4.6. FIREPol® DNA Polimeraz enzimi protokolü için kullanılan PCR koşulları

	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	95	30 s	35
Primer bağlanma	52	45 s	35
Uzama	72	1 dk 30 sn	35
Son uzama	10	10 dk	1

Ancak, bir önceki çalışmaya (Şekil 4.25) ait RT-PCR reaksiyon ürünlerinin 1:10 oranında sulandırılmasıyla gerçekleştirilen PCR işleminden sonuç alınamamıştır (Şekil 4.26). Bu çalışmalar sırasında; Çar-Yuk-1, Çar-Yuk-7, Çar-Eğri-3 izolatlarına ait dsRNA örnekleri ile sekans dizilerinin elde edilebilmesine yeterli olabilecek miktarda PCR ürünü elde edilemediğinden Çar-Eğri-13 izolatına ait sekans verileri ile çalışmaya devam edilmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.26. PeCpF ve PeCpR primerleri ve Trabzon hurması yapraklarından elde edilen dsRNA'lar FIREPol® DNA Polimeraz enzimi kullanılarak elde edilen PCR ürünlerine ait %1'lik agaroz jel elektroforez, M1: 1 KB Ladder (Katalog no: SM0314, Promega), 1: Çar-Yuk-1 izolatı (1:10 sulandırılmış PCR ürünü) 2: Çar-Yuk-7 izolatı (1:10 sulandırılmış PCR ürünü)

4.6. Persimmon cryptic virus Çar-Eğri-13 İzolatının Kapsid Protein Bölgesinin Sekans Verilerinin Analizi

Bu çalışmada Çar-Eğri-13 izolatının kapsid protein bölgesine ait ileri ve geri yönlü primerler ile elde edilen sekans verilerinden Mega 11 programı aracılığıyla ortak konsensus dizi oluşturulmuştur. Çar-Eğri-13 izolatına ait konsensus dizi FASTA formatına çevrilmiştir ve NCBI'da BLASTn analizine tabi tutulmuştur. Çar-Eğri-13 izolatının farklı ülkelerde yürütülen çalışmalardaki PeCV izolatları ile aralarındaki nükleotit bakımından benzerlik oranları elde edilmiştir (Tablo 4.7). Blast analiz sonuçlarına göre Çar-Eğri-13 izolatının GenBank'da tüm sekans verisi bulunan tek izolat olan İtalyan izolatı SSPI (HE805114) ile %99,69 oranında benzerlik içerdiği belirlenmiştir. Ayrıca diğer cryptic virüsler ile de nükleotit benzerliğine sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Persimmon cryptic virus Çar-Eğri 13 İzolatının Nükleotit Blast Analiz Sonuçları

Virüs	İzolat Adı	NCBI Kayıt No	Kapsadığı Nükleotit Oranı (%)	Benzerlik Oranı (%)	Orijini
Persimmon cryptic virus	Samsun S3	KT962117	14	96.48	Türkiye
Persimmon cryptic virus	Persimmon	LC427233	59	99.47	Kore
Persimmon cryptic virus	FuyuTCG A4	MF804511	14	99.29	Güneydoğu ABD
Persimmon cryptic virus	MK-PeCV-1	MK722176	54	100	Kuzey Makedonya
Persimmon cryptic virus	Algemesi	KX352444	61	100	İspanya
Persimmon cryptic virus	SSPI	HE805114	100	99.69	İtalya
Persimmon cryptic virus	KO	AB968365	79	99.22	Kore
Panax cryptic virus 2	Cho	MH898511	91	67.26	Kore
Panax cryptic virus 2	Won	MH898510	91	67.26	Kore
Dactylorhiza cryptic virus 1	Won	MH898488	64	66.91	Kore
Pepper cryptic virus 2	Ember	MG542626	14	72.06	ABD

Diğer taraftan, Çar-Eğri 13 izolatının kapsid protein bölgesinin amino asit dizilimi elde edilmiştir. BLASTp analizi ile amino asit dizilimi GenBank'ta yer alan diğer PeCV ve cryptic virus izolatlarının amino asit dizileri ile karşılaştırılmış ve benzerlik oranları belirlenmiştir (Tablo 4.8). Çar-Eğri-13 izolatının kapsid protein bölgesi amino asit dizilimi bakımından İtalyan izolatı SSPI (YP_006390090) ile %99,69 ve Panax cryptic virus (QED42885) ile %67.8 benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

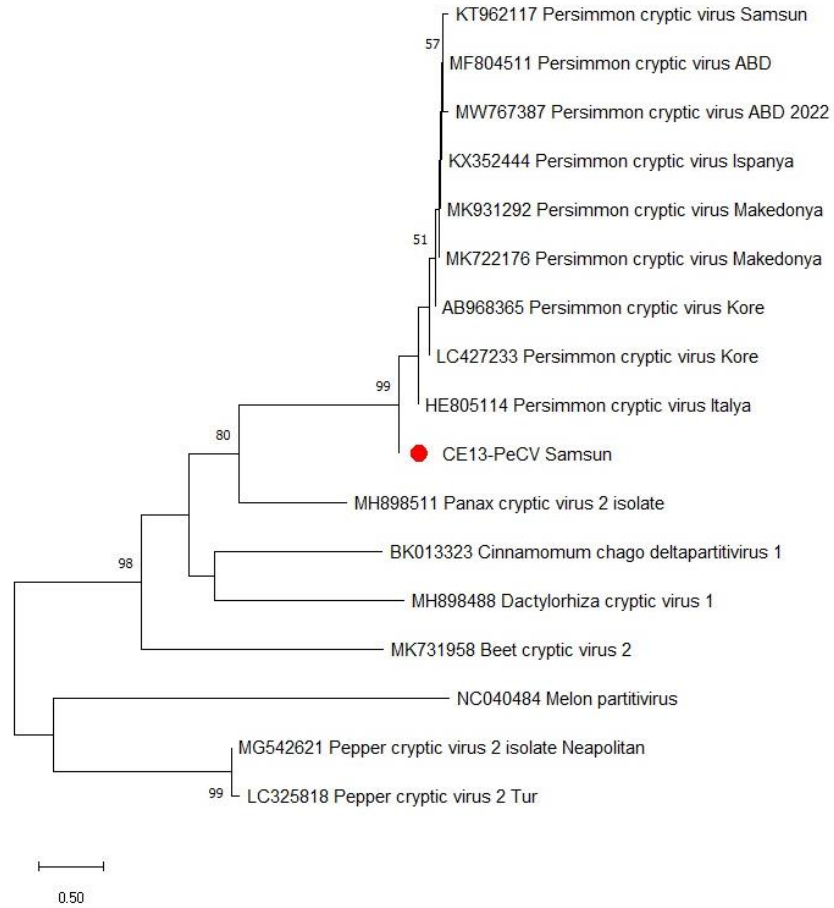
Tablo 4.8. Persimmon cryptic virus Çar-Eğri 13 İzolatının Amino Asit Blast Analiz Sonuçları

