

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANTALYA VE ISPARTA İLLERİNDE KARANFİL ÜRETİM
ALANLARINDA KARANFİL BENEKLENME VİRÜSÜ
(*Carnation mottle virus* = CarMV) İZOLATLARININ BİYOLOJİK
VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Tuğba BAKIR

Danışman: Doç. Dr. Bayram ÇEVİK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
ISPARTA – 2011**

TEZ ONAYI

Tuğba BAKIR tarafından hazırlanan “**Antalya ve Isparta İllerinde Karanfil Üretim Alanlarında Karanfil Beneklenme Virüsü (*Carnation mottle virus = CarMV*) İzolatlarının Biyolojik ve Moleküler Karakterizasyonu**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Süleyman Demirel Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Bayram ÇEVİK (İmza)

Süleyman Demirel Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri:

Doç. Dr. Nejla YARDIMCI (İmza)

Süleyman Demirel Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı

Yrd. Doç. Dr. Mehtap ŞAHİN-ÇEVİK (İmza)

Süleyman Demirel Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Mehmet Cengiz KAYACAN
Enstitü Müdür V.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	7
2.1. Karanfil Hastalıkları	7
2.1.1. Karanfil virüs hastalıkları	7
2.1.1.1. Karanfil beneklenme virüsü (<i>Carnation mottle virus</i> , CarMV)	9
2.1.1.2. Hastalığın bulunuşu, yaygınlığı ve konukçuları	9
2.1.1.3. Hastalığın belirtileri	10
2.1.1.4. Hastalığın taşınma yolları	11
2.1.1.5. Karanfil beneklenme virüsünün partikül morfolojisi ve genom yapısı	11
2.1.1.6. Karanfil beneklenme virüsünün tanılanması ve tanılanma yöntemleri	12
2.1.1.7. Karanfil beneklenme virüsü genlerinin dizilenmesi ve filogenetik analizleri.....	16
2.1.1.8. Ülkemizde karanfil beneklenme virüsü	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	19
3.1. Virüs İzolatları	19
3.2. Oligonükleotid Primerler	20
3.3. Total RNA İzolasyonu	21
3.3.1. One Step RNA izolasyon yöntemi	22
3.3.2. CTAB total nükleik asit izolasyon yöntemi	22
3.4. Kılıf Protein Genlerinin Çoğaltılması	23
3.5. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	24
3.6. Kılıf Protein Genlerinin Klonlanması	25
3.6.1. Ligasyon	25

3.6.2. Transformasyon	25
3.7. Rekombinant Kolonilerin Seçimi	25
3.8. Rekombinant Bakteriyel Kolonilerin Belirlenmesi	26
3.9. Plazmid İzolasyonu	27
3.10. <i>EcoR</i> I Restriksiyon Enzimiyle Kesme (Digestion) İşlemi	28
3.11. Kılıf Protein Geninin Dizisinin Belirlenmesi ve Karşılaştırılması	28
3.12. Kılıf Protein Geninin Filogenetik Analizi	29
3.13. Biyolojik İndeksleme	29
3.13.1. İndikatör bitkilerin yetiştirilmesi	30
3.13.2. Mekanik inokulasyon	30
3.13.3. Simptomların gözlenmesi	33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	34
4.1. Total RNA İzolasyonu	34
4.2. Tersine Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT – PCR)	35
4.3. Kılıf Protein Genlerinin Klonlanması ve DNA Dizilemesi	36
4.4. Kılıf Protein Genlerinin Dizi Analizi	41
4.4.1. Nükleotid dizi analizi	41
4.4.2. Amino asit dizi analizi	46
4.5. Filogenetik Analizler	50
4.6. Biyolojik İndeksleme	53
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	54
6. KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	62

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

**ANTALYA VE ISPARTA İLLERİNDE KARANFİL ÜRETİM
ALANLARINDA KARANFİL BENEKLENME VİRÜSÜ
(*Carnation mottle virus* = CarMV) İZOLATLARININ BİYOLOJİK VE
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Tuğba BAKIR

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Bayram ÇEVİK

Dünyada ve ülkemizde karanfil üretimi kesme çiçekler arasında önemli bir yere sahiptir. Karanfil yetiştiriciliğinde ekonomik kayıplara neden olan birçok fungal, bakteriyel ve viral hastalıklar bulunmaktadır. Viral hastalıklardan karanfil beneklenme virüsü (*Carnation mottle virus*, CarMV) karanfil yetiştirilen birçok ülkede yaygın olarak bulunmaktadır. Daha önce yapılan bir çalışmada Antalya ve Isparta illerinde karanfil üretim alanlarından 33 örnek toplanmış ve CTAB yöntemiyle toplam nükleik asit izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra bu örneklerde iki aşamalı ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) yöntemiyle CarMV'ne ait kılıf protein (CP) genleri çoğaltılarak 33 tane örnekten 31 tanesinde 1000 bp büyüklüğünde CarMV CP genine denk gelen bant elde edilerek CarMV varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada her iki il için seçilen 5'er izolat olmak üzere toplam 10 farklı CarMV izolatından çoğaltılan kılıf protein genleri T-A klonlama yöntemiyle pGEM-T Easy plazmitine klonlanarak *Escherichia coli* bakterisine aktarılıp koloniler elde edilmiştir. Her bir örnek için elde edilen beyaz kolonilerden en az beş tanesi seçilmiş ve koloni PCR yöntemiyle taranarak her bir örneğin kılıf protein genini içeren en az iki beyaz koloni belirlenmiştir. Bu kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra plazmitler *EcoRI* enzimiyle kesilip CarMV kılıf protein geni içerdikleri doğrulanmıştır. Daha sonra, kılıf protein genlerinin dizilimi yapılarak bunların nükleotid dizilimi ve amino asit dizilimi belirlenmiştir. Bu diziler analiz edilerek ülkemizin iki farklı bölgesinden elde edilen CarMV izolatlarının CP gen dizilimleri birbirleriyle ve gen bankası veri tabanından alınan ve dünyanın farklı üretim bölgelerinden elde edilen CarMV CP genleriyle karşılaştırılarak benzerlik oranları ve filogenetik ilişkileri ortaya konmuştur. Ayrıca bu CarMV izolatlarının bazılarının otsu bitkilere inokülasyonları yapılarak biyolojik özellikleri belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Karanfil, karanfil beneklenme virüsü, RT-PCR, kılıf protein geni, DNA dizileme ve analizi

2011, 62 sayfa

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *CARNATION MOTTLE VIRUS* (CarMV) OF ISOLATES IN CARNATION PRODUCTION AREAS IN ANTALYA AND ISPARTA

Tuğba BAKIR

Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bayram ÇEVİK

Carnation has an important place in cut flowers production in Turkey and the world. There are many fungal, bacterial and viral diseases causing economic losses in carnation. Among viral pathogens *Carnation mottle virus* (CarMV), commonly found in many carnation producing countries. In a previous study the presence of CarMV was determined in carnation production areas of Antalya and Isparta by two-step reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR). In this study, total of 33 samples were collected from 6 different carnation production greenhouses in Isparta and Antalya. Total nucleic acid was isolated from samples using CTAB method. Then, these samples were tested for presence of CarMV by RT-PCR method amplifying the CP genes and it was determined that 31 of 33 samples were infected with CarMV. In this study, ten different isolates representing Isparta and Antalya were selected and CP gene of these isolates were cloned in to pGEM T Easy by T-A cloning approach. After the transformation of the *Escherichia coli* a number of colonies potentially carrying the CarMV CP genes were obtained. For each sample at least five white colonies were screened by colony PCR and at least two colonies carrying the pGEM-T Easy plasmid with the CarMV CP gene were identified. Plasmids were isolated from these colonies and of the presence of CarMV CP gene in the plasmids was confirmed by *EcoRI* digestion. The CP genes were sequenced and their nucleotide and deduced amino acid sequences were determined. Similarity and phylogenetic relationship of the CP gene of Turkish CarMV isolates with each other and with the CP genes of CarMV isolates from different regions of the world were determined using the nucleotide and amino acid sequences. In addition, by making some of these CarMV isolates harbeceous plants, biologic properties of isolates were determined.

Key words: Carnation, carnation mottle virus, RT-PCR, coat protein gene, DNA sequence and analyze

2011, 62 pages

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında zengin bakış açısı ile beni aydınlatan, bilgi ve tecrübesiyle karşılaşılan güçlüklerin aşılmasında yardımcı olan ve göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Bayram ÇEVİK'e, tecrübelerini paylaşan ve her konuda bana destek olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehtap ŞAHİN-ÇEVİK hocama teşekkürlerimi sunarım.

Tez jürime katılan Sayın Doç. Dr. Nejla YARDIMCI hocama ve fikirleri ile beni destekleyen tüm bölüm hocalarıma, destek ve yardımlarıyla beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan çok değerli laboratuvar çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde en büyük desteğim olan sevgili aileme anneme, babama ve kardeşime çok teşekkür ediyorum.

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi (SDÜ BAP) tarafından desteklenen 2787-YL-11 nolu proje kapsamında yürütülmüştür.

Tuğba BAKIR
ISPARTA, 2011

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Türkiye’de kesme çiçek üretimi yapılan iller (Doldur, 2008)	4
Şekil 2.1. <i>Dianthus barbatus</i> bitkisinde CarMV’ünün oluşturduğu nekrotik lokal lezyonlar	10
Şekil 2.2. a) <i>Chenopodium amaranticolor</i> ve b) <i>Chenopodium quinoa</i> bitkilerinde CarMV’nün oluşturduğu lokal lezyonlar	11
Şekil 2.3. Karanfil beneklenme virüsü (CarMV)’nün elektron mikroskopuyla çekilmiş görüntüleri	12
Şekil 3.1. CarMV’ünün karanfil yapraklarında yol açtığı beneklenme	20
Şekil 3.2. CarMV’ünün karanfilde neden olduğu gelişme geriliği ve çiçeklerde görülen küçülme	20
Şekil 3.3. Virüsün kılıf protein genlerinin korunmuş bölgelerine spesifik primerler.....	21
Şekil 3.4. İndikatör bitkilerin yetiştirilmesi	30
Şekil 3.5. Mekanik inokulasyon çalışması	32
Şekil 4.1. Total RNA izolasyon sonucunu gösteren jel fotoğrafı	34
Şekil 4.2. Karanfil üretim alanlarından elde edilen izolatlardan CarMV’ne ait yaklaşık 1000 bp uzunluğundaki kılıf protein geninin çoğaltıldığını gösteren jel fotoğrafı	35
Şekil 4.3. Transformasyonu yapılan <i>E. coli</i> bakterilerinin ampisilin ve X-gal içeren LB besi ortamında oluşturdukları mavi beyaz koloniler	38
Şekil 4.4. Seçilen beyaz kolonilerin daha sonra kullanılmak üzere tekrar büyütüldüğü petri	38
Şekil 4.5. Farklı CarMV izolatlarının kılıf protein genlerini içeren kolonilerin belirlenmesi için yapılan koloni PCR yardımı ile yaklaşık 1200 bp’lik bantların elde edildiğini gösteren jel fotoğrafları	40
Şekil 4.6. <i>EcoRI</i> restriksiyon enzimiyle yapılan kesimden sonra pGEM-T Easy plazmitlerinin CarMV’nün 1000 bp’lık kılıf protein genini içerdiğini gösteren jel fotoğrafları	41
Şekil 4.7. CarMV’nün kılıf protein genine ait çoklu dizi karşılaştırması	43

Şekil 4.8. CarMV'nün kılıf protein genlerinin amino asit dizilimlerine ait çoklu dizi karşılaştırması	47
Şekil 4.9. CarMV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilerinin TreeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı	51
Şekil 4.10. Dünyadaki CarMV izolatları ile ülkemizdeki CarMV izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizi karşılaştırmalarının TreeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı	52
Şekil 4.11. a) Sağlıklı <i>Chenopodium amaranticolor</i> bitkisi ve b) CarMV'ünün <i>C. amaranticolor</i> bitkisinde oluşturduğu lokal lezyonlar	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Isparta ilindeki farklı üretim seralarından toplanmış olan karanfil izolatları.....	19
Çizelge 4.1. Antalya ve Isparta illerindeki CarMV izolatları ile dünyadaki CarMV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimlerinin karşılaştırılması	45
Çizelge 4.2. Antalya ve Isparta illeri CarMV izolatları ile uluslar arası CarMV izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizilimlerinin karşılaştırılması	49

1. GİRİŞ

Geçmişten bu yana insanlar için sevgi, dostluk, mutluluk duygusu veren çiçekler küreselleşen dünyada bir süs bitkisi olmaktan çıkıp ekonomik değeri olan bir tarım ürünü haline gelmiştir. Dünya’da pek çok ülke bunun farkına varmış ve çiçek yetiştiriciliğinden para kazanır duruma gelmiştir. Süs bitkileri üretim ve pazarlaması son 40 yılda dünyada ve Türkiye’de çok hızlı bir gelişme ve değişim göstermiştir. Gelişmiş ülkelerde yeni teknik ve teknolojiler devreye girerken, Afrika, Asya ve Güney Amerika’daki gelişmekte olan ülkeler iklim ve ekolojik avantajlarını süs bitkileri üretiminde kullanarak ülke ekonomilerine önemli katkılar sağlamaya başlamışlardır (Groot, 1998).

