

**Araştırma Makalesi**  
(Research Article)

Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg., 2018, 55 (2):211-220  
DOI: 10.20289/zfdergi.376458

Gülenay YILMAZ<sup>1</sup>  
Necip TOSUN<sup>2</sup>

## Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) Tohumlarında *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & De Toni)'nin Varlığının Moleküler Yöntemlerle Araştırılması

The Studies on the Presence of *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & De Toni) in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Seeds with Molecular Methods

<sup>1</sup> TC Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ziraat Karantina Müdürlüğü, 35230, İzmir / Türkiye

<sup>2</sup> Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 35100, Bornova / Türkiye

sorumlu yazar: gulenay.yilmaz@tarim.gov.tr

Alınış (Received): 09.01.2018

Kabul tarihi (Accepted): 06.02.2018

### Anahtar Sözcükler:

*Plasmopara halstedii*, ayçiçeği (*Helianthus annuus*), PCR, hidroliz problemleri, optimizasyon

### Key Words:

*Plasmopara halstedii*, sunflower (*Helianthus annuus*), PCR, hydrolysis probes, optimization

### ÖZET

**T**ohum kaynaklı olan ve tohumla taşınabilen etmenlerin hızlı tanınması ve bunların kontrol altına alınması sağlıklı bir ürün elde etmenin ilk aşamasını oluşturmaktadır. Bu çalışmanın amacı, ithalat aşamasında analiz şartı olan tohum kaynaklı *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & De Toni)'nin ayçiçeği tohumundaki varlığının klasik yöntemlere göre çok daha avantajlı moleküler yöntemler kullanılarak optimizasyonunun gerçekleştirilmesidir. Klasik PCR (agaroz jel elektroforez) ile ilgili hesaplamaları EPPO (Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Organizasyonu) Standart Protokolleri Appendix 2 ve Real Time PCR (hidroliz problemleri) ile ilgili hesaplamalar ise EPPO Standart Protokolleri Appendix 3 referans alınarak optimize edilmiştir. Ayrıca, EPPO Standart Protokollerinde yer almayan Real time PCR (SyberGreen) çalışmasında ise, SyberGreen Mastermix kit protokolü esas alınarak optimize edilmiştir. Böylece, ülkemiz karantina laboratuvarları içerisinde her üç moleküler protokolün daha uygulanabilir olması sağlanmıştır. Ayrıca, bu optimizasyon ile etmenin ayçiçeği tohumundan direkt tespitine yönelik ilk moleküler çalışma da ülkemiz karantina laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

### ABSTRACT

**T**he fact that rapid diagnosing of especially seed-borne pathogens and their control is the first step to obtain healthy crop. The aims of the study were to optimize the analyzing methods in detecting presence of *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & De Toni requiring analysis at the time of importation in the sunflower seed using current molecular methods that were much more advantageous than that of classical methods. Calculations related to classical PCR (agarose gel electrophoresis) were optimized by referring to Appendix 2 of the EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organisation) Standard Protocols while those related to real-time PCR (the hydrolyze probes) were optimized by referring to Appendix 3 of the EPPO Standard Protocols. Moreover, SyberGreen Mastermix Kit protocol was used for optimization for the study of real-time PCR (SyberGreen) that is not present in the EPPO Standard Protocols. Thus, it was provided that all three molecular protocols were confirmed for better applicable and practical ways for the quarantine laboratories in our country. Furthermore, the first molecular study for direct detection of the agent from sunflower seed through this optimization was conducted in quarantine laboratories of Turkey.

### GİRİŞ

*P.halstedii*, Chromista alemi, Oomycota şubesi, Oomycetes sınıfı, Peronosporales takımı, Peronosporaceae familyasındadır. *P.halstedii*, monopodial şekilde dallanmış, genellikle üç sterigmata ile sonlanan ve oval-eliptik sporangium taşıyan, her birinde apikal papillalar bulunan silindirik şeklindeki sporangiforları

ile karakterizedir. Etmen, tohumda misel ve/veya oospore formunda, tarlada ise bitki artıklarında oluşturduğu oosporlarla kışlar ve toprakta oospore formunda 5-10 yıl canlılığını sürdürebilir. *P. halstedii*'nin bu biyolojik özelliklerinden dolayı tohumla taşınma riski bulunmaktadır ve fitopatogen mikroorganizmaların taşınmasında tohum çok önemli rol oynamaktadır

(Noble,1957; Zizzerini, A. and Raggi, V.,1974). Tohumlar, üzerinde veya içinde bulundukları patojenlerden zarar görebildikleri gibi, bu patojenlerin yayılmalarında ve taşınmalarında aracılık görevini de yapabilmektedirler (Erkan, 1998).

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'ne bağlı Ziraî Karantina Müdürlüğü organizasyonu içinde bulunan karantina laboratuvarlarında, "Bitki Karantinası Yönetmeliği Listesi"nde ülkeye giriş şartı bulunan tüm bitki ve bitkisel ürünler, ithale mani teşkil eden karantinaya tabi zararlı organizmalar yönü ile analiz edilirler. *P.halstedii*, Avrupa Birliği Karantina Yönetmeliği'nde (Directive 92/103/CEE) ve ülkemiz Bitki Karantinası Yönetmeliği EK 2/B Listesi'nde yer almaktadır (www.mevzuat.gov.tr). Ülkemizde bulunmasına ve yaygın olarak görülmesine rağmen karantina listelerinden çıkarılmamasının sebebi; ırk oluşturma eğiliminin yüksek olmasıdır. Amaç, ayçiçeği yetiştirme alanlarında *P.halstedii*'nin yeni genotipleri veya yeni ırk'ları kadar fungusit dayanıklılığı gösteren izolatların yayılmasını da önlemektir (Moinard et al., 2006). *P.halstedii*'nin tohumdan hızlı, güvenilir ve hassas tespiti, hastalığın ülkeye girişini ve yayılmasını önlemek açısından büyük bir önem arz etmektedir. Bu nedenle, özellikle ithalat giriş kapılarında bitki sağlığı tedbirleri uygulanmalıdır. Günümüze kadar fungal organizmaların tespit ve tanılanması klasik metotlara göre yapılmaktaydı ki bunlar, seçici besiyeri, yetiştirme testi, biyokimyasal, kimyasal ve immunobiyolojik analizlerdir (Singleton, 1992). Ayçiçeği mildiyösü *P.halstedii*, obligat bir patojendir ve morfolojik tanımlama sadece konukçu bitki üzerinde yetiştirme testi (in-vivo) olarak mümkündür (Bouterige et al., 2000). Patojenlerin teşhisi için temel olmasına karşın, bu yöntemlerin en önemli dezavantajları; kültüre alınmış organizmanın bu ortamdaki yeteneği, zaman, emek ve taksonomik uzmanlık gerektirmesidir. Yetiştirme testi analiz süresi 10-14 gün sürebilmekte bu durum, tohum ithalat ve ihracatı yapan kuruluşlar ile üreticileri olumsuz yönde etkilemektedir.

