

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



PROJE BAŞLIĞI

**RNA interferans Mekanizması ile Nicotiana Benthamiana'da Şarka Hastalığına Dayanıklılık
Kazandırılması**

**Proje No:
FBA-11-3569**

Proje Türü:

NORMAL ARAŞTIRMA PROJESİ

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü

Y. Doç. Dr. Kahraman Gürcan, ERÜ Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü

Araştırmacılar

Prof.Dr. OSMAN GÜLŞEN, ERÜ Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü

DOÇ.DR. SEMİH YILMAZ, ERÜ Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü

DOÇ.DR. AYDIN UZUN, ERÜ Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü

DOÇ.DR. MİKAİL AKBULUT, ERÜ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

DOÇ.DR. KADİR UĞURTAN YILMAZ, ERÜ Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü

UZMAN Kemal DEĞİRMENCİ, Tarım Bakanlığı, Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü

Temmuz 2014

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi - BAP FBA-11-3569 No'lu proje ile maddi olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ/ AMAÇ VE KAPSAM	7
2. GENEL BİLGİLER	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM	12
4. BULGULAR	25
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	40
6. KAYNAKLAR	42

ÖZET

Potyviriidae üyesi olan Plum Pox Virüs'ün (PPV) etmeni olduğu Şarka hastalığı *Prunus* türlerinde çok önemli ekonomik kayıp nedenidir. Virüs 1930'ların başından beri istikrarlı bir şekilde yayılmaktadır. Son 15 yılda Güney ve Kuzey Amerika'ya yayılmıştır. Hastalığın Türkiye'de de yayılması devam etmektedir. Son yıllarda başta gen susturma olmak üzere biyoteknolojik yaklaşımlar hastalıklarla mücadelede kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada PPV genomunda P1, HC-Pro ve kılıf protein (CP) bölgelerini kapsayan beş fragmanın RNA interferans (RNAi) ve gen susturmadaki rolü çalışılmıştır. *Nicotiana Benthamina* ve *Prunus armenica* bitkisel materyal olarak kullanılmış, öncelikle rejenerasyon potansiyelleri çalışılmıştır. *Nicotiana Benthamina*'da tek hücreden rejenerasyon başarı ile gerçekleştirilmiştir. Hastalıklı bitkiler tespit edilmiş, bu hastalıklı bitkilerde serolojik (DASI-ELIZA) ve moleküler yöntemlerle (RT-PCR ve baz dizileme) virüs ırkı belirlenmiş, gen transferinde kullanılacak 5 gen bölgesine Gateway gen transformasyonuna uygun rekombinasyon bölgeleri (attB1 ve attB2) eklenmiş, transgen bölgeleri öncelikle pDONR201 vektörüne, daha sonra taşıyıcı vektöre (pHELLSGATE12) aktarılmıştır. Taşıyıcı vektörler elektroporasyon yöntemi ile *Agrobacterium tumefaciens* bakteri hücrelerine aktarılmış ve NB in vitro sürgünlerden alınan yaprak parçacıkları transformant *Agrobacterium tumefaciens* ile inoküle edilip transgenik bitkiler geliştirilmiştir. Çalışmanın son aşamasında genetik transformasyonunun başarısını tespit etmek için, transgenik bitkiler virüs ile inoküle edilmiş ve transformant *Nicotiana Benthamina* bitkisinde dayanıklı oldukları tespit edilmiştir.

ABSTRACT

Plum Pox Virus (PPV), a member of Potyviridae, causes to Sharka disease, the most devastating viral disease of Prunus species and result in important economic lost. PPV was first discovered in 1930's and since then it has spread consistently. In last 15 years, PPV has been also transferred from Europe to North and South America. In Turkey, the infection level are increasing. Biotechnological approaches including gene silencing have been investigated to struggle with the viruses. Here we also report investigation of the role of 5' fragment of PPV containing P1, HC-Pro and Coat protein (CP) in gene silencing and RNAi mechanism. *Nicotiana benthamiana* and *Prunus armeniaca* were used as plant material and first regeneration protocol for both plants were investigated. Adventitious regeneration succeeded for *Nicotiana benthamiana*. Naturally infected plants in Kayseri were detected by serological and molecular approaches and used as virus source. The 5' fragment of PPV was modified adding recombinant region (attB1 ve attB2) which was required for Gateway gene transformation. The PCR-amplified 5' region was first transferred to the entry vector (pDONR201) and subsequently to transferred the vector (pHELLSGATE12). The later vector was then transferred into *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. Transgenic *Agrobacterium tumefaciens* cells were applied to *Nicotiana benthamiana* leaf and transgenic plants were obtained. Efficiency of transformation were confirmed by PPV inoculation.

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Prunus türü sosyal ve ekonomik açıdan Türkiye'de oldukça önemlidir. Türkiye, Prunus türlerinden, kayısı, kiraz ve vişne üretiminde dünyada lider konumunda; badem, şeftali ve erikte ise ilk on ülke içinde yer almaktadır. Potyviriidae üyesi olan Plum Pox Virüs'ünün (PPV) etmeni olduğu Şarka hastalığı Prunus türlerinde çok önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Bu çalışmada, PPV genomunun 5 bölgesi *Nicotiana benthamiana* bitkisine aktararak Şarka hastalığına dayanıklılık kazandırma çalışılmıştır. İlk aşamada kayısıda gen transferi hedeflenmiş ve kayısı rejenerasyonu çalışılmış, fakat kayısıda adventif rejenerasyon elde edilememiş, *Nicotiana benthamiana* kullanılmıştır. Çalışmada PPV belirtileri gösteren ağaçlar belirlenmiş, örnekler toplanmış, örnekler serlojik ve moleküler yöntemlerle çalışılmış ve PPV ırkı belirlenmiştir. Serolojik ve revers transkriptaz PCR çalışmaları Kayseri ili PPV ırkını belirlemede başarılı olmamış, DNA dizileme ile Kayseri'de PPV bulaşık örneklerin Türkiye (T) ırkını taşıdıkları tespit edilmiştir. Kayısıda Hacıhaliloğlu dâhil beş çeşitte rejenerasyon çalışılmış, sürgün ve kallus elde edilmesine rağmen adventif rejenerasyon gerçekleşmemiştir. PPV çalışmalarında gösterge bitki olarak kullanılan *Nicotiana benthamiana* bitkilerinde ise adventif rejenerasyon başarı ile gerçekleştirilmiştir. PPV T genomundan çoğaltılan 5 parça rekombinasyon yöntemleri ile manupule edilerek Gateway teknolojisine uygun 5 vektör konstrüktü oluşturulmuştur. Bu konstrüktler *Agrobacterium Tumefaciens* transfer edilip *Nicotiana benthamiana* bitkilerine gen aktarımında kullanılmıştır. 18 adet transformant bitki elde edilmiş, 10 transformant bitki başarı ile büyütülmüş ve PPV-T ile inoküle edilip belirti oluşumu gözlenmiştir. Transformant bitkilerde virüs belirtileri gözlenmezken, kontrol bitkilerinde yoğun belirti tespit edilmiştir. Bu çalışma PPV genomundan alınan 5 parçasında gen susturmada etkili olduğu göstermiştir.

Geleneksel ıslahta başarı; genlerin çalışma mekanizmalarının, genom üzerindeki yerlerinin, ekspresyonlarının ve diğer genlerle olan etkileşimlerinin bilinmesi ile doğrudan bağlantılıdır. Moleküler biyolojide gen manipulasyon teknikleri uygulanmadan genetik mekanizmalarını ispatlamak mümkün olmamaktadır. Bu araştırmada gen manipulasyon teknikleri çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Plum Pox Virüsü'nün etmeni olduğu Şarka hastalığı Prunus meyve grubunda önemli bir hastalık olup, ekonomik olarak çok önemli kayıplara neden olmaktadır (Lopez-Moya ve ark. 2000). PPV, dünyada ekonomik olarak en önemli görülen bitki virüs ailesi Potyviridae'nin bir üyesidir. Cambra ve ark. 2006 yılı itibariyle Şarka'nın son 30 yılda 10 000 EU zarar verdiğini belirtmişlerdir. Şarka belirtilerinin görülmesi virüsün grubuna, konukçu bitkinin türü ve çeşidine bağlı olarak 2-4 yıl sürebilir. Yaprakta soluk yeşil noktalar, halkalar ve çizgiler, meyvelerde halkalar ve lekeler, çürüme ve yumuşak çukurluklar oluşmaktadır. Meyvelerde enfeksiyonla beraber, şeker miktarında düşüş, tatta bozulma, erken meyve dökümü gözlenir. Hastalık 1932 yılında Bulgaristan'da ilk defa tespit edilmiş, günümüzde Avrupa'nın neredeyse tamamına, Akdeniz havzası ülkelerine yayılmıştır (Llacer ve ark. 1986; Louro ve Corvo, 1986; Mazyad ve ark. 1992). Son 15 yılda, Şili'de (Rosales ve ark. 1998) Kanada'da (Thompson ve ark. 2001), ve ABD'de (Levy ve ark. 2000) de tespit edilmiştir. PPV Türkiye'de ilk defa 1968 yılında tespit edilmiştir (Sahtiyancı, 1969). Türkiye'de özellikle park alanlarında, süs bitkilerinde görülen hastalığın Ankara'da yaygın olduğu belirlenmiş, kayısı yetiştiriciliğinin yoğun olduğu Malatya'da ise görülmemiştir (Elibüyük 2003; Serkaya ve ark. 2003; Elibüyük 2004; Elibüyük 2006).

Prunus cinsi, Türkiye'de sosyo-ekonomik açıdan önemli 5 türü barındırır: badem (*P. dulcis* Miller), Avrupa Eriği (*P. domestica* L.), Japon Eriği (*P. salicina* Lindl.), şeftali ve nektarin (*P. persica* L.), kiraz (*P. avium* L.), ve vişne (*P. cerasus* L.)'dir. Bu türlerin meyve tohumları oldukça sert odunsu bir endokarp ile kaplı olduğu için badem dışındaki Prunus türleri ayrıca sert çekirdekli meyveler olarak ta adlandırılır. Badem dışındaki türlerde meyvenin yenebilen kısmı sulu mezokarptır. Türkiye, kayısı, kiraz ve vişne üretiminde dünya lideridir. Tablo 1'de de belirtildiği gibi badem, şeftali ve erikte ise ilk on ülke içinde yer almaktadır (FAO, 2011). Türkiye'nin kayısı ihracat değerleri son yıllarda artarak 350 milyon dolar seviyesine ulaşmıştır (FAO 2011). (Bu rakam Türkiye'nin en önemli ihraç bitkisi fındıkta 700 milyon dolar civarındadır/FAO 2011 istatistikleri). Sonuç raporu sunulan bu araştırmanın yürütüldüğü Kayseri ili coğrafi olarak hem Türkiye'nin en büyük kayısı üreticisi ili Malatya'ya yakın hem de Erzincan ve Elazığ ile beraber Malatya'dan sonra en çok kayısı üreten illerden biridir.

Tablo 1. Prunus cinsi ekonomik meyve türlerinde ülkelerin üretim değerleri (FAO 2009)

TÜRLER							
Kayısı		Kiraz - Vişne		Badem		Şeftali - Nektarin	
Ülkeler	Üretim (ton)	Ülkeler	Üretim (ton)	Ülkeler	Üretim (ton)	Ülkeler	Üretim (ton)
Türkiye	660.894	Türkiye	417.694	ABD	1.562.200	Çin	8.529.329
Özbeki.	290.00	ABD	390. 0	İspanya	270.100	İtalya	1.638.100
İtalya	233.600	İtalya	125.90	Suriye	97.002	İspanya	1.205.70
Cezayir	202.806	İspanya	90.000	Türkiye	54.844	ABD	1.197.665
Ukrayn	115.800	Suriye	76.055	Cezayir	47.39	Yunan.	6 4.000
Fransa	100.000	Rusya	69.00	Çin	35.000	Türkiye	547.219
Suriye	98.913	Romanya	67.874	Avustü.	18.957	Mısır	42.000
İspanya	97.100	Özbeki.	67.000	Portekiz	2.454	Fransa	310.000
Çin	78 112	Ukrayna	51. 00	İsrail	1.762	Arjantin	270.000
Macaris.	78.75	Polonya	50.505	Şili	11.000	G.Arika	107.808
						Ukrayna	136.700

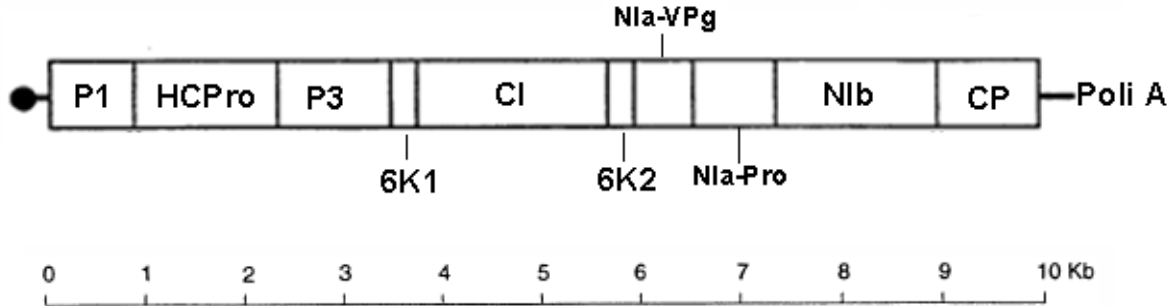
Şarka hastalığının uzun mesafede yayılmasında enfekte fidan ve gözlerin bir bölgeden başka bir gölgeye transferi ile olmaktadır. Plum pox virüsü afidler aracılığıyla kısa mesafede yayılır. Afidelerin kimyasal uygulamalarla kontrolü etkin olmadığı için hastalığın yayılmasını kesin olarak engellemek mümkün değildir (Kegler ve ark. 1998). PPV'ye karşı mücadele koruyucu önlemler almaktan ibarettir. Hastalığın erken teşhisi biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemlerle yapılmaktadır (Asensio ve ark. 1994; Boscia ve ark. 1997; Cambra ve ark. 1994; Candresse ve ark. 1998; Schneider ve ark. 2004; Varveri ve ark. 1987; Wetzler ve ark. 1992). Hastalığa dayanıklı çeşitlerin sayısı azdır. Kayısı çeşitlerinden 'Goldrich', 'Harlayne', 'Stark Early Orange', 'Stella' ve 'Harcot' (Dosba ve ark. 1991; Karayiannis ve ark. 1999; Fuchs ve ark. 2001) PPV-M ve PPV-D gruplarına dayanıklıdır. Türkiye kayısılarının 7 tanesinin ve 5 erik çeşidinin PPV'ye dayanıksız olduğu belirlenmiştir (Elibüyük ve Erdiller, 1995).

PPV'nin altı alt grubu tanımlanmıştır; M, D, C, EA, W ve Rec (Glasa ve ark. 2004; James ve Varga., 2005; Myrta ve ark. 2006; Nemchinov ve ark. 1996; Palkovics ve ark. 1993). Serçe ve ark. (2009) Ankara'da isole ettikleri bir hattın var olan hatlarından farklı olduğunu belirtip bu hat için PPV T (Turkey) adını önermişlerdir. En yoğun olarak görülen alt grup PPV-M ve PPV-D (Candresse ve ark. 1998)'dir. PPV-M grubu, Orta ve Doğu Avrupa'da yaygın olup, PPV-D Batı Avrupa ve Amerika kıtasında gözlenmektedir. PPV-Rec alt grubu Orta Avrupa'da görülmektedir (Glasa ve ark. 2004). Diğer üç alt grup ise (PPV-C, PPV-EA, PPV-W) yaygın değildir (Candresse ve Cambra 2006). Türkiye'de de PPV-M (Elibuyuk, 2003, 2004, 2006; Sertkaya ve ark. 2003) yaygın olup, bazı bitkilerde PPV-D grubunun PPV-M ile birlikte bulunduğu belirlenmiştir (Elibüyük, 2004). Son olarak PPV-Rec grubu Isparta'da tespit edilmiştir (Candresse ve ark. 2007).

PPV alt gruplarının tüm genom sekansları belirlenmiş (Fanigliulo ve ark. 2003; Glasla ve ark. 2004; James ve Varga, 2005; Lain ve ark. 1989; Maiss ve ark. 1989; Myrta ve ark. , 2006; Palkovics ve ark. 1993; Sáenz ve ark. 2000; Teycheney ve ark. 1989) ve genomlar NCBI (National Center for Biotechnology Information), GeneBank'a kaydedilmiştir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=12211>). PPV genomu tek iplikli bir RNA'dan oluşur. RNA genom büyüklüğü yaklaşık 9786 baz olup, tek bir okuma çerçevesinden oluşmaktadır. Bu tek okuma çerçevesi bir tek polipeptid kodlar. Polipeptid, yine PPV genomu tarafından kodlanan üç enzim

tarafından kesilip 10 protein ürününe dönüştürülür (Salvador ve ark. 2006). Bu proteinler P1, HCPro, P3, 6K1, CI, 6K2, Nla-VPg, NlaPro, Nlb, ve CP'dir. Şekil 1. PPV genlerinin virüs genomu üzerinde yerlerini ve genlerin yaklaşık büyüklüklerini göstermektedir. Virüs çalışmaları 3 gen/protein üzerine yoğunlaşmıştır. Bu genler P1, HCPro ve Coat (kılıf) protein genidir. (Lopez-Moya ve ark. 2000, Salvador ve ark. 2006). HCPro, RNA sessizleştirme mekanizmasında, P1 ise virüsün hareketinde ve çoğaltılmasında sorumludur. Ayrıca P1'in, HCPro ile RNAi sessizleştirme mekanizmasında da yer aldığı bilinmektedir. PPV genomlarının genetik yapıları birbirlerine yakın olmakla beraber % 11 civarında baz dizisi farklılığı göstermektedir. Baz dizisi farklılıkları genoma dağılmıştır. P1 ve HCPro genleri %4 ve %6 oranında varyasyonla virüs genomunda en fazla korunan iki gendir (Palkovics ve ark. 1993; Pruss ve ark. 1997; Kasschau ve Carrington., 1998; Urcuqui-Inchima ve ark. 2001). Gen bölgeleri ve fonksiyonları hakkında detaylı bilgi derleme olarak hazırlanmış makalelerde mevcuttur (Lopez-Moya ve ark. 2000; Salvador ve ark. 2006).

Şekil 1. PPV genlerinin genom üzerinde yerleri. Lopez-Moya ve ark. (2000)'nın çalışmasından uyarlanmıştır.



Odunsu bitkilerde gençlik kısırlığı döneminin uzun olması, özellikle vegetatif çoğaltımdan kaynaklanan yüksek heterozigotluk, bitkilerin büyük olması nedeniyle geleneksel ıslahın yoğun iş gücü, arazi ve yatırım gerektirmesi ve tüm bitkilerde görülen döllenme biyolojisinden kaynaklı zorluklar nedeniyle, geleneksel bitki ıslahı metodları dışındaki, karakterlerin iyileştirilmesi amacıyla kullanılan biyoteknolojik medotlar odunsu bitki ıslahı ve genetikçileri için önemli olmuştur. Meyve türlerinde ve diğer odunsu bitkilerde bu yüzden bir çok kültürü ve genetik transformasyon çalışması yapılmıştır. Gen transferi çalışmalarının geleneksel ıslah çalışmalarına eklenerek ekonomik olarak önemli, ilkbahar geç donlarına dayanıklılık, bodurluk, meyvelerin erken veya geç olgunlaşması, hastalıklara dayanıklılık ve meyve özellikleri gibi karakterlerin iyileştirilmesinde kullanılması meyve ıslahını kolaylaştırmaktadır.

RNAi mekanizmasıyla gen susturma çalışmaları dışında gen transferi çalışmaları meyve türlerinde ve Prunus familyasında yoğun olarak rapor edilmiştir. Tablo 2, Petri ve Burgos (2005)'un meyve türlerinde gen transformasyonu çalışmalarını derledikleri makaleden alınmış olup, başarılı transformasyon çalışmalarını özetlemektedir. Prunus familyasında PPV'ye dayanım sağlayan gen veya genlerin belirlenemediği, bu nedenle izole edilip karakterize edilmediği için direkt dayanıklılık geninin aktarımı mümkün değildir. Çalışmalarda Şarka dayanımının kayısıda bir lokusla (Dicenta ve ark. 2000; Karayiannis ve ark. 2008), iki lokusla (Dosba ve ark. 1991; Moustafa ve ark. 2001; Rubio ve ark. 2004; Krška ve ark. 2002) ve üç lokusla (Guillet-Bellanger ve Audergon 2001; Salava ve ark. 2005) kontrol edildiğini belirten çelişkili sonuçlar rapor edilmiştir. Birkaç kayısı genetik bağlantı haritasında dayanım lokusunun pozisyonunun belirlendiği yayınlanmıştır (Hurtado ve ark. 2002; Salava ve ark. 2002; Vilanova ve ark. 2003; Lalli ve ark. 2008, Pilarova ve ark. 2010). 'Goldrich', 'Harlayne', 'Stark Early Orange', 'Stella' ve 'Harcot' (Dosba ve ark. 1991; Karayiannis ve ark. 1999; Fuchs ve ark. 2001) hastalığa dayanıklı olduğu tespit edilen Kuzey Amerika (ABD ve Kanada) kayısı çeşitleridir. Dayanım çalışmalarında bu 5 çeşit kaynak olarak kullanılmaktadır. Dayanımın kalitatif mi yoksa kantitatif özellikte mi olduğu netleşme de yaygın görüş bağlantı grubu 1 (LG1)'in yukarı kısmında yer alan bir tek lokusun Şarka'ya dayanımda % 70'e kadar etkin olduğudur. Avrupalı gruplar tarafından kayısı şarka dayanımı üzerine yoğun makale yayınlanmasına rağmen Şarka dayanımı üzerine eksik ve tartışmalı noktalar mevcuttur. Bunlar sırasıyla şöyledir; a) farklı gruplar tarafından yapılan genetik haritalardaki dayanım lokuslarının yeri birbirleriyle uyuşmamaktadır; b) LG1'deki majör lokusun yanı sıra minör lokusların etkileri netleşmemiştir (Lambert ve ark. 2007; Pilarova ve ark. 2010); c) farklı dayanım kaynakları keşfedilmemiş, çalışmalar muhtemelen aynı dayanım mekanizmasına sahip 5 dayanıklı çeşit ile sınırlı kalmıştır. Daha da önemlisi, önemli bir gen havuzu olan Türkiye'de yetiştirilen kayısı çeşitleri ve yabancı kayısı formlarının dayanım mekanizmaları bütün bu çalışmaların dışında kalmıştır. Kayısı dayanım gen veya genlerinin izolasyonu ve karakterizasyonu kısa zamanda mümkün görünmemektedir.