Virüs	İzolat Adı	NCBI Kayıt No	Kapsadığı Amino Asit Oranı (%)	Benzerlik Oranı (%)	Orijini
Persimmon cryptic virus	SSPI	YP_006390090	100	99.69	İtalya
Persimmon cryptic virus	KO	BAO98799	80	100	Kore
Persimmon cryptic virus	Algemesi	ANW45880	61	100	İspanya
Persimmon cryptic virus	Persimmon	BBG58116	59	100	Kore
Persimmon cryptic virus	MK-PeCV-1	QEO60642	54	100	Kuzey Makedonya
Panax cryptic virus	Won	QED42885	100	67.80	Kore
Dactylorhiza cryptic virus 1	Won	QED42873	95	55.08	Kore
Mulberry cryptic virus 1	21716931-M	AWN09390	88	53.71	İngiltere
Morus alba cryptic virus	-	UID86016	88	53.71	Çin
Carnation cryptic virus 3	DC	BBM06289	88	51.05	Güney Kore
Amaranthus cryptic virus 2	Won	QED42861	98	46.84	ABD
Plant associated deltapartitivirus 6	JUR20SW1	UTQ50856	100	40.18	Slovenya
Pepper cryptic virus 2	Chiltepin53	AYA43803	93	42.62	Meksika
Vitis cryptic virus	T1	BCS51498	90	43.99	Japonya
Beet cryptic virus 2	BCV2-JKI 1825732	QCF59321	88	44.37	Almanya
Panax cryptic virus 1	Won	QED42881	89	35.99	Çin
Citrullus lanatus partitivirus	-	QLC27869	87	37.81	Brezilya
Pepper cryptic virus 1	Chiltepin30	AYA43792	86	36.30	ABD

4.7. Persimmon Cryptic virus Çar-Eğri-13 izolatının moleküler filogenetik analizi

Kapsid protein bölgesinin sekans analizi sonrasında Çar-Eğri-13 izolatının, NCBI'da kayıtlı bulunan PeCV izolatları ile filogenetik ilişkisi araştırılmıştır. Bunun için NCBI'dan indirilen PeCV izolatlarından 9 tanesi seçilerek filogenetik ağaç oluşturmak için kullanılmıştır (Tablo 3.6). Öncelikle ClustalW yöntemi ile izolatların kapsid protein gen bölgelerine ait nükleotit dizileri hizalanmıştır. Daha sonra Mega 11 yazılımında (Tamura vd., 2021) yer alan Neighbor-Joining Yöntemi (Saitou ve Nei, 1987) kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

Oluşan filogenetik ağaç incelendiğinde, 10 PeCV izolatının üç ayrı ana dala ayrıldığı gözlemlenmiştir. Çalışmada kullanılan Çar-Eğri-13 izolatının (CE13-peCV CP), diğer PeCV izolatları ile %99 bootstrap (seç-bağla testi) değeriyle desteklenen aynı soy hattından kaynaklandığı belirlenmiştir. Filogenetik ağaçtaki dal mesafeleri incelendiğinde bütün PeCV izolatlarının aralarında yakın bir genetik ilişki içerisinde olduğu anlaşılmıştır. Filogenetik ağacın tamamı incelendiğinde cryptic virüs türlerinin 2 ana dala ayrıldığı görülmektedir (Şekil 4.27). Pepper cryptic virus 2 izolatları ve Melon partitivirus izolatı farklı bir dalda toplanmıştır. Diğer taraftan ikinci ana dalda Panax cryptic virus 2 izolatının %80 bootstrap değeriyle PeCV izolatlarına en yakın genetik ilişki içerisinde olduğu belirlenmiştir. Beet cryptic virus 2'nin %98 bootstrap değeriyle ikinci ana dalda diğer izolatlardan ayrı bir alt dala ayrıldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4. 27. Mega 11 Programında Neighbor-Joining Yöntemi kullanılarak PeCV izolatlarının ve bazı cryptic virus izolatlarının kapsid protein gen bölgesi (CP) nükleotit dizi analizine göre filogenetik ilişkileri. Bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri 1000 olarak seçilmiş ve %50'nin altındaki değerler ağaçta yer almamıştır. Referans izolatları ait bilgiler Tablo 3.6' da yer almaktadır.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, Samsun ili Çarşamba ilçesinde farklı lokasyonlarda bulunan iki kapama Trabzon hurması bahçesinin PeCV ile bulaşıklık durumu araştırılmıştır. PeCV, çift zincirli RNA (dsRNA) özelliğinde genom yapısına sahip bir virüs türüdür (Morelli vd., 2015). Morris ve Dodds (1979) tarafından bitki bünyesinde bulunan virüslerin dsRNA'larının izole edilmesi için oluşturulan ilk rapordan bu yana, başka yöntemler de geliştirilmiştir (Bar-Joseph vd., 1983; Choi ve Randles, 1997; Valverde vd., 1990; Yoshikawa ve Converse, 1990). Bu çalışmada, Khabbazi vd. (2017) tarafından uygulanmış olan dsRNA izolasyon yöntemi modifiye edilerek Trabzon hurması yapraklarından PeCV dsRNA'larının izolasyonu için kullanılmıştır. İzolasyon yönteminde, başlangıç materyali olarak üç farklı ağırlıkta (0.5 gr, 1 gr ve 1.5 gr) semptomlu ve semptomsuz Trabzon hurması yaprak dokusu denenmiştir. dsRNA izolasyonunu takiben, PeCV'ye özgü primerler kullanılarak, RT-PCR yöntemi ile PeCV'nin kapsid protein bölgesinin bir bölümü çoğaltılmaya çalışılmıştır. dsRNA izolasyonunda 0.5 gr ve 1 gr yaprak dokusu kullanıldığında, örnek miktarının yeterli olmadığı ve RT-PCR ile sonuca ulaşamadığı tespit edilmiştir. Kullanılan yaprak miktarının önemli olduğu ve yöntemin sadece 1.5 gr hem semptomlu hem de semptomsuz yaprak dokuları ile başarılı sonuç verdiği belirlenmiştir. Bu yöntem, Trabzon hurmasında PeCV'nin belirlenmesi için ilk kez kullanılmıştır.