ELISA ve PCR gibi bir çok serolojik ve moleküler yöntemler, pratik ve güvenilir olarak tercih edilmektedir. Bu teknikler içerisinde en önemlilerinden birisi de PCR yöntemidir. PCR; basit, spesifik ve hassas bir tekniktir (Mullis, 1990). Teknik, ilk bulunduğu 1985 yılından itibaren hızlı bir gelişme göstermiş ve günümüzde bitki biyoteknolojisinin her alanında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Innis and Gelfand 1990). PCR'in en önemli özelliklerinden birisi, özel bir DNA dizisinin seçilip çoğaltılarak istenmeyen dizilerin ortaya çıkmasını önlenemesidir. Bu özellik, test edilen örnekler içerisinde aranan bölgenin olup olmadığını aynı zamanda bölgenin çok miktarda kopyası elde edileceğinden daha ileri tekniklerle DNA'nın analiz edilmesini sağlamaktadır (Kahya vd., 2013). Bitki

dokularından karantina etmenlerinin tespiti (Bonants et al., 2001; Balmas et al., 2005) ve tohumlardan karantina bakterilerinin varlığının tespiti için (Berg et al. 2005; Hadas, 2005) de çok sayıda özgün polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testi geliştirilmiştir.

Eppo tarafından yayınlanan ve 13 Avrupa ülkesindeki toplam 16 laboratuvar tarafından test edilen (loos and lancu, 2008) PCR temelli tespit yönteminin ülkemizde de uygulanabilirliğinin belirlenmesi, hızlı tanı yöntemlerinin geliştirilmesi ve karantina önlemleri açısından oldukça önem taşımaktadır. Bu çalışma ile *P.halstedii*'nin ithal ayçiçeği tohumlarındaki varlığının rutin tespit ve teşhisi için hassas ve güvenilir metotların ülkemizde de uygulanabilir bir duruma gelmesi sağlanmıştır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Marteyal

Çalışmamızın ana materyalini 2011-2014 yılları arasında ithal edilmiş ve tesadüfi olarak seçilmiş üretim amaçlı ayçiçeği tohumları ile Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü yetiştirme alanları, Edirne Sera TGM ve Süloğlu Geçkinli köyü ayçiçeği mildiyösü belirtisi gösteren bitkilerden doğal olarak elde edilen *Plasmopara halstedii* izolatları ve hassas ayçiçeği çeşidi 9661-A oluşturmaktadır.

### Moleküler çalışmalarda kullanılan materyal

Moleküler çalışmalardaki materyali, 20 baz dizimli primerler (PHAL-F ve PHAL-R), probler (qPForward, qPReverse, qProbe), internal kontrol olarak 18S prob, 18S ve 18F ayçiçeği bitkisi seti), Zymo Research DNA izolasyon kiti, *P. halstedii* izolatlarına ait DNA'lar, Taq DNA Polimeraz, dNTP'ler ve PCR master mix oluşturmaktadır. *P. halstedii* izolatlarına ait DNA'ların elde edilmesi amacıyla yapılan izolasyon çalışmalarında Zymo Research Fungal-Bakteriyel DNA izolasyon kit protokolü uygulanmıştır. Kit içerisinde izolasyon için gerekli olan lysis buffer, DNA binding buffer, DNA pre-wash buffer, DNA wash buffer ve DNA elution buffer ile birlikte bashing bead lizis tüp, tüm toplama tüpleri ve mikrosantrifüj tüpleri mevcuttur ve DNA ölçümü için Picodrop spektrofotometre kullanılmıştır. Tohumların öğütülmesi için Retsch marka GM 200 öğütücü, MagnaLyser doku parçalayıcı, otomatik pipet seti ve pipet uçları ile mikrosantrifüj cihazı kullanılmıştır. Nükleikasitlerin amplifikasyonunda Thermal Cycler (Eppendorf© Mastercycler Gradient) cihazı kullanılmıştır. PCR çalışmaları sonucunda amplifiye edilmiş DNA'lar agaroz jel elektroforez çalışmalarının materyalini oluşturmuştur. PCR ürünlerinin ayrıştırılmasında klasik PCR'da, agaroz, TBE buffer, DNA marker (ThermoScientific), yükleme tamponu (loading), Agaroz jel tankı (ThermoScientific), güç kaynağı (Consort) ve jeldeki DNA bantlarının görüntülenmesinde UV

Transilluminatör görüntüleme cihazı kullanılmıştır. Real time PCR çalışmasında da, Syber Green PCR mastermix (SYBR®Green I boyası içeren Real Time PCR çalışmalarına uygun olarak hazırlanmış, kullanıma hazır bir PCR reaktifi karışımıdır), hidroliz problemleri, LightCycler 480 Multiwell Plate 96, Roche marka LightCycler 480 II cihazı kullanılmıştır. Moleküler çalışmalarda, 24 örnek klasik PCR, 34 örnek real time PCR yöntemi ile testlenmiştir (Çizelge 1). Yeni nesil moleküler bir tespit yöntemi olan hidroliz problemleri ile Real time PCR'da yapılan çalışmalarda da 9 ithal tohum örneği bu yöntemle testlenmiştir (Çizelge 2).