Tablo 2'de verilen çalışmalar dışında Prunus familyasında gen transformasyonu yerleştirmeye yönelik markör gen transformasyonu çalışmaları rapor edilmiştir. Örneğin ekonomik olarak önemli badem çeşidi 'Ne Plus Ultra' ile ilgili başarılı bir rejenerasyon ve transformasyon rapor edilmiştir. Transformasyon oranının kanamisin [neomycin phosphotransferase (nptII)] için % 5.6 ve manoz (mannose- phosphomannose isomerase (pmi) için % 6.8 bulunmuştur (Ramesh ve ark. 2006). 'Montmorency' vişne çeşidinde % 3.1 ve bodur kiraz anacı 'Gisela 6' (*P. cerasus* x *P. canescens*)'da % 3.3 oranında glucuronidase (GUS) transformasyon oranı rapor edilmiştir (Song ve Sink, 2006). Şeftali 'Miraflores' çeşidi yapraklarında % 3.6 oranında (Perez-Clemente ve ark. 2004), *Prunus*

virginiana'da da tohumdan çoğaltılan sürgünlerde % 2.6 oranında (Dai ve ark. 2007), 'Angeleno' ve 'Larry Anne' Japon eriklerinde hipokotil dokularından sırasıyla % 0.8 ve % 0.3 oranında başarılı olunan transformasyon çalışmaları rapor edilmiştir. Erik yaprak dokularında rejenere edilen bitkilere (Mikhailov ve Dolgov., 2007; Yancheva ve ark. 2002) transformasyon çalışmaları yapılmıştır.

Yapılan bu çalışma ile bire bir benzerlik gösteren diğer bir örnek ise Erikte PPV'ye dayanıklı hat geliştirme çalışmalarıdır. PPV'ye dayanım sağlamak, RNAi mekanizmasını aktive etme için kılıf protein geni ve diğer genleri kullanarak otsu ve bazı diğer bitkilerde çalışılmış isede (Regner ve ark. 1992; Ravelonandro ve ark. 1993; Palkovics ve ark. 1995; Guo ve Garcia 1997; Ravelonandro ve ark. 1997; Jaquet ve ark. 1998; Taver-Roudet ve ark. 1998; Wittner ve ark. 1998; Barajas ve ark. 2004, Di Nicola-Negri ve ark. 2005) asıl başarı öyküsü erikte gerçekleşmiştir. PVP kılıf protein geni 1994 yılında erik bitkilerine aktarılmış ve dayanıklı hat geliştirilmiş (Scorza ve ark. 1994), C5 klonu adı konulan bir hatın ileriki yıllarda yapılan çalışmalarla tam dayanım gösterdiği saptanmış (Ravelonandro ve ark. 1997; Hily ve ark. 2004; Malinowski ve ark. 2006), ve dayanımın RNAi mekanizmasının aktive edilmesiyle gerçekleştiği tespit edilmiştir (Scorza ve ark. 2001). C5 klonu farklı ülkelerde arazi denemelerine tabi tutulmuş HoneySweet ismiyle piyasaya sürülme aşamasına gelmiştir (Zagrai ve ark. 2008; Scorza ve ark. 2010)

Bu projenin temel amacı Plum Pox Virüs'nin 3 gen bölgesini içeren 5 parçanın RNAi mekanizması aktive edilerek Şarka Hastalığı'na dayanıklılıkta rolünü belirlemek olmuştur. Projenin önemli bir diğer amacı gen susturma ve gen manipülasyon tekniklerini geliştirmek ve uygulamasını yapmaktır. 2000 yılında insan genom dizisi analizi belirlendikten hemen sonra 2002 yılında model bitki Arabidopsis'in genomu açıklanmış, sonraki yıllarda bir çok bitki genomunun (mısır, patates, pirinç, kavak, üzüm, şeftali vs..) baz dizisi rapor edilmiştir. Geline nokta artık yeni genom analizinden daha çok genlerin ve genom üzerindeki diğer noktaların fonksiyonlarının belirlenmesi önem kazanmıştır. Arabidopsis'de ve diğer model ve major bitkilerde yüzlerce laboratuvar özellikle ekonomik açıdan önemli gen fonksiyonlarını belirlemek üzere çalışmalar yapmaktadır. Bitki ıslahı açısından bu nokta çok önemlidir. Gen fonksiyonları ve çalışma mekanizmaları özellikle başta mutasyon ve gen transferi olmak üzere, gen manipülasyon teknikleri ile belirlenip ispatlanabilmektedir. Gen susturma teknikleri gen fonksiyonlarını belirlemede çok yaygın olarak kullanılan gen manipülasyon yöntemlerindendir. Bu projede de son yıllarda çok önemli olan gen susturma mekanizması olan RNAi çalışılmış ve birçok moleküler biyoloji tekniği uygulanmıştır.

Tablo 2. Meyve ağaçlarında genetik transformasyon ile ıslah çalışmaları-Petri ve Burgos (2005)'un çalışmasından uyarlanmıştır.

Türler	Çeşit	Gen	Fenotip	Yıl
<i>Actinidia deliciosa</i> (Kivi)	Haward	rol A, B, C b-1	köklenme kapasitesini arttırmak	1999
<i>Carica papaya</i> (Papaya)	Sunset	Cp-PRSV	PRSV'ye dayanım	1977
<i>Citrus aurantifoliata</i> (Laym)	Mexican	Cp-CTV	CTV'ye dayanım	2002
<i>Citrus aurantium</i> (Turu ç)	-a	Cp-CTV	CTV'ye dayanım	2000
<i>Citrus paradisi</i> (Greyfurt)	Rio Re	Cp-CTV gna	CTV'ye dayanım, böceklerle dayanım	2000
<i>Citrus paradisi</i> (Greyfurt)	Duncan	cirotene sentez geni	b-karoten seviyesinin artırılması	2002
<i>Citrus sinensis</i> (Porta al)	Pine pple	PR-	Phytophthora citrophthora'ya dayanım	2001
<i>Citrus sinensis</i> X <i>Poncirus trifoliata</i> (Crizo)	Citrango	HAL 2	Tuzluluğa tolerans	2000
<i>Citrus sinensis</i> X <i>Poncirus trifoliata</i> (Carizo)	Citrango	LFY ve AP1	Gençlik kısırlığının kısıltılması	2001
<i>Diospyros kaki</i> (Trabzon hurması)	Jiro	cryIA(c)	lepidoptera'ya dayanım	1997
<i>Juglans regia</i> L. (Ceviz)	-a	cryIA(c)	Cydia pomonella'ya dayanım	1998
<i>Malus X domestica</i> (Elma)	-a	Endochitinase	Scab'a dayanım	2000
<i>Malus X domestica</i> (Elma)	Jonaold	bar	Basta'ya dayanım	1996
<i>Malus X domestica</i> (Elma)		Rs-AFP ad AMP1	Antibakteriyel ve fungal dayanım	1996
<i>Malus X domestica</i> (Elma)	M.6	rol B	köklenme kapasitesini arttırmak	1998
<i>Malus X domestica</i> (Elma)	M.9/29	rol B	köklenme kapasitesini arttırmak	2001
<i>Malus X domestica</i> (Elma)	Gala , M.26	attE	Ateş Yanıklığı'n dayanım	2000
<i>Malus X domestica</i> (Elma)	Galaxy	ech42 and nag70	Scab'a dayanım	2003
<i>Malus X domestica</i> (Elma)	Arian	pin	Scab'a dayanım	2004
<i>Malus X domestica</i> (Elma)	Gala	HcrVf2	Scab'a dayanım	2004
<i>Malus X domestica</i> (Elma)	Elstar	S3 RNase	Kendine uyumsuzluk	2004
<i>Prunus armeniaca</i> (Kayısı)	Kecskmeter	Cp-PPV	Sharka dayanım	1994
<i>Prunus avium</i> (Kira)	Mazzard F12/	Ri-T-DNA	köklenme kapasitesini arttırmak	1998
<i>P. avium</i> X <i>pseudocerasus</i> (Kiraz anacı)	Colt	Ri T-DNA	köklenme kapasitesini arttırmak	1998
<i>P. Dawykensis</i> (Kiraz anacı)	Damil	Ri-T-DNA	köklenme kapasitesini arttırmak	1998
<i>P. domestica</i> (erik)	S anley	Cp-PPV	Sharka'ya dayanım	1994
<i>P. fructicosa</i> X <i>avium</i> (Kiraz)	Black Eagle	afp	-	1999
<i>P. incisa</i> X <i>serrula</i>	Inmil	T-DNA (ipt bar)	köklenme kapasitesini arttırmak	1998
<i>P. persica</i> (Şeftali)	Redhaven	-DNA (ipt)	dallanma kapasitesini arttırmak	1991
<i>Pyrus communis</i> (Armut)	Barlet	D5C1	Ateş Yanıklığı'na dayanım	1992
<i>Pyrus communis</i> (Armut)	Passe Crassane	attE	Ateş Yanıklığı'na da anım	1999
<i>Pyrus communis</i> (Armut)	Coference	gus	Gus ekspresleme	2003
<i>Pyrus communis</i> (Armut)	BP1030	rol B	köklenme kapasitesini arttırmak	2003
<i>Pyrus communis</i> (Armut)	Beurre Bosc	rol C	köklenme kapasitesini arttırmak	1999
<i>Vitis vinifera</i> (Üzüm)	eo Musat	RCC , nptII	Mantarlara dayanım	2000

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Proje kapsamında aşağıdaki iş paketleri sırası ile yürütülmüştür.

1. Plum Pox Virüsü ile bulaşık ağaçların tespiti ve virüs irkının serolojik ve moleküler olarak tespit edilmesi
2. Farklı kayısı çeşitlerinde (Hacıhaliloğlu, Kabaş, Şekerpare, İribitirgen, ve İğdır kayısı) sürgün kültürü ve rejenerasyon çalışmaları
3. *Nicotiana Benthamina* gösterge bitkisinde rejenerasyon ve transformasyon çalışmaları
4. Vektör konstrüksiyonu, *Agrobacterium Tumefaciens* aktarılması ve *Nicotiana Benthamina* bitkilerine transferi
5. Gen transferi/RNAi çalışmasındaki başarının PPV inokülasyonları ile tespit edilmesi

3.1. Plum Pox Virüsü ile bulaşık ağaçların tespiti ve virüs irkının serolojik ve moleküler olarak tespit edilmesi

Kayserinin çeşitli semtlerinden (Tablo 2) PPV belirtisi gösteren ağaçlardan örnekler toplanmış, örneklerde PPV enfeksiyonu moleküler ve serolojik yöntemlerle belirlenmiş ve virüs irki dizileme ile de tespit edilmiştir.

Tablo 3. PPV belirtisi gösterdiği için toplanan örnekler

Sıra no	Örneklerin Toplandığı Yer	Bitkisel Kaynak	Sıra no	Örneklerin Toplandığı Yer	Bitkisel Kaynak
1	Talas Sosyete Pazarı	Kayısı	36	Talas Sosyete Pazarı	Kayısı
2	Talas Sosyete Pazarı	Kayısı	37	Talas Sosyete Pazarı	Kayısı
3	Talas Sosyete Pazarı	Kayısı	38	Talas Sosyete Pazarı	Kayısı
4	Talas Sosyete Pazarı	Erik	39	Talas Sosyete Pazarı	Kayısı
5	Talas Sosyete Pazarı	Kayısı	40	Talas Sosyete Pazarı	Kayısı
6	Yenidoğan Lojman girişi	Kayısı	41	Talas Sosyete Pazarı	Erik
7	Yenidoğan Lojman girişi	Kayısı	42	Talas Sosyete Pazarı	Kayısı
8	Yenidoğan Lojman girişi	Kayısı	43	Talas Sosyete Pazarı	Kayısı
9	Okul Bahçesi, kontrol	Kayısı	44	Yenidoğan Lojman girişi	Kayısı
10	Kayseri TED Koleji	Kayısı	45	Yenidoğan Lojman girişi	Kayısı
11	Kayseri TED Koleji	Erik	46	Yenidoğan Lojman girişi	Kayısı
12	Kayseri TED Koleji	Kayısı	47	Yenidoğan Lojman girişi	Erik
13	Kayseri TED Koleji	Kayısı	48	Esenyurt	Kayısı
14	Kayseri TED Koleji	Kayısı	49	Hisarcık	Kayısı
15	Yukarı Talas Yolu	Kayısı	50	Esenyurt	Kayısı
16	Yukarı Talas Yolu	Kayısı	51	Esenyurt	Kayısı
17	Talas, Beğendik'e giderken	Kayısı	52	Esenyurt	Kayısı
18	Talas, Beğendik'e giderken	Kayısı	53	Hisarcık	Kayısı
19	Talas, Beğendik'e giderken	Kayısı	54	Esenyurt	Kayısı
20	Talas, Beğendik'e giderken	Kayısı	55	Hisarcık	Kayısı
21	Talas, Beğendik'e giderken	Erik	56	Hisarcık	Kayısı
22	Talas, Beğendik'e giderken	Kayısı	57	Beyazşehir-İldem yolu	Kayısı
23	Talas, Beğendik'e giderken	Kayısı	58	Beyazşehir-İldem yolu	Kayısı
24	Talas, Beğendik'e giderken	Kayısı	59	Beyazşehir-İldem yolu	Erik
25	Talas, Beğendik'e giderken	Kayısı	60	Erkilet yolu	Kayısı
26	Talas, Beğendik'e giderken	Kayısı	61	Hürriyet	Kayısı
27	Yukarı Talas Yolu	Kayısı	62	Erkilet	Erik
28	Yukarı Talas Yolu	Kayısı	63	Erkilet	Kayısı
29	Yukarı Talas Yolu	Kayısı	64	Altınoluk	Kayısı
30	Yukarı Talas Yolu	Erik	65	Altınoluk	Kayısı
31	Yukarı Talas Yolu	Kayısı	66	Altınoluk	Kayısı
32	TED Koleji	Kayısı	67	Altınoluk	Kayısı
33	TED Koleji	Kayısı	68	Altınoluk	Erik
34	Talas Sosyete Pazarı	Kayısı	69	Altınoluk	Kayısı
35	Talas Sosyete Pazarı	Erik	67	Altınoluk	Kayısı

DASI-ELISA PPV testleme çalışmaları ve ırkların belirlenmesi

PPV-ırklarını belirlemede öncelikle yaygınca kullanılan DASI-ELISA (Camra ve ark. 1994) testi kullanılmıştır. Bütün ırkları tanımlayan 5B-IVIA antiserumu ile PPV'nin varlığı belirlenirken, PPV-M spesifik antiserum-AL ve PPV-D spesifik antiserum 4D ile ırklar belirlenmiştir.

Önce 1 gr yaprak örneği 20 katı ekstraksiyon çözeltisi içinde homojenize edilmek suretiyle örnekler hazırlanmıştır (Cambra et al., 1994) . Ekstraksiyonu çözeltisi Phosphate buffer saline (PBS) (bir litre için 5 tablet)+ %2 Polyvinylpyrrolidone (PVP-10) ve % 0.2 sodium diethyl dithiocarbamate (DIECA) karıştırılarak hazırlanmıştır.

DASI-ELISA testi

1. Tabağa bağlamada, poliklonal immunoglobulin 1/1000 oranında karbonat bufer içerisinde seyreltilerek 96'lık eliza tabağı kuyucuklarına 200µl aktarılmış 16 saat 4°C de inkübasyona bırakılmıştır.
2. 3'er dakika 3 kez PBS(Sigma, bir litre için 5 tablet)+ -% 0.005 Tween karışımı ile yıkama yapılmıştır.
3. Örnek ekstrakte edilerek 200µl tabaktaki her kuyucuğa eklenmiş 16 saat 4°C de inkübasyona bırakılmıştır.
4. 3'er dakika 3 kez PBS-Tween ile yıkama yapılmıştır.
5. Kuyucuklara PBS+BSA ile sulandırılmış monoklonal antibadi eklenmiş (antiserum 5B-IVIA veya antiserum-AL veya antiserum-4D) 37°C de 2 saat inkübe edilmiştir.
6. 3'er dakika 3 kez PBS-Tween ile yıkama yapılmıştır.
7. 200µl Alkalın fosfataz ile işaretli anti-mouse imminoglobulinler kuyulara konularak 37°C de 2 saat inkübasyon yapılmıştır.
8. 3'er dakika 3 kez PBS-Tween ile yıkama yapılmıştır.
9. 200µl Alkalın fosfataz solüsyonu substrat tampon içerisinde çözülerek kuyucuklara aktarılmıştır.
10. ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda negatif sonuç veren bitkilerin 2 katı ve üzeri absorbans değerine sahip örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir. Enfekteli ve enfektesiz örnekler pozitif ve negative kontrol olarak kullanılmıştır.

Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR)

RNA ekstraksiyonu

Yetmiş örnekte RNA ekstraksiyon Qiagene şirketinin RNeasy Mini Kiti kullanılarak yapılmıştır.

Qiagene prosedürü kısaca aşağıdaki sıra ile uygulanmıştır:

1. Ekstraksiyon bufer içindeki örneklerden 300 µl alınarak 400 µl RLT buffer ile ve 30 saniye vorteks yapılır.
2. 14,000 rpm de 3dk santrifüj edilir.
3. Süpernatat yeni 1.5 ml ependorf tüpe alınarak üzerine (400 µl) aynı hacimde %70 etanol eklenir ve mikropipetle karıştırılır.
4. 800 µl karışım spin tüplere aktarılır ve 8,000 x g de 15sn santrifüj edilir. Altta kalan sıvı dökülür.
5. 700 µl RWI eklenerek 8,000 x g de 15 sn santrifüj edilir. Altta kalan sıvı dökülür.
6. 500 µl RPE eklenerek 8000 x g de 15 sn santrifüj edilir. Altta kalan sıvı dökülür.
7. 500 µl RPE eklenerek 10000 x g de 2 dk santrifüj edilir. Altta kalan sıvı dökülür.
8. Filtre kısmı alınır 1.5 ml ependorf tüpüne yerleştirilir.
9. 50 µl RNase free water eklenerek 8,000 x g de 1dk santrifüj yapılır.
10. Elde edilen toplam RNA'ların konsantrasyonu NanoDrop ile ölçülüp -80°C'de muhafaza edilmiştir. Tüm örneklerden toplam RNA izole edilmiştir.

cDNA kütüphanelerin kurulması

cDNA yapımı aşağıdaki sıra ile gerçekleştirilmiştir:

1. Nukleaz içermeyen mikrosantrifüj tüplere aşağıdaki bileşenler eklenmiştir:

Oligo(dT)12-18 (500 µg/ml) yada	}	1 µl
50-250 ng random primer yada		
2 pmol gen-spesifik primer		
1ng-5mg arasında total RNA yada		
1-500 ng mRNA	}	x µl
1 µl dNTP mix(her biri 10 mM)		
Steril distile su		12 µl
2. 5 dk 65 °C de karıştırılıp ve hızlıca buz üzerine konmuştur. İçeriği tüp altında toplamak için kısa bir santrifüj yapıp ve aşağıdaki bileşenleri eklenmiştir.

5X First-Strand Bafır	4 µl
0.1 M DTT	2 µl
RNaseOUT (40 units/ µl)	1 µl
3. Tüp kısaca santrifüj edilip oligo (dT) ve gen spesifik primer kullanıldığında 42 °C de 2 dk inkübe edilmiş, rondon primer kullanıldığında 25 °C de 2 dk inkübe edilmiştir.
4. 1 µl (200 units) SuperScript II RT eklenip ve pipetleme yaparak karıştırılmıştır. Random primer kullanıldığında 25 °C de 10 dk inkübe edilmiştir.
5. Daha sonra 42 °C de 50 dk ve reaksiyonu inaktif etmek için 70 °C de 15 dk inkübe edilmiştir.

Kullanılan primerler ve PCR

Oluşturulan cDNA kütüphaneleri TaKaRa LA PCR kit kullanılarak çoğaltılmıştır. TaKaRa LA PCR kit Ver. 2.1 e göre aşağıdaki PCR karışımı ve döngüsü takip edilerek yapılmıştır:

PCR içeriği	-1 x	PCR döngüsü 94 °C-3 <u>dk</u> 94 °C-0.45 dk 58 °C-2 dk 72 °C-3 dk } 35 döngü Son uzama sıcaklığı-72 °C-5 <u>dk</u>
Su	-----	
10 X LA Buffer II(Mg free)	5 µl	
dNTP	8 µl	
25 mM MgCl2	5 µl	
Primer forward	10-50	
pmol		
Primer revers	10-50	
pmol		
TaKaRa LA Taq	0.5 µl	
Template	< 1 µg	
Toplam hacim	50 µl	

Genel PPV tanımlanması Wetzel ve ark. (1991) yöntemine göre P1 ve P2 primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PPV-D tanımlanması Olmos ve ark. (1997) yöntemine göre P1 ve PD primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PPV-M tanımlanması yine Olmos ve ark. (1997) yöntemine göre P1 ve PM primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

RT-PCR primerleri ve dizileri:

P1: 5'- ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC -3'

P2: 5'- CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA -3'

PD: 5'- CTT CAA CGA CAC CCG TAC GG-3'

PM: 5'- CTT CAA CAA CGC CTG TGC GT-3'

Sekanslama Çalışmaları

Tam güvenilir bir tanımlama için (ayrıca genetik varyasyonu da görmek amacıyla) Glasa ve ark. (2002) rapor ettiği primerler (virüs genomunun (Cter)P3-6K1-(Nter)CI bölgesini çoğaltan PP3 ve PCI primerleri) ile Candresse ve ark. (1998)'nin geliştirdiği PD primerleri kullanılmıştır. Bu primerler T ve M ırkları için modifiye edilerek ismarlanmıştır. Sekanslanacak fragmanların çoğaltılması için yapılan PCR çalışmaları yukarıda belirtildiği gibidir.