Süs bitkileri; kesme çiçek, iç mekan (saksılı) süs bitkileri, dış mekan süs bitkileri ve doğal çiçek soğanları olmak üzere dört farklı gruba ayrılan bir sektördür. Bu sektör içinde üretim miktarı olarak ve değer bakımından en büyük paya sahip olan grup kesme çiçeklerdir. Kesme çiçek genellikle buket, sepet, çelenk ve arajmanlarda kullanılan, çiçek, gonca, dal ve yaprakların taze, kurutulmuş, boyanmış veya ağartılmış olarak kullanıma sunulmuş durumlarını ifade eden bir kavramdır. Kesme çiçek yetiştiriciliğinin konuları arasında bu ürünlerin yetiştirilmesi, toplanması, işlenmesi, sınıflandırılması, depolanması ve pazarlanması gibi faaliyetler yer almaktadır (Kazaz, 2006).

Günümüzde gelişmiş ülkeler yanında Afrika, Asya ve Güney Amerika’daki gelişmekte olan bazı ülkeler sahip oldukları ekolojik avantajlar yanında ucuz işgücü ve ulaşım olanaklarını da kullanarak süs bitkileri üretimine yönelmişlerdir. Dolayısıyla kesme çiçek üretimi ve ticareti Hollanda gibi geleneksel çiçek ülkesi yanında, Kolombiya, İsrail, Hindistan, Kenya ve Ekvador gibi bazı ülkelerde de çok önemli boyutlara ulaşarak kesme çiçekler artık bu ülkelerinde önemli ihraç ürünleri arasında yer almıştır (Doldur, 2008).

Kesme çiçek üretimi başlangıçta ABD, Hollanda ve Japonya gibi gelişmiş ülkelerde hızla yayılmasına rağmen bugün Dünya’da 50’den fazla ülke kesme çiçek üretimi

yapmaktadır. Günümüzde ise en fazla üretim Hollanda'da yapılmakta olup Hollanda kullandığı ileri teknoloji sayesinde üretimin yanı sıra tekrar ihraç (re-export) yoluyla dünya sıralamasında ihracatta da önde gelen ülke konumundadır (Aydınşakir, 2009). Hollanda'da Rabo Bank tahminlerine göre, 1998 yılında dünyada süs bitkileri endüstrisinin getirisi 50 milyar dolardan fazladır. Bu toplam içerisinde; kesme çiçekler 24,7 milyar dolar ile ilk sırayı almaktadır (Groot, 1998). Günümüzde ise Dünya'da toplam süs bitkileri üretim ve ticaretinin 60 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir. Bunun yaklaşık 35 milyar dolarını kesme çiçekler oluşturmaktadır (Aydınşakir, 2009).

Kesme çiçek yetiştiriciliği Türkiye'de önemli bir tarım sektörünü oluşturmaktadır. Ülkemizde bulunan kesme çiçek üretim alanları incelendiğinde kesme çiçek üretiminin Marmara Bölgesinde Yalova, Ege Bölgesinde İzmir, Akdeniz Bölgesinde ise Antalya ve Mersin civarında yoğunlaştığı görülmektedir. Ayrıca Karadeniz Bölgesinde de Samsun civarında kesme çiçek yetiştiriciliğinin yayılmaya başlamıştır. Yalova, Mersin, Samsun ve İzmir'de genellikle iç pazara yönelik üretim yapılırken Antalya'da ise çoğunlukla dış pazara yönelik üretim yapılmaktadır. Üretim alanlarına göre Türkiye'de süs bitkileri arasında ağırlıklı olarak karanfil üretilmektedir. Artan dış pazar talebini karşılamak amacıyla karanfil üretimi hızlı bir şekilde artarak toplam kesme çiçek üretiminin %52'sine ulaşmıştır. Son yıllarda bu oran daha da artmakta olup 2005 sezonu itibarıyla toplam üretimin %60'ını oluşturmaktadır. Üretimde diğer önemli kesme çiçek çeşitleri %14 üretim payı ile gül ve %10 üretim payı ile gerbera oluşturmaktadır (Anonim, 2010).

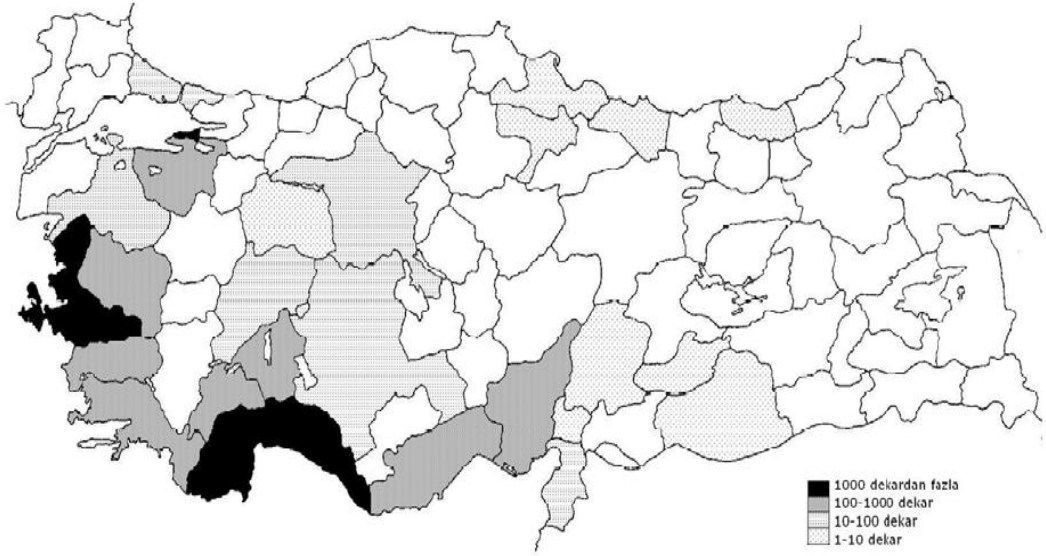
Karanfil; *Caryophyllaceae* (Karanfilgiller) familyası, *Dianthus* cinsi içinde yer alan bir türdür ve anavatanı Akdeniz Havzasıdır. Yaklaşık 2000 yıldan daha fazla bir süredir karanfil yetiştiriciliği yapılmaktadır. *Dianthus*'un Güney Avrupa, Asya ve Kuzey Afrika'nın ılıman bölgelerine dağılmış olan 300'ün üzerinde türü bulunmaktadır (Tiryakioğlu, 2006).

Karanfil, ülkemiz koşullarında rahatlıkla yetiştiriciliğinin yapılabilmesi ve ihracat bakımından önemli bir yere sahip olması nedeniyle kesme çiçek sektöründe en önde gelen ürünler arasında yer almaktadır (Alagöz vd., 2006).

Ülkemizde karanfil üretiminin en yaygın olduğu Antalya ve İzmir'de üretimin %97'si plastik seralarda gerçekleştirilmektedir. Akdeniz bölgesinin ikliminin ılımlı olması ve bol ışık alması nedeniyle plastik seralarda karanfil yetiştiriciliği ısıtmaya gerek duyulmadan yapılabilir (Taşcıoğlu ve Sayın, 2003). Karadeniz bölgesi ise yaz aylarında serin ve nemli iklimi ile yazlık karanfil yetiştiriciliğinde iyi bir bölge olması gerekirken teknik bilgi ve üretim materyali eksikliğinden yeterince üretim yapılmamaktadır. Kesme çiçek yetiştiriciliğinde kullanılan türlerin çoğaltılmasında çelik köklendirme, aşı ve tohumla çoğaltma gibi klasik yöntemlerin yanında, doku kültürü gibi modern vejetatif çoğaltım yöntemleri de kullanılabilir. İhracata yönelik üretim yapan işletmeler, özellikle karanfil için damızlık hatlar satın alma ve bunlarla kurdukları damızlık seralarından çiçek üretim materyali ihtiyaçlarını karşılamaya çalışmaktadırlar. Ancak hem damızlık hatlar ve hem de üretim materyali ihtiyacı yurt dışından sağlanmaktadır.

Ülkemizde başta karanfil olmak üzere kesme çiçek yetiştiriciliği ve ihracatının merkezi Antalya'dır. Ancak hava sıcaklıklarının yüksekliğinden dolayı Antalya ilinde ise yaz sezonunda üretim yapılamamaktadır. Antalya'da karanfil dikimleri Haziran-Temmuz aylarında yapılmakta olup çiçeklenme ise Ekim-Mayıs ayları arasında gerçekleşmektedir. Dolayısıyla, Antalya'da Temmuz-Ekim ayları arasında aşırı sıcak ve nem gibi olumsuz iklim koşulları nedeniyle üretim boşluğu yaşanmaktadır. Bu yüzden dönem içerisinde bu yöreden yapılan ihracat kesintiye uğramaktadır. Bu durum ise özellikle yurtdışı alıcılarının başka pazarlara yönelmesine sebep olmaktadır. Bu kesintinin giderilmesi ve elde edilmiş olan yurtdışı pazarlarının kaybedilmemesi için alternatif üretim bölgelerinin oluşturulması gereği ortaya çıkmıştır. Isparta ilinin Antalya'ya yakın oluşu, yüksek rakımı (1050 m) ve yaz aylarındaki uygun ekolojisi yanında çiftçilerin ve kamuoyunun büyük ilgisi nedeniyle Isparta alternatif üretim bölgeleri arasında önem kazanmıştır. Bu nedenle 2002 yılında Isparta'da ihracata yönelik karanfil üretimine başlanmış olup

Antalya'nın üretim yapmadığı yaz aylarında Isparta'da yayla şartlarında karanfil yetiştirilmektedir. Isparta'nın Antalya'da üretimin bittiği aylarda devreye girmesi sayesinde yıl boyu karanfil üretimi ve ihracatına olanak sağlanmıştır. Giderek yaygınlaşan yazlık karanfil üretimiyle Isparta'nın önümüzdeki yıllarda Antalya'ya ciddi bir alternatif olması beklenmektedir (Özkan ve Karagüzel, 1997; Gürsan, 2002; Kazaz, 2006).