Morelli ve Arlı-Sökmen (2016)'in yürüttükleri çalışmada semptomlu ağaçlardan alınan örneklerde PeCV'yi saptamışlardır. Jevremović vd. (2019), beş tane Trabzon hurması ağacından 4 semptomlu ve 1 semptomsuz yaprak örneğini PeCV'ye karşı test etmişler ve semptomlu örneklerin hepsinden sonuç elde edilirken, semptomsuz örnek ile sonuca ulaşamamışlardır. Bu tez çalışmasında ise, hem semptomlu (3 adet) hem de semptomsuz (4 adet) örneklerden sonuç elde edilmiştir. Cho vd. (2016), Trabzon hurması ağaçlarından 3 semptomlu ve 74 semptomsuz olmak üzere toplam 77 yaprak örneğini alarak PeCV'ye karşı test etmiş ve 67 örnekten sonuç elde etmişlerdir. Ruiz-García vd. (2017), Trabzon hurması ağaçlarından 5 adet semptomlu ve 5 adet semptomsuz olmak üzere toplam 10 yaprak örneğini PeCV'ye karşı test etmiş ve örneklerin 9 tanesinde sonuç elde etmişlerdir.

Speiegel (1987), kullanmış olduğu dsRNA izolasyon yöntemiyle 50 gr taze yaprak dokusundan Strawberry mild yellow-edge virus'e ait dsRNA'ları izole etmiştir. Bir başka çalışmada, Tzanetakis ve Martin (2008), içlerinde *Fragaria chiloensis* latent

virus ve *Fragaria chiloensis cryptic virus*'ün de bulunduğu altı adet virüsün tanısı amacıyla dsRNA'ları izole etmişlerdir. İzolasyonda 10 gr yaprak dokusu kullanarak RT-PCR sonucunda yöntemin çalıştığını belirlemişlerdir. Fazla miktarda yaprak dokusu kullanmak enfekteli dokudan faydalanmayı kısıtlayacağı gibi işlem süresinin uzamasına da neden olmaktadır. Bizim araştırmamızda ise izolasyon aşamasında çok az miktarda (sadece 1.5 gr) yaprak dokusu kullanarak başarılı bir sonuç elde edilmiştir.

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, Blouin vd. (2016), dsRNA izolasyon yönteminde kullanılan yaprak dokusu miktarını 0.1 gr'a düşürmüşlerdir. Ancak bu yöntemde mevcut dsRNA izolasyon kiti ve anti-dsRNA monoklonal antikor kullanılması maliyeti artırmıştır. Sınırlı finansal kaynaklara sahip laboratuvarlar için bu yöntem uygun olmayabilir. Bu tez çalışmasında dsRNA izolasyon kiti gibi yüksek maliyetli ürünler kullanılmayarak tasarruf edilmiştir.

Önceki çalışmalarda kullanılan dsRNA izolasyon yöntemlerinin birçoğu fenol içeren yöntemlerdir (Watkins vd., 1990; Okada vd., 2015). Fenol RNA'nın proteinlerden ayrılmasına ve çöktürülmesine yardımcı olur, ancak çevre ve insan sağlığı açısından olumsuz etkilere sahiptir. Bundan dolayı, çalışmamızda zararlı olan kimyasal madde içeriği az olan bir yöntem tercih edilmiştir.

Birçok çalışmada, dsRNA izolasyon yönteminde kullanılan Whatman Cellulose CF-11 artık üretici firma tarafından üretilmemektedir. CF-11 yerine kolayca temini sağlanan ve Khankhum vd. (2016) tarafından dsRNA izolasyon işlemi sırasında örnek başına 100 mg olarak kullanılan Cellulose fibers (Catalog No. C6288, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dsRNA'ların bağlanmasında başarılı olmuştur. Bu tezde daha az miktarda (15 mg) Cellulose fibers kullanılarak benzer şekilde sonuç elde edilmiştir.