**Çizelge 1.** Klasik PCR ve Real Time PCR'da kullanılan örnekler

**Table 1.** Samples used in the classical PCR and real-time PCR

No	Örnek Numarası	DNA Ölçümü (ng)	İthal edilen ülke
1	128-11	99,6	Fransa
2	129-11	55,6	Fransa
3	132-11	38,4	Fransa
4	137-11	37,6	Fransa
5	142-11	40,5	Fransa
6	156-11	42,5	Fransa
7	269-11	19,1	Şili
8	350-11	61,9	Fransa
9	380-11	40,2	Fransa
10	422-11	73,8	Fransa
11	425-11	71,2	Fransa
12	432-11	47,0	Şili
13	142-12	66,8	A.B.D
14	201-12	63,2	Şili
15	295-12	65,8	Fransa
16	305-12	88,9	Sırbistan
17	400-12	72,1	Şili
18	401-12	62,6	Şili
19	411-12	29,5	Şili
20	420-12	30,5	Şili
21	424-12	39,7	Şili
22	429-12	70,9	Şili
23	438-12	68,5	Fransa
24	61-13	87,4	Fransa
25	65-13	56,5	Fransa
26	76-13	86,1	Fransa
27	80-13	80,2	Fransa
28	88-13	85,4	Fransa
29	144-13	57,5	Fransa
30	331-14	44,7	Fransa
31	351-14	63,0	A.B.D
32	352-14	65,9	A.B.D
33	353-14	62,4	Fransa
34	355-14	80,7	Fransa

**Çizelge 2.** Hidroliz Problemleri ile Yapılan Çalışmada kullanılan örnekler

**Table 2.** The hydrolysis probes and the samples used in the studies

No	Örnek Numarası	DNA ölçümü (ng)	İthal edilen ülke
1	122-14	51,4	A.B.D
2	398-14	71,3	Fransa
3	399-14	58,0	Fransa
4	400-14	30,5	Fransa
5	401-14	33,2	Fransa
6	403-14	47,5	Fransa
7	404-14	60,5	Fransa
8	405-14	60,2	Fransa
9	425-14	57,3	Fransa

## Yöntem

### Moleküler Çalışmalar

#### *Plasmopara halstedii*'nin DNA izolasyonu

Etmenin, ayçiçeği tohumlarındaki varlığının moleküler yöntemler ile tespit edilebilmesi için öncelikle Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü yetiştirme alanları, Edirne Sera TGM ve Süloğlu Geçkinli köyü ayçiçeği mildiyüsü belirtisi (Şekil 1) gösteren bitkilerden doğal olarak elde edilen *P. halstedii* izolatlarının DNA izolasyonu Zymo Research ZR Fungal-Bakteriyel DNA Kit protokolü ile yapılmış olup çalışmamız boyunca pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere DNA'lar -80°C'de saklanmıştır.

#### Klasik PCR yöntemi için optimizasyon

Çalışmamızda, enfekteli yapraklardan elde edilen ve pozitif kontrol için kullanılacak olan *P. halstedii* izolatlarının ve test edilen örneklerin DNA'sı, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile amplifiye edilmiş ve örnekler pozitif kontrol ile karşılaştırılmıştır. PCR işlemi, loos et al. (2007)'a göre yapılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri, %1'lik agaroz jelde elektroforezde yürütülmüştür (Şekil 2). Öncelikle, bu çalışmada kullanılacak primerler için gerekli literatür incelemeleri yapılmış ve loos'a göre (2007) ribozomal büyük alt ünite DNA'sına dayalı *P. halstedii*'ye özgü geliştirilen PCR testi referans alınmıştır. Uluslararası ticari bir firma (ThermoScientific) tarafından da primer sentezi yapılmıştır. Çizelge 3'de kullanılan PHAL-forward ve PHAL-reverse primerlerinin baz dizilimleri ve bağlanma sıcaklıkları verilmiştir. PCR reaksiyonundaki bileşenlerin miktarları, literatürde belirtilen değerlere uygun olarak bu çalışmada 50 µl'lik reaksiyon hacmi için optimize edilmiştir. Reaksiyonlarda 1X polimeraz zincir reaksiyon (PCR) buffer'ı içeren mastermix kullanılmıştır. Mastermix'in bileşenleri Çizelge 4'te verilmiştir. Amplifikasyonda bir örnek için konsantrasyon 1X, bu çalışmadaki örnek sayısı 24 ve 1 hacim de pipetaj hatası eklenerek 25X konsantrasyonda hesaplamalar yapılmıştır.

**Çizelge 3.** Primer baz dizilimi ve bağlanma sıcaklığı (Loos, 2007)

**Table 3.** Primer base array and binding temperature

Primer Baz Dizilimi	Bağlanma Sıcaklığı (°C)*
PHAL-Forward	33,2
5'-TATCTTAAGTTGCTTATAC-3'	
PHAL-Reverse	40,6
5'-AGCATATACAGCACATACG-3'	

\*Bağlanma Sıcaklığı değerleri (ThermoScientific)

**Çizelge 4.** Klasik PCR protokolü reaksiyon içeriği

**Table 4.** Reaction content of the classical PCR protocol

Bileşenler	1X (50µl)	25X
Su	25,75µl	643,75 µl
10X Taq buffer	5µl	125 µl
dNTP	5µl	125µl
MgCl <sub>2</sub>	4µl	100 µl
PHAL-F	2,5µl	62,5 µl
PHAL-R	2,5µl	62,5 µl
TaqDNA polimeraz	0,25µl	6,25 µl
Kalıp DNA	5 µl	
Toplam Hacim	50 µl	

### Real Time PCR yöntemi için Syber Green ile optimizasyon

Çalışmamızda Roche LC 480 II cihazını (Şekil 3) kullanarak real time (gerçek zamanlı) PCR uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Real Time PCR için; primerler (PHAL-F ve PHAL-R), SyberGreen Master Mix (dNTP, MgCl<sub>2</sub>, TaqDNA polimeraz enzimi, Taq buffer, Dnase free su)'e ihtiyaç duyulmaktadır. Çizelge 5' de reaksiyon içeriğinin miktarları belirtilmiştir. Çizelge 1' de belirtilen PCR ürünleri (toplam 34 örnek), Real time PCR cihazında "var/yok" analizi yapmak üzere hazırlanmıştır. Otuz dört örnek ve 1 hacim de pipetaj hatası eklenerek 35X konsantrasyonda hesaplamalar yapılmıştır.

SyberGreen boyası; çift sarmal DNA ipliklerinin majör boşluklarına bağlanan bir boyadır. Reaksiyon aşamasında, primerlerin dimerizasyon sonucu bağlanmaları halinde oluşan çift sarmal DNA iplikçiklerine de bağlanabilir

(Şekil 4). Analiz aşamasında Syber Green boyasının dimer bölgelere bağlanması nedeniyle floresan sinyalleri artar. Elde edilen floresan sinyallerinin istenen hedef bölgenin amplifikasyonu ile mi gerçekleştiği yoksa non-spesifik dimerizasyon sonucu bir ürün mü olduğunu anlayabilmek için "melting curve" (erime eğrisi) analizi yapılır. Bu durum "erime eğrisi" grafiğinde tekrar değerlendirilir.