Şekil 1.1. Türkiye'de kesme çiçek üretimi yapılan iller (Doldur, 2008)

Antalya Bölgesinde yüksek kaliteli ve ihracata yönelik kesme çiçek üretimi yapılmaktadır. 2008 yılı TUIK istatistiklerine göre Türkiye'nin kesme çiçek ihracatının %86'sı Antalya'dan, %11'i İzmir'den, %2'si Yalova'dan, %0,25'i Isparta'dan ve %1'i diğer illerden yapılmaktadır (Anonim, 2010). Türkiye'de 1995 yılında 280 milyon adet, 1999 yılında ise 406,8 milyon adet kesme çiçek üretilmiştir. Üretilen bu çiçeklerin 231 milyonu iç pazarda tüketilirken, 175 milyon adet kesme çiçek ise (1998) yurt dışına ihraç edilmiştir. Kesme çiçek ihracatından elde edilen döviz miktarı 1998 yılında 13,5 milyon dolar olmuştur. İhracatın %90'dan fazlasını spreyci karanfil oluşturmakta ve ihracatın %65-70'i İngiltere'ye yapılmaktadır.

Dünyanın birçok ülkesinde olduğu gibi ülkemizde de son 25 yılda süs bitkileri ekonomiyeye katkı sağlayan tarımsal üretimin önemli bir kolunu oluşturmaktadır.

Ayrıca kullandığı işgücü miktarı açısından da sosyal yaşamdaki katkısı büyüktür. Ülkemiz birçok süs bitkisinin gen kaynağı olmakla beraber, iklim ve toprak özellikleri bakımından da birçok türün yetiştiriciliğine çok uygun olmasına rağmen bu sektördeki gelişmede istenilen seviyelere ulaşamamıştır (Aydinşakir, 2009). Bunun nedenleri arasında işletmelerdeki alt yapı yetersizlikleri, kesme çiçek üretim ve ihracatı için bağımsız bir teşvik ve uygulama politikasının olmayışı, dış pazarlardaki kıyasıya rekabet koşulları, tek ürün (karanfil) ve tek pazar (İngiltere) oluşu ve küçük ölçekli fazla sayıda ihracatçının kendi aralarında rekabete girmeleri, Akdeniz ve Ege bölgelerinde sebze ürünlerinin kesme çiçeklere alternatif olması, ihracatta nakliyenin çok pahalı olması yanında bazı hastalıklardan dolayı ürün kalitesinin rakip ülkelere göre daha düşük olması sayılabilir (Anonim, 2001).

Karanfil yetiştiriciliğinde ekonomik kayıplara neden olan birçok fungal, bakteriyel ve viral hastalıklar bulunmaktadır. Bu hastalıkların verim ve kaliteye yaptıkları olumsuz etkilerden dolayı üretim ve ihracat istenilen düzeyde değildir. Viral hastalıklardan karanfil beneklenme virüsü (*Carnation mottle virus*, CarMV) karanfil yetiştirilen birçok ülkede yaygın olarak bulunmaktadır. CarMV dünyada karanfil yetiştiriciliğinde ekonomik kayıplara neden olan bir hastalık etmenidir (Cañizares et al., 2001; Singh et al., 2005; Safari et al., 2009). Bu hastalık etmeni karanfil üretiminde verimi ve kaliteyi olumsuz yönde etkilemekte olup ekonomik değeri düşürmektedir. Ülkemizde karanfil yetiştirilen seralarda verim ve kalitenin diğer ülkelere göre düşük olmasının en önemli nedenlerinden birisinin virüs hastalıkları olduğu düşünülmektedir. Buna karşın ülkemizde karanfil virüslerinin varlığına ve yaygınlığına yönelik yeterince araştırma yapılmamıştır. Bu nedenle ülkemiz karanfil üretim alanlarında virüs hastalıklarının varlığı ve yaygınlığı kesin olarak bilinmemektedir. Günümüzde Antalya ve Isparta'da giderek gelişmekte olan kesme çiçekler arasında önemli bir yere sahip olan karanfil sektöründe verim ve kaliteyi artırmaya, önemli karanfil hastalıkları ile mücadeleye yönelik çeşitli çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla daha önce yaptığımız bir çalışmada Antalya'da karanfil üretim alanlarında CarMV'nün varlığı gösterilerek teşhisi ve tanılanması yapılmıştır. Daha sonra virüsün Isparta bölgesinde de olduğu gösterilerek bölgede yetiştirilen karanfil çeşitlerinde de yaygın olarak bulunduğu gösterilmiştir. Bu

Çalışmada ise Antalya ve Isparta bölgesinde karanfil yetiştiriciliğinde verim ve kaliteyi olumsuz etkilediği düşünülen viral etmenlerden biri olan CarMV izolatlarının kılıf protein genlerini klonlayıp dizilimi belirlenerek ülkemizde ilk olarak CarMV'nn moleküler karakterizasyonu yapılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Karanfil Hastalıkları

Dünyada ve ülkemizde karanfil yetiştiriciliğinde ekonomik kayıplara neden olan birçok hastalık bulunmaktadır. Bu hastalıkların önemlileri arasında *Rhizoctania solani*, *Fusarium culmorum*, *Alternaria dianthi*, *Phytophthora spp.* ve *Phytum spp.*, *Fusarium oxysporum*, *Uromyces dianthi* ve *Botrytis cinerea* gibi fungal etmenler, *Erwinia chrisanthemi* ve *Pseudomonas caryophylli* gibi bakteriyel hastalıklar bulunmaktadır. Ayrıca karanfil yetiştiriciliğinde verim ve kaliteyi olumsuz etkileyen çok sayıda virüs hastalığı bulunmaktadır. Bu hastalıklardan pek çoğu meristem kültürü ve termoterapi (ısı uygulaması) yöntemleriyle ticari çeşitlerden temizlenmiştir (Gosalvez-Bernal et al., 2006). Ancak bu virüslerin bazılarının böceklerle taşınmasından dolayı dünyada karanfil yetiştirilen bölgelerde bu hastalıklara rastlanmakta olup virüs hastalıkları bu bölgelerde verim ve kaliteyi azaltarak önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Bennet and Milne, 1976; Gürsan, 1988; Sánchez-Navarro et al., 1999; Raikhy et al., 2006). Karanfilde yaygın olarak görülen virüs hastalıkları ve oluşturdukları belirtiler aşağıda belirtilmiştir.

2.1.1. Karanfil virüs hastalıkları

Karanfil baskı halka virüsü (*Carnation etched ring virus*, CERV): CERV bitki virüslerinin *Caulimovirus* grubunun bir üyesidir (Hull et al., 1984). CERV enfeksiyonunun oluşturduğu belirtiler bazen CarMV'nün yol açtığı belirtilere benzemekte olup birbirleriyle karıştırılmaktadır. CERV karanfil bitkilerinde gövdenin beneklenmesine ve damarlaşmasına yol açmakta olup aynı zamanda yapraklarda kahverengi lekelere, halkalara ve sararma gibi daha şiddetli belirtilere de neden olmaktadır. Ayrıca enfekteli bitkiler geç çiçeklenmekte ve çiçek kalitesi de azalmaktadır. Belirtiler ilk çıkan bitki tomurcuklarında hafif olabilmekte ve bitki canlılığı üzerinde açık bir etkisi olmamaktadır (Anonymous, 2005). Ayrıca CERV belirtileri mevsimlere göre değişiklik göstermekte olup virüs yaprak bitleri, mekanik

inokulasyon ve aşılama yolu ile taşınabilmektedir. Bitkilerin teması ve tohum ile taşınması söz konusu değildir (Anonim, 2008).

Karanfil damar benek virüsü (*Carnation vein mottle virus, CVMV*): CVMV karanfil yaprakları üzerinde sarı lekelenme ve benek desenleri oluşturmaktadır. Enfekteli bitkilerin genç yapraklar üzerinde genellikle damarlar üzerinde koyu yeşil renkli noktalar ve lekelenmeler görülmektedir. CVMV virüsü ile enfekteli bitkilerde renk kırılmalarının meydana geldiği verimin azaldığı ve kaliks çatlamasının büyüklüğünde artış gözlenmiştir. Belirtiler yaşlı yapraklarda genellikle kaybolmaktadır (Anonymous, 2005). Etmen virüs vektör böcekleri ve mekanik inokulasyon yoluyla taşınmaktadır. Ancak bitkilerin teması ile taşınma olmamaktadır (Anonim, 2008).

Karanfil halkalı leke virüsü (*Carnation ring spot virus, CRSV*): CRSV karanfil yapraklarında bazen konsantrik, 1-2 cm çapında küçük halkalara yol açarken bazen de genç yapraklarda deformasyona, beneklenmeye ve sararmaya neden olmaktadır (Anonymous, 2005). Bunların yanında bu hastalıkla enfekteli bitkilerde genel olarak bodurluk ve şekil bozukluğu yanında çiçeklerde de şekil bozuklukları görülmektedir (Anonim, 2008). İlk olarak *Dianthus spp.*, bitkilerinde bildirilmiş olup hastalık etmeni nematodlar tarafından taşınmaktadır. Ayrıca virüs mekanik inokulasyon, aşı ve bitkilerin birbiri ile temasıyla taşınmakta olup tohumla taşınması söz konusu değildir. Hastalık etmenini dünyada karanfil yetiştiriciliği yapılan birçok yerde görmek mümkündür. (Anonim, 2008).

Karanfil gizli virüsü (*Carnation latent virus, CLV*): CLV karanfil bitkileri üzerinde belirgin bir belirti oluşturmamasına rağmen çiçek kalitesini düşürerek bitkisel üretimi olumsuz olarak etkilediği kanıtlanmıştır (Anonymous, 2005). Enfekteli bitkilerin genelde belirti göstermemesine rağmen bazen nekrotik beneklenmeyi ve çizgileri görmek mümkün olabilmektedir (Anonim, 2008). Ancak hastalık belirtileri mevsimlere göre değişiklik göstermektedir. CLV yaprak bitlerinden doğal olarak *Myzus persicae* ile taşınmakla birlikte (Kassanis, 1956) mekanik inokulasyon ve aşılama yolu ile de taşınabilmektedir. Fakat CLV bitkilerin teması ve tohum ile

taşınmamaktadır.

Karanfil çizgi virüsü (*Carnation streak virus*, CSV): Karanfil çizgi virüsü ilk olarak *Dianthus spp.* karanfillerinde bildirilmiştir. Belirtileri yapraklarda beneklenme, nekrotik gri yada kırmızı nekrotik çizgiler şeklinde olmaktadır. Deneysel olarak inoküle edilen bitkilerde ise damar açılması ve beneklenme şeklinde görülmektedir. Hastalık etmeni afit vektörleriyle yarı persistent olarak taşınmaktadır. Ayrıca zor taşındığı bildirilmekle birlikte virüs mekanik inokülasyon yoluyla da taşınmasına rağmen bitkilerin teması ile taşınmamaktadır (Anonim, 2011).

2.1.1.1. Karanfil beneklenme virüsü (*Carnation mottle virus*, CarMV)

Karanfil beneklenme virüsü (CarMV) karanfilde görülen diğer virüs hastalıklarının içinde en önemli ve yaygın olan bir virüsdür. CarMV üretim alanlarında önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Singh et al., 2005).

2.1.1.2. Hastalığın bulunuşu, yaygınlığı ve konukçuları

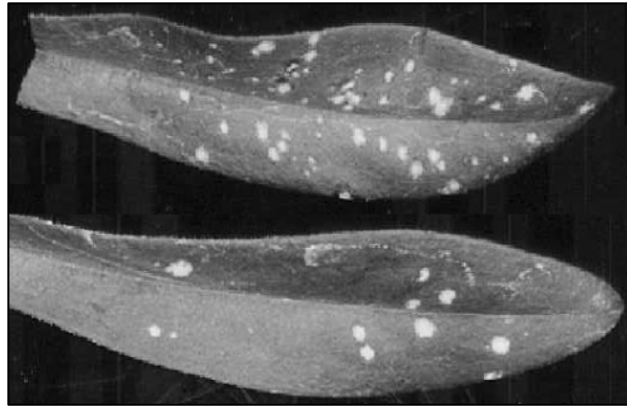
Hastalık etmeni ilk olarak *Dianthus spp.* bitkilerinde bildirilmiştir. Virüsün bazı konukçuları arasında *Dianthus caryophyllus*, *D. barbatus*, *Begonia spp.*, *Chenopodium amaranticolor* ve *Chenopodium quinoa* bulunmaktadır. CarMV, geniş bir konukçu dizisine sahip olup karanfiller, begonya, pervane çiçeği, çöğen, Medine çiçeği, petunya, horozibiği, defne gibi çok sayıda çiçek türünü enfekte etmektedir (Anonymous, 2007).