Dizi analizi için kullanılan primerler:

PP3	TTATCTCCAGGARTTGGAGC
PCI	TTGAGTCAAATGGRACAGTTGG
P3D_F	ACATTGCGGAGACAGCACTG
P3D_R	TGCCTTCAAACGTGGCACTG
P3T_F	ATATAGCAGAGACGGCACTT
P3M_F	ACATAGCAGAAACGGCACTC

3.2. Farklı kayısı çeşitlerinde (Hacıhaliloğlu, Kabaası, Şekerpare, İribitirgen, ve İğdır kayısı) sürgün kültürü ve rejenerasyon çalışmaları

Sürgün ve yapraklarından adventif rejenerasyon gerçekleştirmede Perez ve ark. (2000) ile Burgos ve ark. (2003)'nin çalışmaları referans alınmıştır. Birinci yıl sadece Hacıhaliloğlu gözleri kültüre alınmış, başarılı sonuç alınmadığı için ikinci yıl ise Hacıhaliloğlu çeşidine ilaveten Kabaası, Şekerpare, İribitirgen ve İğdır kayısı çeşit ve tipleri çalışılmıştır. 2012- 2013 Mayıs -Eylül süresince ayda bir kez sürgünler alınmıştır. Yapraklar temizlenip sürgünler 1,5-2 cm uzunluğunda, üzerinde bir veya iki göz olacak şekilde in vitro dikime hazırlanmıştır. Yüzde 15'lik sodyum hipoklorit ile 15 dakika yıkanan bitki parçacıkları 3 defa 5 dakika siteril saf su ile çalkalanıp sürgün geliştirme ortamına dikilmiştir. Her büyüme kabına (magenta veya cam kavanoz) 5 sürgün dikilmiş, beyaz floresan lambalarla sağlanan 16 saat aydınlıkta (45-50 µE m⁻² s⁻¹), 24 °C'de bitkiler kültüre alınmıştır. Sürgün geliştirme ortamı olarak QL makro besin maddeleri (Quoirin ve Lepoivre 1977), DKW mikro besin maddeleri, vitaminler, organik bileşikler (Driver ve Kuniyuki 1984), % 3 süzkroz ve %7 agar 3,1 µM BA kullanılmıştır. pH 5,7'ye ayarlanarak 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak ortam hazırlanmıştır. Her denemede iki litre ortam 26 büyüme kabında (kavanoz veya magenta kutusu) katılaştırılmış, her büyüme kabına 5 sürgün ekilmiştir. Toplamda: Hacıhaliloğlu çeşidinde 260 büyüme kabında 1300 sürgün denemede kullanılmıştır. Diğer çeşit ve tiplerin her biri için 130 büyüme kabında 650 sürgün kullanılmıştır.

Gözlerden süren taze sürgünlerin yaprakları rejenerasyon için kullanılmıştır. Rejenerasyon ortamı makro ve mikro besin elementleri, vitamin ve organik maddeleri sürgün geliştirme ortamı ile aynı tutulmuştur. Büyümeyi düzenleyici olarak 9 µM TDZ ve 4 µM NAA kullanılmıştır. Standart Agar yerine saf agar eklenmiştir. PH'ı 5.7'ye ayarlanmış ortamlar otoklavlandıktan sonra sıcaklık 50 °C düşürülecek petri tabaklarına 25 ml dağıtılmıştır. Katılaştıran ortamların üzerine siteril yapraklar 2-3 mm kalınlığında şeritler halinde kesilerek yerleştirilmiştir. Her çeşit için 100 petri kabında olmak üzere 500 yaprak parçası rejenerasyon ortamına alınmıştır. Karanlıkta ve 16 saat aydınlıkta (45-50 µE m⁻² s⁻¹), 24 °C'de yaprak şeritleri kallus ve adventif sürgün oluşumu için kültüre alınmıştır. Oluşan kalluslar her üç haftada bir bir 5 ay boyunca alt kültüre alınmıştır.

3.3. *Nicotiana Benthamina* gösterge bitkisinde rejenerasyon ve transformasyon çalışmaları

Nicotiana benthamiana virüs çalışmalarında gösterge olarak kullanılan otsu bitkilerden biridir. Çalışmada NB tohumları sterilize edilmiş, MS ortamında çimlendirilmiş ve oluşan bitkilerin 4. haftadan itibaren yaprakları kesilerek *Agrobacterium* süspansiyonunda 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra steril kurutma kağıdı üzerinde tutularak kurutulan yaprak üzerine 3-4 çizik atılmış sonra 3 gün inokülasyon ortamında kültüre alınmıştır. İnokülasyon ve rejenerasyon ortamı MS + gelrite + 30 g sukroz +3.1 µM BA katılarak hazırlanmıştır. İnokülasyon/seleksiyon ortamına ayrıca 0.63 mM cefotaxime + 0.13 mM kanamisin eklenmiştir. Her bir fragman için her petride 5 parça olmak üzere 100 adet yaprak şerit kültüre alınmıştır. Yaprak dokuları 16 saat aydınlıkta (45–50 µE m⁻² s⁻¹), 24 °C'de bitkiler kültüre alınmıştır. 3 hafta sonra bitkiler bitki büyümeyi düzenleyici içermeyen MS ortamına aktarılmıştır. Köklendirme işlemi yine MS ortamında gerçekleştirilmiştir.

3.4. Vektör konstrüksiyonu, vektörlerin *Agrobacterium Tumefaciens* aktarılması ve *Nicotiana benthamiana* bitkilerine gen transferi

Primer dizaynı ve transgen parçacıklarının elde edilmesi

Primer dizaynı için PPV M tüm genom dizisi NCBI GeneBank'tan indirilmiştir. 5 fragman için primerler Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) internet programı kullanılarak dizayn edilmiştir. Standart primer tasarım kriterleri Primer3 programına girilerek en uygun primerleri üretmiştir. Bu özellikler şöyledir; primerler 18-25 baz uzunluğunda, 55-60°C bağlanma sıcaklığında ve % 40-60 GC içeriğine sahip olmalıdır. Sadece birinci fragmanın sol primeri tasarım edilirken transgen lokusu P1 geninin tamamını çoğaltabilmek için primer tasarım kriterleri geniş tutulmuştur. Primerlerin PPV genomu üzerindeki yerleri Şekil 2'de; baz dizileri, uzunlukları, PCR'da bağlanma sıcaklıkları ve amplifiye edecekleri bölgeler ise Şekil 3' de verilmiştir.

Şekil 2.Plum pox virus Marcus Hattının tüm genomu ve NCBI GeneBank kayıt bilgilerinin özeti ve tranfer edilecek 5 lokus ve her lokus için sol sağ primer yeşil ve sarı renkle işaretlenmiştir.

Tanım: Plum pox virus strain Marcus, isolate GR001 9, Genomik RNA

Kayıt no: Numarası; FM955843

Organizma: [Plum pox virusmarcus](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=587197)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=587197>)

Virus: Potyviridae, Potyvirus

Kayıt Yapan Araştırmacılar; Palmisano. F, Minafra. A, Bazzoni. A, Boscia. D, Castellano. MA ve Savino. VN.

```
1 aaaaataaaaaactcaacacacacatcaaaaattttatgcatcaaatcaatctcaagcta
61 tcaaaattttcacaatttctactggaagatcaagaaccaacaaagaacattcctcaaatt
12 ttctcccaaatttactgcaagtgcaagatgcaaccattgtattggctcattcacttggc
181 acctgatgcagctatccaccaggataatgcaaacagattggcaaaggcctggacccgtc
241 cagagaaccgccaagtgcagtaacgtgcattctactgtgccgaagagcggcaaaaagtctca
301 taaatacatatgagagtgcaacagctagtcttggaagggtggaggagaaattgcaac
361 ctatgtttgctaagcgagagtttagcaaaacagtcacaaagagaaaagggtcctcggtgct
421 tcaagaaagctctgaagaattatcgaaaagaagctcaagaacagtataaaggaggagc
481 gtgagagattccaatttctcaacgggtccagatgcaaatgtaaccaaactcagtttgaca
541 aatgtgaagcttcagatgggtgccattccccatattattgagaacctagctttacaa
601 caccatcaatgaaaaagaaggtagtgtttactaaggataggatgtccgaggctcactac
661 aacttttcatgaggagggttctgcaaacgccaaggcaaatggtaaaaagttagatgca
721 tagggcgtaagcgtgttagtcgggtcactacacgacgaaagtcgtctgacatacttgcga
781 cacatgttcggcacttgatgttcaaaaccacgctatgacctgtgttgacaggcaa
841 ccaagaagattctgcaactgttgcacaacagtggtttcaccatgtccacaagaaag
901 gggagataacaccaggaatgagcggattgtgtgtaacctgaatctatcgacccaa
961 tgcattgtgtacgacacggatcttttatagttcgtgaaaacacaactcattctgttg
1021 actcacggtgtaagggttccaagagcagagcaatgagatgttactactctgacccag
1081 gcaacaattttgggatgtttcaccatttattgacgtgcaagctacgcgaactg
1141 atcatcagtgacacatctgacctggacgtgaaggagtggttatgttcagcactgtgt
1201 gccaaagcgaataatccctgttgaaaaattacatgtctgcaatgtgtctaaaagtactct
1261 acatgtcacaacaggaaatcgtgatagatttcgacagtaattgagcagcatgagaaaa
1321 cagtgatggataactatccacaattttcacatgttctgttttctaagaggtatcgtg
1381 aattgatgcgcgtggaaaatcagaattatgaagctttcaaggatatcagcacatgatag
1441 gtgagcgcaaaagaagcaacttttccatctcaacaagaatcaatgaattaatcattaagg
1501 gtgttatgatgagcgcaacagactacatagaagtctcgatcatctgcgcgaactagcgc
1561 gatatcagaagaatcgacagagaacattaggaacggatctataaaggcttcagggaaca
1621 aaatctcatcaaaagcacatgtcaatatgcagcttatgtgtgataatcaactgatacta
1681 atggcaatttctgtgtgggacagagagatcatcggcaaacgcttcttaggaattatt
1741 tcgatgtgatcagattgagcagggtctacagacgtcatattgttcgtgaaaatcctagag
1801 gcattcgcaaatggcattggcaacctgttatgtcaacaatctggcagcactacgta
1861 agcagctcttgggtgaagagtgcaattcattttgaggtcctaaaggaatgcactagcaagc
```

1.Fragman

2. Fragman

3. fragman

1921 gaggggaaaatttgtataccagtggtgtgtcacacacgaagacggtacaccactgg
 1981 agtctgaaataataagtcagcaaaagaatcatttagttgtgtaactcaggtgactcga
 2041 agtatgtggattcgcccagcaaggagggtgcaatgttcatagcaaaaggcaggttatt
 2101 gttacatcaacattttccttgctatgctgatacaataaataagatgaacaaaaagt
 2161 tcacaaagacagtgcgtagacactattgtacccaagcttgagcatggccatcgatgatgg
 2221 acttagctacagcttgccacttttctcgagttctctaccagaaactcggaatgctgagc
 2281 ttccacgaatactcgtgatcatgaagcaaatatcttcatgtggtgactcattcggat
 2341 cactgtcaactggaatgcatgtcttgaaagcgaacacaatcaatcaacttattagcttcg
 2401 ctagtgtacattggatccaagcatgaaaacatacctggttgaggtctgaagtggata
 2461 agtgtgatgaattcaaaaatgtcaagctctgtatcagaagcatttacaagcccatca
 2521 tggagcaggtgcttaagaagaacatatttactgctcatgagcgtttgtcacctggg
 2581 tcttaatggcgtgttcagtagtggtcattggaaaaagacacacaataatggatcacac
 2641 gatctcatagctggcagcgatcacatcaatgttatcagcacttcagcccaagtctcgc
 2701 ttgcaagtacactgaatgcaccaatgaatgtcattgacgaacatgcagcagttctgtgtg
 2761 atagtgtctttaggaaccaagccatatgcatctcatgatggcagtggaagactttag
 2821 aaagaatgaaggcacgaactgaatctgatcacaccctgaatgattaaaggtttcagtac
 2881 tccgacaggcgacaccacatctggttgaaaaagtatttccaggagtttagagcaggct
 2941 ggagagaattaagttggtcggaagggttctctgcaatctggaatcgagcgggtggcgaa
 3001 aacatataccaaaatcttcatcccgaaggacgcagcagatttaggaggcaggtacgaca
 3061 tctcgggtcggtcattacttggcagccaatacaaacgcctgaaggacgcagttcggcgga
 312 1 aaagagacgcagttgttggtaacacacaccagtcgatgggaaagctatttgcaaagcta
 3181 tcggaattccacaagtttttccaagcactctgaagatgttgatatgctcatcatat
 3241 ttggtctctgctctcaataggagccacatgcaattcaatgattaatgagcacaaacatt
 3301 taaagcaagtcgctgccgatcgtgaagataagaaaagattcaagagattgcaggtctgt
 3361 acacgagactattagaaaagattggtgcacaccaacacggtatgaatttctgaatatg
 3421 tgcaaggtgagaacctgatctatcgaaatgacagaggacttgatcgccgatgggcaag
 3481 ttgtgtacatcaaagcaagagagattcacaagctaactggaacgagtcgtagcatttg
 3541 tagccctgttatgatgctttttagtcggaacggagtgatggtttacaaaaatcctca
 3601 acaagctaaaggcgctcatgggaagtattgatcagactgttaccatcaaaaattggacg
 3661 acattgaagacatgttgacgaaaagaattgacagtcgattttgtgctgcaaagtaacg
 3721 aagtcgcaccaactgttccatttgactcaacattgagaagtggtggactaatcagcttg
 3781 aaacaggaaatgtgatccgcactacagaactgaaggacactttctcgagttacacgag
 3841 agaacgcagcacagctgcaatgaagtatgatggttcacatcaaaacatcctaactcc
 3901 gcggagcagttggctcaggtgaagtcaactgggttgccatttcatctaaagcaaaaagggtc
 3961 atgtttgtctaattgaaccactcgaccattagctgaaaatgtgtgcaagcaactacgag
 4021 ggcaaccattcaacgttaacccacattgcgtatgcgcggaatgagcaccttgggtcaa
 4081 ctccaatcactgtgatgacgagtggttacgcactgcacttcttagcgaacaatccgactt
 4141 atttgataactacaagtgcacatcttcgacgagtgacgtacacgacgcacatcagcaa
 4201 tggcatttagatgtctcttccggagtattcgtaccagggaagatactgaaagtctcaa
 4261 caacacctcccgggctcaggtgaagtgttcaagacaaaaaggaggtgaaggttatcgttg
 4321 acgaagcactgtattccagcagttcgttctaacttggcactggatgtaatagtata
 4381 tctgaagcatggcgtaacgtgttggtctatgtggcaagtacaatgaggtggacacac
 4441 taagcaagctgctacggatagaagcttaagggttcgaaagtgtatggcggaaccatga
 4501 aagtcggcaatgtcgaaattccaacgagtggtactcaagccaagccacattttgtggtg
 4561 caacaaacattatcgagaatggagtcacactggatcgacgtggtgtggaatttgggtc
 4621 tcaaagctgcaccgtctgtgacattgacaaccgactgttcgttatacgaagaagagca
 4681 ttggctatggggagagaattcaagactgggtcgagttggccgaaacaaaccaggagcgg
 4741 cacttctgattggattcacagagaaaggactcactcaataccctcgataattgcaacag
 4801 aagccgcatctctatgtttcacctatggcctaccagtcatgacaaacggtgtgtcaaca
 4861 gcttactagcgtatgtactgttaagcaagcagcaactatgcaacaattgaactatcac
 4921 cattttacacagtggtcattggtggttgatggcagatgcaccaggaaattttcgggt
 4981 tgcataaaagctacagactgcgcgactcagaagtaactgtaataaattgcccataccaa
 5041 acagcaatgtgtgtgggtgatgagttcgtgattataagcgacaagggtgcaatttgg
 5101 acctcgatgaaaacatccgtgtgccattctatgtgaggacattcctgaaactctacatg
 5161 acaaagttggcaagcagtggaactcataagtcggatgcaggatttgaagaatttga
 5221 gttcgagtgctgcaagatagcgtacacattgcagacagatatccactcattcctcgga
 5281 cagttaaaaactattgacgattgttagagcaagaaaggacaaagcaagcacactcagag
 5341 cgatgaccagccaattctgttcaagttcgaatttctctgtcaagcatcacatcagcaa
 5401 ttgctcgaagtatgccaaggatcacactgaggagaaacattggtgttctgcagatggcga
 5461 agtctcaattgttgaattcagaatctgaacatcgatccaagtatcctgagctcgttc
 5521 gcaactttgtgtcttagaattgtgtcatcatcagacaaaggaggaggtctcaaagacac
 5581 tgcagctaaaagggcattggaacaagcgactatcacgcgtgacgcaacattgatgctcg
 5641 gagtcttgggtggggagcatggatgatttacttattgaaggatagtttctgagaag
 5701 aagttgttcaccaaggcttcaaccgcaggcgaagacaaaataaagttcaggcaagctc
 5761 gggataatagaatggcaagagaggtgtatggcgacgattcaactatggaggactactcg
 5821 gttccgcatactcaagaaagggaagagtaagggaaaaactagaggaatgggaacgaaaa
 5881 ctgcaagtttgaacatgatggttacgacctacagattataacttctgctggtccg
 5941 tcgatccgttaactggtcactattgtagagaacctctcatggacatcaacctggtgc

4. Fragment

6001 aggagcatttttcgcaaatccggaatgactacattggagatgacaagatcacgatgcagc
 6061 acataatgtcaaatcctggtatcgttgcgtattacatcaaggatgcaactcaaaaagccc
 612 1 tcaaatgtgatcttaccacacaacccattgcgcgtatgtgataagactgtctattg
 6181 caggatttccggagagagaatttgaattgaggcagacaggacaccaacttctcgaac
 6241 ctaatgcaattcctaagatcaacgaggaaggggaagaagaagtgtatcatgaaagcaagt
 6301 cctgttttagaggcttgagagactacaatccgatcgcaagttcgatatgccagttgaaca
 6361 attcgtccggcactcgtcagatgagatgtttggtctgtttcggaggactaattgtta
 6421 cgaatcagcaccttttcaaaagaaatgatggagagttaacaattcgatcacatcatggtg
 6481 aatttgggtgaaggacacaaaaactctcaactgctaccttgaagggtcgcgacatag
 6541 tgatcatccgattaccaaaaggactttccccctttccaaaagattgcagttccgaacac
 6601 ccaccacagaggatagagtctgcttaattggatcaaaactttcaacaaagagcatatcca
 6661 gcactatgtcagaaacaagtccacatacctgttgacaacagtcacttttgaagcact
 6721 ggatcagcacgaaggatggtcactgtggactgcctatcgttaagtactcgagatgggagca
 6781 ttcttgggctgcatagttctgcaaatcaacgaatacgcaaaattctatgcagcatttc
 6841 ctgacaactttagaccatatactgtcaaatcaggataatgataactggattaaacaat
 6901 ggcggtacaatccagatgaggtctgtgggggtctttgcaactcaagagagatattccac
 6961 agagtcctgttcacagtttgcaaaactactgacggaccttgatggggagttcgtttataatc
 7021 agtccaaaacaacacattggcttcgggacaagttagaaggaaattgaaagcggttggag
 7081 cctgtctcggacaattggtgacaaaacatgttgtaaaggtaaagtcactcttttgaga
 7141 catactgttgacacaccagaagagcatgaattcttgcaccttggatgggagcatacc
 7201 agaaaagtgttgaataaggatgcgtatgttaaagatctgatgaaatactcgaagccaa
 7261 ttgtcgttgagctgttgactgtgagcaattcgagcgcgctgtcgtatgtcgttatctga
 7321 tgttgatttcaaaagtttgcagaagaatgcaactatgtcacagaccggatgacataattct
 7381 ctgcacttaacatgaaagcagcagttggtgctctgtacagtggcaagaagagggattatt
 7441 tcaaaagtgtcttgagcaagacaaggggattttataaaagctagtgcgaacgcctat
 7501 tcatgggaaagaaaggagtggtgaatggttctttaaaggctgaattgcgaccaaagaga
 7561 aagtggaagcaacaagactcgtctttcacagcagcaccaatcgacactcttctgggg
 7621 gaaaagtgtgtgcagcatttcaacaatcaattctgcagctgaattgcactgcccat
 7681 ggagcgttggaatgacaaaattcagaggtggtgggacaagttactcagagctataccag
 7741 atgggtggaatctattgcgatgtgacggttctcagttcgatagctctctcaccatatt
 7801 taatcaacgcagttctcaacatccgtctggcctcatggaagagtgggatatggtgagc
 7861 agatgcttgcgaacttatatacgagattgtttacacgcaatcgcgactccagatggaa
 7921 caattgtgaagaagtcaagggcaataatagtggtcagccttcgacggttgggacaaca
 7981 cactcaggtgcattctagcaatgacttactcactttgaagcgttggtatcatccagaca
 8041 cacacgattgcatttgcgggtatttctgtaattggtgacgatttagtcttgcagtgcatc
 8101 cagcgtacgagagcatgtatgatgaactccaagaacactttcacaaactggactgaact
 8161 acacattcacaacaaagactgagaacaaggaggaattgtggtcatgtctcataggggtg
 8221 tattgtttgaggacatgtacattccaaactggaacctgagagaatcgtgtcaatacttg
 8281 agtgggatagatcaaatgaaccaattcacagactggaggcaatttgtcatcaatggtcg
 8341 aggcgaggggtcacaaagaactgctgagagaaattcgaaatttacagttgggttcttg
 8401 aacaggcaccatacaatgtctttcaaaagacgggaaagccccgtacatagcagagacgg
 8461 cactcaggaaactctatactgattctgaagcatctgagacggaaattgagagatacctcg
 8521 aagcattttacaatgatgttgatgatagccttgactccaacattgtatataccaggctg
 8581 atgaaaaggaggacgatgaagaagtggatgcagggaagacctactgtgtaactgcaccgg
 8641 cagcaactgtggcgacgactcaaccagctccagtatacaacctgcaccccaaacacag
 8701 caccaatgttcaacccattttcactccagcaacaactcagcctgcgtaagaccagttc
 8761 ctccaattccagggggccaaaccgcggtctttggagttatggaaatgaagacgcacac
 8821 ctagcacctcaaacatttggtaatacaggaaggataggacgtcgatgcaggatcga
 8881 ttggaacttgcagtgccacgcttaaaaacaatgacatgaagttatctctaccgaagg
 8941 tgaagggaaaaacaattatgaactaaatcatttggcacactacagtctgcacaagttg
 9001 actgtcaaacacacgagctccacaatcctgtttccagacttggatgaaggagttaaagc
 9061 gtgattacgatgtcacagatgaggaaatgagcatcatttgaattggcttgatggttgggt
 912 1 gcatcgaaaacggaacgtctccaacatcaatggaatgtgggtgatgatggatggggaga
 9181 cacaagtggatccaataaagccattgttgatcacgcgaacccacttttagacaaa
 9241 ttatggcacatttcagtaacgtggtgaagcgtatattgaaaacgaaattacgagaaaag
 9301 catacatgccaaggtatggaattcagcgcaacctgacagattacagcctcgccagatacg
 9361 ccttgtattttacgaatgacttcaacaacgctgtgctgcagctgaagctcatatac
 9421 agatgaaggcagcagcattgagaaatgttcaaaatcgtttatttggcttggatggaaacg
 9481 tcggaacacaagaaggagacacagagagcacaccgctggtgacgtgaatcgcaacatgc
 9541 acaacctcctcgtgtgaggggagtgtagtggctcggatctatcataaactctacttg
 9601 ggtgagagtctagtacccaattgttttagattcctgtcagcatcctttctcggctt
 9661 aattgggacacattcagtgaggttatacctccacatgtgttagtctttattgtcgaaca
 9721 caggccctgtatctgatgtagcgaatttactccattcgggttatagttctgtgtca
 9781 agagac