**Çizelge 5.** Real Time PCR SyberGreen Protokolü Reaksiyon içeriği  
**Table 5.** Reaction content of the real-time PCR SyberGreen Protocol

Bileşenler	1X	35X
dH <sub>2</sub> O	1,9 µl	66,5 µl
F 0,3 µl	0,3 µl	10,5 µl
R 0,3 µl	0,3 µl	10,5 µl
SyberGreenMasterMix	5 µl	175 µl
Kalıp DNA	2,5 µl	
Toplam Hacim	10µl	

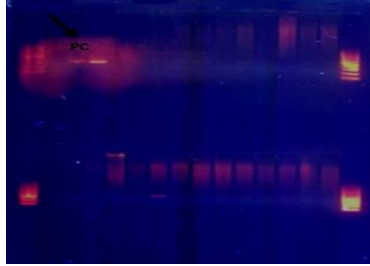


(a)



(b)

**Şekil 1.** (a,b). Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü yetiştirme alanlarında ayçiçeği bitkisinde mildiyö belirtileri  
**Figure 1.** (a,b). Signs of mildew in the sunflower in raising fields of Institute of Agricultural Research of Trakya



**Şekil 2.** Bazı PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezdeki görünümü  
**Figure 2.** View of some PCR products on the agarose gel electrophoresis

[sütun: M, 100 bp Marker (Fermentas); 1, negatif kontrol; 2, pozitif kontrol; 3, pozitif kontrol; 4, 128-11; 5, 129-11; 6, 137-11; 7, 156-11; 8, 269-11; 9, 350-11; 10, 380-11; 11, 422-11; 12, 425-11; 13, 432-11; 14, 142-12; 15, negatif kontrol; 16, 295-12; 17, 420-12; 18, 305-12; 19, 400-12; 20, 401-12; 21, 411-12; 22, 424-12; 23, 429-12; 24, 201-12; 25, 61-13; 26, 65-13; 27, 76-13; 28, 80-13]



**Şekil 3.** LightCycler480 II Real Time PCR cihazı  
**Figure 3.** LightCycler480 II Real Time PCR device

### Ayçiçeği Mildiyösü ile doğal enfekte örneklerin %1'lik agaroz jel elektroforez ile moleküler analizi

İthal edilen tohum örneklerine ek olarak; Tekirdağ-Hayrabolu yolu üzerindeki tarlalardan bulaşık Tunca çeşidi ayçiçeği bitkilerinden seçilmiş ve tablalardan doğal enfekte tohum, gövde ve yaprakları alınarak çalışmaya dahil edilmiştir. Bunun sebebi, bulaşık olduğunu bildiğimiz örneklerin moleküler yöntemlerle doğruluğunu gösterebilmektir. Deneme alanlarından alınan bu bulaşık örnekler buz çantasında laboratuara getirilmiş ve Climax marka derin dondurucuda -20°C' de DNA izolasyonu yapılarak saklanmıştır. *P. halstedii* nin varlığı, %1'lik agaroz jel elektroforezde hem ithal tohum örneklerinde hem de doğal enfekte tohum, gövde ve yapraklardan alınan örneklerde pozitif kontrole göre karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Böylece yöntemin uygulanabilirliği ve güvenilirliği doğrulanmıştır.

### Ayçiçeği mildiyösü ile doğal enfekte örneklerin SyberGreen ile moleküler analizi

Bu çalışmada; PHAL-forward/PHAL-reverse primerleri kullanılarak SyberGreen protokolü ile Real time PCR cihazına bir önceki çalışmada elde edilen 40 PCR ürünü yüklenmiştir. Amaç; Real time PCR'da doğal enfekte örneklerdeki *P. halstedii* izolatlarına ait DNA'ların varlığının teyid edilmesidir. Bu çalışmada da yine; 31 ithal tohum, 3 pozitif kontrol, 1 negatif kontrol olmak üzere toplam 4 adet doğal enfekte tohum, yaprak ve gövdeden alınan örnekler ve 1 hacim de pipetaj hatası için toplam 40X konsantrasyonda hesaplamalar

yapılmıştır ve bu reaksiyonun içeriği Çizelge 6'da belirtilmiştir.

**Çizelge 6.** Ayçiçeği Mildiyösü ile doğal enfekte örneklerin SyberGreen ile real time PCR reaksiyon içeriği

**Table 6.** Reaction content of the real-time PCR with SyberGreen of the samples naturally infected with sunflower mildew

Bileşenler	1X	40X
dH <sub>2</sub> O	3,8 µl	152
F 0,6 µl	0,3 µl	12
R 0,6 µl	0,3 µl	12
SyberGreenMastermix	10 µl	400
Kalıp DNA	5 µl	
Toplam Hacim	20 µl	

### Moleküler yöntemlerde hidroliz probleminin kullanılması

Çalışmamızda, *P. halstedii* için qPHAL-F ve qPHAL-R primerleri ile qPHAL-P probu, *Helianthus annuus* (ayçiçeği) için ise 18S uni-F ve 18S uni-R primerleri ile 18S uni-P probu kullanılmıştır (loos et al., 2012). *P. halstedii* ve *H. annuus* için kullanılan primer-prob'ların baz dizimleri Çizelge 7'deki gibidir. DNA izolasyon aşamasında hem *P. halstedii* hem de *Helianthus annuus* DNA'larının elde ediliyor olmasından yola çıkılarak, real time PCR reaksiyonlarında, reaksiyonun kontrolü amacıyla, her iki DNA'ya spesifik primer-probe setleri ile reaksiyonlar kurulmuştur. Böylelikle, her örnek için, mutlaka *Helianthus annuus* pozitif sonuç çıkması beklenir. Aksi durumda, *P. halstedii* negatif dahi olsa, sonuç geçersizdir ve DNA izolasyon aşaması itibarıyla çalışma tekrar edilmelidir (Çizelge 8).