Karanfil beneklenme virüsü nispeten karanfile özgü bir virüs olarak kabul edilmesine karşın Danimarka'dan *Begonia elatior* ve Yeni Zellanda'dan *Daphne sp.* gibi diğer süs bitkileri üzerinde de doğal enfeksiyon oluşturduğu rapor edilmiştir (Singh et al., 2005). CarMV dünya çapında yayılan ve termoterapi veya meristem kültür ile karanfil virüsleri içerisinde en zor elimine edilen ve sağlıklı ürünlere giriş yaptıktan sonra hızlıca yayılan bir virüsdür (Sánchez-Navarro et al., 2007). Kaliforniya'da yapılan bir çalışmada çiçek üretim seralarında CarMV %78 gibi yüksek bir oranda

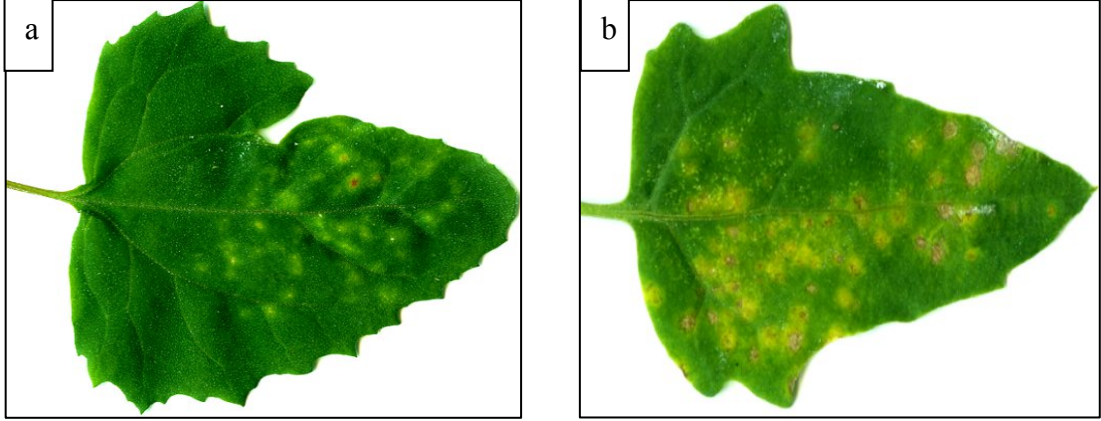
enfeksiyon yaptığı rapor edilirken Lübnan ve diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda hastalığın %100'e yaklaşan oranlarda yaygın olduğu bildirilmiştir (Singh et al., 2005).

2.1.1.3. Hastalığın belirtileri

Karanfil beneklenme virüsü belirtileri gözle kolaylıkla görülmediğinden dolayı anlaşılması güç bir hastalıktır. Ancak bitkinin yaprağı ışığa tutulduğu zaman virüsün yol açtığı düzensiz lekeler zor da olsa görülebilir. Yapraklarda hafif simptomlar oluşturmasına rağmen diğer patojenler tarafından da enfekte edildiği zaman bitkiyi zayıflatmaktadır (Safari et al., 2009). CarMV hafif belirtiler oluşturmasına karşın karanfillerin tüm çeşitlerinde ciddi enfeksiyonlara da sebep olmakta ve enfekteli bitkiler hafifçe bodurlaşmaktadır. Aynı zamanda virüs karanfilde yaş ağırlık, toplam çiçek sayısı ve yan sürgün sayısının azalmasına neden olarak verimliliğin düşmesine neden olmaktadır. Buna ek olarak virüs bazı durumlarda çiçeklerin canlılığının azalmasına ve küçülmesine neden olarak karanfil çiçeklerin düşük kalitede olmasına da yol açmaktadır. Virüs enfeksiyonu karanfilde sadece çiçek kalitesini ve raf ömrünü etkilemekle kalmayıp enfekteli bitkilerin doğada bulunan diğer patojenlerin enfeksiyona karşı hassas hale getirmektedir (Singh et al., 2005).



Şekil 2.1. *Dianthus barbatus* bitkisinde CarMV'nün oluşturduğu nekrotik lokal lezyonlar (Garcia-Castillo et al., 2001)



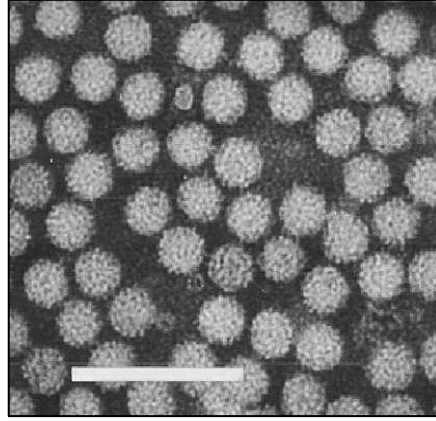
Şekil 2.2. a) *Chenopodium amaranticolor* ve b) *Chenopodium quinoa* bitkilerinde CarMV'nün oluşturduğu lokal lezyonlar (Garcia-Castillo et al., 2001)

2.1.1.4. Hastalığın taşınma yolları

Karanfil beneklenme virüsü temas yoluyla ve hasat işlemi sırasında kolayca taşınabilmektedir (Singh et al., 2005). Bunun yanında virüs deneysel olarak mekanik inokulasyon ve aşı gözü ile de bulaşmaktadır. Ancak CarMV tohumla veya vektörler ile taşınmamaktadır (Anonim, 2008).

2.1.1.5. Karanfil beneklenme virüsünün partikül morfolojisi ve genom yapısı

Karanfil beneklenme virüsü (*Carnation mottle virus*, CarMV), *Tombusviridae* familyasından *Carmovirus* grubunun bir üyesidir (Raikhy et al., 2006). Karanfil beneklenme virüsü CarMV tek sarmal pozitif duyarlıkta yaklaşık 4.0 kilobases (kb) RNA genomu içerir (Guilley et al., 1985). Virüs 30 nm çapında küresel veya yuvarlak (Ikozehedral) yapıda vironlara sahiptir (Garcia-Castillo et al., 2001). CarMV'nün tüm genom dizilimi virüs genomunun beş açık okuma çerçevesi (ORFs) içerdiğini göstermiştir. ORF1 ve ORF2 p27'nin sonunda stop kodonun okumasıyla (readthrough) kodlanan p86 olan aynı başlama kodonunu paylaşmaktadır (Cañizares et al., 2001).



Şekil 2.3. Karanfil beneklenme virüsü (CarMV)'nün elektron mikroskopuyla çekilmiş görüntüleri (<http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/ICTVdB/00.074.0.02.001.htm>)

2.1.1.6. Karanfil beneklenme virüsünün tanılanması ve tanılanma yöntemleri

Buğday filizi (wheat germ) ekstratlarıyla yapılan *in vitro* translasyon çalışmalarıyla CarMV'nün RNA'sından 77 kDa (CP-I), 38 kDa (CP-II) ve 30 kDa (CP-III) olmak üzere üç ayrı polipeptit zincirleri sentezlendiği belirlenmiştir. Bu üç polipeptiti kodlayan RNA büyüklüğü, hemen hemen viral RNA'nın tüm uzunluğunu ifade etmekte olup tüm genomun bu üç proteini kodladığı düşünülmüştür. *In vitro* koşullarda yapılan denatüre poliakrilamid jel elektroforezi altında peptit haritalamayla ve denatüre edilmiş virüs partiküllerine karşı geliştirilen antikorlar kullanılarak yapılan immunopresipitasyon yöntemleriyle CP-II proteininin viral kılıf proteini olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca CP-I ve CP-II proteinlerinin denatüre edilmiş virüs partiküllerine karşı geliştirilen antikorlar arasında çapraz reaksiyon olmaması viral RNA'nın 3' ucunun *Escherichia coli* polinükleotit fosforilaz tarafından parçalanmasıyla virüsün enfekte edebilme yeteneğini kaybetmesi ve 77 kDa protein ürününün seçici olarak kaybolmasına neden olmuştur. Bu gözlemler, viral RNA'nın polysistronik olduğunu göstermekte ve CarMV'nün RNA 3-terminus yapısı viral RNA zincirlerinin translasyonunu düzenleyici bir role sahip olabileceği gösterilmiştir (Salomon et al., 1978).

CarMV'nün genomunun çoğunu temsil eden 3850 uzunluğunda bir cDNA parçası, plazmid-primer yönteminin bir modifikasyonunu kullanarak *E. coli* bakterisine klonlanmıştır. 3250 bp ve 1950 bp büyüklüğünde birbirleriyle örtüşen (overlapping) iki cDNA klonu tanımlanarak Bgl II enzimiyle kesilip birleştirilerek CarMV genomunu içeren pCarMV-1C plazmidi elde edilerek klonlama tamamlanmıştır. Bu plazmidin CarMV'nün cDNA dizilerini içerdiği random primerler kullanılarak sentezlenen bir cDNA probu kullanılarak Southern blot hibridizasyon yöntemiyle teyit edilmiştir. *Chenopodium quinoa* yaprak özlerinden ve virionlardan elde edilen total tek iplikli RNA'lar pCarMV-1C'dan sentezlenen proba Northern blot hibridizasyonuna tabii tutulmuştur. Hibridizasyon sonucunda tam uzunlukta genomik RNA'nın yanı sıra, CarMV ile ilişkili yaklaşık 1600 bp ve 1750 bp iki RNA bulunmuş ve RNA'ların virüs genomu 3' ucundan ortaya çıkan subgenomik RNA'lar olduğu belirlenmiştir (Carrington and Morris, 1984).

In vitro koşullarında CarMV'nün translasyon stratejisi genellikle tam uzunlukta genomik RNA (4.3 kb) içsel başlama olaylarıyla açıklanmıştır. 1984 yılında yapılan bu çalışmada bunun en azından kısmen doğru olmadığı gösterilmiştir. Denatüran sükröz gradiyan yöntemiyle ayrıştırılan kılıf proteiniyle kaplanmış RNA yada CarMV'nün enfekteli yapraklarında elde edilerek denatüre edilmeyen koşullarda ayrıştırılan toplam RNA'dan mRNA'ya bağımlı bir tavşan retikülosit hücre sisteminde protein sentezinde kullanılmıştır. Yaklaşık 38 kDa büyüklüğünde kılıf proteinini kodlayan subgenomik RNA'lar için kanıtlar bulunmuştur. α -kimotripsin ile kısmi yapılan proteoliz ve SDS/polyacrilamide jel elektroforezi sonucunda bu proteinin otantik CarMV kılıf protein ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Harbison et al., 1984).

CarMV'nün genomik ve subgenomik RNA'larının *in vitro* translasyon ürünleri bir tavşan retikülosit lizat sistemi kullanılarak analiz edilmiştir. Viral RNA'lardan p80, p40 ve p34 olmak üzere üç ana polipeptit sentezlenmiştir. Virion RNA'sı kalıp olarak kullanıldığında baskın ürünü elde edilen p40 proteininin SDS-poliakrilamid jel ve anti-CarMV serum ile immunoprecipitasyon yoluyla CarMV kılıf proteini olduğu tespit edilmiştir. Sükröz gradient santrifüj sonrasında fraksiyonu yapılan

virion RNA'larından yapılan translasyon analiz ile p40 p80 ve p34 kDa büyüklüğünde protein sentezlenerek bunların subgenomik RNA tarafından kodlanmış olduğu bulunmuştur. α -kimotripsinle yapılan proteoliz sırasında oluşan kesilmiş peptitlerin analizi ile p80 ve p34 ortak veya örtüşen (overlapping) amino asit dizileri içerdiği bulunmuştur. Bu veriler CarMV'nün alternatif translasyon mekanizmalarına sahip olduğunu desteklemektedir (Carrington and Morris, 1985).