Cryptic virüslerin, mekanik olarak bitki öz suyu ile bulaştırılamadığı daha önceki çalışmada bildirilmiştir (Dodds vd., 1984). Boccardo vd. (1985), bulaşık olmayan beyaz yonca ve diğer otsu bitkilere White clover cryptic virus (WCCV-1 ve WCCV-2)'ün mekanik olarak iletilmesine yönelik çalışmalar yapmışlardır. İnokule ettikleri bitkileri ELISA yöntemiyle test etmişlerdir. Test sonucuna göre bitki öz suyu ile bulaştırmada başarısız oldukları bildirilmiştir.

PeCV'nin biyolojik karakterizasyonu ile ilgili Morelli vd. (2015) tarafından yapılan çalışma dışında, literatürde herhangi bir başka çalışmaya rastlanılmamıştır. Morelli vd. (2015), semptomlu Trabzon hurması yaprağından izole ettikleri PeCV'yi

bazı konukçu bitkilere inokule etmişlerdir. Bu konukçular üzerinde, 4 hafta sonunda hiçbir simptom elde edemediklerini bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında incelenen PeCV izolatları, *N. glutinosa*, *N. rustica*, *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*, *Capsicum annuum* ve *Cucumis sativus*'da herhangi bir simptom oluşturmaması bakımından, yapılan diğer çalışma ile benzerlik göstermektedir. Ancak PeCV'nin zaman zaman latent (simptomsuz) bir virüs olması sebebiyle, sadece simptomolojik açıdan değil ayrıca test bitkilerinden dsRNA izolasyonu yapılarak moleküler teknikler ile PeCV enfeksiyonu bu çalışmada ayrıca incelenmiştir. İzolasyon sonrasında, PeCV'nin kapsid protein bölgesine-özü bir çift primer kullanılarak RT-PCR yöntemi uygulanmıştır. RT-PCR sonucunda beklenen büyüklükte (Şekil 4.12) ve ayrıca virüse-özü olmayan bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.14). Ancak, tekrarlanan diğer mekanik inokulasyon çalışmasını takiben, dsRNA izolasyonu ve RT-PCR uygulamalarında bir önceki gibi kapsid protein bölgesine özü ürün elde edilememiştir. Bu nedenle Şekil 4.12'deki test bitkilerine ait PCR ürünlerinin aynı reaksiyonda pozitif kontrol olarak kullanılan dsRNA örneğinden kontaminasyon sonucu elde edilmiş olabileceği sonucuna varılmıştır. PeCV'nin biyolojik karakterizasyonunu teyit edebilmek için yeniden *N. glutinosa*, *N. rustica*, *Vigna unguiculata*, *Cucumis sativus* ve *N. benthamiana* bitkilerine Trabzon hurması yaprağından PeCV'nin mekanik olarak bulaştırılmasına çalışılmıştır. İnokulasyondan 3 hafta sonra test bitkilerinden dsRNA izolasyonu yapılarak PeCV enfeksiyonu incelenmiştir. İzolasyon sonrasında, PeCV'nin kapsid protein bölgesine-özü bir çift primer kullanılarak RT-PCR yöntemi uygulanmıştır. RT-PCR sonucunda beklenen büyüklükte (Şekil 4.24) bant elde edilememiştir. Bu nedenle çalışmada kullanılan test bitkilerinin PeCV'nin konukçusu olmadığı sonucuna varılmıştır. Gelecekteki çalışmalarda, farklı bitki türleri kullanılarak otsu test bitkilerine PeCV'nin mekanik olarak inokulasyon çalışmalarına devam edilmesi gerekmektedir.

Filogenetik analize göre Çar-Eğri-13 izolatının İtalyan izolatı (HE805114) ve diğer PeCV izolatları ile aynı soy hattından kaynaklandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.27). Nükleotit ve amino asit sekans dizilerinin Blast analizi bu çalışmaya ait Çar-Eğri-13 izolatının İtalyan SSPI izolatı (HE805114) ile %99,69 oranında benzer olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, Çar-Eğri-13'ün diğer cryptic virüslerden Panax cryptic virus 2 ile %67,26, Dactylorhiza cryptic virus 1 ile %66,91 ve Pepper cryptic virus 2 ile %72,06 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

6. SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında, Samsun ili Çarşamba ilçesinde bulunan Trabzon hurması yetiştiriciliği yapılan alanlarda, PeCV'nin varlığı moleküler yöntemlerle belirlenmiş ve elde edilen Çar-Eğri-13 izolatının diğer PeCV izolatları ile birbirine olan genetik yakınlık düzeyleri incelenmiştir. Bu kapsamda 2021 yılında yapılan survey çalışmasında semptomlu ve semptomsuz ağaçlardan alınan yaprak örneklerinin hepsinde PeCV'nin varlığı tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, uygulanan dsRNA izolasyon yöntemi, PeCV'nin dsRNA' sının elde edilmesinde başarılı olunmuştur. Ancak kullanılan yaprak dokusu miktarının yöntemin başarısında önemli olduğu belirlenmiştir.

CF-11 üretiminin üretici firma tarafından sonlandırılması nedeniyle CF-11 yerine kullanılan Selüloz fibers oldukça az miktarda doku örneğinden dsRNA elde edilmesini sağlamıştır. Bunun yanı sıra, bu çalışmada kullanılan yöntemin fenol içermemesi, insan sağlığı bakımından zararlı olmaması önemli bulunmuştur.