**Çizelge 7.** *P. halstedii* ve *H. annuus* için kullanılan primer-prob'ların baz dizimleri (loos et al., 2012)

**Table 7.** Base arrays of the primer probes used for *P. halstedii* and *H. annuus* (loos et al., 2012)

Primer/Probe	Baz Dizilimi
Hedef : <i>Plasmopara halstedii</i>	
Forward primer : qPHAL-F	5'-TTCCAGTGTCTATAATCCGTGGT-3'
Reverse primer : qPHAL-R	5'-GCACATACGCCGAGCGTA-3'
Probe: qPHAL-P	5'-FAM-TCGGCGAGCGTGTGCGTGT-BHQ1-3
Hedef : <i>Helianthus annuus</i>	
18 S uni-F	5'-GCAAGGCTGAACTTAAAGGAA-3'
18 S uni-R	5'-CCACCACCCATAGAATCAAGA-3'
18 S uni-P	5'-ACGGAAGGCACCACCAGGAGT-BHQ1-3'

**Çizelge 8.** *H. annuus*-*P. halstedii* real time PCR'da sonuç değerlendirme

**Table 8.** Evaluation of the results on real time PCR for *H. annuus*-*P. halstedii*

	Örnek1	Örnek2	Örnek3
<i>P. halstedii</i>	+	+	-
<i>H. annuus</i>	-	+	+
Sonuç	Geçersiz, Tekrar edilmeli.	+	-

Primer-prob reaksiyon karışımı, *P.halstedii* ve ayçiçeği bitkisi için ayrı ayrı hazırlanmıştır. Primer ara stok hazırlanışında; qPHAL-F ve qPHAL-R primerleri *P. halstedii* için, 18S uni-F ve 18S uni-R primerleri ise *Helianthus annuus* için kullanılmıştır. Forward ve reverse primerlerinden 10µM (100µM'lık ana stoktan 10µl alınıp üzerine 90µl Dnase free su eklenerek) ara stok hazırlandı. Problar için ise; 4µM ara stok hazırlandı. Hidroliz problemleri ile Real time PCR karışım tüpünün hazırlanması aşamasında 1 örnek için reaksiyonun içinde olması gereken PPMix (primer-prob karışım miktarı) için miktarlar Çizelge 9'da belirtildiği gibidir. Hazırlanan ara stoktan 2µl PPMix kullanılmıştır.

**Çizelge 9.** Primer-prob (PPMix) reaksiyon karışımı  
**Table 9.** Reaction mixture of primer-probes (PPMix)

ANA STOK	1X	100X
100µM	F 0.1µl	10µl
	R 0.1µl	10µl
	Prob 0.04µl	4µl
	Su 1,76µl	176µl
TOPLAM	2µl	200 µl

Karışım tüpü hazır hale geldikten sonra Real time PCR (LC480 II) cihazına yüklenmek üzere hazırlanmıştır. Toplam 15µl (karışım) + 5 µl DNA = 20µl (15 µl plate'e dağıtılır ve üzerine 5 µl DNA her bir kuyucuğa son reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde ilave edilir) cihaza konmadan önce 2000 rpm'de 15 saniye santrifüj işlemi uygulanmış ve cihaza yüklenmiştir. Çalışmamızda, 9 örnek, 3 pozitif kontrol (yeni) ve daha önceki çalışmada kullandığımız 2 pozitif kontrol (eski), 1 negatif kontrol de çalışmaya dahil edilmiş 1 hacim pipetaj hatası da eklenerek toplam 16X konsantrasyonda hesaplamalar yapılmıştır (Çizelge 10). Pozitif kontrole göre örnekler değerlendirildiğinde amplifikasyon eğrisinde herhangi bir pik gözlenmemiştir.

**Çizelge 10.** Real time PCR (Hidroliz problemleri) Mastermix içeriği  
**Table 10.** Mastermix content of the real-time PCR (Hydrolysis probes)

Bileşenler	1X	16X
SU	9µl	144µl
PPMix	2µl	32µl
TaqMan MasterMix(Enzim)	4µl	64µl
TOPLAM	15µl	

## ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### Agaroz jel elektroforez çalışmaları sonucunda DNA bantlarının değerlendirilmesi

Bu çalışmada loos et al.(2007)'nin geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. *P. halstedii* izolatlarından elde edilen DNA'nın kalıp DNA olarak kullanıldığı PCR reaksiyonundaki bileşenlerin miktarları 50 µl'lik final hacim için optimize edilmiştir. Elde edilen

hesaplamalar sonucunda *P. halstedii* için Klasik PCR Protokolü reaksiyon içeriği Çizelge 4'deki gibi oluşturulmuştur ve primerlerin, reaksiyonda başarılı olduğu belirlenmiştir.

PCR reaksiyonu, toplam 24 örnek ile çalışılmıştır. Agaroz jel (%1'lik) elektroforez çalışmaları sonucunda; pozitif kontrole göre, değerlendirilebilir her bant "var / yok" olarak kaydedilmiştir. Örneklerde değerlendirilebilir herhangi bir bant oluşmamıştır. Pozitif kontrolün DNA bandı ise yaklaşık 308 bp aralığında gözlemlenmiştir (Şekil 2). DNA izolasyonu yapılan tohumlar; *P. halstedii* varlığı yönünden arı bulunmuştur.

### Real time PCR yöntemi için SyberGreen ile optimizasyon sonuçlarının değerlendirilmesi

Çizelge 1' de belirtilen PCR ürünleri (toplam 34 örnek), Real time PCR cihazında "var/yok" analizi yapılmak üzere hazırlanmıştır. Bu çalışmada, PHAL-F / PHAL-R primerleri kullanılarak SyberGreen boyası ile Real time PCR cihazına örnekler yüklenmiştir. *P.halstedii* izolatlarından elde edilen DNA'nın kalıp DNA olarak kullanıldığı PCR reaksiyonundaki bileşenlerin miktarları 10 µl'lik final hacim için optimize edilmiştir. Elde edilen hesaplamalar sonucunda *P. halstedii* için Real Time PCR SyberGreen Protokolü Reaksiyon İçeriği Çizelge 5'deki gibi oluşturulmuştur.

Çalışmamızda, pozitif kontrol ve primerler amplifikasyon eğrisinde de görüldüğü gibi (Şekil 5 ) sadece pozitif kontrolün Ct (Cycler Treshold) değeri okunmuş, örneklerde herhangi bir Ct değeri kaydedilmemiştir. Ancak primer dimerleri tespit edilmiştir.

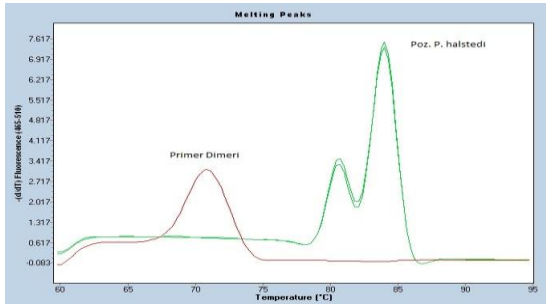
Pozitif kontrolde amplifikasyon gözlenmiş, örneklerde *P. halstedii* ye ait DNA bulunmadığı için herhangi bir amplifikasyon gözlenmemiştir. Amplifikasyonda görülen pozitif ve negatif sonuçlar, melting eğrisi (Şekil 4) grafiğinde teyit edilmiştir. Ct değeri, yükselme eğrisinin en yüksek fazının izdüşümüdür. Bu denemede pozitif kontrol Ct değeri 27 olarak okunmuş ve örneklerde herhangi bir sinyal görülmemiştir.