Karanfil beneklenme virüsünün genomik RNA'sının (4003 nükleotit) tamamının dizilimi yapılmıştır. Dizileme genomun %99'undan fazlasını içeren viral RNA'nın klonlanmış cDNA kopyalarından RNA ile cDNA transkriptlerinin doğrudan dizilenmesiyle tamamlanmıştır. Genom dizisi birlikte gözlenen iki farklı proteinin translasyonu için iki uzun açık okuma çerçevesi içermektedir. Sentezlenen proteinlerden biri amber sonlandırma kodunu baskılanmasıyla üretilirken diğerinin sentezinin de bir baskılama olayının meydana gelme olasılığının yüksek olduğu belirlenmiştir. Karanfil beneklenme virüsü genomunun bu bölümünün dizisi diğer RNA virüslerinden bulunan RNA polimerazlara yüksek oranda homoloji gösterdiği bulunmuştur (Guilley et al., 1985).

CarMV subgenomik RNA 5' uçlarının ortaya çıktığı genomik koordinatlar yüksek çözünürlük S nükleaz koruma ve primer uzaması haritalama teknikleriyle belirlenmiştir. İki 3' proksimal subgenomik RNA'lar 2532 ve 2315 nükleotitlerinde (genom 5' ucundan sayılarak) başlar. Bu RNA'lar sırasıyla 11472 ve 1689 nükleotitlerini içermektedir. İki subgenomik RNA'nın transkripsiyon başlama bölgelerini çevreleyen önemli nükleotit diziliminde önemli oranda homoloji bulunmuştur. 1.5 kilo baz RNA; viral kılıf proteinin sentezini başlatmak için ilk AUG'yi kullanmaktadır. 1.7 kb RNA'daki AUG: 183 nükleotitden oluşan kısa bir okuma çerçevesini başlatarak 6.7 kDa büyüklüğünde bir protein kodlamaktadır. SP6 transkripsiyon ve hücre dışı translasyon sisteminde daha önce tanımlanan CarMV gen ürünü p27 kodlayıcı diziler viral genomun 5' ucuyla ilişkilendirilmiştir (Carrington and Morris, 1986).

Karanfilde hastalığa yol açan ve içlerinde CarMV'nün de bulunduğu beş farklı virüsün tanılanması amacıyla radyoaktif olmayan bir moleküler hibridizasyon yöntemi geliştirilmiştir. Yapılan çalışmada bu yöntem karanfil virüslerinin tanılanmasında kullanılan standart ELISA ve biyolojik testlerle kıyaslanmıştır. Farklı yöntemlerin hassaslık düzeyleri karşılaştırıldığında ham bitki özütü kullanılarak yapılan teşhiste moleküler hibridizasyon tekniğinin DAS-ELISA'dan en az 125 kez daha duyarlı olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca bu metot çok fazla pipetleme ve santrifüj gerekliliğini ortadan kaldırarak çok fazla örneğin aynı anda test edilmesine olanak sağlamıştır. Sonuç olarak geliştirilen hibridizasyon yönteminin rutin virüs taraması için uygun bir metot olduğu gösterilmiştir (Sánchez-Navarro et al., 1996).

Karanfil beneklenme virüsünün tespiti için Hindistan'da yapılan bir çalışmada ülkenin farklı bölgelerinden toplanan 93 karanfil örneği serolojik yöntemlerden DAS-ELISA ile poliklonal IgG kullanılarak test edilmiştir. Çalışma sonucunda test edilen örneklerden yaklaşık 90 tanesinin CarMV pozitif olduğu bulunarak CarMV'nün Hindistan'da farklı karanfil üretim bölgelerinde yaygın olarak bulunduğu tespit edilmiştir. CarMV mekanik inokulasyon yoluyla seçici test bitkilerine aktararak diğer karanfil virüslerinden ayrı bir şekilde *Saponaria vaccaria* ve *Catharanthus roseus* bitkilerinde çoğaltılarak muhafaza edilmiştir. Virüs enfekteli test bitkilerinden saflaştırılarak SDS-PAGE yöntemiyle karakterizasyonu yapılarak yaklaşık 38 kDa kılıf proteini Western blotlama yoluyla tespit edilmiştir. Ayrıca, elektron mikroskobu ve immüno elektron mikroskobu yöntemleriyle virüsün morfolojisi araştırılarak elektron mikroskobunda 30 nm çapında izometrik virüs partikülleri gözlenmiştir. Bunun yanında RT-PCR yöntemiyle spesifik primerler kullanılarak virüsün kılıf ve hareket proteinlerini kodlayan genler çoğaltılmıştır. Ayrıca immüno yakalama RT-PCR (Immuno capture RT-PCR, IC-RT-PCR) yöntemi de CarMV tanısında daha hassas bir yöntem olarak kullanılmıştır (Singh et al., 2005).

İran son yıllarda süs bitkileri üretiminde ilerleyen bir ülke olup Mahallat bölgesi İran'da süs bitkileri üretim merkezlerinden en önemlilerinden biri konumundadır. 2008 yılı Ocak ve Nisan ayları boyunca Mahallat bölgesi karanfil seralarından hafif mozayik belirti gösteren 100 örnek toplanmış ve CarMV'ne spesifik poliklonal

antikor kullanılarak DAS-ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Sonuçlar bu örneklerin %75'inin CarMV ile enfekteli olduğunu göstermiştir. Ayrıca RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) ve kılıf protein genine spesifik bir çift primer kullanılarak enfekteli bitkiden total RNA izolasyonu ve RT-PCR yapılmıştır. Yapılan RT-PCR analizleri sonucunda enfekteli bitkilerden yaklaşık 1 kbp büyüklüğünde bantlar çoğaltılarak bitkilerin CarMV pozitif oldukları onaylanmıştır. Son olarak karanfil yapraklarından elde edilen CarMV izolatlarından bazıları fosfat tamponu (pH 7.0) kullanılarak *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor* ve *Spinacea oleracea* bitkilerine inoküle edilmişlerdir. Inokulasyondan 4-7 gün sonra test bitkilerinin yapraklarında klorotik ve nekrotik lokal lezyonlar oluştuğu saptanmıştır (Safari et al., 2009).

2.1.1.7. Karanfil beneklenme virüsü genlerinin dizilenmesi ve filogenetik analizleri

Karanfil beneklenme virüsünün genom yapısını belirlemek, moleküler karakterizasyonu yapmak ve virüs izolatlarının birbirleriyle olan genetik ilişkilerini ortaya koymak amacıyla virüsün tüm genomu veya genlerden bir veya birkaçının dizilimleri belirlenmiştir. CarMV'nün 4003 nükleotit uzunluğundaki tüm genom dizilimi ilk olarak ABD'nin Kaliforniya eyaletinde belirlendikten sonra İspanya, İtalya, Hollanda, Çin, Hindistan ve Tayvan gibi dünyanın bazı önemli karanfil üretim bölgelerinden CarMV izolatları belirlenerek tüm genom dizilimleri belirlenmiştir. Dünyanın farklı karanfil üretim alanından elde edilen izolatların tüm genomlarının replikaz, hareket ve kılıf protein genlerinin karşılaştırılması sonucunda izolatların birbirleriyle genetik ilişkileri belirlenmiştir. Aynı zamanda bu genlerin dizi karşılaştırmasıyla yapılan filogenetik analizleri sonucunda CarMV'nün *Tombusviridae* familyasında yer alan diğer cinsler içinde bulunan virüslerle ilişkisi olduğu ortaya konmuştur. Bunun sonucunda taksonomik sınıflandırmaya en uygun filogenetik gruplanmanın replikaz ve kılıf protein genlerinin karşılaştırılmasından elde edildiği bulunmuştur. Ayrıca 9 farklı ülkeden 23 farklı CarMV izolatının kılıf protein ve hareket protein genleri karşılaştırılarak bu izolatların genetik ilişkisi araştırılmıştır. Bunun sonucunda zaman ve yer olarak farklı izolatların birbirlerine benzer olduğu yüksek oranda genetik stabilite gösterdiği belirlenmiştir. Ancak kılıf

protein geninin aminoasit diziliminin 164. ve 331. pozisyonlarındaki amino asitlere göre sırasıyla prolin (P) ve lisin (K) içeren ve alanin (A) ve asparajin (N) içeren izolatlar PK ve AN olarak iki gruba ayrılmışlardır (Cañizares et al., 2001).

Hindistan’da yapılan bir çalışmada farklı karanfil çeşitlerinde CarMV varlığı ELISA ve farklı RT-PCR yöntemleriyle belirlendikten sonra seçilen bir izolatın kılıf protein geni çoğaltılarak klonlanmıştır. Bu izolatın kılıf protein geninin amino asit dizilimi elde edilerek dünyanın diğer karanfil üretim bölgelerinden elde edilen ve gen bankası veritabanlarında bulunan CarMV izolatlarının kılıf proteinleriyle karşılaştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda CarMV kılıf protein geninin genel olarak oldukça korunduğunu ancak bazı belirgin farklılıkların olduğu belirlenmiştir. CarMV’nün Hindistan izolatının kılıf proteininin 164. ve 331. pozisyonlarında sırasıyla prolin (P) ve asparajin (N) bulunduğu ve bu nedenle de bu izolatın daha önce belirlenen PK ve AN gruplarından farklı olduğu ve PN adında yeni bir grup oluşturduğu belirlenmiştir (Singh et al., 2005).

2.1.1.8. Ülkemizde karanfil beneklenme virüsü

Ülkemizde daha önce yapılan bir çalışmada Isparta ve Antalya illerinde karanfil yetiştiriciliği yapılan 5 farklı özel firma ve kamuya bağlı bir araştırma merkezine ait toplam 6 farklı seradan alınan toplam 33 örnek alınmıştır. Alınan örneklerin 31 tanesinin (31/33) CarMV ile enfekteli olduğu RT-PCR yöntemiyle belirlenerek CarMV’nün Türkiye’de teşhisi ve tanınması ilk kez yapılmış olup iki farklı karanfil üretim bölgesinde yetiştirilen farklı karanfil çeşitlerinde virüsün yaygın olarak bulunduğu belirlenmiştir (Çevik vd., 2010).