5. Fragman

Fragman 4
Ürün Uzunluğu 529

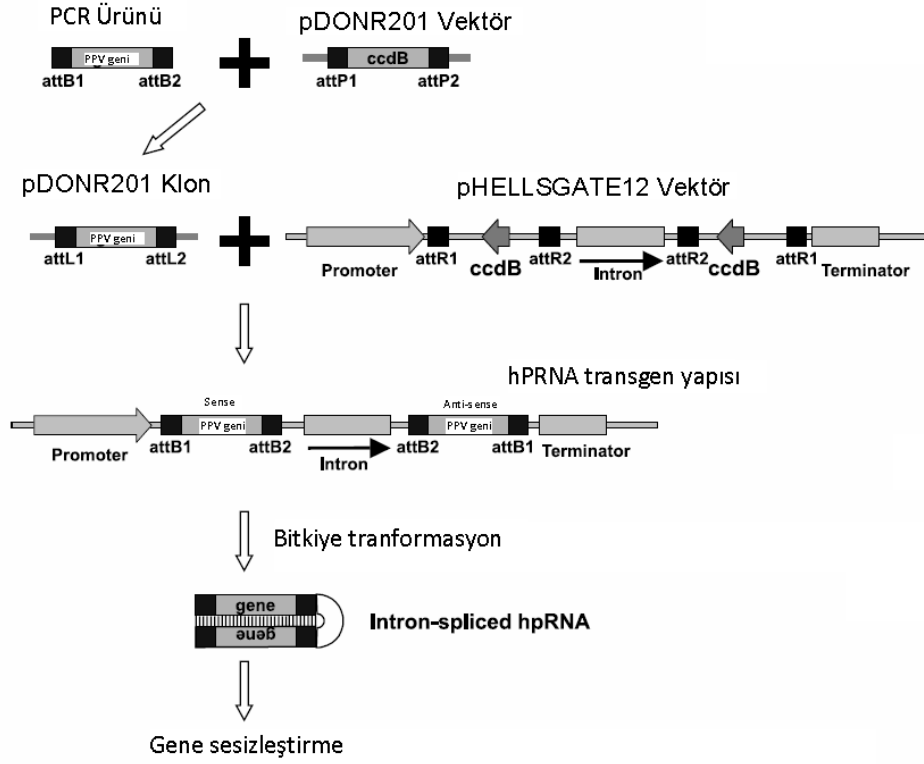
1 atcaacataaatgaagatgaaacaaaaagt**tccacaagaacagtgcgtgac**actattgta
>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>

Fragman 5
Ürün Uzunluğu 1000

1 caccaatggttcaacccccattttcactccagcaacaactcagcctgcggttaagaccagttc

20

Şekil 4. Gateway yaklaşımının temel aşamaları

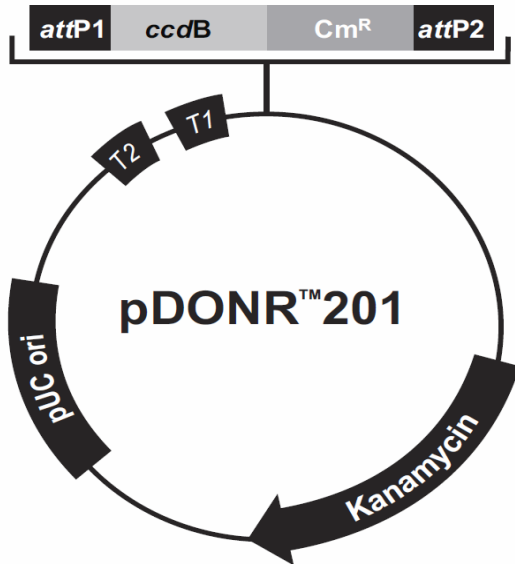


3.4.1. Rekombinasyon çalışmaları

Donör vektöre (pDONR201) genlerin aktarılması (Bp reaksiyonu)

PCR ürünü fragmanları öncelikle donör attP1 ve attP2 bölgelerini içeren plazmite eklenmiştir. Bunun için pDONR201 (Invitrogen) plazmiti kullanılmıştır. Gen bölgelerinin plazmit içerisine aktarımı protokol el kitapçığında detaylı olarak belirtilmektedir (http://wolfson.huji.ac.il/expression/gateway_pdonr_vectors.pdf). Plazmitin özellikleri Şekil 5'de verilmektedir. Özetle; 2 µl clonase tampon, 2 µl PCR ürünü, 1 µl (150 ng) pDONR201, 2 µl TE, 2 µl BP Clonase (Invitrogen) oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra 1 µl proteinase-K ilave edilerek 10 dakika 37 °C' de inkübe edilmiştir.

Şekil 5. Gateway teknolojisi için tasarlanmış pDONR201 vektörü (Invitrogen). attP1 ve attP2 bölgeleri belirtilmiştir. Pozitif seçim için Kanamisin direnç geni içermektedir.



Gen aktarılan transformant vektörlerin seçilmesi

PCR ürünlerinin donör vektöre aktarılma başarısı ve transformant vektörlerin seçimi öncelikle donör vektörlerin *E. coli* hücrelerinde çoğaltılmasıyla belirlenmiştir. 1 µl donör vektör 50 µl 'One Shot ® OmniMAX™ 2 T1 Phage-Resistant Cells' (Invitrogen) ile karıştırılmış, 42 °C'de 30 dakika sıcak şok uygulamasından sonra 250 µl S.O.C. ortamı eklenip 37 °C ve 200 rpm'de 1 saat çalkalamak suretiyle inkübatörde bekletilmiştir. Her bir örneğin 20 µl'si 100 µg/ml kanamisin içeren LB besiyerinde 16-24 saat 37 °C'de inkübe edilip, sadece transformant hücreler kolonileşmiştir. Vektör plazmitler *E. Coli*'den 'Minielute plasmid prifikasyon kit' ile izole edilmiştir. Detaylı bilgi kullanıcı el kitabında mevcuttur (<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/na0300bul.Par.0001.File.tmp/na0300bul.pdf>)

Transformant donör vektörler pDONR™201'den geliştirilmiş primerler kullanılarak koloni PCR ile de belirlenmiştir. Bu primerlerin baz dizisi şöyledir;

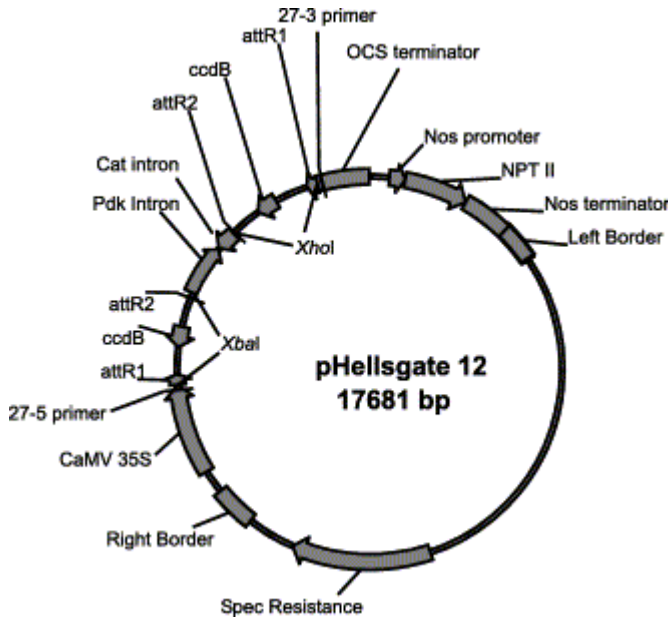
Forward primer 5'-TCGCG TTAAC GCTAG CATGG ATCTC-3'

Reverse primer 5'-GTAAC ATCAG AGATT TTGAG ACAC-3'

Donör vektörden transgenlerinin taşıyıcı vektöre aktarılması (LR reaksiyonu)

pHELLSGATE12 vektörü taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Bu vektör, vektörü geliştiren "The Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO)" kurumundan temin edilmiştir. Şekil 6'da pHELLSGATE12 vektör yapısı gösterilmektedir. Vektörler arası gen aktarımı için bir önceki reaksiyondan elde edilmiş PVP genlerini taşıyan 2 µl donör vektör, 2 µl taşıyıcı vektör (pHELLSGATE12) (300 ng), 2 µl LR Clonase tampon, 2 µl LR Clonase enzimi karıştırılarak 16 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiş, inkübasyon sonrası karışıma 1 µl proteinase-K eklenerek 37 °C'de 10 dakika bekletilmiştir.

Şekil 6.Taşıyıcı vektörün dizaynı. CaMV 35S promotor bölgesi, Pdk intron, attR rekombinasyon bölgeleri, OCS terminator , Nos promotör ve terminatörü ile NPT II (kanamisine direnç) pozitif seleksiyon geni gösterilmiştir.



Rekombinasyonun başarısı öncelikle vektörün *E. coli* hücrelerinde klonlaması ile tespit edilmiştir. *E. coli* içine transformasyon daha önce belirtildiği gibi yapılmıştır. *E. Coli* içinde çoğalan taşıyıcı vektör içinde beklenen transgen yapının olup olmadığı taşıyıcı vektörün promotör ve terminatör bölgelerinden geliştirilen primerler kullanılarak koloni PCR'ı ile tespit edilmiştir.

Primerlerin dizisi şöyledir;

P27-5 5' GGGATGACGCACAATCC 3'

P27-3 5' GAGCTACACATGCTCAGG 3'

Taşıyıcı vektörün *Agrobacterium tumefaciens* hücrelerine aktarılması

Agrobacterium hücreleri satın alınmıştır. Fakat çalışmalar başladığı sırada hücrelerin canlılıklarını kaybettikleri anlaşılmıştır. Ankara Üniversitesinden Prof. Dr. Sabahattin Özcan yeni hücreler göndermiş, bu hücrelerden bir koloni seçilip, çoğaltılmış ve kompatent hale getirilmiştir. Kompatent *Agrobacterium* hücreleri, spektrofotometrede O.D₆₀₀ de 1.5-20 değerini verinceye kadar 16 saat civarında 1 ml LB besiyeri (10 g tryptone, 5 g maya özütü, 10 g NaCldeiyonize su ile 1 litreye tamamlanır) içinde büyütülmüştür. Beş defa siteril su ile 3000 rpm de 15 dakika santrifüj edilerek yıkanmak suretiyle transformasyona hazırlanmıştır. 2 ng plazmit pHELLSGATE12 ve 40 ul *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 hücreleri elektroporasyon cihazının (Biorad GenPulser) kuvetinde yavaşça

karıştırılmıştır. Küvet cihaza koyulduktan sonra, 1440 volt- 5 ms elektrik vuruşuyla plazmidin *Agrobacterium* transferi gerçekleştirilmiştir. *Agrobacterium* karışımı daha sonra 400 µl LB ortamına aktararak 28°C ve 200 rpm de 3 saat inkübe edilmiş, 28° C de 3 gün karanlıkta muhafaza edilerek bitki parçacıklarının transformasyonunda için kullanılmıştır. Bakteriler kanamisinli LB besiyerinde bir gece inkübe edilerek transformasyonun başarısı kontrol edilmiştir.

3.5. Gen transferi çalışmasındaki başarının tespit edilmesi

PPV inokülasyonlar

Transformant bitkiler önce MS ortamında köklendirilmiş, daha sonra dış ortama aktarılmıştır. 4-5 yaprak aşamasında PPV-T izolatının mekanik inokülasyon gerçekleştirilmiştir. Virüs ile bulaşık olan kaysı, şeftali ve erik bitkileri PBS buffer içinde ezilmiş, otu yapraklara carborandum tozu serpilmiş, vürüslü yaprak özütleri transformant NB yapraklarına ovularak uygulanmıştır. Inokülasyondan 21 gün sonra semptom oluşumu gözlenmiştir.

Serolojik ve Moleküler testler

Inokülasyondan 21 gün sonra üç hafta boyunca haftada bir kez yukarıda daha önce açıklandığı gibi 8 örnekte DASI-ELIZA testi yapılmış, 5B-IVIA antiserumuna reaksiyon seviyesi ölçülmüştür.

Fragmanların *Nicotiana benthamiana* genomuna entegrasyonu, PCR çalışmaları ile tespit edilmiştir. Sekiz transformant bitkiden DNA Qiagen Plant DNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilmiş. Beş fragman için geliştirilen lokus spesifik primerler kullanılarak transformant bitki DNA'ları çoğaltılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Plum Pox Virüsü ile bulaşık ağaçların tespiti ve virüs ırkının serolojik ve moleküler olarak tespit edilmesi

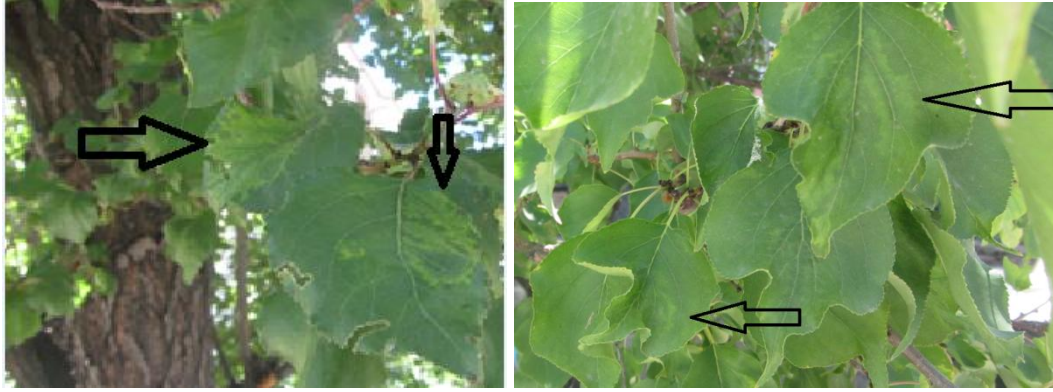
Kayseri il merkezinde belirti gösteren 70 örnek toplanmış (Resim 1), toplanan örnekler 3 yaklaşımla testlenmiştir:

- Serolojik testler ve Moleküler primerlerle örneklerin pozitif olup olmama durumlarının belirlenmesi
- Serolojik testler ve Moleküler primerlerle ırkların belirlenmesi
- Dizi analizi ile ırkların netleştirilmesi ve genetik çeşitliliğin belirlenmesi

- Örneklerin pozitif olup olmama durumları:

Örneklerin 5B-IVIA antiserumuna gösterdikleri reaksiyon belirlenmiş ve tüm PPV ırklarını çoğaltan P1/P2 primer çifti ile örneklerin pozitif olup olmama durumları belirlenmiştir: 70 örneğin 51 adeti DASİ-ELİSA ve RT-PCR sonucunda pozitif bulunmuştur (Tablo 4 ve Şekil 7)

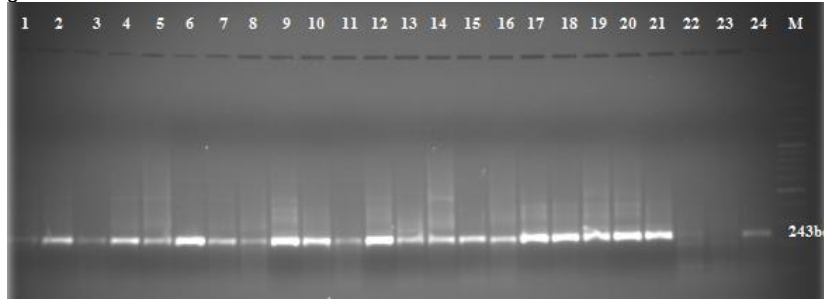
Resim 1. Semptom gösteren kayısı örnekleri



Tablo 4. Toplanan örneklerde PPV test sonuçları

Örnek sayısı		DASİ-ELİSA			RT-PCR		
		PPV-Poli	PPV-M	PPV-D	PPV-Poli	PPV-M	PPV-D
Kayseri	12	+	-	-	+	+	-
Kayseri	9	+	+	-	+	+	-
Kayseri	30	+	+	+	+	+	+
Kayseri	19	-	-	-	-	-	-

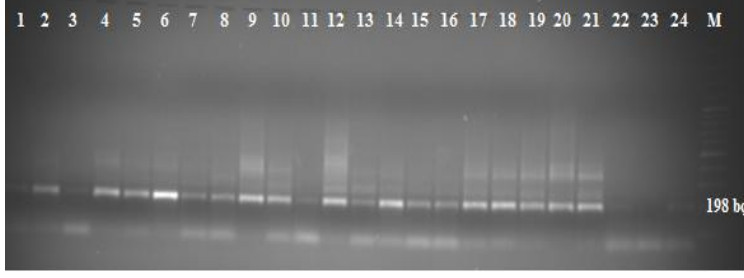
Şekil 7: PPV-Poli primerleri kullanılarak gerçekleştirilen RT-PCR analizi (örnek 1-24 arası, M:Markır) PPV bulaşıklılığını göstermektedir.



- İrk (streyn/suş) belirleme testleri

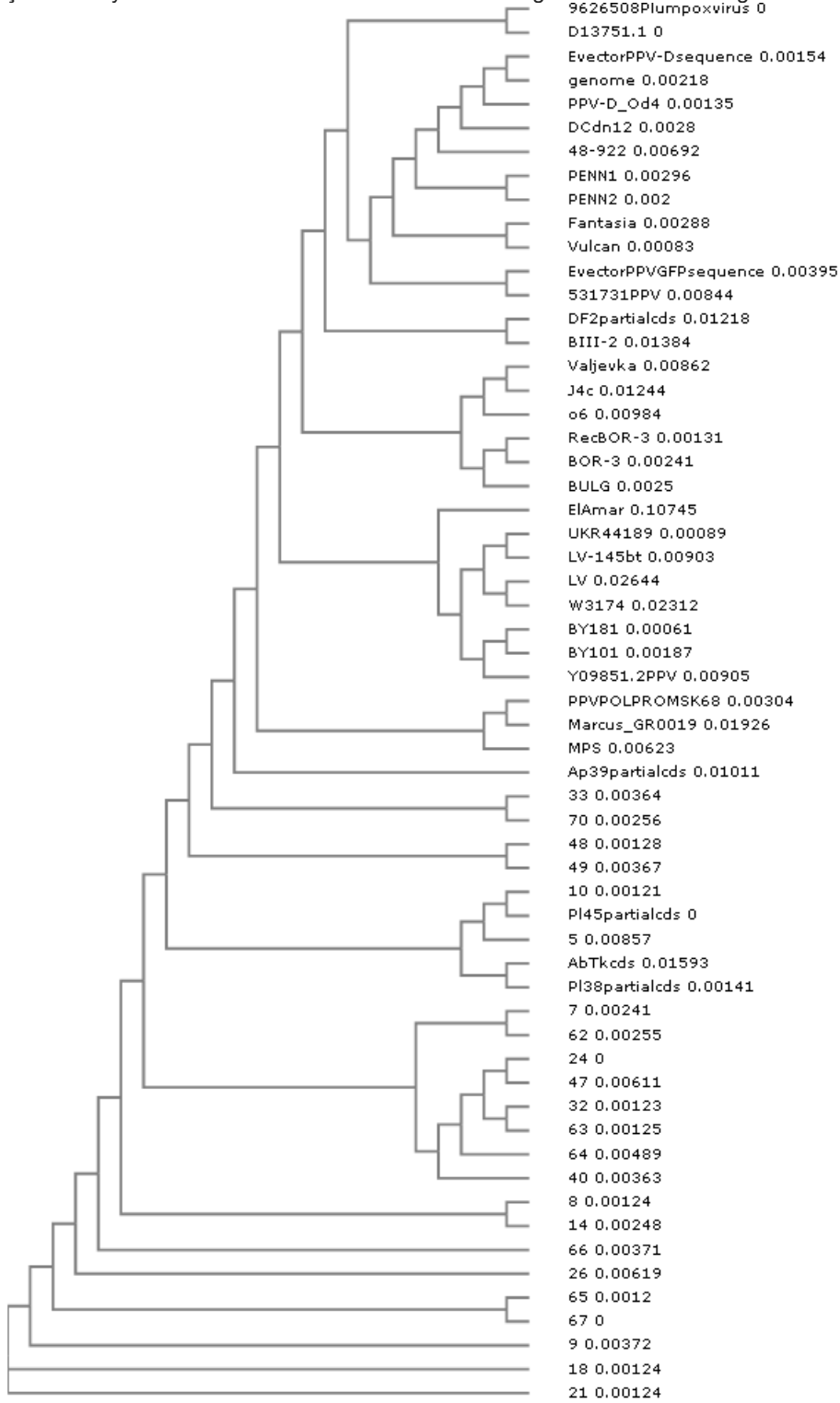
PPV-M ve PPV-D ırklarını belirlemek için AL ve 4D antibodileri kullanılmıştır. Ayrıca M ve D ırkını çoğaltacak primerler ile tüm örneklerin cDNA'sı PCR ile çoğaltılmıştır. Eliza ve primer sonuçlarına göre M ve D ırklarının sayısı Tablo 2'de özetlenmiştir. Pozitif örneklerin 39 adeti PPV-M spesifik antiserum ile reaksiyona girerken 30 adeti aynı zamanda PPV-D spesifik antiserum ile reaksiyona girmiştir. 51 adet pozitif örnek M ırkına spesifik primerlerle çoğaltılmıştır (Şekil 8)

Şekil 8. Spesifik PPV-M primerleri kullanılarak gerçekleştirilen RT-PCR analizi (1-24 arası, M:Markır)



c) Dizi analizi ile ırkların netleştirilmesi ve genetik çeşitliliğin belirlenmesi
70 Örneklerin, P3-6K1 bölgesini kapsayan 830 bazlık bölgesi PCR ile çoğaltılmış ve PCR ürünleri hizmet alımı yolu ile dizilenmiştir. Fragmanlar iki yönden ileri ve geri primerleri ile dizilenmiş, kirli bölgeler çıkartılmış ve 807 baz konsensüs fragman elde edilmiştir. 23 örnek iyi dizilenirken (Liste 1), geriye kalan örneklerde bozuk nükleotid dizileri gözlenmiştir. Gen bankta kayıtlı olan PPV genomları indirilmiş ve bunların 807 P3-6K1 bölgesi çıkarılarak, bu çalışmada elde edilen diziler ile Mega ve ClustalW2 programlarında analiz edilmiştir (Şekil 9). Filogenetik analiz Kayseri örneklerinin PPV-T ırkı olduğunu göstermiştir.