Agaroz Jel Elektroforez (%1'lik) çalışmaları sonucunda her bir örnek için oluşan ve değerlendirilebilir her bant "var /yok" şeklinde kaydedilmiştir. Buna göre; ithal tohum örneklerinde herhangi bir bant açılımı gözlemlenmemiş fakat doğal enfekte tablalardan alınan tohum örneklerinde (B1 ve B2) ve gövde (G1) den alınan örneklerde pozitif kontrole göre daha düşük düzeyde bant görüntüsü (Şekil 6) gözlemlenmiştir. Bu sonuç, doğal enfekte örneklerden izole edilen *P. halstedii* izolatlarına ait DNA'ların varlığını göstermekte ve klasik PCR protokolünün ve döngüleme profili basamaklarının doğruluğunu teyit etmektedir.

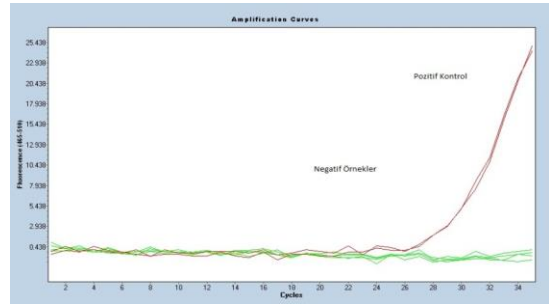
### Ayçiçeği mildiyösü ile doğal enfekte örneklerin SyberGreen ile Moleküler Analizinin Değerlendirilmesi

Amplifikasyon eğrisi (Şekil 7) değerlendirildiğinde, pozitif kontrol Ct değeri, 30. döngüde sinyal vermiştir. Bu eğri, pozitif kontrolün sistemde amplifiye olduğunu ve test edilen örneklerin kontrole göre

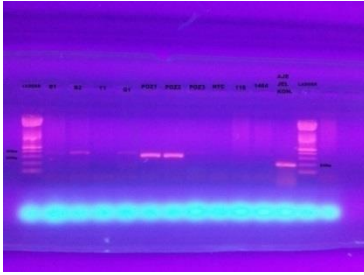
değerlendirilebileceğini göstermektedir. İthal tohum örneklerinde ve negatif kontrolde herhangi bir sinyal görülmemiştir. Sadece, doğal enfekte ayçiçeği tablalarından alınan tohum, yaprak ve gövdeden alınan örneklerde, 35. döngüden sonra düşük amplifikasyon sinyali görülmüştür.



Şekil 4. Pozitif kontrol ve primer dimeri pik eğrileri  
Figure 4. Peak curves of the positive controls and the primers



Şekil 5. Amplifikasyon Eğrisi  
Figure 5. The amplification curve



Şekil 6. Bazı ithal tohum, doğal enfekte tohum, gövde ve yapraklardan alınan örneklerin, pozitif kontrole göre bant görüntüleri  
Figure 6. Band view of some exported seeds, naturally infected seeds, and samples from the stems and leaves relative to the controls

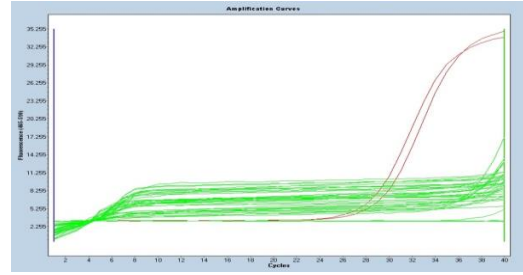


Figure 7. The Amplification Curve  
Şekil 7. Amplifikasyon Eğrisi

Grafiğe göre (Şekil 8) pozitif örnekler 80-84°C'de melting pik'i vermiştir. Negatif örnekler, herhangi bir pik vermemiştir. Tohum ve gövde örneklerinde 35. döngüden sonra, amplifikasyon eğrileri görüldüğü için melting eğrisi ile de kontrol edilmiştir. Pozitif kontrole göre net pik'ler olmasa da, 80-84°C'de, düşük düzey pik eğrileri gözlenmiştir. Bu sonuç ile primerlerin reaksiyonda başarılı olduğu, pozitif kontrol ve doğal enfekte örneklerden izole edilen *P.halstedii* izolatlarının DNA'larının değerlendirilebilir pik eğrileri verdiği saptanmıştır.

### Hidroliz problemleri kullanılarak analizi yapılan örneklerin değerlendirilmesi

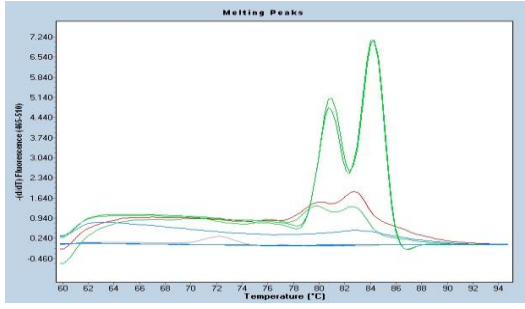
Bu çalışmada, 9 örnek (Çizelge 2), 3 pozitif kontrol (yeni) ve daha önceki çalışmada kullandığımız 2 pozitif kontrol (eski), 1 negatif kontrol de çalışmaya dahil edilmiş 1 hacim pipetaj hatası da eklenerek 15X konsantrasyonda hesaplamalar yapılmıştır. Çalışmamızda

tekrar yeni pozitif kontrol kullanmamızın nedeni örneklemeyi arttırmaktır. Pozitif kontrole göre örnekler değerlendirildiğinde amplifikasyon eğrisinde herhangi bir pik gözlenmemiştir (Şekil 9).

Çalışmamızda, moleküler yöntemler ile elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

Klasik PCR çalışmalarında reaksiyona girecek bileşenlerin (Taq Buffer, dNTP, MgCl<sub>2</sub>, PHAL-F, PHAL-R, TaqDNA Polimeraz, Su, Kalıp DNA) optimum konsantrasyonları belirlenmiş (Çizelge 4) ve Thermal Cycler cihazı agaroz jel elektroforez çalışmaları sonucunda çoğaltılan DNA'lar %1' lik agaroz jel elektroforezde 100 voltta 35 dakika yürütülmüştür. PCR ürünleri transillimünatöre 302 nm UV ışık altında fotoğraflanarak kaydedilmiştir. Pozitif kontrole göre herhangi bir bandın gözlemlenmemesi etmene ait herhangi bir DNA'nın da olmadığını göstermektedir (Şekil 2).