Daha önce yapılan ve yukarıda belirtilen çalışmalarda Antalya ve Isparta illerinde karanfil üretim alanlarında CarMV varlığı iki aşamalı RT-PCR yöntemiyle tespit edilerek çok sayıda CarMV izolatı elde edilmiştir. Bu çalışmada ise Isparta ve Antalya’dan daha önce elde edilen CarMV izolatlarından her il için seçilen 5’er izolatın CP genleri T-A klonlama yöntemiyle pGEM-T Easy plazmitine klonlanarak DNA dizilimi belirlenmiştir. Bu izolatların CP gen dizilimleri birbirleriyle ve gen

bankası veri tabanından alınan ve dünyanın farklı üretim bölgelerinden elde edilen CarMV CP genleriyle karşılaştırılarak genetik ilişkileri belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Virüs İzolatları

Yapılan bu tez çalışmasında TÜBİTAK-BİDEB üniversite öğrencileri yurt içi araştırma projeleri destekleme programı kapsamında 2008 yılında yürütülen proje çalışmalarında Antalya ve Isparta illeri üretim seralarından toplanan karanfil örneklerinden RT-PCR yöntemiyle belirlenen CarMV izolatları kullanılmıştır. Her iki ilden elde edilen CarMV izolatlarından 5'i Antalya'dan 5'i ise Isparta'dan olmak üzere toplam 10 izolat seçilerek bu çalışmada kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Antalya ve Isparta illerinden farklı üretim seralarından toplanmış olan karanfil örnekleri ve bunlardan elde edilen CarMV izolatları

Örnek Adı	Bölge	Karanfil Çeşidi	RT-PCR Sonucu	Örnek Adı	Bölge	Karanfil Çeşidi	RT-PCR Sonucu
CarMV 1	Antalya X TARIM	Turbo	-	CarMV 18	Isparta A TARIM	Optima	+
CarMV 2		Betsy	+	CarMV 19		Berry	+
CarMV 3		Baltico-T	+	CarMV 20		Morita	+
CarMV 4		Evita	+	CarMV 21		Disney	+
CarMV 5		Tebe	-	CarMV 22		Star	+
CarMV 6	Antalya Y TARIM	Festival	+	CarMV 23	Isparta B TARIM	Miro	+
CarMV 7		Shakira	+	CarMV 24		Millet	+
CarMV 8		PV5053	+	CarMV 25		Malaga	+
CarMV 9		Guandino	+	CarMV 26		Masai	+
CarMV 10		Veleta	+	CarMV 27		Bizzet	+
CarMV 11		Donetello	+	CarMV 28		American	+
CarMV 12	Antalya Z TARIM	Chery Rozi Barbara	+	CarMV 29	Isparta C TARIM	Baltico-G	+
CarMV 13		Lior	+	CarMV 30		Turbo	+
CarMV 14		Biristane	+	CarMV 31		Star-G	+
CarMV 15		Artemis	+	CarMV 32		Loris	+
CarMV 16		Romani	+	CarMV 33		Judith	+
CarMV 17		Rosella	+				



Şekil 3.1. CarMV'nün karanfil yapraklarında yol açtığı beneklenme

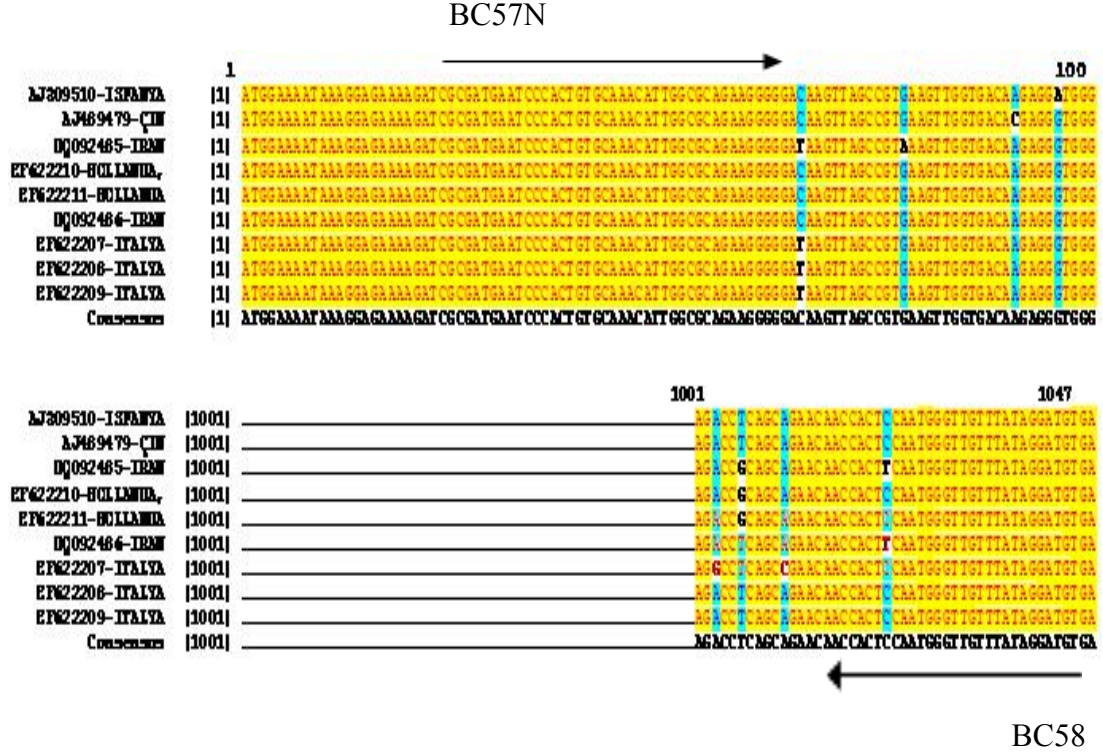


Şekil 3.2. CarMV'nün karanfilde neden olduğu gelişme geriliği ve çiçeklerde görülen küçülme

3.2. Oligonükleotid Primerler

Ülkemizdeki karanfil beneklenme virüsü (CarMV) izolatlarının kılıf protein (coat protein, CP) geninin 1000 bazlık kısmı dışında herhangi bir DNA dizilimi bilinmemektedir. Dünyanın çeşitli yerlerinden elde edilen ve Gen Bankası veri tabanında bulunan CarMV kılıf protein genlerinin alt ve üst kısımlarında korunmuş bölgelerine spesifik ve CarMV CP geninin tamamını çoğaltacak bir çift primer tasarlanmıştır. Bu çalışmada CarMV kılıf protein geninin çoğaltılması için tasarlanan

BC57N 5' ATGGAATAAAGGAGAAAAGATCGCG 3' ve BC58 5' TCACATCCTATAAACAACCCATTG 3' primerleri kullanılmıştır.



Şekil 3.3. Virüsün kılıf protein genlerinin korunmuş bölgelerine spesifik primerler

3.3. Total RNA İzolasyonu

Karanfil beneklenme virüsü (CarMV) bir RNA virüsü olduğundan dolayı kılıf protein genlerinin çoğaltılması için -80°C de saklanan enfekteli bitkilerden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla enfekteli bitkilerden toplanan izolatlardan 100 mg alınıp 1.5 ml'lik santrifüj tüpü içerisinde sıvı azot kullanılarak ezilmiştir. Ezilen yaprak dokusu tek aşamalı RNA izolasyon solüsyonu (One Step RNA Solution, BioBasic, Kanada) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda total RNA izolasyonu veya daha önce rapor edildiği şekilde CTAB yöntemi (Li, R. vd., 2008) kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmıştır. Kullanılan One Step total RNA izolasyonu ve CTAB total nükleik asit izolasyonu yöntemleri aşağıda açıklanmıştır:

3.3.1. One Step RNA izolasyon yöntemi

Karanfil yapraklarından 100 mg alınarak 1.5 ml'lik eppendorf tüplerinde sıvı azot ile ezilmişlerdir. Ezilen doku örneklerine tek aşamalı RNA izolasyon solüsyonundan (One Step RNA Solution) 1 ml eklenerek, vorteksle iyice karıştırılıp homojenizasyon sağlanmıştır. Örnekler 4°C'de 12000 g hızda 10 dakika santrifüj yapılarak çözünmeyen bitki dokuları çöktürülmüş ve RNA içeren süpernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır. Tüpler 5 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletildikten sonra 200 µl 24:1 kloroform:isoamylalcohol eklenmiştir. Örnekler bu karışım ile iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında tekrar 3 dakika beklenmiştir. Daha sonra tüpler 4°C 12000 g hızda 15 dakika süreyle santrifüj yapılarak faz ayrımı yapılmış ve RNA içeren (süpernatant) üst fazdan 500 µl alınarak yeni bir tüpe aktarılmıştır. Süpernatant üzerine 500 µl isoproponal eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra tüpler 12000 g hızda 10 dakika süreyle santrifüj yapılarak RNA'lar çöktürülmüştür. Sıvı kısım atıldıktan sonra çöktürülen RNA, 1 ml %70 etil alkol ile yıkandıktan sonra tüpler 7500 g hızda 5 dakika süreyle santrifüj yapılarak RNA'ların yıkanması sağlanmıştır. Etanol içeren sıvı kısım döküldükten sonra tüpler ağzı açık olarak oda sıcaklığında 5 dakika süreyle bekletilerek çöktürülen RNA'lar kurutulmuştur. RNA'lar 50 µl steril saf su ile çözündürülerek -80°C'ye kaldırılmışlardır.

3.3.2. CTAB total nükleik asit izolasyon yöntemi

Karanfil yaprak örneklerinden 100 mg alınıp sıvı azot içerisinde ezilmişlerdir. Tüplerdeki doku örneklerine %2 CTAB, %2 PVP-40, 100 mM Tris-HCL (ph=8), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA ve %0.2 mercaptoethanol içeren 1 ml CTAB tampon solüsyonu eklenerek vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra örnekler -20°C'de 5-15 dk bekletilerek dondurulmuştur. Daha sonra örnekler vorteksle en yüksek hızda en az 60 sn karıştırılmıştır. Elde edilen homojenat 65°C de en az 15 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra 10.000 g hızda 5 dk süreyle santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında 650 µl süpernatant alınarak yeni bir 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne eklenmiştir ve üzerilerine eşit hacimde 24:1 kloroform:isoamylalcohol karışımı

eklenerek 15.000 g hızda 10 dk süreyle santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında 500 µl süpernatant alınarak 350 µl isopropanol içeren yeni bir 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne eklenerek karışım 15.000 g hızda 10 dk süreyle santrifüj yapılmıştır. Daha sonra sıvı kısım dökülerek elde edilen pellet 1 ml %70'lik etanol ile yıkanmıştır. Karışım 15.000 g hızda 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra sıvı kısım dökülerek tüpler oda sıcaklığında 10-15 dk süreyle kurutulmuştur. Son olarak kurutulan pelletler 100 µl 20 mM Tris-HCl pH 8.0 solüsyonu ile çözdürüldükten sonra RNA'lar -20°C'ye kaldırılmışlardır.

3.4. Kılıf Protein Genlerinin Çoğaltılması

Karanfil beneklenme virüsü (CarMV) kılıf protein geninin çoğaltılmasında önce RNA'dan DNA sentezlenmesi sonra sentezlenen DNA'nın çoğaltılmasını sağlayan tersine transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) yöntemi kullanılmıştır. Enfekteli bitki dokusundan izole edilen toplam RNA'dan CarMV'nün kılıf proteinlerinin çoğaltılması için Takara (Japonya) firmasından sağlanmış olan iki aşamalı PrimeScript RT-PCR kiti (Two Step RT-PCR Kiti) kullanılmıştır. İlk aşamada total RNA'dan random primer ve PrimeScript reverse transkriptaz enzim kullanılarak "komplementer DNA" (cDNA) sentezlenmiştir. Toplam hacim 20 µl olacak şekilde 1X reverse transkriptaz tampon solüsyonu, 1-3 µg toplam RNA, 0.5 mM dNTP, 200 pmol random primer, 20 ünite Primer Script Reverse Transkriptaz, 20 ünite RNase İnhibitörü ve steril saf su ilave edilerek RT reaksiyonu hazırlanmıştır. PCR makinesi 30°C'de 10 dakika, 45°C'de 1 saat ve 75°C'de 15 dakika ve daha sonra da 4°C'de sürekli olarak kalacak şekilde programlanmıştır.

Daha sonra kılıf protein genine spesifik primerler ve hata oranı düşük Ex Taq DNA polimeraz enzimi kullanılarak kılıf protein genleri aşağıdaki prosedüre göre çoğaltılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyon (PCR)'u için; 1X PCR tampon solüsyonu, 2 µl cDNA, 0.5 mM dNTP, 20 pmol primer BC 57N, 20 pmol primer BC 58, 0.25 ünite Takara Ex Taq DNA Polimeraz ve su ilave edilerek 25 µl'lik karışım hazırlanmıştır. PCR makinesi önce 94°C'de 3 dakika bekletilmiş ve daha sonra 94°C 30 s, 55°C 30 s ve 72°C 1,5 dk süreyle 40 döngüyü tamamladıktan sonra 72°C 5

dakika bekletilmiş ve son olarak da 4°C’de sürekli kalacak şekilde programlanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri 100bp plus DNA büyüklük markörleriyle birlikte %1’lik agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp etidyum bromür ile boyandıktan sonra Mini BIS-Pro (DNR, İsrail) görüntüleme cihazında ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir.