Şekil 9. Kayseri örnekleri ile GenBank örneklerinin filogenetik analiz dendogramı



Liste 1. 23 örneğin fasta formatında PPV dizisi.

>5

TGGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTCGGAAAGATTCTCTGCAATCTTGAATCGCAGCGGTGGCGAAAACATATA
CCAAAGGCCCTTCATCCCGAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTTCGGTCATTACTTGGCAGCCA
ATACAAACGCCTGAAAGACGTGGTTTCGGCGGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACCAGTCGATGGGGAAGCTAT
TCTGCAAAGCTATCGGAATTTCTACAAGTTTTCTTCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTG
CTTTGATAGGAGCCACATGCAATTCAATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGA
AAAGATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTG
AATATGTGCAAGGTGAAAACCCCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAA
GTAAAGAGATTACAAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTTGTAGCCCTTGTTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGA
GTGATGGTGTTTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGGAAGTATCGATCAGACTGTTACCATCAAAGTTTGGAC
CGACATTGAAGACATGTTGGACGAAAAGAATTGACAGTCGATTTTGTCTTGCAAGTAATGAAGTTGCACCAACTG

>7

TGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTCGGAAAGATTCTCTGCAATCTTGAATCGCAGCGGTGGCGAAAACATATACC
AAAGCCTTTTCATCCCGAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTTCGGTCATTACTTGGCAGTCAATA
TACAAACGCCTGAAAGACGTGGTTTCGGCGGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACCAGTCGATGGGGAAGCTATTCT
GCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTTCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCTT
TCAATAGGAGCCACATGTAATTCATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGACAAGAAAA
GATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAAT
ATGTGTCAAGGTGAAAACCCCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAGAGTA
AAAGAGATTACAAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTTGTAGCCCTTGTTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGAGTG
ATGGTGTTTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGGAAGTATCGATCAGACTGTTACCATCAAAGTTTGGACG
ACATTGAAGACATGTTGGACGAAAAGAAGTTGACAGTCGATTTTGTCTTGCAAAGTAATGAAGTTGCACCAACTG

>8

TGGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTCGGAAAGATTCTCTGCAATCTTGAATCGCAGCGGTGGCGAAAACATATA
CCAAAGCCTTTTCATCCCGAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTTCGGTCATTACTTGGCAGTCAA
TACAAACGCCTGAAAGACGTGGTTTCGGCGGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACCAGTCGATGGGGAAGCTATT
CTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTTCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATATATTTGGTCTCTTG
TTTCAATAGGAGCCACATGTAATTCATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGAA
AAGATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGA
ATATGTGCAAGGTGAAAACCCCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAG
TAAAGAGATTACAAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTTGTAGCCCTTGTTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGAGT
GATGGTGTTTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGGAAGTATCGATCAGACTGTTACCATCAAAGTTTGGAC
GACATTGAAGACATGTTGGACGAAAAGAAGTTGACAGTCGATTTTGTCTTGCAAAGTAATGAAGTTGCACCAACTG

>9

TGGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTCGGAAAGATTCTCTGCAATCTTGAATCGCAGCGGTGGCGAAAACATATA
CCAAAGCCTTTTCATCCCGAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTTCGGTCATTACTTGGCAGTCAA
TACAAACGCCTGAAAGACGTGGTTTCGGCGGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACCAGTCGATGGGGAAGCTATT
CTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTTCCAAGCACCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTG
CTTTCAATAGGAGCCACATGTAATTCATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGAA
AAAGATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGA
AATATGTGCAAGGTGAAAACCCCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAG
GTAAAGAGATTACAAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTTGTAGCCCTTGTTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGAGT
GTGATGGTGTTTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGGAAGTATCGATCAGACTGTTACCATCAAAGTTTGG
ACGACATTGAAGACATGATGGACGAAAAGAAGTTGACAGTCGATTTTGTCTTGCAAAGTAATGAAGTTGCACCAACTG

>10

TGGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTCGGAAAGATTCTCTGCAATCTTGAATCGCAGCGGTGGCGAAAACATATA
CCAAAGCCTTTTCATCCCGAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTTCGGTCATTACTTGGCAGTCAA
TACAAACGCCTGAAAGACGTGGTTTCGGCGGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACCAGTCGATGGGGAAGCTATT
CTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTTCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTG
TTTCAATAGGAGCCACATGCAATTCAATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGAA
AAGATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGA
ATATGTGCAAGGTGAAAACCCCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAG
TAAAGAGATTACAAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTTGTAGCCCTTGTTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGAGT
GATGGTGTTTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGGAAGTATCGATCAGACTGTTACCATCAAAGTTTGGAC
GACATTGAAGACATGTTGGACGAAAAGAAGTTGACAGTCGATTTTGTCTTGCAAAGTAATGAAGTTGCACCAACTG

>14

TGGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTCGGAAAGATTCTCTGCAATCTTGAATCGCAGCGGTGGCGAAAACATATA
CCAAAGCCTTTTCATCCCGAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTTCGGTCATTACTTGGCAGTCAA
TACAAACGCCTGAAAGACGTGGTTTCGGCGGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACCAGTCGATGGGGAAGCTATT
CTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTTCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTG
TTTCAATAGGAGCCACATGTAATTCATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGAA
AAGATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGAATGAATTTCTTGAA
TATGTGCAAGGTGAAAACCCCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGT
AAAAGAGATTACAAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTTGTAGCCCTTGTTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGAGT
GATGGTGTTTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGGAAGTATCGATCAGACTGTTACCATCAAAGTTTGGAC
GACATTGAAGACATGTTGGACGAAAAGAAGTTGACAGTCGATTTTGTCTTGCAAAGTAATGAAGTTGCACCAACTG

>18

TGGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTCGGAAAGATTCTCTGCAATCTTGAATCGCAGCGGTGGCGAAAACATATA
CCAAAGCCTTTTCATCCCGAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTTCGGTCATTACTTGGCAGTCAA
TACAAACGCCTGAAAGACGTGGTTTCGGCGGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACCAGTCGATGGGGAAGCTATT
CTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTTCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTG
TTTCAATAGGAGCCACATGTAATTCATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGAA

TGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTTCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGATATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCT
TTCAATAGGAGCCACATGTAATTCATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGAAA
AGATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGCACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAA
TATGTGCAAGGTGAAAACCCCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTCATCAAAGT
AAAAGAGACTCACAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGAGT
GATGGTGTTTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGTGTCATGGGGAGTATCGATCAGACTGTTACCATCAAAGTTTGGAC
GACATTGAAGACATGTTGGACGAAAAGAAGTTGACAGTCGATTTTGTCTTGCAAAGTAATGAAGTTGCACCAACTG

>48

TGGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTCGGAAAGATTCTCTGCAATCTTGGAATCGCAGCGGTGGCGAAAACATATA
CCAAAGCCTTTTCATCCCGAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTTCGGTCATTACTTGGCAGTCAA
TACAAACGCCTGAAAGACGTGGTTTCGACGGAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACAGTCGATGGGGAAGCTATT
CTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTTCCAAGCACTCTGAAAATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTG
TTTCAATAGGAGCCACATGTAATTCATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGAA
AAGATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGA
ATATGTGCAAGGTGAAAACCCCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTTGATTGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAG
TAAAGAGATTACAAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGAGT
GATGGTGTTTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGGAAGTATCGATCAGACTGTTACCATCAAAGTTTGGAC
GACATTGAAGACATGTTGGACGAAAAGAAGTTGACAGTCGATTTTGTCTTGCAAAGTAATGAAGTTGCACCAACTG

>49

TGGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTCGGAAAGATTCTCTGCAATCTTGGAATCGCAGCGATGGCGAAAACATATAC
CAAAGCCTTTTCATCCCGAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTTCGGTCATTACTTGGCAGTCAAT
ACAAACGCCTGAAAGACGTGGTTTCGGCGGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACAGTCGATGGGGAAGCTATTCT
TGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTTCCAAGCACTCTGAAAATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCT
TTCAATAGGAGCCACATGTAATTCATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGAAA
AGATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAA
TATGTGCAAGGTGAAAACCCCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTTGATTGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGT
AAGAGAGATTACAAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGAGT
GATGGTGTTTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGGAAGTATCGATCAGACTGTTACCATCAAAGTTTGGAC
GACATTGAAGACATGTTGGACGAAAAGAAGTTGACAGTCGATTTTGTCTTGCAAAGTAATGAAGTTGCACCAACTG

>62

TGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTCGGAAAGATTCTCTGCAATTTTGAATCGCAGCGGTGGCGAAAACATATACC
AAAGCCTTTTCATCCCGAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTTCGGTCATTACTTGGCAGTCAATA
CAAACGCCTGAAAGACGTGGTTTCGGCGGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACAGTCGATGGGGAAGCTATTCT
GCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTTCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCTT
TCAATAGGAGCCACATGTAATTCATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGAAA
GATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAA
ATGTGCAAGGTGAAAACCCCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGTA
AAGAGATTACAAAGTTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGAGTG
ATGGTGTTTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGGAAGTATCGATCAGACTGTTACCATCAAAGTTTGGACG
ACATTGAAGACATGTTGGACGAAAAGAAGTTGACAGTCGATTTTGTCTTGCAAAGTAATGAAGTTGCACCAACTG

>63

TGGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTCGGAAAGATTCTCTGCAATCTTGGAATCGCAGCGGTGGCGAAAACATATA
CCAAAGCCTTTTCATCCCGAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTTCGGTCATTACTTGGCAGTCAA
TACAAACGCCTGAAAGACGTGGTTTCGGCGGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACAGTCGATGGGGAAGCTATT
CTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTTCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTG
TTTCAATAGGAGCCACATGTAATTCATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGAA
AAGATTCAAGAGACTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGA
ATATGTGCAAGGTGAAAACCCCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAG
TAAAGAGATTACAAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGAGT
GATGGTGTTTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGTGTCATGGGAAGTATCGATCAGACTGTTACCATCAAAGTTTGGAC
GACATTGAGGACATGTTGGACGAAAAGAAGTTGACAGTCGATTTTGTCTTGCAAAGTAATGAAGTTGCACCAACTG

>64

TGGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTCGGAAAGATTCTCTGCAATCTTGGAATCGCAGCGGTGGCGAAAACATATA
CCAAAGCCTTTTCATCCCGAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTTCGGTCATTACTTGGCAGTCAA
TACAAACGCCTGAAAGACGTGGTTTCGGCGGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACAGTCGATGGGGAAGCTATT
CTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTTCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTG
TTTCAATAGGAGCCACATGTAATTCATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGAA
AAGATTCAAGAGACTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGA
ATATGTGCAAGGTGAAAACCCCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAG
TAAAGAGATTACAAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGAGT
GATGGTGTTTACAAAGATCCTCAATAAGCTTAAGGGTGTCATGGGAAGTATCGATCAGACTGTTACCATCAAAGTTTGGAC
GACATTGAAGACATGTTGGACGAAAAGAAGTTGACAGTCGATTTTGTCTTGCAAAGTAATGAAGTTGCACCAACTG

>65

TGGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTCGGAAAGATTCTCTGCAATCTTGGAATCGCAGCGGTGGCGAAAACATATA
CCAAAACCTTTTCATCCCGAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTTCGGTCATTACTTGGCAGTCAA
TACAAACGCCTGAAAGACGTGGTTTCGGCGGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACAGTCGATGGGGAAGCTATT
CTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTTCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTG
TTTCAATAGGAGCCACATGTAATTCATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGAA
AAGATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGA
ATATGTGCAAGGTGAAAACCCCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAG
TAAAGAGATTACAAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGAGT
GATGGTGTTTACAAAGATCCTCAATAAGCTTAAGGGTGTCATGGGAAGTATCGATCAGACTGTTACCATCAAAGTTTGGAC
GACATTGAAGACATGTTGGACGAAAAGAAGTTGACAGTCGATTTTGTCTTGCAAAGTAATGAAGTTGCACCAACTG

>66

TGGAGCAAGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTCGGAAAGATTCTCTGCAATCTTGGAATCGCAGCGGTGGCGAAAACATATAC
CAAAGCCTTTTCATCCCGAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTTCGGTCATTACTTGGCAGTCAAT

ACAAACGCCTGAAAGACATGGTTCGGCGGAAAAGAGACGACGTTGTTGTACACACACCAGTCGATGGGGAAGCTATTC
TGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTCTTCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCT
TTCAATAGGAGCCACATGTAATTCATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGAAA
AGATTCAAGAGATTGACGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAA
TATGTGCAAGGTGAAAACCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGT
AAAAGAGATTCAACAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTTGTAGCCCTTGTTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGAGT
GATGGTGTTCACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGGAAGTATCGATCAGACTGTTACCATCAAAGTTTGGAC
GACATTGAAGACATGTTGGACGAAAAGAAGTTGACAGTCGATTTTGTCTTGCAAAGTAATGAAGTTGCACCAACTG
>67
TGGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTTCGGAAAAGATTCTCTGCAATCTTGAATCGCAGCGGTGGCGAAAACATATA
CCAAAGCCTTTTATCCCGAAAGACGACGAGATTTAGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTCCGGTCATTACTTGGCAGTCAA
TACAAACGCCTGAAAGACGTGGTTTCGGCGGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACCAGTCGATGGGGAAGCTATT
CTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTCTTCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCT
TTTCAATAGGAGCCACATGTAATTCATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGAA
AAGATTCAAGAGATTGACGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGA
ATATGTGCAAGGTGAAAACCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAG
TAAAAGAGATTCAACAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTTGTAGCCCTTGTTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGAGT
GATGGTGTTCACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGGAAGTATCGATCAGACTGTTACCATCAAAGTTTGGAC
GACATTGAAGACATGTTGGACGAAAAGAAGTTGACAGTCGATTTTGTCTTGCAAAGTAATGAAGTTGCACCAACTG

>70

TGGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTTCGGAAAAGATTCTCTGCAATCTTGAATCGCAGCGGTGGCGAAAACATATA
CCAAAGCCTTTTATCCCGAAAGACGACGAGATTTAGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTCCGGTCATTACTTGGCAGTCAA
TACAAACGCCTGAAAGACGTGGTTTCGGCGGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACCAGTCGATGGGGAAGCTATT
CTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTCTTCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCT
TTTCAATAGGAGCCACATGTAATTCATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGAA
AAGATTCAAGAGATTGACGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGA
ATATGTGCAAGGTGAAAACCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAG
TAAAAGAGATTCAACAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTTGTAGCCCTTGTTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGAG
TGATGGTGTTCACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGGAAGTATCGATCAGACTGTTACCATCAAAGTTTGGAC
GACATTGAAGACATGTTGGACGAAAAGAAGTTGACAGTCGATTTTGTCTTGCAAAGTAATGAAGTTGCACCAACTG

4.2. Farklı kayısı çeşitlerinde (Hacıhaliloğlu, Kabaası, Şekerpare, İribitirgen, ve İğdir kayısı) sürgün kültürü ve rejenerasyon çalışmaları

Farklı kayısı çeşit ve tiplerinde adventif sürgün oluşturma çalışmaları yapılmıştır. Birinci yıl sadece Hacıhaliloğlu gözleri kültüre alınmış, başarılı sonuç alınmadığı için ikinci yıl ise Hacıhaliloğlu çeşidine ilaveten Kabaası, Şekerpare, İribitirgen, ve İğdir kayısı çeşit ve tipleri çalışılmıştır. 2012- 2013 Mayıs -Eylül süresince ayda bir kez sürgünler alınmıştır. Her denemede iki litre ortam 26 büyüme kabında (kavanoz veya magenta kutusu) katılaştırılmış, her büyüme kabına 5 sürgün ekilmiştir. Toplamda: Hacıhaliloğlu çeşidinde 260 büyüme kabında 1300 sürgün denemede kullanılmıştır. Diğer çeşit ve tiplerin her biri için 130 büyüme kabında 650 sürgün kullanılmıştır. Tablo 5'de değerler görüldüğü üzere sürgün sürgün oluşumunda sorun yaşanmamıştır.

Tablo 5. Kayısı çeşitlerinde kültüre alınan tomurculardan süren sürgün sayısı

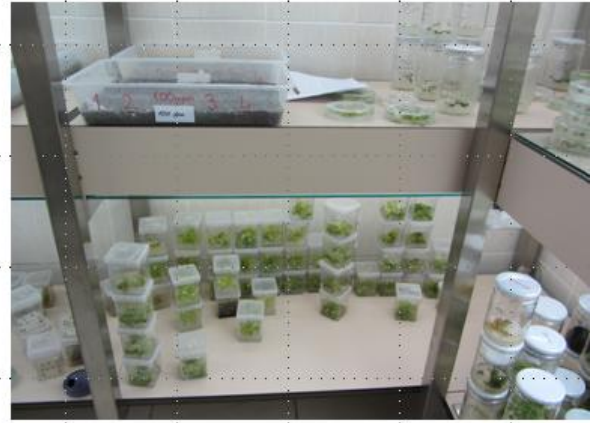
Çeşitler	Süren sürgün sayısı				
	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül
Hacıhaliloğlu (1. Yıl)	22	40	15	17	18
Hacıhaliloğlu (2. Yıl)	39	70	35	20	30
Kabaası	22	34	33	15	14
Şekerpare	40	45	22	25	12
İribitirgen	33	72	35	22	15
İğdir	58	40	27	30	24

Gözlerden süren taze sürgünlerin yaprakları rejenerasyon için kullanılmıştır. Rejenerasyon ortamı makro ve mikro besin elementleri, vitamin ve organik maddeleri sürgün geliştirme ortamı ile aynı tutulmuştur. Büyümeyi düzenleyici olarak 9 µM TDZ ve 4 µM NAA kullanılmıştır. Her çeşit için 100 petri kabında olmak üzere 500 yaprak parçası rejenerasyon ortamına alınmıştır. Karanlıkta ve 16 saat aydınlıkta (45–50 µE m⁻² s⁻¹), 24 °C'de yaprak şeritleri kallus ve adventif sürgün oluşumu için kültüre alınmıştır. Yaprakların tamamında kallus oluşmuştur. Oluşan kalluslar her üç haftada bir 5 ay boyunca alt kültüre alınmıştır. Kalluslar sulu ve oldukça canlı görülmelerine rağmen (Resim 3) adventif sürgün gelişmemiştir.

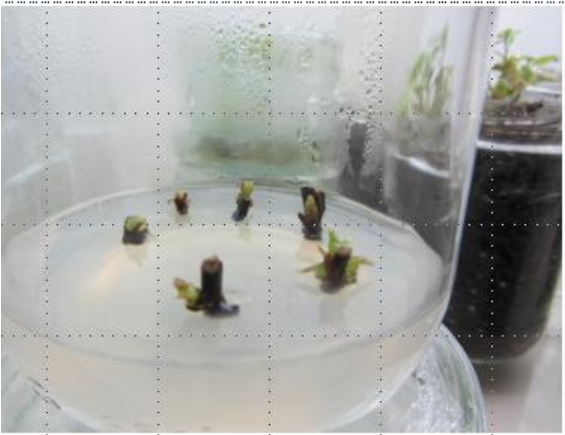
Resim 2. Kayısı sürgün çalışmasından resimler



1. Sürgün kültüründeki bitkilerin genel görüntüsü.



2. Sürgün kültüründeki bitkilerin genel görüntüsü



3. Sürgüne alınan gözler



4. Süren gözler



5.Süren gözler

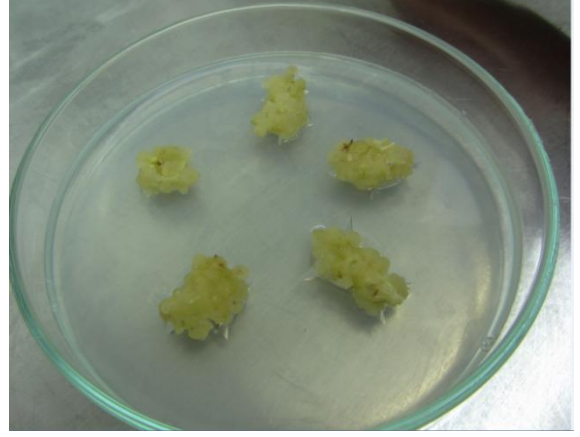
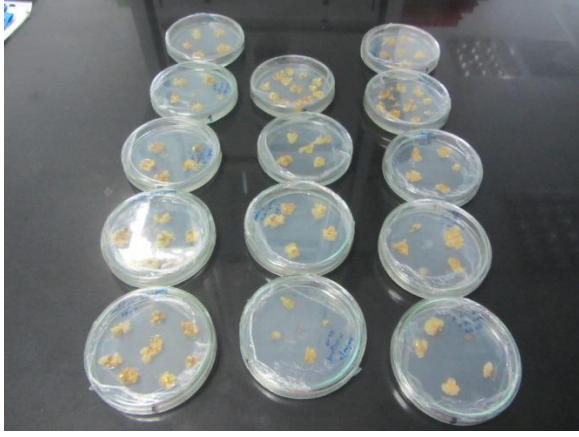


6.Süren gözler



7.Süren gözler

Resim 3. Petri kaplarında kayısı kallus dokuları



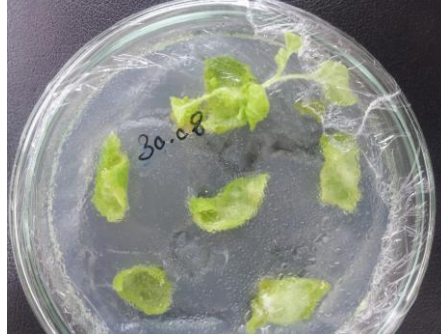
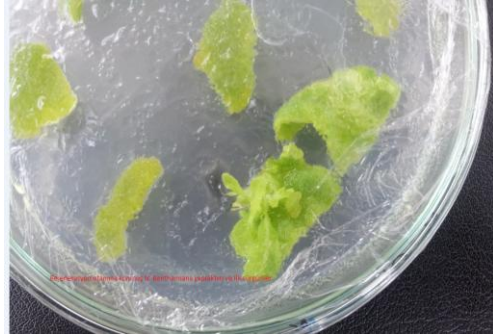
4.3. *Nicotiana Benthamiana* gösterge bitkisinde rejenerasyon ve transformasyon çalışmaları

Nicotiana Benthamiana virüs çalışmalarında gösterge olarak kullanılan otsu bitkilerden biridir. Kayısıda adventif rejenerasyon çalışmasından sonuç alınmamış bu nedenle *Nicotiana Benthamiana* çalışılmıştır (Resim 4). Çalışmada NB tohumları sterilize edilmiş, MS ortamında çimlendirilmiş ve oluşan bitkilerin yaprakları *Agrobacterium* ile inoküle edilmiş, rejenerasyon ortamında transformant adventif sürgünler elde edilmiştir.