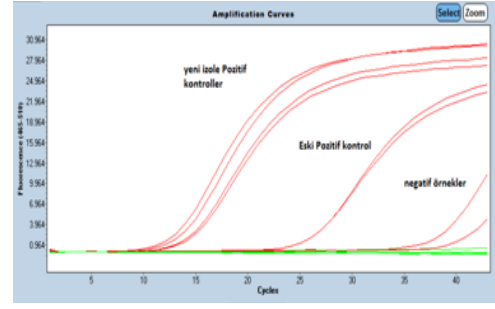


**Şekil 8.** Melting Eğrisi  
**Figure 8.** The Melting Curve

SyberGreen boyası; çift zincir spesifik bir boya olduğundan primer dimerlerine bağlanarak yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. Amplifikasyonda görülen pozitif ve negatif sonuçlar, Melting eğrisi grafiğinde teyit edilmiştir. Ct (Cycles Treshold) değeri, yükselme eğrisinin en yüksek fazının iz düşümüdür. Bu denemede pozitif kontrol Ct değeri 27 olarak okunmuş ve örneklerde herhangi bir sinyal görülmemiştir. Bu durum, ithal tohum örneklerinde Real time PCR'da *P. halstedii* DNA varlığı yönünden negatif olduğunu göstermiştir.

Ayçiçeği Mildiyösü ile doğal enfekte tohum, gövde ve yapraktan alınan örnekler ve ithal tohum örneklerinin %1' lik agaroz jel elektroforez ile moleküler analizi çalışmalarının değerlendirilmesi ile ilgili olarak yapılan denemenin sonuçları çalışmada kullanılan yöntemin, PCR bileşenlerinin optimizasyonunun (Çizelge 4) doğruluğunu ve karantina laboratuvarında uygulanabilir ve güvenilir bir yöntem olduğunu göstermiştir. Bu çalışmadan sonra elde edilen PCR ürünleri, Real time PCR uygulamasında tekrar kullanılmıştır.

Ayçiçeği mildiyösü ile doğal enfekte örneklerin SyberGreen ile moleküler analizinin değerlendirilmesi ile ilgili yapılan denemenin sonuçları doğal enfekte örneklerin pozitif olduğunu göstermektedir. Bu sonucu doğrulamak için melting eğrisi incelenmiştir. Bu durum, doğal enfekte örneklerin melting eğrisinde pozitif olduğunu teyit etmektedir. Doğal enfekte örneklerdeki düşük düzey pik eğrisi, hedef DNA miktarının düşük olması ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca, bu örneklerden daha yüksek düzey pik eğrisi alabilmek için, PCR döngü sayısının 40 döngüden 50 döngü düzeyine artırılması daha uygun olabilir fakat SyberGreen metodu ile 40 döngü üzerindeki reaksiyonlar güvenilir olmadığından bu yaklaşım uygulanmamıştır. Çalışmalara spesifikasyonu ve tekrar edilebilirliği yüksek olan, yanlış pozitif olasılığını



**Şekil 9.** Primer-prob çalışmasında amplifikasyon eğrisi.  
**Figure 9.** The amplification curve in the Primer-probe study.

da ortadan kaldıran hidroliz problemleri dahil edilerek, sürdürülebilir ve güvenilir bir yöntem uygulanmıştır.

Hidroliz problemleri kullanılarak analiz edilen örneklerin değerlendirilmesi ile ilgili yapılan denemenin sonuçlarına göre, her örnek için, mutlaka *Helianthus annuus* pozitif sonuç çıkması beklenir. Aksi durumda, *P. halstedii* negatif dahi olsa, sonuç geçersizdir ve DNA izolasyon aşaması itibarıyla çalışma tekrar edilmelidir.

*P. halstedii* 'nin, zaman, emek ve taksonomik uzmanlık gerektiren klasik yöntemler (EPP0 (PM 7/85-2) Yetiştirme Testi, 10-14 gün) yerine tohumdan daha erken, hızlı, güvenilir ve hassas tespiti için moleküler yöntemler (2-3 gün) kullanılarak patojen daha erken tespit edilebilecektir. Böylece üreticilere ve ayçiçeği tohum ithalat ve ihracatı yapan kuruluşlara ekonomik fayda sağlayacak ve ülkemiz karantina laboratuvarları içerisinde de etmenin ayçiçeği tohumundan tespitine yönelik ilk çalışma olacaktır. Özellikle analiz sürelerinin uzunluğu, liman, antrepo, yeddi-emin gibi gümrüklü sahalarda bekleme sürelerini de uzatmakta ve ithalatçı firmalara maliyeti yüksek olmaktadır. 2017 değerlerine göre dış karantina analizlerinin ücret tarifesini her numune için 600 TL ayrıca belge-beyan kontrolü, bitki pasaportu kaydı gibi diğer işlemler ile her beklediği süre için de ayrıca ücretlendirme yapılmaktadır. Bu ücretlendirme bekleme yerine göre değişkenlik gösterebilmekte 3 günden sonraki her gün için maliyet yükselmektedir. Sahadaki bu sıkıntılara çözüm olacak en etkili yollardan birisi de analiz sürelerini kısaltacak en hızlı ve güvenilir metodların bu laboratuvarlarda uygulanabilmesidir.

Bu çalışmalar sonunda edinilen bilgi, tecrübe ve gözlemlerimize göre klasik ve moleküler yöntemleri avantaj ve dezavantaj olarak karşılaştırdığımız kriterler Çizelge 11'de verilmiştir.