3.5. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Çoğaltılmış CarMV kılıf protein genlerinin ürünleri BioBasic PCR pürifikasyon kiti kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda saflaştırılmıştır. Yaklaşık 1000 baz çifti CarMV kılıf protein geni dışında spesifik olmayan bantlar üretilmiş PCR ürünleri %1’lik agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle yukarıda belirtildiği gibi ayrıştırıldıktan sonra yaklaşık 1000 baz çifti olan CarMV kılıf protein genine ait bant jelden kesilerek BioBasic PCR jel pürifikasyon kiti kullanılarak saflaştırılmıştır.

BioBasic PCR Pürifikasyon Aşamaları: PCR ürünlerinin tamamı 50 µl olarak kabul edilmiş ve tüplerin içine 150 µl bağlanma tamponu eklenmiştir. Elde edilen karışım kolonlara aktararak, 2 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 2 dk süreyle 10000 dev/dk hızda santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında kolondan geçen sıvı kısım dökülmüştür. Kolonlara önceden etil alkol eklenmiş olan yıkama tamponundan 500 µl eklenerek 2 dk 10000 dev/dk hızda santrifüj yapılmıştır. Kolondan geçen sıvı kısım dökülerek, yıkama aşaması tekrar edilmiştir. Kolonlarda kalan etil alkolün tamamen uzaklaştırılması amacıyla tüpler bu defa boş olarak 1 dk süre ile 10000 dev/dk hızda santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonunda kolonlar önceden etiketlenmiş olan steril santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Kolonların orta kısmına önceden 65°C’de ısıtılmış olan bırakırma tamponundan 50 µl konularak 2 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Son olarak tüpler 2 dk 10000 dev/dk’da santrifüj yapılmıştır. Kolonlar atılarak, saflaştırılmış PCR ürünlerini içeren ependorf tüpleri kullanılıncaya kadar -20°C’de saklanmıştır.

3.6. Kılıf Protein Genlerinin Klonlanması

RT-PCR yöntemiyle çoğaltılan ve daha sonra saflaştırılan CarMV kılıf protein genleri T-A klonlama yöntemi ile Promega firmasından sağlanmış olan pGEM-T Easy vektörüne aşağıda açıklandığı şekilde klonlanmıştır.

3.6.1. Ligasyon

Ligasyon, PCR yoluyla çoğaltılan ve klonlanacak olan kılıf protein genlerinin pGEM-T Easy plazmit vektörü ile doğrudan birleştirilmesi işlemidir. Bu aşamada, RT-PCR ile çoğaltılan ve saflaştırılan CarMV kılıf protein geni çoğaltılan genin miktarını gösteren bantların yoğunluğuna bağlı olarak 3 µl veya daha fazla alınarak, 50 ng pGEM-T Easy plazmid, 5 ünite T4 DNA ligaz enzimi ve 2X ligasyon tampon çözeltisi (0,05 M Tris-HCl pH 8,0, 0,01 M MgCl₂ 1 mM ATP) içeren 10 µl'lik ligasyon karışımı hazırlanarak 4°C'de 16 saat bekletilerek birleştirilmiştir.

3.6.2. Transformasyon

Ligasyon karışımının bir kısmı, hücre duvarı kimyasal uygulamalarla (10 mM CaCl₂) geçirgen hale getirilmiş (competent) *Escherichia coli* bakterisinin JM109 ırkına aktarılmıştır. Bu amaçla 100 µl hacminde -80°C'de dondurulmuş JM109 ırkı ve buzda çözdürülmüş bakteri hücrelerine birleştirilmiş pGEM-T Easy plazmid ve CarMV CP genini içeren 5 µl ligasyon karışımı eklenerek 30 dk süreyle buz içerisinde tutulmuştur. Daha sonra karışım 42°C'de 90 saniye süreyle bekletilerek ısı şoku uygulandıktan sonra birkaç dakika süreyle tekrar buza konularak transformasyon işlemi tamamlanmıştır.

3.7. Rekombinant Kolonilerin Seçimi

Transformasyonu yapılan bakteriler 750 µl SOC bakteriyel sıvı besi ortamı (%2 bacto-trytone, %0,5 bacto-yeast ekstrakt 0,05 NaCl, 0,01M KCl, 0,01M MgCl₂, 0,01M MgSO₄ ve 0,2M glikoz) veya LB bakteriyel besi ortamı eklenerek

büyütölmek üzere 1 saat süreyle 37°C’de 180 dev/dk hızla çalkalamalı inkübatörde tutulmuştur. Daha sonra büyütölen bakteriler 60 µg/ml ampisilin, X-gal maddesi (20mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indoly-B-galacto-pyranoside) ve IPTG içeren LB katı ortamı (%2 bacto-trytone, %0,5 bacto-yeast ekstrakt, 0,05 M NaCl,) içeren petri kaplarına ekilerek 37°C’de 16 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda sadece CarMV CP genini taşıyan pGEM-T Easy plazmidini içeren bakteriler ortamda büyüyüp beyaz renkli koloniler, CarMV CP genini içermeyenler ise mavi renkli koloniler oluşturacağından dolayı CarMV CP genini içeren kolonilerin seleksiyonu yapılmıştır.

3.8. Rekombinant Bakteriyel Kolonilerin Belirlenmesi

Mavi-beyaz koloni seçimi, istenilen genleri içeren rekombinant plazmidleri taşıyan bakteriyel kolonilerin seçiminde yararlı olmasına rağmen bazen mavi koloniler hedef genleri içerebileceği gibi bazı beyaz koloniler de istenilen geni içermeyebilir. Bundan dolayı oluşan beyaz renkli kolonilerin gerçekten CarMV CP genini taşıyan pGEM-T Easy plazmidini içerip içermediği daha hassas bir yöntem olan Koloni PCR yöntemiyle taranarak daha kesin olarak belirlenmiştir. Bu yöntem rekombinant plazmidlerle yapılan klonlamayı destekleyici olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla önce elde edilen beyaz koloniler steril bir pipet ucuyla alınarak LB ortamı içeren yeni bir petri kabına 1 cm² büyüklüğünde bir alana çizme yoluyla inokule edilerek 37°C’de 16 saat boyunca büyütöldükten sonra kullanılmak üzere 4°C’de saklanmıştır. Koloni PCR için 10X PCR Tampon Solüsyonu, 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTPs, 0.5 µl Primer M13F, 0.5 µl Primer M13R, 0.25 µl Taq DNA Polimeraz ve steril saf su ilave edilerek karışım hazırlanmıştır. Koloni PCR için hazırlanıp PCR tüplerine konulan karışıma çizilerek büyütölen beyaz renkli bakteri kolonilerinden steril bir pipet ucuyla alınarak bakteri kolonisi eklenmiştir. Koloni PCR karışımı ilk olarak 95°C’de 3 dk bekletildikten sonra, 95°C’de 30 s, 50°C’de 30 s, 72°C’de 2 dk 40 döngüyü tamamladıktan sonra 72°C’de 5 dk bekletilerek ve 4°C’de sürekli kalacak şekilde programlanmıştır. Koloni PCR’ın tamamlanmasından sonra elde edilen PCR ürünleri %1’lik agaroz jeline yüklenerek elektroforez yöntemiyle DNA büyüklük markörleriyle birlikte ayrıştırılıp etidium bromür ile boyandıktan sonra

ultraviyole ışık altında Mini BIS-Pro (DNR, İsrail) jel görüntüleme sisteminde görüntülenerek bantların büyüklüklerine göre klonlamamızın başarılı olup olmadığı belirlenmiştir.

3.9. Plazmid İzolasyonu

Koloni PCR'dan elde edilen sonuçların elektroforez yöntemiyle analiz edilmesinden sonra CarMV kılıf protein genini içeren pGEM-T Easy plazmidini içerdiği kesin olarak belirlenen koloniler seçilerek bunlardan BioBasic plazmid saflaştırma kiti kullanılarak plazmid izolasyonu yapılmıştır. Her bir izolat için koloni PCR'da pozitif sonuç veren en az iki koloni seçilerek plazmid izolasyonu yapılmıştır. Her bir CarMV izolatu için koloni PCR sonuçlarına göre seçilen koloniler, 60 µg/ml ampisilin içeren 5 ml LB sıvı besi ortamına inokule edilerek 37°C'de 16 saat boyunca 180 dev/dk hızda çalkalamalı inkübatörde büyütülmüştür. Steril bir mikrofuj tüpüne 1000 µl gliserol ve 1000 µl büyütülen bakterilerden alınarak gliserol stokları hazırlanmıştır. Geriye kalan kısmı BioBasic firmasından (Kanada) sağlanan plazmid saflaştırma kiti kullanılarak plazmid izolasyonu yapılmıştır. Plazmid izolasyonu üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

Bakteri hücrelerinin parçalanması için her bir örneğe 100 µl solüsyon I eklenip 1 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Parçalanmış bakteri hücrelerinin nötralizasyonu için 200 µl solüsyon II eklenerek tüpler 4-6 defa aşağı yukarı karıştırılıp tekrar 1 dk oda sıcaklığında beklenmiştir. Daha sonra 350 µl solüsyon III ilave edilerek yavaşça karıştırılmıştır. Örnekler 12000 dev/dk ve 4°C'de 5 dk santrifuj yapıp kolonun üstünde kalan sıvı kısmı dökülmüştür. Daha sonra kolonlar 10000 dev/dk ve 4°C'de 2 dk süreyle santrifuj yapılmıştır. Daha sonra plazmid diğer maddelerden temizlemek için 500 µl yıkama solüsyonu eklenip yine 10000 dev/dk ve 4°C'de 2 dk süreyle santrifuj edilmiştir. İstenmeyen maddeleri tamamen uzaklaştırmak ve daha temiz bir plazmid elde edebilmek için yıkama solüsyonu ekleme işlemi tekrarlanmıştır. Yıkama solüsyonundaki etil alkolü tamamen uzaklaştırmak için kolonlar 1 dakika 10000 dev/dk'da tekrar santrifuj edilmiştir. Son olarak 50 µl elution tampon solüsyonu eklenerek plazmid saflaştırma işlemi tamamlanmıştır.

3.10. *EcoR* I Restriksiyon Enzimiyle Kesme (Digestion) İşlemi

Saflaştırılan plazmitler klonlamada kullanılan *EcoR* I enzimi ile kesilerek yaklaşık 1000 bp'lik CarMV CP genini taşıyıp taşımadıkları kesin olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu pGEM-T Easy plazmid DNA'larından 10 µl, 20000 ünite *EcoR* I enzimi, 1X *EcoR* I enzimi tampon solüsyonu ve steril saf su eklenerek bir tüp içerisinde toplam 25 µl'lik bir digestion (kesme) karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım 37°C'de 16 saat süreyle bekletilerek plazmidlerin kesilme işlemi yapılmıştır. *EcoR* I enzimiyle kesme işleminin tamamlanmasından sonra elde edilen DNA'lar 100 bp plus DNA büyüklük markörleriyle birlikte %1'lik agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak etidyum bromür ile boyandıktan sonra Mini BIS-Pro (DNR, İsrail) görüntüleme cihazında ultraviyole ışık altında görüntülenmiş ve 1000 bp'lik CarMV CP genini taşıyıp taşımadıkları kesin olarak belirlenmiştir.