Tablo 6. Transformant *Nicotiana benthamiana* sayısı

Fragmanlar	Transformant sürgün sayısı
F 1	3
F 2	5
F 3	2
F 4	4
F 5	4

Resim 4. *Nicotiana benthamiana* bitkilerinde rejenerasyon ve transformasyon çalışmaları



a) Rejenerasyon ortamında *N. Benthamiana* yaprakları ve ilk sürgünler

b) Rejenerasyon ortamında büyüyen sürgün



c) Dış koşullara alıştırılmak üzere torf ortamında yetiştirilen *N. Benthamiana* bitkileri

4.4. Vektör konstrüksiyonu, rekombinant vektörlerin *Agrobacterium Tumefaciens* hücrelerine aktarılması ve *Nicotiana Benthiana* bitkilerine transferi

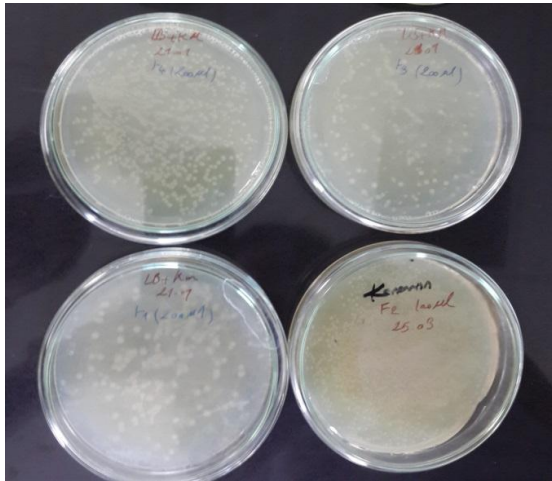
Plum pox virüsünün RNA gen susturmadaki rolünü belirlemek üzere PPV T irkının beş bölgesi için konstrüktler geliştirilmiştir. Beş bölge (Tablo 7) PCR ile çoğaltılmış, attB1 ve attB2 oligonükleotidleri eklenmiş, gateway sistemine uygun hairpin konstrüktler oluşturmak üzere kullanılmıştır. attB1 ve attB2 eklenen parçalar ilk olarak pDONR221 vektörüne transfer edilmiştir.

Tablo 7. Beş adet vektör konstrüktünde kullanılan PPV fragman primerleri

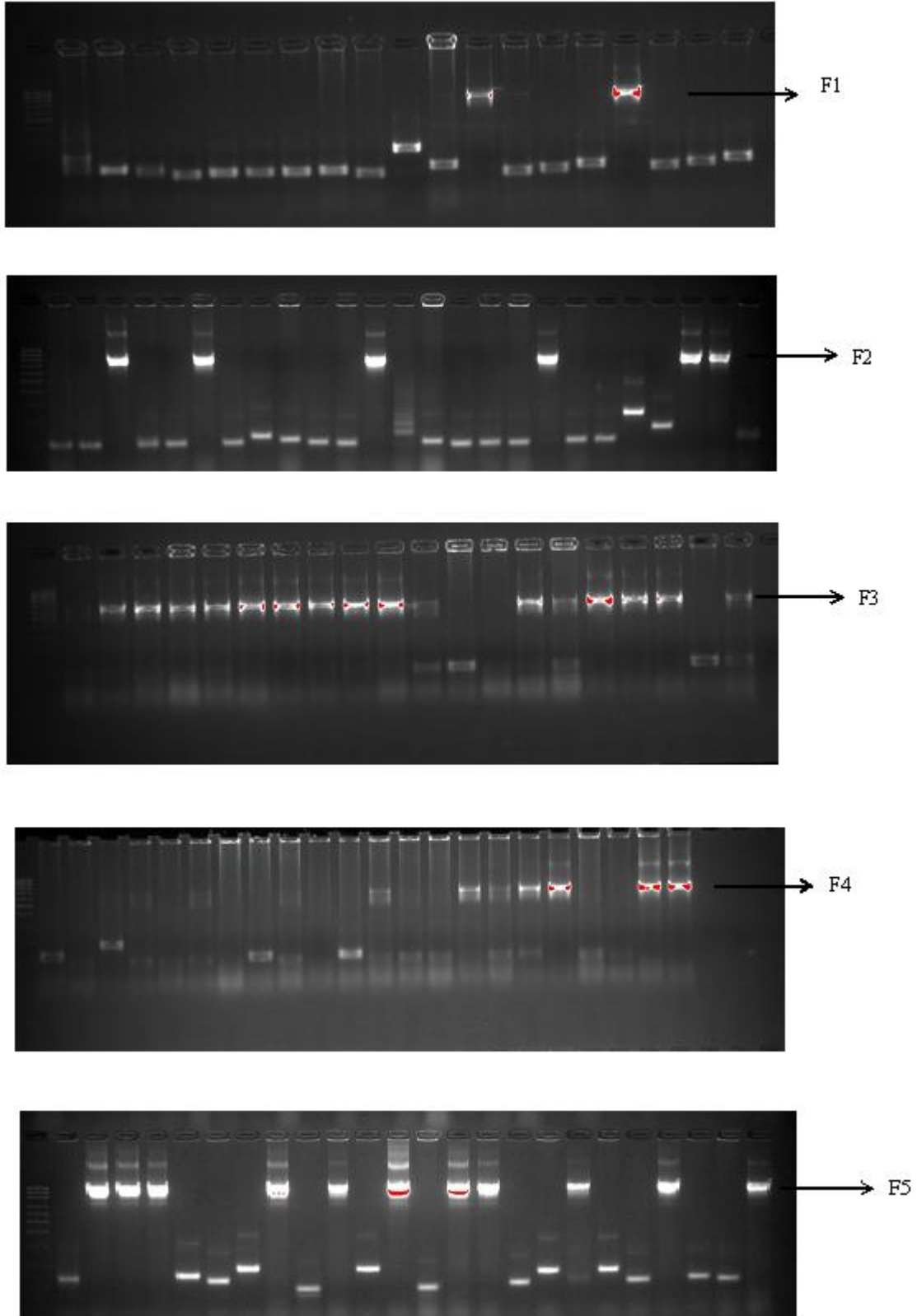
Fragman	İsim	Dizi
F 1	Forward (UTR/P1)	5'GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC AAATATAAAACTCAACACAACATTCA 3'
	Reverse (UTR/P1)	5'GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT CGCTTACGCCCTATGATCTC 3'
F 2	Forward (P1/HCPPro)	5'GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TAGTCGGTCACTACACGACGA3'
	Reverse (P1/HCPPro)	5'GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT TCATTGATCTTGTGAGATGG3'
F 3	Forward (HCPPro)	5'GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TGATGAGCGCACAAGACTACA3'
	Reverse (HCPPro)	5'GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT AACCTGCCTTTGCTATGAACA3'
F 4	Forward (HCPPro/P3)	5'GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTCACAAAGACAGTGCCTGA3'
	Reverse (HCPPro/P3)	5'GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT AACTGCTGCATGTTCTGTCAA3'
F 5	Forward (CP)	5'GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC GCTGATGAAAAGGAGGACGA3'
	Reverse (CP)	5'GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT CTCCCCTCACACCGAGGA3'

PPV fragmanlar pDONR221 vektörü içine aktarılmış daha sonra One Shot 10 Chemically Compotent *E. coli* kiti kullanılarak, pDONR221 vektörü, *E. coli* içine transfer edilmiş ve 50 µg/ml kanamisin içeren ortamda büyütülmüştür (Resim 5). Fragmanı taşıyan vektörler prufikasyondan sonra koloni PCR'ı ile çoğaltılmış, fragmanları vektör içinde olduğu kesinleştirilmiştir (Resim 6).

Resim 5. pDONR221 vektörünü taşıyan *E. coli* kolonileri

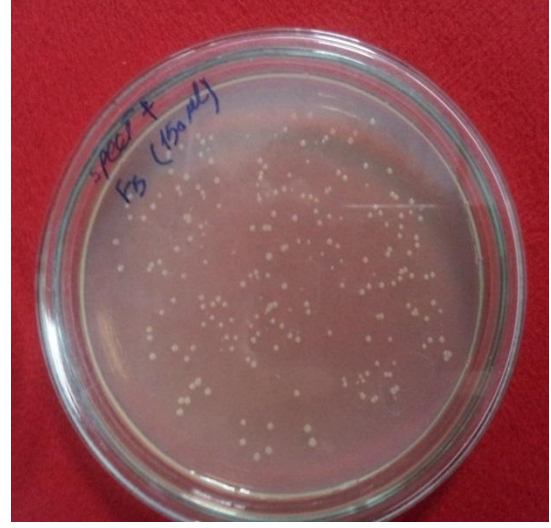
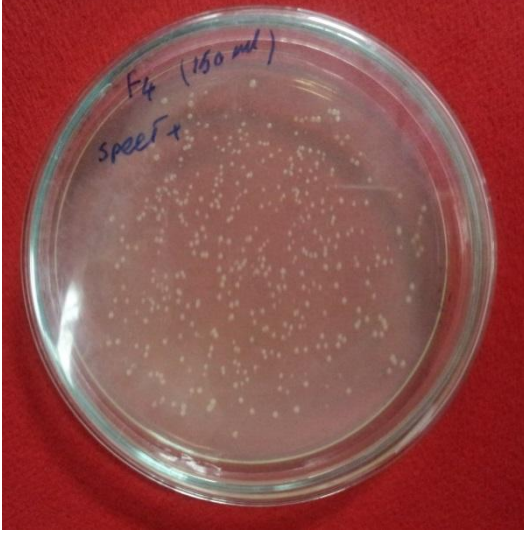


Resim 6. pDONR221 vektörüne fragmanların (F1, F2, F3, F4 ve F5 için) başarı ile aktarıldığını gösteren koloni PCR resimleri

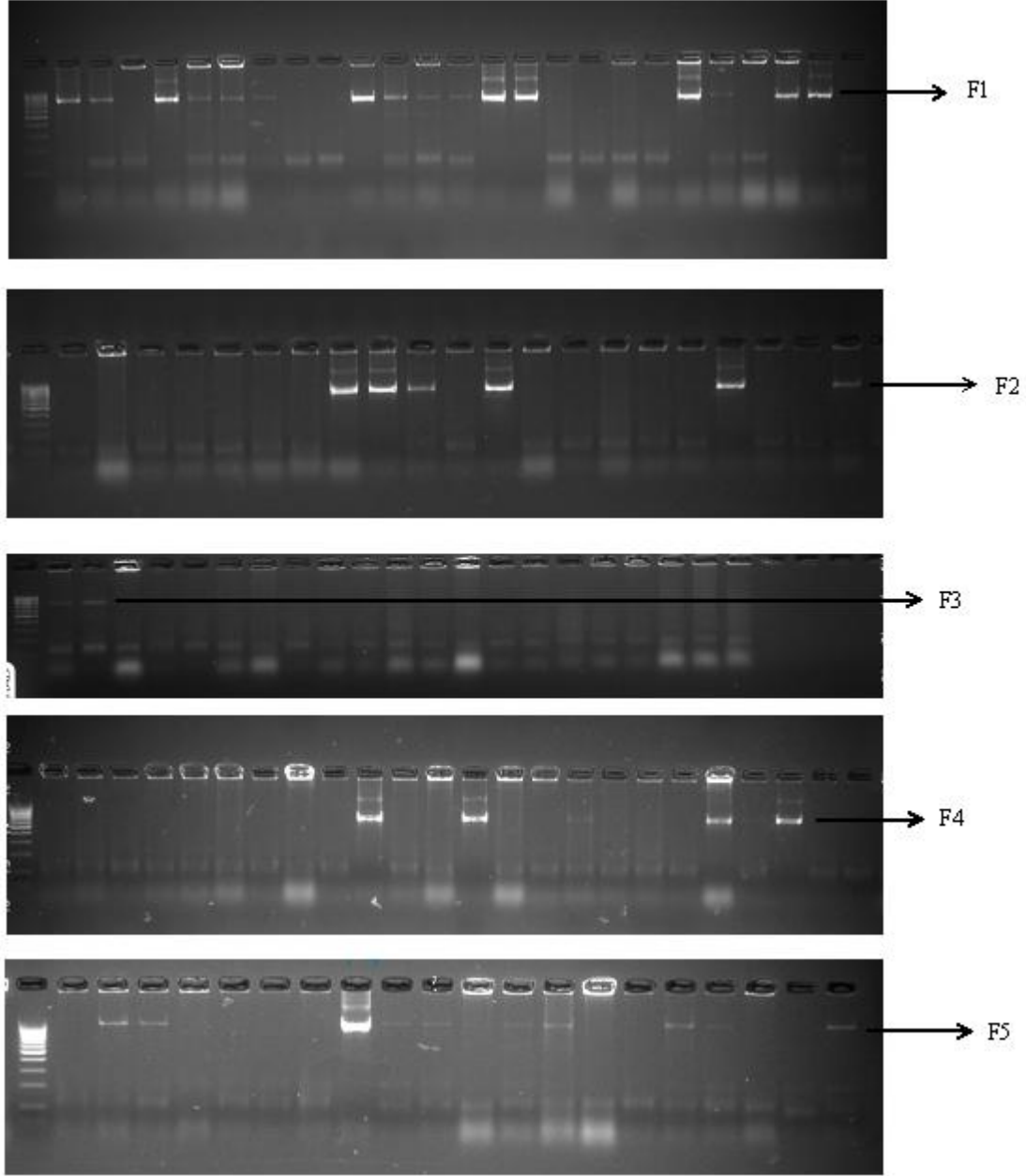


Pozitif pDONR221 vektörleri purifiye edilmiş ve LR reaksiyonunda kullanılmıştır. 100 mg/l Spectinomycin (Spec) içeren LB ortamında büyüyen pozitif kloniler (Resim 7), koloni PCR ile amplifiye edilerek reaksiyonun başarısı, transgen bölgelerin pHELLSGATE12 vektörüne aktarıldığı ispatlanmıştır (Resim 8).

Resim 7. pHELLSGATE12 vektörünü taşıyan *E. coli* kolonileri



Resim 8. **pHELLSGATE12** vektörüne fragmanların (F1, F2, F3, F4 ve F5 için) başarı ile aktarıldığını gösteren koloniPCR resimleri



4.5. Gen transferi çalışmasındaki başarının PPV inokülasyonlar ile tespit edilmesi

İnokülasyon çalışmaları

Nicotiana Bentamiana bitkilerinde adventif rejenerasyon başarı ile gerçekleştirilmiştir. PPV T genomundan çoğaltılan 5 parça, genetik rekombinasyon yöntemleri ile manupule edilerek, Gateway teknolojisinin kullanımına uygun 5 vektör konstrüktü oluşturulmuştur. Bu konstrüktler EHA105 *Agrobacterium Tumafaciens* hücrelerine transfer edilip *Nicotiana benthamiana* bitkilerine 5 parça ayrı olarak aktarılmıştır. 18 adet transformant bitki elde edilmiş, transformant bitki PPV-T ile inoküle edilip semptom oluşumu gözlenmiştir. Transformant bitkilerin hiç birinde virüs belirtisi görülmezken, kontrol bitkilerinde yoğun semptomlar tespit edilmiştir. PPV genomundan alınan 5 parçasında gen susturmada etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Resim 9. *Nicotiana benthamiana* bitkilerinin PPV-T ile inokülasyonu



Resim 10. Semptom göstermeyen transformant *Nicotiana benthamiana* bitkiler



Resim 11. Semptom gösteren kontrol *Nicotiana benthamiana* bitkiler

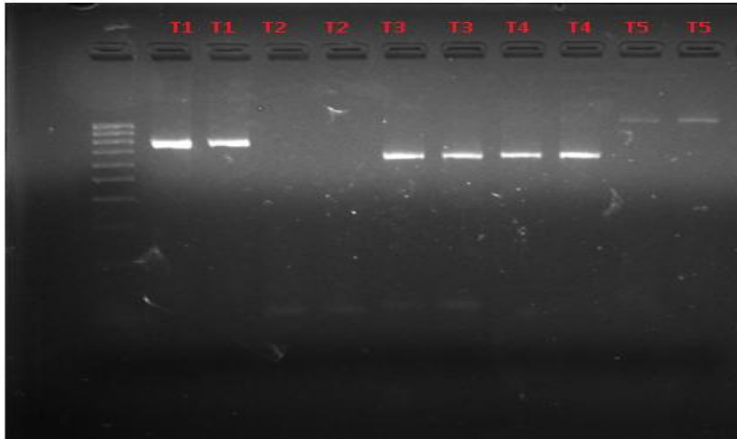


Serolojik ve Moleküler testler

İnokülasyondan 21 gün sonra üç hafta boyunca haftada bir kez DASİ-ELİZA testi yapılmış, 5B-IVIA antiserumuna reaksiyon seviyesi ölçülmüştür. DASİ-ELİZA'da tüm örnekler negatif çıkmıştır.

Fragmanların *Nicotiana benthamiana* genomuna entegrasyonu, PCR çalışmaları ile tespit edilmiştir. Beş fragman için geliştirilen lokus spesifik primerler kullanılarak transfromant bitki DNA'ları çoğaltılmıştır (Resim 11). Resim 11'de bantı görülmeyen T2 fragmanı için PCR birkaç kez tekrar edilmiş ve amplifikasyon gerçekleşmiş, T2 fragmanının da bitkilere entegre olduğu görülmüştür.

Resim 11. Semptom gösteren kontrol *Nicotiana benthamiana* bitkilerinde virüs fragmanları.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

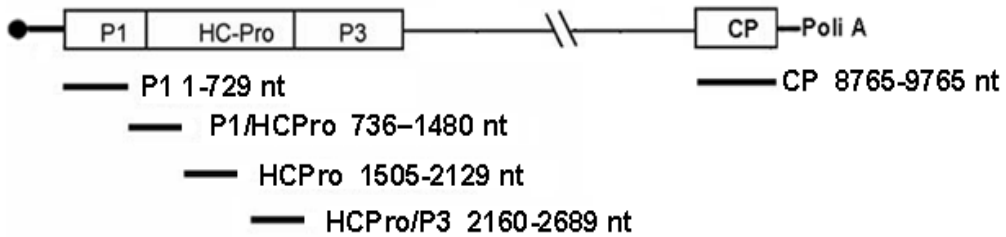
Kayseri il merkezinde birçok enfeksiyonlu ağaç tespit edilmiş ve bunlardan 51 adetinde PPV varşoğı testler ile de netleştirilmiştir. Kayseri il merkezinde bulaşıklığın yüksek seviyede olduğu görülmektedir. Pozitif örneklerin 39 adeti PPV-M spesifik antiserum ile reaksiyona girerken 30 adeti aynı zamanda PPV-D spesifik antiserum ile reaksiyona girmiştir. 51 adet pozitif örnek M ırkına spesifik primerlerle çoğaltılmıştır. Tek bir izolatın M ve D antiserumu ile reaksiyona girmesi PPV karakterizasyon çalışmalarında görülen bir olgudur. Candresse ve ark (1998) Türkiye’de alınan Ab-Tk izolatının hem M hemde D antiserumları ile reaksiyon gösterdiğini belirtmiştir. Glasa ve Candresse (2005) bu izolatın virüs genomunun 1566. bazı civarında HC-Pro geninde bir rekombinasyon olduğunu rapor etmişlerdir. Ulubaş Serçe ve ark. (2009) daha sonra Ab-Tk izolatının tüm sekans analizini yaparak bu izolatın rekombinasyonunu kesinleştirmiş ve bu izolatı yeni bir ırk (PPV-Turkey) olarak önermişlerdir. Aynı zamanda Ankara’dan toplanan hem D hem de M ile reaksiyon gösteren izolatları analiz ettiklerinde bu izolatlardan bazılarının Ab-Tk ile çok yakın nükleotid dizi benzerliğigösterdiklerini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada belirlenen M ve D ile reaksiyon gösteren 33 izolatın PPV-T olma ihtimali yüksek görülmüş, kesinleştirmek için dizileme yapılmıştır. Yirmiüç örneğin 807 baz uzunluğunda P3-6K1 bölgesi dizilenmiştir. Ayrıca GenBankta kayıtlı olan PPV genomları indirilmiş ve bunların 807 P3-6K1 bölgesi çıkarılmıştır. Bu çalışmada elde edilen diziler ve GenBank’a kayıtlı diziler birlikte analiz edilmiştir. Filogenetik analiz Kayseri örneklerinin PPV-T ırkı olduğunu göstermiştir. Elde edilen T izolatı vektör konstrüktü çalışmalarında virüs kaynağı olarak kullanılmıştır.

Çalışmada PPV T grubunun P1, HC-Pro ve kılıf protein geni (CP) için Gateway yaklaşımı kullanılarak 5 adet vektör geliştirilmiş, *Nicotiana benthamiana* bitkilerine aktarılmış ve virüs parçalarının bitkilere dayanıklılık kazandırdığı, inokülasyon çalışmaları ile ispatlanmıştır. Kılıf proteyini birçok virus sesizleştirme çalışmasında kullanılmış ve dayanıklı bitki geliştirmede kılıf proteyinin önemli olduğu belirlenmiştir (Domínguez ve ark. 2002; Fagoaga ve ark. 2006; Hilly ve ark 2007). P1 ve HC-Pro genlerinin seçilmesinde ise şu noktalar göz önünde bulundurulmuştur;

- 1) P1 ve HC-Pro, PPVD ve PPVM alt grupları arasında en fazla korunmuş gen bölgelerdir (Palkovics ve ark. 1993, Glasa ve ark. 2004, Nicola-Negri ve ark. 2005, Salvador ve ark. 2006).
- 2) P1 ve HC-Pro RNA gen sessizleştirme mekanizmasında etkindirler (Pruss ve ark. 1997; Kasschau ve Carrington, 1998; Nicola-Negri ve ark. 2005, Salvador ve ark. 2006).
- 3) P1 ve HC-Pro PPV genomunun ilk iki açık okuma çerçevesi (ORF) ürünüdür ve C uçlarının kontrolünde kendilerini aktive ederler (Lopez-Moya ve ark. 2000, Nicola-Negri ve ark. 2005, Salvador ve ark. 2006).
- 4) P1 hem genom amplifikasyonunu artırmada hemde HC-Pro RNA susturma süpresörü olarak trans formunda hareket eder (Urcuqui-Inchima ve ark. 2001, Nicola-Negri ve ark. 2005, Salvador ve ark. 2006).