Ekonomik olması sebebiyle, dsRNA yönteminin gelecekte Trabzon Hurması anaç, kalem ve fidanlıkların sertifikasyonu amaçlı test edilmesinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Ayrıca bu çalışmada, farklı otsu test bitkilerine PeCV'nin mekanik olarak bitki öz suyu ile bulaştırılıp-bulaştırılmadığı incelenmiştir. Çalışma sonunda altı farklı test bitkisinin herhangi bir semptom oluşturmadağı belirlenmiştir. Bununla birlikte test bitkilerinden dsRNA izolasyonu yapılarak moleküler açıdan da PeCV enfeksiyonu araştırılmıştır. Bu çalışmada kullanılan altı farklı test bitkisinin PeCV'nin konukçusu olmadığı belirlenmiştir.

KAYNAKÇA

- Abou Kubaa, R., Saldarelli, P., Attar, B., Jreijiri, F., & Choueiri, E. (2019). First report of *Pittosporum cryptic virus 1* in *Pittosporum tobira* in Lebanon. *Journal of Plant Pathology*, 102(2), 567–567. doi:10.1007/s42161-019-00455-8.
- Abou-Elnasr, M., Jones, A., & Mayo, M. (1985). Detection of dsRNA in particles of vicia cryptic virus and in *Vicia faba* tissues and protoplasts. *Journal of General Virology*, 66, 2453-2460.
- Andrews, J. (1999). *The pepper trail: history and recipes from around the world*. Denton, Texas: Univ. North Texas Press.
- Bar-Joseph, M., Rosner, A., Moscovitz, M., & Hull, R. (1983). A simple procedure for the extraction of double-stranded RNA from virus-infected plants. *Journal of Virological Methods*, 6(1), 1–8. doi:10.1016/0166-0934(83)90062-9 .
- Blouin, A., Ross, H., Hobson-Peters, J., O'brien, C., Warren, B., & MacDiarmid, R. (2016). A new virus discovered by immunocapture of double-stranded RNA, a rapid method for virus enrichment in metagenomic studies. *Molecular Ecology Resources*, 16(5), 1255-1263.
- Boccardo, G., Lisa, V., Luisoni, E., & Milne, R. (1987). Cryptic plant viruses. *Adv. Virus Res.*, 33, 171 –214. doi:10.1016/S0065-3527(08)60477-7.
- Boccardo, G., Milne, R., Luisoni, E., Lisa, V., & Acotto, G. (1985). Three seedborne cryptic viruses containing double-stranded RNA isolated from white clover. *Virology*, 147(1), 29–40. doi:10.1016/0042-6822(85)90224-7 .
- Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A., & Özkan, M. (2001). Meyve ve Sebze Bileşimi Soğukta Depolanmaları. Ankara: Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 24.
- Chiumenti, M., Morelli, M., Saldarelli, P., & Giampetruzzi, A. (2015). Bioinformatic analysis of NGS libraries: a modern tool for discovery and characterization of viral diseases in ancient fruit crops . *Conference: NETTAB & Integrative Bioinformatics Joint Symposium*, (s. 162-164). Bari, Italy.
- Cho, I., Park, M., Kwon, S., Choi, G., Hammond, J., & Lim, H. (2016). First report of Persimmon cryptic virus and Persimmon virus A in Korea. *Journal of Plant Pathol*, 98:694.
- Cho, I., Yang, C., Yoon, J., Kwon, T., Hammond, J., & Lim, H. (2020). First report of Passiflora latent virus(Passiflora latent virus;PLV) infecting persimmon in Korea. *Plant Disease*.
- Choi, Y., & Randles, J. (1997). Microgranular cellulose improves dsRNA recovery from plant nucleic acid extracts. *BioTechniques*, 23, 610–611.
- Dodds, J., Morris, T., & Jordan, R. (1984). Plant Viral Double-Stranded RNA. *Annual Review of Phytopathology*, 22(1), 151–168.
- Ehlers, J., & Hall, A. (1997). Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops Research*, 53(1-3), 187–204. doi:10.1016/s0378-4290(97)00031-2 .
- Elbeaino, T., Kubaa, R., Digiaro, M., Minafra, A., & Martelli, G. (2011). The complete nucleotide sequence and genome organization of Fig cryptic virus, a novel bipartite dsRNA virus infecting fig, widely distributed in the Mediterranean basin. . *Virus Genes*, 42(3), 415–421. doi:10.1007/s11262-011-0581-0.
- FAO. (2020). FAOSTAT. www.faostat.fao.org adresinden alındı