**Çizelge 11.** Klasik ve moleküler yöntemlerin bazı kriterler yönünden karşılaştırılması**Table 11.** Comparison of the classical and molecular methods for some criteria

KRİTER	AÇIKLAMA	KLASİK YÖNTEMLER Yetiştirme Testi, Besiyeri hazırlama, Biyokimyasal Testler	MOLEKÜLER YÖNTEMLER Klasik & Real Time PCR
Zaman	Testin, örnek alımından sonuç verilene kadar geçen süresidir.	10-14 gün	1-2 gün
Hassasiyet	Aranan etmenin tespit edilebilme düzeyidir.	%70-95	%99
Spesifiklik	Aranan etmenin net olarak tespit edilebilmesidir.	%70-80	%99
Tekrar edilebilirlik	Her örnek her uygulamada farklı sonuç verebilir.	Yok	%99
İnsan Faktörü	Analizi yapan kişinin yetkinlik ve kabiliyeti	%100 etkili	%3 etkili
Uygulama Süreci	Analiz aşamaları	Çok aşamalı	2 aşamalı
Kontrol Mekanizması	Analiz aşamalarının kontrol edilebilirliği	Yok	Her aşama kontrollü
Raporlama	Analiz sonucunun belgelenmesi	Makroskobik ve mikroskobik analiz	Genetik veri analizi

Aynı şekilde yaptığımız çalışmada, moleküler yöntemleri de kendi aralarında karşılaştırdığımızda klasik PCR çalışmalarının duyarlı, protokol standart hale geldikten sonra uygulamasının kolay ve kullanım alanının geniş olması gibi avantajları bulunmaktadır. Buna karşılık kontaminasyon riskinin yüksek olması, zaman ve yoğun emek gerektirmesi, analitik özgünlüğünün düşük olma olasılığı, kantitasyonun belirlenememesi ve kullanılan reaktiflerin kanserojen etkisinin olması gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Real time PCR çalışmalarının ise, duyarlılık, özgünlük ve tekrar edilebilirliğinin yüksek olması, kontaminasyon riskinin düşük olması, zaman tasarrufu, bir çok hedefi aynı anda analiz edebilme özelliği ve kantitatif analizlerin dahi reaksiyon süreci ile eş zamanlı olarak tespit edilebilmesi gibi ciddi avantajları vardır. Klasik PCR işlemlerine göre yüksek maliyetli olması, cihazların donanımsal özelliklerine göre standardizasyon ve analiz farklılıklarının olması, kullanıcılarda teknik donanım ve alt yapı gerektirmesi gibi dezavantajlı yönleri de bulunmaktadır.

## SONUÇ

Sonuç olarak; *P.halstedii* (Farl.) Berl. & De Toni'nin tohumlardaki varlığının rutin analiz gerektiren karantina

laboratuvarlarında klasik yöntemlere ek olarak, protokolü loos et al.(2007) ve loos et al.(2012)'ye göre EPPO'da da açıklandığı biçimi ile yapılan hesaplamalar sonucu optimize edilmiştir. Oluşturulan bu protokoller, klasik PCR ve real time PCR yöntemleri ile tüm laboratuvarlarda uygulanabilir. Çalışılan tüm bu moleküler yöntemler içerisinde "hidroliz problemleri" en hassas, güvenilir, hızlı ve uygulanabilir bir yöntem olarak önerilmektedir.

Bu metod ile daha hızlı, daha güvenilir bir genetik veri analizi gerçekleştirilmiştir. Özellikle ithalat aşamasında firmalar, tohumların analiz süresince gümrüklü sahalarda bekletildiği antrepolara bekledikleri her gün için ödeme yapmakta ve bu durum maliyetlerin artmasına sebep olmaktadır. Uygulanacak bu yöntem, güvenilir ve hassas duyarlılıktaki sonuçları ile, analiz bekleme sürelerini minimize ederek tüm ayrıçığı tohum ithalat ve ihracatı yapan kuruluşlara da ekonomik fayda sağlayacaktır. Analizlerin doğru ve güvenilir olması, tarım ekonomisi ve ticari ekonomiye katkı sağlarken, ülkemizin karantina etmenlerine karşı hassasiyeti de vurgulanmıştır. Bu çalışma, diğer karantinaya tabii zararlı organizmaların analizleri için de örnek teşkil edecektir.

## KAYNAKLAR

Berg T., Tesoriero L. and Hailstones D.L., 2005, PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in *Brassica* seed. Plant Pathology Volume 54, Issue 3 June 2005, 416-427pp.  
<http://www.mevzuat.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=7.5.15548&sourceXmlSearch=&MevzuatIliski=0> Erişim: Nisan, 2016. Bitki karantinası yönetmeliği.  
 Bonants, P.J.M., Schoen, C., van der Wolf, J.M. and Zijlstra, C., 2001, Developments in detection of plant pathogens and other plant-related organisms: Detection in the past detection in the future. In: Proceedings of the 53th International Symposium of Crop Protection, Gent, Belgium, May 8th 2001. Mededelingen Faculteit

Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschap, Universiteit van Gent, 66: 25-37pp.  
 Bouterige, S., Robert, R., Bouchara, J.P., Marot-Leblond, A., Molinero, V. and Senet, J.M., 2000, Production and characterization of two monoclonal antibodies specific for *Plasmopara halstedii*. Applied and Environmental Microbiology, 33 ref.66(8):3277-3282pp.  
 Erkan, S., 1998, Tohum Patolojisi, EÜ Zir.Fak.Bitki Koruma Bölümü Doktora Programı Ders Kitabı 6-40s.  
 Ios, R., Laugustin, L., Rose, S., Tourvieille, J. and Tourvieille de Labrouhe, D., 2007, Development of a PCR test to detect the

- downy mildew causal agent *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds. *Plant Pathology* 56, 209-218pp.
- Ioos, R. and Iancu, G., 2008, European collaborative studies for the validation of PCR-based detection tests targeting regulated fungi and oomycetes. *Bulletin OEPP/EPPO (2008) Bulletin* 38, 198–200pp.
- Ioos, R., Fourrier, C., Wilson, V., Webb, K., Jean-Luc Schereffer, and Tourvieille de Labrouhe, D, 2012, An optimized duplex real-time PCR tool for sensitive detection of the quarantine oomycete *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds. *Phytopathology* 102:908-917pp.
- Innis, M.A. and Gelfand.,1990, Optimization of PCR's in PCR Protocols. Academic, San Diego, CA, 3-12pp.
- Kahya, S., Buyukcangaz, E. ve Carlı, K.T., 2013, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu. *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.* 32 (2013), 1: 31-38.
- Moinard, J., Mestries, E. and Penaud, A., 2006, An overview of sunflower downy mildew. *Phytoma – La Défense des Végétaux* 589:34–38pp.
- Mullis, KB., 1990, The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American.* 1990; 262(4):56–61. 64–5. [PubMed]
- Noble, M., 1957, The transmission of plant pathogens by seed In:Horton-Smith C. (ed.) *Biological aspects of Transmission of Diseases* Oliver & Body, Edinburg, UK, a,81-85pp
- Singleton, L., Mihail, J.D., Rush, C.M., 1992. *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*, APS Press, St. Paul, MN.
- Zizzerini, A. and Raggi, V., 1974, *Plasmopara helianthi* in sunflower seeds, transmission of the disease and germination capacity of infected seeds. *Sementi Elette* 20(5):21-25. "alınmıştır" Review of *Plant Pathology*,1976. 55(2):150p.