Transfer edilen 5 parçanın PPV genomu üzerindeki yerleri ve uzunlukları ve genom üzerindeki pozisyonları Şekil 10’da şematize edilmiştir. Gateway teknolojisinde aktarılacak transgenin optimum uzunluğu 600 baz civarındadır (Helliwell ve ark. 2003). Bu nedenle P1 ve HC-Pro genlerini içeren yaklaşık 2600 bazlık bölge 4 parça halinde transfer edilmiştir. Nicola-Negri ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada P1 ve HCPro genleri için 4 parça belirlemişlerdir. Sonuç projesi sunulan bu çalışmada da Nicola-Negri ve ark. (2005) tarafından belirlenen uzunluklardaki parçacıklar transfer edilmiştir. Kılıf proteini 1kb uzunluğunda olmasına rağmen daha önceki çalışmalarda yapılageldiği üzere (Scorza ve ark. 1994; Ravelonandro ve ark. 1997; Hilly ve ark. 2007) kılıf proteyin geni tam bir parça olarak aktarılmıştır. Çalışma sonunda benzeri çalışmalarda rapor edildiği gibi (Negri ve ark. 2005; Ravelonandro ve ark. 1997; Hilly ve ark 2007) tüm fragmanlar dayanıklı hatların oluşmasında etkili olduğunu göstermiştir.

Şekil 10. Transfer edilen 5 parçanın PPV genomu üzerindeki yerleri ve uzunlukları ve genom üzerindeki pozisyonları



Kayısıda proje başvuru metninde planlandığının aksine rejenerasyon sağlanamamıştır. Kayısıda adventif rejenerasyon çalışmaları Escalettes ve Doasba (1993) tarafından başlatılmıştır. Araştırmacılar thidiazuron (TDZ) ve Naphtaleneacetic Acid (NAA) karışımının rejenerasyon için optimum olduğunu belirtmişlerdir. Perez-Tornero ve ark. (2000) kayısıda rejenerasyon çalışmış ‘Helena’ kayısı çeşidinde yapraktan bitki rejenerasyonunda TDZ ve Benzyladenine (BA) kombinasyonunun iyi sonuç verdiğini, NAA büyüme düzenleyicinin ise fenolik bileşik salınımını azalttığını rapor etmiştir. ‘Bebeco’ çeşidinde yapılan bir çalışmada BA ve Indol Asetik Asit (IAA)

kombinasyonu kullanılarak, yaprak disklerinden en yüksek rejenerasyon oranı elde edilmiştir (Koubouris ve Vasiliakakis, 2006). Çalışmamızda literatürde belirtildiği gibi TDZ ve NAA kombinasyonu kullanılmış maalesef 5 çeşidin (Hacıhaliloğlu, Kabaası, Şekerpare, İribitirgen, ve İğdir kayısı) kallus dokularından adventif sürgün gelişmemiştir.

Sonuç raporu sunulan bu projede RNA interferans mekanizmasının aktifletirilmesi ile Şarka hastalığına dayanıklılığın oluşturulması amaçlanmıştır. Bu tür çalışmalar literatürde gen sessizleştirme veya gen susturma (Gene Silencing) başlığı altında yer almaktadır. Gen sessizleştirme virüslere ve işgalci nükleik asitlere karşı bitkilerin ve diğer organizmaların aşağı gen regülasyonu (down regülasyon) ile gerçekleştirdikleri moleküler savunma mekanizması olup, sayısız orijinal çalışma ve derleme makale ile açıklanmıştır (Fire ve ark. 1998; Voinnet ve ark. 2000; Waterhouse ve ark. 2001; Hannon, 2002; Wassenegeger, 2002; Pattanayak ve ark. 2005; Poethig ve ark. 2006; ; Warkocki ve Figlerowicz, 2006; Souza ve ark. 2007; Chen, 2009; Lele, 2009; Maas, 2010; Beisel ve Paro, 2011; Djuranovic ve ark. 2011; Huntzinger ve Izaurralde, 2011). Dört gen sessizleştirme mekanizması bilinmektedir. Bu mekanizmalar; a) transkripsiyon sonrası gen sessizleştirme (posttranscriptional gene silencing- PTGS) veya RNA interferans (RNA interference- RNAi) b) transkripsiyon gen sessizleştirme (transcriptional gene silencing) c) mikroRNA sessizleştirme (microRNA silencing) ve d) virüs tetikli gen sessizleştirme (virus induced gene silencing)'dir. Dört moleküler mekanizmanın hepside hücre düzeyinde gen farklılaşmasında ve gen regülasyonunda virüs ve transpozonlara karşı korumada önemli rol oynar (Bartel, 2000; Vaucheret ve ark. 2001; Burch-Smith ve ark. 2004; Pattanayak ve ark. 2005; Poethig ve ark. 2006; Warkocki ve Figlerowicz, 2006; Chen, 2009; Lele, 2009; Maas, 2010; Beisel ve Paro, 2011; Djuranovic ve ark. 2011; Huntzinger ve Izaurralde, 2011). Bu çalışmada hedeflendiği gibi *Nicotiana benthamiana* bitkisinde gen susturma başarılmıştır.

Virüs kılıf protein genleri virüslere karşı RNAi mekanizmasını aktifleştirmede sıkça kullanılmıştır. Citrus tristeza virüs (CTV) kılıf proteini (CP) virüse dayanıksız turuncgillere aktararak bitkilere dayanıklılık kazandırılmıştır (Domínguez ve ark. 2000; Domínguez ve ark. 2002; Fagoaga ve ark. 2006). Son 10 yılda yapılan RNAi mekanizmasıyla gen susturma çalışmalarında, sonuç raporu sunulan bu projede de gerçekleştirildiği gibi, transfer edilecek gen aksi yöne yerleştirilen bir komplementeri ve aralarına yerleştirilen bir intron ve transkripsiyonu sağlayacak promotör ve terminatör bölge içerecek şekilde tasarlanmaktadır. Böylelikle transkripsiyon esnasında gen ve genin komplementeri birlikte transkript edilmekte, iki komplementer transkripsiyon sonrası birleşerek hairpin yapıda çift iplikli RNA oluşmaktadır.

Bu çalışmaya oldukça benzeyen bir çalışma Papaya meyvesinde yapılmıştır. Papaya Ring Spot Virüs'ü (PRSV), Şarka virüsü gibi Potyviridae familyasının Potyvirus cinsinin altında yer almaktadır. PRSV doksanların başında Havayi'de yayılmış, papaya endüstrisini tehdit etmiş, ama virüs kılıfının bitkilere transferi ile sağlanan dayanıklı genotipin kullanımı ile birlikte bölgede üretim yükselişe geçmiştir (Gonsalve ark.1998, 2004). PRSV'ye dayanıklı çeşit geliştirme ile bitirilmiş olsa bu proje ile bire bir örtüşen benzerlikler şöyledir; virüs istikrarlı bir şekilde yayılmaktadır, çünkü PRSV, aynen Şarka virüsünde olduğu gibi, afidler aracılığıyla 'non-persistent' olarak yayılmaktadır. Diğer bir ifadeyle afit enfekte bir bitkiden beslenir beslenmez, birkaç saniye içinde virüs afite transfer olur. Bu durum böcek kontrolü veya hastalıklı bitkilerin yok edilmesiyle hastalığı kontrolünü imkansız kılmaktadır. İkinci olarak, PRSV'ye dayanıklı doğal çeşit veya genotip çok sınırlı sayıda mevcuttur. Havayi'de değil ama payanın yaygın olarak yetiştirildiği Filipin'de PRSV'ye dayanıklı 'Sinta' hibridi piyasaya sürülmüş, ama ne yazık ki dayanımı iki yıl gibi çok kısa bir sürede virüs tarafından kırılmıştır. Üçüncü olarak, çapraz-koruma (bitkilerin görece zayıf ırklarla bulaştırılarak, dayanımın artırılması) Havayi, Tayland ve Tayvan'da denenmiş hastalığın yayılmasını engelleyecek bir başarı sağlanamamıştır. Dördüncü olarak, karantina önlemleri ve hastalıklı bitkilerin görüldüğü anda sökülüp yakılması uygulanmış ama bu önlemlere rağmen Şarka'nın dünyada yayılışı gibi PRSV'de de artmıştır. Sonuç olarak Havayi'li araştırmacılar PRSV genomunda kılıf proteinin kodlayan geni kullanarak PRSV'ye dayanıklı papaya geliştirme yoluna girmişlerdir. Kılıf protein geni bitki içerisinde RNAi mekanizmasını harekete geçirerek bitkinin virüse karşı korunmasını sağlamıştır. Havayi'deki papaya üretiminin % 95'ni sağlayan Puma bölgesinde doksanların başında endüstri hastalık nedeniyle kırize girmiş aynı yıllarda transgenik papaya çalışmalarını başlanmış, ve iki hat ('SunUp' ve 'Rainbow') 1998'de piyasaya sürülmüştür. Dayanıklı transgenik hatların piyasaya sürülmesiyle beraber üç yılda toplam üretimdeki oranı % 65'den geçen üretim Puma'da 2002 yılında tekrar yükselmiş ve % 88'e çıkmıştır (Fitch ve ark. 1992; Swain ve ark. 2001; Gonsalves, 1998, 2001; Gonsalve ark.1998, 2004)

Sonuç itibarıyla PPV genomunun 5 bölgesi *Nicotiana benthamiana* bitkisine aktararak Şarka hastalığına dayanıklılık kazandırma çalışılmıştır. Önce virüs kaynakları toplanarak test edilmiş ve Kayseri ilinde PPV-T ırkının yaygın olduğu belirlenmiştir. Kayseri izolatlarının nükleotid dizisi GenBank'ta kayıtlı genomlar ile analiz edilmiş, filogenetik ilişki belirlenmiştir. TPPV-T'nin 5 parçası PCR ile çoğaltılmış, PPV T genomundan çoğaltılan 5 parça rekombinasyon yöntemleri ile manupule edilerek Gateway teknolojisine uygun 5 vektör konstrüktü oluşturulmuştur. Kayısı rejenerasyonu çalışmasında adventif rejenerasyon elde edilememiş, *Nicotiana benthamiana* bitkisi çalışılmıştır. *Nicotiana Benthamiana* bitkilerinde adventif rejenerasyon başarı ile gerçekleştirilmiştir. Beş konstrükt Agrobacterium Tumefaciens transfer edilip *Nicotiana benthamiana* bitkilerine transfer edilmiştir. 18 adet transformant bitki elde edilmiş, 10 transformant bitki başarı ile büyütülmüş ve PPV-T ile inoküle edilip belirti oluşumu gözlenmiştir. Transformant bitkilerin hiç birinde virüs belirtisi gözlenmezken, kontrol bitkilerinde yoğun semtom tespit edilmiştir. PPV genomundan alınan 5 parçasında gen susturmada etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Ainsley PJ, Collins GG, Sedgley M (2000) Adventitious shoot regeneration from leaf explants of almond (*Prunus dulcis* Mill.). *In Vitro Cell Dev Bio Plant* 36: 470–474.
- Angell SM, Baulcombe DC (1997) Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *The EMBO Journal*, 16: 3675–3684.
- Antonelli M, Druart P (1990) The use of a brief 2, 4-D treatment to induce leaf regeneration on *Prunus canescens* Bois. *Acta Hort*, 280: 45–50.
- Asensio M, Gorris M, Sanz A, Corbonell E, ve Cambra M (1994) Characterization and detection of plum pox virus using monoclonal antibodies. *Acta Hort*. 386: 354–356.
- Barajas D, Tenllado F, Gonzales-Jara P, Martinez-Garcia B, Atencio FA and Diaz-Ruiz JR (2004) Resistance to Plum pox virus (PPV) in *Nicotiana benthamiana* plants trasformed with the PPV HC-Pro silencing suppressor gene. *J Plant Pathol* 86: 239–248.
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell*, 116: 281-297.
- Bassi G, Cossio F (1991) In vitro shoot regeneration of 'Blufre' and 'Susina di Dro' prune cultivars (*Prunus domestica* L.). *Acta Hort* 289:82
- Bassi G, Cossio F (1994) Simplified protocol for in vitro shoot regeneration from leaves of *Prunus domestica* L. (cv. 'Susina di Dro'). In: Schmidt H, Kellerhals M (eds) *Progress in Temperate Fruit Breeding*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 361–363
- Beisel C, Paro R (2011) Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms, *Nat Rev Genet*. 12, 123-135.
- Bhagwat B, Lane D (2004) In vitro shoot regeneration from leaves of sweet cherry (*Prunus avium*) 'Lapins' and 'Sweetheart'. *Plant Cell Tissue Org Cult* 78: 173–181
- Bramley PM, Pennings, HMJ, Bowler C (2005) Fruitspecific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nature Biotechnology*, 23: 890-895.
- Brigneti G, Voinnet O, Li W, Ji L, Ding S, Baulcombe DC (1998) Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *The EMBO Journal*, 17: 6739–6746.
- Broothaerts W, Keulemans J, Van Nerum I (2004) Selffertile apple resulting from S-RNase gene silencing. *Plant Cell Reports*, 22: 497-501.
- Burgos L, Alburquerque N (2003) Ethylene inhibitors and low kanamycin concentrations improve adventitious regeneration from apricot leaves. *Plant Cell Reports* 21: 1167-1174.
- Camara Machado da A, Puschmann M, Puhlinger H, Kremen R, Katinger HWD, Laimer da C, machado M (1995) Somatic embryogenesis of *Prunus subhirtella autumnosa* and regeneration of transgenic plants after *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep*, 14:335–340.
- Cambra M, Capote N, Myrta A, Llácer G (2006) Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease. *EPPO Bull* 36: 202–204.
- Cambra M, Capote N, Myrta A, Llácer G (2006) Plum pox vir  s and the estimated costs associated with sharka disease. *OEPP/EPPO Bulletin*, 36 : 202–204
- Cambra M, Asensio M, Gorris MT, Pérez E, Camarasa E, Garcia JA, Moyaj JJ, Lopez-abella D, Vela C, ve Sanz A (1994). Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 24: 569-577.
- Candresse T ve Cambra M (2006) Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of Plum pox virus strains. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 36; 239–246.
- Candresse T, Svanella-Dumas L, Gentit P, Caglayan K,   evik B, (2007) First report of the presence of Plum pox virus Rec strain in Turkey. *Plant Dis*. 91: 331.
- Candresse T, Cambra M, Dallot S, Lanneau M, Asensio M, Gorris MT, Revers F, Macquaire G, Olmos A, Boscia D, Quiot JB, VE J. Dunez J (1998) Comparison of Monoclonal Antibodies and Polymerase Chain Reaction Assays for the Typing of Isolates belonging to D and M Serotypes of Plum Pox Potyvirus. *Plzytopntizologti*, 88: 198-203
- Chen X (2009) Small RNAs and their roles in plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 25:21-44
- Curtis IS, Power JB, Hedden P, Phillips A, Lowe KC, Ward DA, Davey MR, (2000) Transformation and characterization of transgenic plants of *Solanum dulcamara* L. Incidence of transgene silencing. *Annals of Botany*, 86: 63-71.
- da Camara Machado A, Puschmann M, Puhlinger H, Kremen R, Katinger H, ve Laimer da Camara Machado M (1995) Somatic embryogenesis of *Prunus subhirtella autumnosa* and regeneration of transgenic plants after *Agrobacterium* mediated transformation. *Plant Cell Rep*. 14: 335–340
- Dai WH, Magnusson V, Johnson C (2007) *Agrobacterium*-mediated transformation of chokecherry (*Prunus virginiana* L.). *Hort- Science*, 42:1 40–142.

- Dandekar AM, Teo G, Defilippi BG, Uratsu SL, Passey AJ, Kader AA, Stow JR, Colgan RJ, James DJ (2004) Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit. *Transgenic Research*, 13: 373-384.
- Davuluri GR, Van Tuinen A, Mustilli AC, Manfredonia A, Newman R, Burgess D, Brummell D, King S, Palys J, Uhlig J, Pennings H, ve Bowler C (2004) Manipulation of DET1 expression in tomato results in photomorphogenic phenotypes caused by post-transcriptional gene silencing. *Plant J*. 40: 344-354.
- Declerck V, Korban SS (1996) Influence of growth regulators and carbon sources on callus induction, growth and morphogenesis from leaf tissues of peach (*Prunus persica* L Batsch). *J Hortic Sci* 71:49-55
- Di Nicola-Negri, E, Brunetti, A, Tavazza, M, Ilardi, V. (2005) Hairpin RNA-mediated silencing of Plum pox virus P1 and HC-Pro genes for efficient and predictable resistance to the virus. *Transgenic Research*, 14: 989-994.
- Dicenta F, Martínez-Gómez P, Burgos L, Egea J (2000) Inheritance of Resistance to Plum Pox Potyvirus (PPV) in Apricot, *Prunus Armeniaca*, *Plant Breed*, 119: 161-164.
- Djuranovic S, Nahvi A, Green R A (2011) parsimonius model for gene regulation by miRNAs *Science*. 331:550-3..
- Domínguez, A, De Mendoza, Guerra AH, Cambra J, Navarro M, Moreno L, Peña PL (2000). Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports*, 19 427-433.
- Domínguez A, De Mendoza AH, Guerra J, Cambra M, Navarro L, Moreno P, Peña L. (2002) Pathogen-derived resistance to Citrus tristeza virus (CTV) in transgenic Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing) plants expressing its p25 coat protein gene. *Molecular Breeding*, 10: 1-10.
- Domínguez A, Fagoaga C, Navarro L, Moreno P, Peña L (2002) Regeneration of transgenic citrus plants under non selective conditions results in high-frequency recovery of plants with silenced transgenes. *Molecular Genetics Genomics*, 267:544-556.
- Dosba F, Denise F, Audergon JM, Maison P, Massonnie G (1991) Plum pox virus resistance of apricot. *Acta Hortic* 293:569-579
- Dosba F, Denise F, Maison P, Massonnie G, Audergon JM (1991) Plum Pox Virus Resistance of Apricot, *Acta Hortic*, 293: 569-579.
- Druart P (1980) Plantlet regeneration from root callus of different *Prunus* species. *Sci Hortic* 12: 339-342.
- Druart P (1980) Plantlet regeneration from root callus of different *Prunus* species. *Sci. Horticult*. 12: 339-342.
- Elibüyük İÖ (2003). Natural spread of Plum pox virus in Ankara, Turkey. *J. Phytopathol*. 151, 617-619.
- Elibüyük İÖ (2004). Current situation of sharka disease in Ankara, Turkey. *Phytoparasitica* 32, 417-420.
- Elibüyük İÖ (2006). Detection of Plum pox virus in ornamental *Prunus cerasifera*. *Phytoparasitica* 34, 347-352.
- Escalettes V, Dosba F (1993) In vitro adventitious shoot regeneration from leaves of *Prunus* spp. *Plant Sci* 90: 201-209
- Escobar, MA, Civerolo, EL, Summerfelt, KR, Dandekar, AM. (2001) RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 98: 13437-13442.
- Escobar MA, Leslie, CA, Mcgranahan, GH, Dandekar, AM (2002) Silencing crown gall disease in walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Science*, 163: 591-597.
- Espinosa AC, Pijut PM, Michler CH (2006) Adventitious shoot regeneration and rooting of *Prunus serotina* in vitro cultures. *HortScience* 41(1):193-201
- Fagoaga C, López C, De Mendoza AH, Moreno P, Navarro L, Flores R, Peña L. (2006) Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of Citrus tristeza virus confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. *Plant Molecular Biology*, 60: 153-165.
- Fanigliulo A, Comes S, Maiss E, Piazzolla P, ve Crescenzi A (2003) The complete nucleotide sequence of Plum pox virus isolates from sweet (PPV-SwC) and sour (PPV-SoC) cherry and their taxonomic relationships within the species. *Archives of Virology* 148: 2137-2153.
- Fitch MMM, Manshardt RM, Gonsalves D, Slightom JL and Sanford JC (1992) Virus resistant papaya derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *Bio/Technology* 10: 1466-1472
- Fuchs E, Grüntzig M, Ernst I, Kegler H (2001) Comparison of apricot genotypes with different resistance level to plum pox virüs (PPV). *Acta Hortic* 550:103-106
- Gentile A, Monticelli S, Damiano C (2002) Adventitious shoot regeneration in peach (*Prunus persica*) (L.) Batsch). *Plant Cell Rep* 20: 1011-1016.