- Fauquet, C., Mayo, M., Maniloff, J., Desselberger, U., & Ball, L. (2005). *Virus taxonomy Eighth report of the International Committee on taxonomy of viruses*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press.
- Felsenstein, J. (tarih yok). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- Gaffar, Y., Sieg-Müller, A., Lüddecke, P., Hartrick, J., Seide, Y., Schuhmann, S., . . . Ziebell, H. (2019). First report of natural infection of beetroot with Beet soil-borne virus. *New Disease Reports*, 5.
- Gregory, A., Scott, S., Brannen, P., & Royal, D. (2018). Graft-transmissible agents in oriental persimmons (*Diospyros kaki* L) in the southeastern USA. *Australasian Plant Disease Notes*, 13(1). doi:10.1007/s13314-018-0306-5.
- Günay, A. (2005). *Sebze Yetiştiriciliği*. İzmir: Meta Basımevi, Cilt-II.
- Ito, T., & Sato, A. (2020). Three novel viruses detected from Japanese persimmon “Reigyoku” associated with graft-transmissible stunt. *European Journal of Plant Pathology*, doi: 10.1007/s10658-020-02063-0.
- Ito, T., Sato, A., & Suzuki, K. (2015). An assemblage of divergent variants of a novel putative closterovirus from American persimmon. *Virus Genes*, 51(1), 105–111. doi:10.1007/s11262-015-1202-0.
- Ito, T., Suzuki, K., & Nakano, M. (2013). Genetic Characterization of Novel Putative Rhabdovirus and dsRNA Virus from Japanese Persimmon. *Journal of General Virology*, 1917-1921.
- Jeyremovic, D., & Paunovic, S. (2019). First report of Persimmon cryptic virus in persimmon in North Macedonia. *Journal of Plant Pathol*, 01: 1285.
- Jo, Y., & Cho, W. (2020). Identification of viruses belonging to the family Partitiviridae from plant transcriptomes. *Research Institute of Agriculture and Life Sciences*. Seoul 08826, Republic of Korea: Seoul National University.
- Karadeniz, T. (2004). *Şifalı Meyveler (Meyvelerle Beslenme ve Tedavi Şekilleri)*. Ordu.: Burcan Ofset Matbaası.
- Kassanis, B., Russell, G., & White, R. (1978). Seed and Pollen Transmission of Beet Cryptic Virus in Sugar Beet Plants. *Journal of Phytopathology*, 91(1), 76–79.
- Kassanis, B., White, R., & Woods, R. (1977). Beet cryptic virus. *Journal of Phytopathology*, Z. 90, 350-360.
- Kenten, R., Cockbain, H., & Woods, R. (1978). Vicia cryptic virus. *Report of Rothamsted Experimental Station for 1977*, 222.
- Khabbazi, A., Bashir, N., Khabbazi, S., & Ighani, H. (2017). Extraction and molecular detection of viral dsRNA from different infected plants. *Journal of Scientific Agriculture*, 1, 197-203.
- Khankhum, S., Escalante, C., de Souto, E., & Valverde, R. (2016). Extraction and electrophoretic analysis of large dsRNAs from desiccated plant tissues infected with plant viruses and biotrophic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 147(2), 431–441. doi:10.1007/s10658-016-1014-7 .
- King, A., Lefkowitz, E., Mushegian, A., Adams, M., Dutilh, B., Gorbalenya, A., . . . Davison, A. (2018). Changes to taxonomy and the international code of virus classification and nomenclature ratified by the international committee on taxonomy of viruses. *Archives of Virology*, 163, 2601-2631.
- Kishore, K. (2014). Monograph of Tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Indian Journal of Drugs*, 2: 5-23.

- Kitagawa, H., & Glucina, P. (1984). *Persimmon Culture in New Zealand*. Wellington, N.Z.: Science Information Publishing Center.
- Lesker, T., Rabenstein, F., & Maiss, E. (2013). Molecular characterization of five betacryptoviruses infecting four clover species and dill. *Archives of Virology*, 158(9), 1943–1952. doi:10.1007/s00705-013-1691-x.
- Li, R., Mock, R., Huang, Q., Abad, J., Hartung, J., & Kinard, G. (2008). A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *Journal of Virol Methods*, 154:48–55.
- Lisa, V., Boccardo, G., & Milne, R. (1981). *Virology*, 115, 410-413.
- Lisa, V., Luisoni, E., & Milne, R. (1980). *Acta Horti*, 110, 175-176.
- Luisoni, E., Milne, R., Accotto, G., & Boccardo, G. (1987). Cryptic Viruses in Hop Trefoil (*Medicago lupulina*) and Their Relationships to Other Cryptic Viruses in Legumes. *Intervirology*, 28(3), 144–156. doi:10.1159/000150010.
- Milleza, E., Ward, L., Delmiglio, C., Tang, J., Veerakone, S., & Perez-Egusquiza, Z. (2013). A survey of viruses infecting *Rosa* spp. in New Zealand. *Australasian Plant Pathology*, 42(3), 313–320. doi:10.1007/s13313-012-0191-x.
- Morelli, M., & Arli-Sokmen, M. (2016). First report of Persimmon cryptic virus in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 98:183.
- Morelli, M., Chiumenti, M., De Stradis, A., La Notte, P., & Minafra, A. (2015). Discovery and Molecular Characterization of a Novel Cryptovirus from Japanese Persimmon Through Conventional Cloning and High-Throughput Sequencing. *Virus Genes*, 50:160-164.
- Morelli, M., Chiumenti, M., La Notte, P., Minafra, A., & Martelli, G. (2014). First report of persimmon virus A in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 96, 610.
- Morelli, M., De Stradis, A., La Notte, P., Merkuri, J., Boscia, D., & Minafra, A. (2012). Detection and molecular characterization of a novel Cryptovirus from persimmon (*Diospyros kaki*). In *Abstracts, 22nd International Conference on Virus and Other Transmissible Diseases of Fruit Crops*, (s. p 117). Rome, Italy: ICVF.
- Morris, T., & Dodds, J. (1979). Isolation and analysis of double stranded RNA from virus infected plants and fungal tissue. *Phytopathology*, 69, 854-858.
- Nakaune, R., & Nakano, M. (2008). Identification of a New Apscaviroid from Japanese Persimmon. *Archives of Virology*, 153, 969-972.
- Natsuaki, T., Natsuaki, K., Okuda, S., Teranaka, S., Milne, R., Boccardo, G., & Luisoni, E. (1986). *Zntervirology*. 25, 69-75.
- Natsuaki, T., Yamashita, S., Doi, Y., Okuda, S., & Teranaka, M. (1983). *Phytopathol.* 49, 593-599.
- Nibert, M., Ghabrial, S., Maiss, E., Lesker, T., Vainio, E., Jiang, D., & Suzuki, N. (2014). Taxonomic reorganization of family Partitiviridae and other recent progress in partitivirus research. *Virus Research*, 188, 128-141.
- Nibert, M., Woods, K., Upton, S., & Ghabrial, S. (2009). Cryspovirus: a new genus of protozoan viruses in the family Partitiviridae. *Archives of Virology*, 154(12), 1959–1965. doi:10.1007/s00705-009-0513-7.
- Nwokolo, E. (1996). *Common Bean*, In: *Food and Feed from Legumes and Oilseeds*. UK: Chapman and Hall.
- Ochoa, W., Havens, W., Sinkovits, R., Nibert, M., Ghabrial, S., & Baker, T. (2008). Partitivirus structure reveals a 120-subunit, helix-rich capsid with distinctive surface arches formed by quasisymmetric coat-protein dimers. *Structure*, 16 (5): 776-86. doi: 10.1016/j.str.2008.02.014.