- Gilissen LJWJ, Bolhaar STH, Matos CI, Rouwendal GJA, Boone, MJ, Krens FA, Zuidmeer L, Van Leeuwen A, Akkerdaas J, Hoffmann-Sommergruber K, Knulst AC, Bosch D, Van De Weg, WE, Van Ree R (2005). Silencing Of The Major apple allergen Mal 1 by using RNA interference approach. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115: 364-369.
- Glasa M, Palkovics L, Komínek P, Labonne G, Pittnerová S, Kúdela O, Candresse T, Šubr Z (2004) Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of plum pox virus (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. *J Genet Virol* 85: 2671–2681
- Gonsalves D (1998) Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. *Annual Review of Phytopathology* 36: 415–437
- Gonsalves D (2001) Transgenic virus-resistant papaya: Farmer adoption and impact in the Puna area of Hawaii. Master of Arts, Liberal Studies SUNY Empire State College (Thesis). New York.
- Gonsalves D, Gonsalves C, Ferreira S, Pitz K, Fitch M, Manshardt R, Slightom J (2004). Transgenic Virus Resistant Papaya: From Hope to Reality for Controlling Papaya Ringspot Virus in Hawaii (<http://www.apsnet.org/online/feature/ringspot/>)
- Gonsalves, D, Ferreira, S, Manshardt, R, Fitch, M, and Slightom, J. (1998) Transgenic virus resistant papaya: New hope for control of Papaya ringspot virus in Hawaii. Online. APSnet Feature, American Phytopathological Society.
- Guillet-Bellanger I, Audergon JM, (2001) Inheritance of the Stark Early Orange Apricot Cultivar Resistance to Plum Pox Virus, *Acta Hortic*, 550:111–116.
- Guo HS and Garcia JA (1997) Delayed resistance to Plum pox potyvirus mediated by a mutated RNA replicase gene: Involvement of a gene-silencing mechanism. *MPMI* 10: 160–170.
- Gutiérrez-E, MA, Luth D, Moore GA (1997) Factors affecting agrobacterium-mediated transformation in Citrus and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports*, 16: 745-753.
- Gutierrez-Pesce P, Taylor K, Muleo R ve Rugini E (1998) Somatic embryogenesis and shoot regeneration from transgenic roots of the cherry rootstock “Colt” (*Prunus avium* P. pseudocerasus) mediated by pRi 1855 T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep*. 17: 574–580.
- Gutierrez-Pesce P, Taylor K, Muleo R, Rugini E (1998) Somatic embryogenesis and shoot regeneration from transgenic roots of the cherry rootstock Colt (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*) mediated by pRi 1855 T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep* 17: 574–580.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286: 950-952.
- Hammatt N (1993) Micropropagation of fastigate bird cherry (*Prunus padus* L.) and adventitious shoot formation fromleaves. *J Hort Sci* 68: 975–982.
- Hammatt N, Grant NJ (1998) Shoot regeneration from leaves of *Prunus serotina* Ehrh. (black cherry) and *P. avium* L. (wild cherry). *Plant Cell Rep* 17:526–530
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404:293-296.
- Hannon GJ (2002) RNA interference. *Nature*, 418, 244–251.
- Hawkins S, Leple JC, Cornu D, Jouanin L, Pilate G. (2003) Stability of transgene expression in poplar: A model forest tree species. *Annals of Forest Science*, 60, 427-438.
- Hily J, Scorza M, Malinowski R, Zawadzka T, Ravelonandro M (2004) Stability of gene silencing-based resistance to Plum pox virus in transgenic plum (*Prunus domestica* L.) under field conditions. *Transgenic Res*. 13, 427-436.
- Huntzinger E, Izauralde E, (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*, 12: 99-110.
- Hurtado MA, Romero C, Vilanova S, Abbott AG, Llácer G, Badenes ML, (2002) Genetic Linkage Maps of Two Apricot Cultivars (*Prunus Armeniaca* L.), and Mapping of PPV (Sharka) Resistance *Theor Appl Genet*, 105: 182–191.
- Jacquet C, Ravelonandro M, Bachelier JC, Dunez J (1998) High resistance to plum pox virus (PPV) in transgenic plants containing modified and truncated form of PPV coat protein gene. *Trasgenic Res* 7: 29–39.
- James D ve Varga A (2005) Nucleotide sequence analysis of Plum pox virüs isolate W3174: Evidence of a new strain. *Virus Research* 110: 143–150.
- Jouanin L, Goujon T, De Nadai, V Martin, MT, Mila I, Vallet C, Pollet B, Yoshinaga A, Chabbert B, Petit-Conil M, Lapierre C. (2000) Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid O-methyltransferase activity. *Plant Physiology*, 123:1363-1373.
- Karayannis I, Thomidis T, Tsaftaris A, (2008) Inheritance of Resistance to Plum Pox Virus in Apricot (*Prunus Armeniaca* L.), *Tree Genet Genomes* 4: 143–148.
- Karayannis I, Di Terlizzi B, Audergon JM (1999) Susceptibility of apricot cultivars to plum pox virus. *Acta Hortic* 488: 753–759.

- Kasschau KD ve Carrington JC (2001) Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology* 285: 71–81.
- Kegler H, Fuchs E, Grüntzig M, Schwarz S, (1998) Some results of 50 years of research on the resistance to plum pox virus. 42: 200-15.
- Koubouris G, Vasilakakis M (2006) Improvement of in vitro propagation of apricot cultivar 'Bebecou'. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 85:173–180.
- Krška B, Salava J, Polák J, Komínek P, (2002). Genetics of Resistance to Plum Pox Virus in Apricot. *Plant Prot Sci*, 38:180–182.
- Laín S, Riechmann JL ve García JA (1989) The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus RNA. *Virus Research* 13, 157–172.
- Lalli DA, Abbott AG, Zhebentyayeva TN, Badenes ML, Damsteegt V, Polák J, Krška B, Salava JA (2008) Genetic Linkage Map for and Apricot (*Prunus armeniaca* L.) BC1 Population Mapping Plum Pox Virus Resistance, *Tree Genet Genomes*, 4: 481–493.
- Lambert P, Dicenta F, Rubio M, Audergon JM, (2007) QTL analysis of resistance to sharka disease in the apricot (*Prunus armeniaca* L.) 'Polonais', 'Stark Early Orange' F1 progeny. *Tree Genet Genomes*, 3: 299–309,
- Lapierre C, Pollet B, Petit-Conil M, Toval G, Romero J, Pilate G, Leplé J, Boerjan W, Ferret V, De Nadai V, Jouanin L. (1999). Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant Physiology*, 119: 153-164.
- Lele RD (2009) Epigenetics gene silencing, *J Assoc Physicians India*. 57: 60-6.
- Levy LV, Damsteegt, ve Welliver R. (2000) First report of plum pox virus (sharka disease) in *Prunus persica* in the United States. *Plant Dis*. 84: 202.
- Liu X, Pijut PM, (2008) Plant regeneration from in vitro leaves of mature black cherry (*Prunus serotina*) *Plant Cell Tiss Organ Cult* 94: 113–123.
- Llacer G, Cambra M, Lavina A ve Arambur J. (1986). Investigations on plum pox (sharka) virus in Spain. *Acta Hort*. 193:155–159.
- Lopez-Moya J, Fernandez-Fernandez M, Cambra M, ve Garcia J (2000) Biotechnological aspects of plum pox virus. *J. Biotechnol*. 76: 121–136.
- Lopez-Noguera S, Petri C, Burgos L (2009) Combining a regeneration-promoting ipt gene and site-specific recombination allows a more efficient apricot transformation and the elimination of marker genes, *Plant Cell Rep*. 28:1781-90
- Louro D, ve Corvo LM (1986). Occurrence of sharka in Portugal. *Acta Hort*. 193:183–186.
- Maas S. (2010) Gene regulation through RNA editing. *Discov Med*. 10: 379-86
- Maiss E, Timpe U, Briske A, Jelkmann W, Casper R, Himmler G, Mattanovich D ve Katinger HWD (1989) The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA. *Journal of General Virology* 70, 513–524.
- Malinowski T, Cambra M, Capote N, Gorris MT. Scorza R, Ravelonandro M (2006) Field trials of plum clones transformed with the Plum pox virus coat protein (PPV-CP) gene. *Plant Disease*. 90, 1012-1018.
- Mante S, Morgens P, Scorza R, Cordts J, Callahan A (1991) Agrobacterium-mediated transformation of plum (*Prunus domestica*) hypocotyls slices and regeneration of transgenic plants. *BioTechnology* 9: 853–857
- Matt A, Jehle JA (2005) In vitro plant regeneration from leaves and internodes sections of sweet cherry cultivars (*Prunus avium*. L). *Plant Cell Rep* 24: 468–476
- Mazyad HM, Nakhla MK, Abo-Elea Ai (1992) Occurrence of plum pox (sharka) virus in stone fruit trees in Egypt. *Acta Hort*. 309:119–124.
- Meister G, Tuschl T, (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431: 343-349,.
- Miguel CM, Druart P, Oliveira MM (1996) Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond (*Prunus dulcis* Mill.) explants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 32:148–153
- Miguel CM, Oliveira MM (1999) Transgenic almond (*Prunus dulcis* Mill) plants obtained by Agrobacterium-mediated transformation of leaf explants. *Plant Cell Rep* 18: 387–393.
- Mikhailov RV, Dolgov SV (2007) Transgenic plum (*Prunus domestica* L.) plants obtained by Agrobacterium-mediated transformation of leaf explants with various selection agents. *Acta Hort* 738:613–623.
- Moller R, Steward D, Phillips L, Flint H, Wagner A (2005) Gene silencing of cinnamyl alcohol dehydrogenase in *pinus radiata* callus cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 1061-1066.
- Moustafa TA, Badenes ML, Martínez-Calvo J, Llacer G (2001) Studies on Plum Pox (Sharka) Resistance in Apricot, *Acta Hort*, 550:117–120.

- Myrta A, Varga A, James D (2006) The complete genome sequence of an El Amar isolate of plum pox virus (PPV) and its phylogenetic relationship to other PPV strains. *Archives of Virology* 151: 1189–1198.
- Nemchinov L, Hadidi A, Maiss E, Cambra M, Candresse T, Damsteegt V (1996) Sour cherry strain of plum pox potyvirus (PPV): molecular and serological evidence for a new subgroup of PPV strains. *Phytopathology* 86: 1215–1221.
- Nowak B, Miczynski K, Hudy L (2004) Sugar uptake and utilization during adventitious bud differentiation on in vitro leaf explants of 'Wegierka Zwykła' plum (*Prunus domestica*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 76:255–260.
- Ochatt SJ (1990) Plant regeneration from root callus protoplasts of sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *Plant Cell Rep* 9:268–271.
- Ochatt SJ, (1990) Plant regeneration from root callus protoplast of sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *Plant Cell Reports*. 9: 268-271.
- Ogita S, Uefuji H, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H (2003). RNA interference: Producing decaffeinated coffee plants. *Nature*, 423: 823.
- Padilla I, Webb K, Scorza R (2003) Early antibiotic selection and efficient rooting and acclimatization improved the production of transgenic plum plants (*Prunus domestica* L.). *Plant Cell Rep* 22:38–45
- Palkovics L, Burgyán J, Balázs E (1993) Comparative sequence analysis of four complete primary structures of plum pox virus strains. *Virus Genes*, 7: 339–347.
- Palkovics L, Wittner A and Balazs E (1995) Pathogen-derived resistance induced by integrating the plum po virus coat protein gene into plants of *Nicotiana benthamiana*. *Acta Hort* 386: 311–317.
- Pattanayak D, Agarwal S, Sumathi S, Chakrabarti SK, Naik PS, Khurana SM (2005) Small but mighty RNA-mediated interference in plants. *Indian J Exp Biol*, 43:7-24.
- Perez-Clemente R, Perez-Sanjuan A, Garcia-Ferriz L, Beltran JP, Canas LA (2004) Transgenic peach plants (*Prunus persica* L.) produced by genetic transformation of embryo sections using the green fluorescent protein (GFP) as an in vivo marker. *Mol Breed*, 14:419–427.
- Perez-Tornero O, Egea J, Vanoostende A, Burgos L (2000) Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from in vitro cultured leaves of apricot. *Plant Sci*, 158:61–70.
- Petri C, Burgos L (2005) Transformation of fruit trees. Useful breeding tool or continued future prospect? *Transgenic Res* 14, 15-26
- Petri C, Alburquerque N, Burgos L (2005) The Effect of aminoglycoside antibiotics on the adventitious regeneration from apricot leaves and selection of NptII-transformed leaf tissue. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 80: 271-276.
- Petri C, Alburquerque N, Burgos L (2005) The effect of aminoglycoside antibiotics on the adventitious regeneration from apricot leaves and selection of nptII-transformed leaf tissues. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 80: 271–276.
- Petri C, Lopez-Noguera S, Burgos L, Alburquerque N (2006) A selection strategy to obtain transformed apricot cultivars. *Acta Hort*, 725(2):771–776.
- Petri C, Lopez-Noguera S, Alburquerque N, Burgos L. (2006b). Regeneration Of Transformed Apricot Plants From Leaves Of A Commercial Cultivar. *Acta Hort. (ISHS)* 717:233-236.
- Petri C, Wang H, Alburquerque N, Faize M, Burgos L (2008a) Agrobacterium-mediated transformation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) leaf explants. *Plant Cell Rep* 27:1317–1324.
- Petri C, Lopez-Noguera S, Alburquerque N, Egea J, Burgos L (2008b) An antibiotic-based selection strategy to regenerate transformed plants from apricot leaves with high efficiency. *Plant Sci* 175:777–783
- Pilarova P, Marandel G, Decroocq V, Salava J, Krska B, Abbott AG (2010) Quantitative Trait Analysis of Resistance to Plum Pox Virus in the Apricot F1 Progeny "Harlayne" X "Vestar", *Tree Genet Genomes*, 6: 467-475.
- Poethig RS, Peragine A, Yoshikawa M, Hunter C, Willmann M, Wu G (2006) The function of RNAi in plant development, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 71:165-70.
- Pruss G, Ge X, Shi XM, Carrington JC & Vance VB (1997) Plant viral synergism: The potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 9, 859–868.
- Ramesh SA, Kaiser BN, Franks T, Collins G, Sedgley M (2006) Improved methods in Agrobacterium-mediated transformation of almond using positive (mannose/pmi) or negative (kanamycin resistance) selection-based protocols. *Plant Cell Rep* 25:821–828.
- Ravelonandro M, Monsion M, Delbos R and Dunez J (1993) Variable resistance to plum pox virus and potato virus Y infection in transgenic plants expressing plum pox virus coat protein. *Plant Sci* 91: 157–169.
- Ravelonandro M, Scorza R, Bachelier JC, Labonne G, Levy L, Damsteegt V et al. (1997) Resistance of trasgenic *Prunus domestica* to Plum pox virus infection. *Plant Dis* 81: 1231–1235.

- Ravelonandro, M, Scorza, R, Callahan, A, Levy, L, Jacquet, C, Monsion, M, Damsteegt, V. (2000) The use of transgenic fruit trees as a resistance strategy for virüs epidemics: the plum pox (sharka) model. *Virus Res.* 71: 63-69.
- Regner F, da Camera Machado A, Laimer da Camera Machado M, Steinkellner H, Mattanovich D, Hanzer V et al. (1992) Coat protein mediated resistance to Plum Pox Virus in *Nicotiana clevelandii* and *N. benthamiana*. *Plant Cell Rep* 11: 30–33.
- Ronemus M, Vaughn MV, Martienssen RA. (2006) MicroRNA-targeted and small interfering RNA-mediated mRNA degradation is regulated by Argonaute, Dicer and RNA-dependent RNA polymerase in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18:1559-1574,.
- Rosales M, Hinrichsen P, Herrera G (1998) Molecular characterization of plum pox virus isolated from apricots, plums and peaches in Chile. *Acta Hort*, 472:401–405.
- Rosati P, Marono G, Swierczewski C (1980) In vitro propagation of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl, cv. Calita). *J Am Soc Hort Sci*, 105:126–129.
- Rubio M, Martínez-Gómez P, Dicenta F, Audergon JM, (2004) Testing of Genetic Control Hypothesis for Plum Pox Virus Resistance in Apricot, *Acta Hort*, 663: 265–267.
- Sáenz P, Cervera MT, Dallot S, Quiot L, Quiot JB, Riechmann JL, García JA (2000) Identification of a pathogenicity determinant of Plum pox virüs in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3+6K1. *Journal of General Virology* 81: 557–566.
- Salava J, Polák J, Krška B, (2005) Oligogenic Inheritance of Resistance to Plum Pox Virus in Apricots, *Czech J Genet Plant*, 41: 167–170
- Salava J, Wang Y, Krška B, Polák J, Komínek P, Miller RW, Dowler WM, Reighard GL, Abbott AG (2002) Molecular Genetic Mapping in Apricot. *Czech J Genet Plant Breed*, 38: 65–68,
- Salvador B, García JA, Simón-Mateo C, (2006) Causal agent of sharka disease: Plum pox virüs genome and function of gene products. *OEPP/EPPO Bulletin* 36: 229–238.
- Sassaki FT, Campos-Pereira T, Maia I de G. (2005) The posttranscriptional gene silencing pathway in *Eucalyptus*. *Genetics and Molecular Biology*, 28: 496-500.
- Schneider WL, Sherman DJ, Stone AL, Damsteegt VD, Frederick RD (2004) Specific detection and quantification of plum pox virus by real-time fluorescent reverse transcription-PCR. *J. Virol. Methods* 120: 97–105.
- Scorza R, Hammerschlag FA, Zimmerman TW (1995) Genetic transformation in *Prunus persica* (peach) and *Prunus domestica* (plum). In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Plant Protoplasts and Genetic Engineering VI* 34. Springer-Verlag, Berlin, 255–268.
- Scorza, R, Ravelonandro, M, Callahan, A.M, Cordts, J.M, Fuchs, M, Dunez, J, Gonsalves, D, (1994). Transgenic plums (*Prunus domestica* L.) express the plum pox virüs coat protein gene. *Plant Cell Rep.* 14, 18–22.
- Scorza R, Callahn A, Levy L, Damsteegt V, Webb K, Ravelonandro M (2001) Post-transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant European plum containing the plum pox potyvirus coat protein gene. *Transgenic Research*, 10: 201-209.
- Scorza, R, Georgi L, Callahan A, Petri C, Hily JM, Dardick C, Damsteegt V, Ravelonandro M, 2010 Hairpin Plum pox virus coat protein (hpPPV-CP) structure in 'HoneySweet' C5 plum provides PPV resistance when genetically engineered into plum (*Prunus domestica*) seedlings. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Julius-Kühn-Archiv, 427.
- Segal G, Song, RT, Messing J (2003) A new opaque variant of maize by a single dominant RNA-interference-inducing transgene. *Genetics*, 165: 387-397.
- Sertkaya G, Ulubas C, Caglayan K, (2003) Detection and characterisation of Plum pox virus (PPV) by DAS-ELISA and RT-PCR/RFLP analysis in Turkey. *Turk. J. Agric. For.* 27: 213–220.
- Serçe CU, Candresse T, Svanella-Dumas L, Krizmai L, Gazel M, Çağlayan K (2009) Further characterization of a new recombinant group of Plum pox virus isolates, PPV-T, found in orchards in the Ankara province of Turkey. *Virus Res*, 142: 121-6.
- Song GQ, Sink KC (2006) Transformation of Montmorency sour cherry (*Prunus cerasus* L.) and Gisela 6 (*P. cerasus* 9 *P. canescens*) cherry rootstock mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 25:117–123
- Souza AJ, Mendes BMJ, Mourão Filho FAA (2007) Gene silencing: concepts, applications, and perspectives in woody plants. *Scientia Agricola* 64:645–656.
- Swain S, Powell DA (2001) Papaya ringspot virus resistant papaya: A case study. Technical report. <http://www.plant.uoguelph.ca/safeFood/gmo/papayarep.htm>
- Tang HR, Ren ZL, Reustle G, Krczal G (2002) Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars. *Scientia Hort* 93:235–244.
- Tang W, Kinken K, Newton, RJ. (2005) Inducible antisense mediated post-transcriptional gene silencing in transgenic pine cells using green fluorescent protein as a visual marker. *Plant and Cell Physiology*, 46:1255-1263.

- Tang W, Newton RJ, Weidner DA (2006) Differential gene silencing induced by short interfering RNA in cultured pine cells associates with the cell cycle phase. *Planta*, 224: 53-60.
- Tavert-Roudet G, Ravelonandro M, Bachelier JC and Dunez J (1998) Transgenic *Nicotiana benthamiana* plant containing the P1 gene of plum pox virus are resistant to virus challenge. *Eur J Plant Pathol* 104: 103–107.
- Tennant P, Fermin G, Fitch MM, Manshardt RM, Slightom JL, Gonsalves D. (2001) Papaya ringspot virus resistance of transgenic rainbow and sunup is affected by gene dosage, plant development, and coat protein homology. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 645-653.
- Teo G, Suzuki Y, Uratsu SL, Lampien B, Ormonde N, Hu WK, Dejong TM, Dandekar AM (2006) Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, 103:18842-18847.
- Teycheney PY, Tavert G, Delbos R, Ravelonandro M, Dunez J (1989) The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA (strain D). *Nucleic Acids Research* 17: 10115–10116.
- Thompson D, McCann M, MacLeod M, Lye D, Green M, James D (2001) First report of plum pox potyvirus in Canada. *Plant Dis.* 85: 97.
- Tian L, Sibbald S, Subramanian J, Svircev A (2007) Characterization of *Prunus domestica* L. in vitro regeneration via hypocotyls. *Sci Hort*, 112: 462–466
- Urcuqui-Inchima S, Haenni AL, Bernardi F (2001) Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research* 74, 157–175.
- V. Savino (1997) Production and characterization of a monoclonal antibody specific to the M serotype of plum pox potyvirus. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 477-480.
- Valério L, Carter D, Rodrigues JC, Tournier V, Gominho J, Marque C, Boudet A, Maunders M, Pereira H, Teulière C. (2003) Down regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase, a lignification enzyme, in *Eucalyptus camaldulensis*. *Molecular Breeding*, 12:157–167.
- Varveri C, Ravelonandro M, Dunez J. (1987). Construction and use of a cloned cDNA probe for the detection of plum pox virus in plants. *Phytopathology* 77:1221–1224.
- Vaucheret H. Post-transcriptional small RNA pathway in plants : mechanisms and regulations, *Genes Dev.* 2006 Apr 1;20(7):759-71
- Vaucheret, H, Bécclin, C, Fagard, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science*, v.114, p.3083-3091, 2001.
- Vilanova S, Romero C, Abbott AG, Llácer G, Badenes ML, An Apricot (*Prunus armeniaca* L.) F2 Progeny Linkage Map Based on SSR and AFLP Markers, Mapping Plum Pox Virus Resistance and Self-Incompatibility Traits, *Theor Appl Genet*, 107, 239–247, (2003).
- Viss WJ, Pitrak J, Humann J, Cook M, Driver J, Ream W. (2003) Crown-gall-resistant transgenic apple trees that silence *Agrobacterium tumefaciens* oncogenes. *Molecular Breeding*, 12: 283-295.
- Voinnet O, Lederer C, Baulcombe, DC (2000) Viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*, 103:157-167.
- Wagner A, Pjillips L, Narayan Rd, Moody JM, Geddes B. (2005) Gene silencing studies in the gymnosperm species *Pinus radiata*. *Plant Cell Reports*, 24: 95-102.
- Warkocki Z, Figlerowicz M (2006) Trans-acting short interfering RNAs. *Postepy Biochem*, 52: 253-9.
- Wassenegger M (2002) Gene Silencing. *International Review of Cytology*, 219, 61-113.
- Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB, (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense PNAS 95:13959-13964.
- Waterhouse PM, Wang MB, Lough T (2001) Gene silencing as an adaptive defense against viruses. *Nature*, 411: 834-842.
- Waterhouse PM, Christopher A. Helliwell (2003) Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Reviews Genetics* 4, 29-38.
- Wetzel T, Candresse T, Macquarie G, Ravelonandro M, Dunez J. (1992) A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox virus detection. *J. Virol. Methods* 39: 27–37.
- Willmann MR, Poethig RS (2005) Time to grow up: the temporal role of small RNAs in plants, *Curr Opin Plant Biol.* 8:548-52.
- Wittner A, Palkovics L and Balazs E (1998) *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the plum pox virus helicase gene are resistant to virus infection. *Virus Res* 53: 97–103.
- Yancheva S, Druart P, Watillon B (2002) *Agrobacterium*-mediated transformation of plum (*Prunus domestica* L.). *Acta Hort* 577:215–217.
- Zagrai I, Capote N, Ravelonandro M, Cambra M, Zagrai L, Scorza R (2008) Plum pox virus silencing of C5 transgenic plums is stable under challenge inoculation with heterologous viruses. *J. Plant. Path.* 1: 63-71.