- Okada, R., Kiyota, E., Moriyama, H., Fukuhara, T., & Natsuaki, T. (2015). A simple and rapid method to purify viral dsRNA from plant and fungal tissue. *Journal of General Plant Pathology*, 81(2), 103–107. doi:10.1007/s10327-014-0575-6 .
- Onur, S. (1990). Trabzon hurması. Derim, Narenciye Araştırma Enstitüsü (özel sayı).
- Osaki, H., & Sasaki, A. (2017). A novel alphapartitivirus detected in Japanese pear. *Virus Genes*, 54(1), 149–154. doi:10.1007/s11262-017-1511-6 .
- Owens, R., Flores, R., Di Serio, F., Li, S., Pallas, V., Randles, J., . . . Vidalakis, G. (2012). Virus Taxonomy, Ninth Report of The International Committee on Taxonomy of Viruses. *Academic Press* (s. 1221-1234). içinde San Diego, CA.
- Özcan, M. (2005). *Trabzon Hurması Yetiştiriciliği*. Hasad Yayınları.
- Özcan, M. (2018). Türkiye'de Trabzon Hurması (*Diospyros kaki* L.) Yetiştiriciliğinin Sorunları ve Geleceği. *Black Sea Journal of Agriculture* 1(2): 38-43.
- Park, D., & Hahn, Y. (2017). Genome sequence of Spinach cryptic virus 1, a new member of the genus Alphapartitivirus (family Partitiviridae), identified in spinach. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(4), 834-837.
- Rossinck, M. (2008). Plant Virus Evolution. doi:10.1007/978-3-540-75763-4 .
- Ruiz-Garcia, A., Chamberland, N., Martinez, C., Massart, S., & Olmos, A. (2017). First Report of Persimmon Cryptic Virus in Spain. *Journal of Plant Pathol*, 99:287.
- Sabanadzovic, S., & Valverde, R. (2011). Properties and detection of two cryptoviruses from pepper (*Capsicum annuum*). *Virus Genes*, 43(2), 307–312. doi:10.1007/s11262-011-0634-4.
- Saitou, N., & Nei, M. (tarih yok). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* , 4:406-425.
- Salem, N., Golino, D., Falk, B., & Rowhani, A. (2008). Complete nucleotide sequences and genome characterization of a novel double-stranded RNA virus infecting *Rosa multiflora*. *Archives of Virology*, 153(3), 455–462. doi:10.1007/s00705-007-0008-3.
- Sidharthan, V., Kalaivanan, N., & Baranwal, V. (2021). Discovery of putative novel viruses in the transcriptomes of endangered plant species native to India and China. *Gene*, 1-9.
- Skelton, A., Fowkes, A., Adams, I., Buxton-Kirk, A., Harju, V., Forde, S., & Fox, A. (2018). First report of *Prunus* necrotic ringspot virus and Mulberry cryptic virus 1 in mulberry (*Morus alba*) in the United Kingdom. *New Dis Rep*, 37(23), 2044-0588.
- Speiegel, S. (1987). Double-stranded RNA in strawberry plants infected with strawberry mild yellow-edge virus. *Phytopathology*, 77, 1492-1494.
- Svanella-Dumas, L., Theil, S., Barret, M., & Candresse, T. (2018). Complete genomic sequence of *Raphanus sativus* cryptic virus 4 (RsCV4), a novel alphapartitivirus from radish. *Archives of Virology*, 163(4), 1097–1100. doi:10.1007/s00705-017-3693-6 .
- Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (tarih yok). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* , 101:11030-11035.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Molecular Biology and Evolution.
- Tatlıoğlu, T. (1993). Cucumber. *Genetic Improvement of Vegetable Crops*, 197–234. doi:10.1016/b978-0-08-040826-2.50017-5 .
- Thompson, J., Higgins, D., & Gibson, T. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-

- specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.
- TÜİK. (2021). *Bitkisel Üretim İstatistikleri*. www.tuik.gov.tr adresinden alındı
- Türkomp. (2022). Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı. : <http://www.turkomp.gov.tr/food-trabzon-hurmasi-meyve-et-rengi-sari-kararli-319> adresinden alındı
- Tzanetakis, I., & Martin, R. (2008). A new method for extraction of double-stranded RNA from plants. *Journal of Virological Methods*, 149(1), 167–170. doi:10.1016/j.jviromet.2008.01.014.
- Vainio, E., Chiba, S., Ghabrial, S., Maiss, E., Roossinck, M., Sabanadzovic, S., . . . Nibert, M. (2018). ICTV . ICTV Virus Taxonomy Profile: Partitiviridae: <https://ictv.global/report/chapter/partitiviridae/partitiviridae> adresinden alındı
- Valverde, R., Nameth, S., & Jordan, R. (1990). Analysis of double stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease*, 74, 255–258.
- Watkins, C., Jones, A., Mayo, M., & Mitchell, M. (1990). Double-stranded RNA analysis of strawberry plants affected by June yellows. *Annals of Applied Biology*, 117(1), 73–83.
- White, R., & Woods, R. (1978). *Phytopathol*, 2. 91, 91-93.
- Xie, W., Antoniw, J., & White, R. (1993). Nucleotide sequence of beet cryptic virus 3 dsRNA2 which encodes a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of General Virology*, 74(7), 1467–1470. doi:10.1099/0022-1317-74-7-1467.
- Xin, M., Cao, M., Liu, W., Ren, Y., Lu, C., & Wang, X. (2017). The genomic and biological characterization of Citrullus lanatus cryptic virus infecting watermelon in China. *Virus Research*, 232, 106–112.
- Xudong, F., & Ren, F. (2022). First report of Vitis cryptic virus from grapevines in China. *Plant Disease*.
- Yoshikawa, N., & Converse, R. (1990). Strawberry pallidosis disease: distinctive dsRNA species associated with latent infections in indicators and in diseased strawberry cultivars. *Phytopathology* , 80, 543–548.
- Yönel, S., Uyulaşer, V., & Yonak, S. (2008). Trabzon Hurmasının Bileşimi ve Besleyici Değeri. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, (s. 339-342).
- Zhan, B., Cao, M., Wang, K., Wang, X., & Zhou, X. (2019). Detection and Characterization of Cucumis melo Cryptic Virus, Cucumis melo Amalgavirus 1, and Melon Necrotic Spot Virus in Cucumis melo. *Viruses*, 11(1), 81. doi:10.3390/v11010081.
- Ziegler, A., Matousek, J., Steger, G., & Schubert, J. (2011). Complete sequence of a cryptic virus from hemp (Cannabis sativa). *Archives of Virology*, 157(2), 383–385.

EKLER

EK-1: PeCV Çar-Eğri 13 izolatının kılıf protein bölgesinin kısmi nükleotid ve amino asit dizileri

#Nükleotid Dizilimi (994 bp)



Başlangıç Kodonu

TTCCAATGGCAGACCAAGGTAATAATGAGACTCCTCTACCAGTCCA
GGCAACCCAACCAGCCGCAAACAGCGATCGTATACCGATCACGACCCTC
CCTGCCCCCAGGTCACAAGCCCCCAATAAACCTGAATACGCACGGATTGC
AGACTCCCTGGAAGACGAATATCAAATCGGATTCCAACGGATCAATCCA
CGACTTCACCGTCGTTACGTTATCCTCAGGTCACAAGAGCTCCACGACCG
ATTGTGCAACTTGTATGCACCTTATTTTCAAGCTGGATATCGTGTTTTCAA
ACATGTTATCGAAGCTTACCCACTACCAGCGGGATACGCTAGTCAAATAG
CATATGCCACTGCGTGTTACGTGTCTTCGTGGTTCTGGGATCTTTACGTTT
CGATCCGAGAATCAGTTAAGAAGCTATCACAAACAGCGTTCCTCCAACA
ATACCAAACAGAACAATTCCACAGCCAGGACCGCTACGACCCATTCTCC
AGCATCTTAACACCGTCATCCGACCTACACACATCCCCGGTGGTTTAGAA
GATTCACCTCTATATCCCACTTATTGCTAACCACGTGCAATGGGGAAACCA
AAGCCCATTCGGCATTAAACCATTATGCCATAAATGAATCTCTGGTACAAG
GTCTCCTTGACGTTATGGACCTTAAGAACAATACTTGGCGTACTGTTCTC
TGTCCTCATGACACACTAGGCCGCCCAATGTGGCTTCTAGATTGGCGTCAA
AATCAAGCTTACGCCTGGTTTCCACAAGAAAACCACTTCTCTAAAGAAGA
TCTAATCGCCGCCCATATTCTTGGAATCCCCTGTTCTCCAAGACTAGGCC
TCGCGACGTTGATGATTGGCAATTCTTTCCAGGAAATGTCATGCCACAAC
ATATCAATATCGCCGCTTATGAAAGAGCAATTCCTCGACGATTCTTCGGA
GCAGCAGAGTATCGGAC

#Amino Asit Dizilimi (319 aa)

MADQGNNETPLPVQATQPAANS DRIPITTL PAPS QAPNKPEYARIADS
LEDEYQIGFQRINPRLHRRYVILRSQELHDRLCNLYAPYFQAGYRVFKHVIEA
YPLPAGYASQIAYATACYVSSWFWDLYVSIRESVKKLSQTAFLQQYQTEQF
HSQDRYDPFLQHLNTVIRPTHIPGGLED SLYIPLIANHVQWGNQSPFGINHYAI
NESLVQGLLDVMDLKNNTWRTVPLSHDTLGRPMWLLDWRQNQAYAWFPQ
ENHFSKEDLIAAHILGIPCS PRLGPRDVDDWQFFPGNVMPQHINIAAYERAIP
RRFFGAAEYR

ÖZ GEÇMİŞ

Sena ÇANKAYA, Samsun Anafartalar Anadolu Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Bitki Koruma Bölümü'nden 27.08.2020 tarihinde mezun oldu. 2020 yılında OMÜ LEE Bitki Koruma Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına girdi. Orta derecede İngilizce bilmektedir (YÖK-DİL: 58.75).

İletişim Bilgileri

ORCID ID: 0000-0002-5692-9527

Yayınlar:

1. Çankaya, S., Arlı-Sökmen, M. (2022). Samsun İli Trabzon Hurması (*Diospyros kaki* L.) Bahçelerinde Persimmon Cryptic Virus Enfeksiyonunun Araştırılması. IV-International Conference Of Food, Agriculture, And Veterinary Sciences On The Occasion Of The 4th Anniversary Of Van Yüzüncü Yıl University. May 27-28, 2022. ss. 417-418.
2. Kaya, S., Çankaya, S, Kutluk-Yılmaz, N.D. (2022). Detection of soil-borne viral and protozoal pathogens by simultaneous extraction of total nucleic acids from sugar beet roots. International Soil Science Symposium On Soil Science & Plant Nutrition. Samsun, Türkiye. pp. 49.