3.11. Kılıf Protein Geninin Dizisinin Belirlenmesi ve Karşılaştırılması

Dizileme işlemi hizmet alımı yolu ile RefGen firmasından temin edilmiştir. DNA dizilimi pGEM-T Easy plazmidinin T-A klonlama bölgesinin yaklaşık 50 bp üst ve alt kısmındaki bölgelere spesifik M13F ve M13R universal primerleri kullanılarak döngü dizileme yöntemiyle otomatik DNA dizileme cihazıyla yapılmıştır. Her bir izolat için bir klonun iki yönden M13F ve M13R primerleri kullanılarak CarMV kılıf protein geninin dizilemesi yapılmıştır. Elde edilen ham DNA dizilimleri Vector NTI DNA dizi analiz programına aktararak öncelikle pGEM-T Easy plazmid vektörüne ait DNA dizileri temizlenerek CarMV kılıf protein genine ait nükleotid dizilimi elde edilmiştir. Daha sonra nükleotid diziliminden yararlanılarak CarMV kılıf protein geninin amino asit dizilimleri elde edilmiştir. İzolatların kılıf protein genlerine ait nükleotid ve amino asit dizileri AlignX programında çoklu dizi karşılaştırma yapılarak birbirleriyle olan benzerlik oranları yüzde olarak belirlenmiştir. Daha sonra gen bankasında DNA ve protein veri tabanlarında araştırma yapılarak dünyanın farklı karanfil üretim bölgelerinden elde edilen CarMV izolatlarına ait tam kılıf protein genlerinin nükleotid ve amino asit dizilimleri elde edilmiştir. Bu diziler karanfil üretim alanlarından elde edilen izolatların kılıf protein genlerine ait nükleotid ve

amino asit dizileriyle AlignX programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. CarMV izolatlarının dünya izolatlarıyla benzerlik gösterip göstermediği ve benzerlik oranları yüzde olarak belirlenmiştir.

3.12. Kılıf Protein Geninin Filogenetik Analizi

Her bir izolat için edilen CP DNA dizilimleri DNA dizi analiz programlarında incelenerek izolatların CP gen dizilimlerinin önce birbirleriyle karşılaştırılarak nükleotid ve amino asit dizilimlerinin birbirleriyle benzerlikleri araştırılmıştır. Daha sonra bu gen dizilimleri dünyanın diğer bölgelerinde bulunan izolatların CP gen dizilimleriyle karşılaştırılarak soy ağaçları oluşturulmuş ve böylece ülkemiz CarMV izolatlarının diğer izolatlarla genetik benzerlikleri ve farklılıkları ortaya konulmuştur.

Farklı karanfil üretim bölgelerinden alınan CarMV izolatlarının AlignX programında çoklu nükleotid ve amino asit dizi karşılaştırmaları yapılarak CarMV kılıf protein genine ait çoklu karşılaştırma dosyaları Clustal X programına aktarılmış ve filogenetik analizleri yapılmıştır. Filogenetik analiz verileri kullanılarak Kiamura iki parametre algoritması uygulanan neighbor-joining yöntemiyle filogenetik soy ağacı oluşturulmuştur. Oluşturulan soy ağacının doğruluğunu istatistiksel olarak belirlemek amacıyla 100 tekerrürlü bootstrap analizi yapılmıştır. Son olarak oluşturulan soy ağaçları TreeView soy ağacı görüntüleme programı kullanılarak görüntülenerek farklı karanfil üretim bölgelerinden toplanan CarMV izolatlarının birbirleriyle olan yakınlık dereceleri ve genetik ilişkileri ortaya konulmuştur. Aynı şekilde dünyanın diğer karanfil üretim bölgelerinden elde edilen izolatların gen bankasında bulunan kılıf protein genlerinin nükleotid ve amino asit dizilerinin çoklu karşılaştırmaları yukarıda belirtildiği gibi filogenetik analizlere tabi tutularak soy ağaçları oluşturularak TreeView programında görüntülenmiştir.

3.13. Biyolojik İndeksleme

Antalya ve Isparta illeri karanfil üretim alanlarında bulunan CarMV izolatlarının biyolojik karakterizasyonları yapılmıştır.

3.13.1. İndikatör bitkilerin yetiştirilmesi

Kazayağı (*Chenopodium amaranticolor* ve *Chenopodium quiano*) bitkileri indikatör bitki olarak yetiştirilmiştir. Bu bitkilerin tohumları 2:1:1 oranında torf+toprak+gübre içeren saksılara ekilmiştir. Ekim yapılacak saksılar 25-26°C sıcaklık, %60 nem ve 16 saat süreyle ışıklanma ayarlı iklim odasına konulmuştur. Bitkilerin yetiştirilmesi için Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'ndeki iklim odaları kullanılmıştır. İndikatör bitkiler 2-4 yapraklı duruma gelene kadar beklenmiştir.



Şekil 3.4. İndikatör bitkilerin yetiştirilmesi

3.13.2. Mekanik inokulasyon

Klonlaması yapılacak örneklerden Antalya ve Isparta'yı temsil edecek şekilde en az ikişer izolat seçilerek yukarıda belirtilen indikatör bitkilere mekanik inokulasyon yapılmıştır. Mekanik inokulasyon için 2-4 yapraklı indikatör bitkiler kullanılmıştır. Mekanik inokulasyon sonrası belirtilen semptomların gözleneceği bitkiler herbir izolat için 5 tane olacak şekilde ayrılmıştır. Ayrıca sağlıklı bitki özsuğu ile mekanik inokulasyon yapılan bir negatif kontrol grubu seçilmiştir. CarMV enfekteli bitki dokusu ve negatif

kontrol grubu için ayrılan bitkinin yaprakları 1:10 oranında, %2 PVP ilave edilerek hazırlanan 0,1 M pH=7.0-7.4 fosfat tampon çözeltisinde ezilmiştir. İndikatör bitkilerin yapraklarında yara oluşumunu sağlamak amacıyla bu tampon çözeltisine 400-600 mesh arası karborandum tozu karıştırılmıştır. Elde edilen bitki özsuğu steril bir gazlı bez yardımı ile 5 tane indikatör bitkiye ve sağlıklı bitkiden hazırlanan diğer tampon çözeltisi de negatif kontrol grubundaki indikatör bitkiye sürülerek işlem tamamlanmıştır. İnokulasyonun sonunda bitkiler çeşme suyu ile yıkanmıştır. Bitkilerde simptomların gözlenebilmesi için 20-25°C sıcaklık, %60 nem ve 16 saat ışıklandırma ayarlı iklim odasında tutulmuştur.



Şekil 3.5. Mekanik inokulasyon çalışması

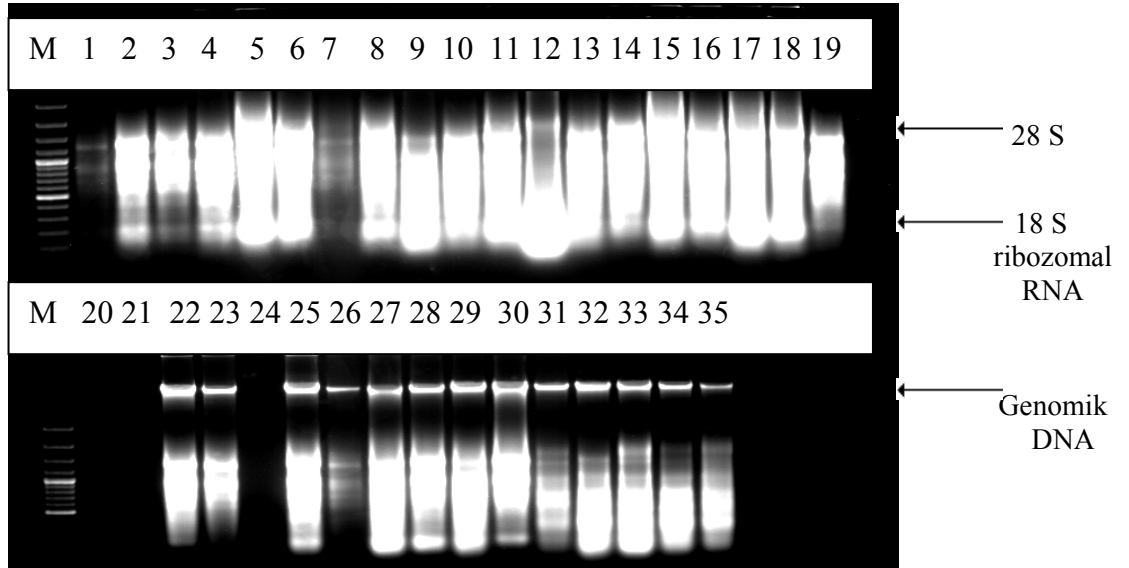
3.13.3. Simptomların gözlenmesi

20-25°C sıcaklık, %60 nem ve 16 saat ışıklandırma ayarlı iklim odasında inokülasyon yapılan enfekteli ve sağlıklı bitkiler 4-6 hafta süreyle periyodik olarak gözlemlenmiştir ve bu gözlemler sonucunda enfekteli bitkilerde oluşan belirtiler, belirtiler oluşma zamanı not edilerek ayrıca enfekteli bitkiler ile sağlıklı bitkiler arasındaki farkları görsel olarak kıyaslamak amacıyla bu bitkiler fotoğraflandırılmıştır. Ayrıca indikatör bitkilerden bazılarında yukarıda belirtildiği gibi total RNA izolasyonu yapılarak CarMV'nün varlığı RT-PCR yöntemiyle test edilmiştir. Böylece belirtiler oluşmasa da mekanik inokülasyonun başarılı olup olmadığı tespit edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Total RNA İzolasyonu

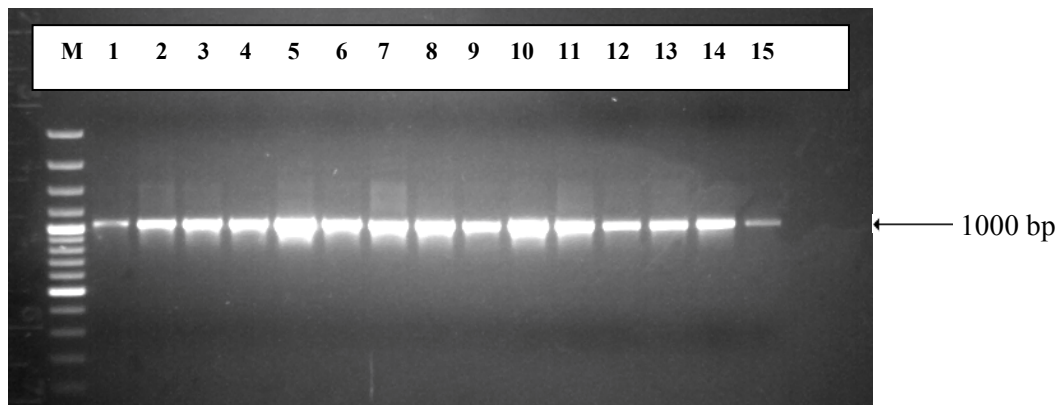
Karanfil beneklenme virüsü bir RNA virüsü olduğundan dolayı kılıf protein geninin çoğaltılması için öncelikle enfekteli olduğu tahmin edilen örneklerden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Total RNA izolasyonu tek aşamalı RNA solüsyonu (BioBasic, Kanada) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Elde edilen toplam RNA'ların niteliğini ve miktarını belirlemek amacıyla RNA'ların bir kısmı %1'lik agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak görüntülenmiştir. Jelde ayrıştırılan total RNA'lar incelendiğinde 28S ve 18S ribozomal RNA'larının belirgin bantlar oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu örneklerden başarılı bir şekilde toplam RNA izolasyonunun yapıldığı ve elde edilen RNA'ların parçalanmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar enfekteli bitki dokularından izole edilen total RNA'ların bitki RNA'ları yanında CarMV'ne ait genomik ve subgenomik RNA'ları da içerdiğini ve CarMV'nün kılıf protein geninin çoğaltılmasında kullanılabileceğini göstermiştir.



Şekil 4.1. Total RNA izolasyonu sonucunu gösteren jel görüntüsü
M: 100 bp plus DNA büyüklük markörü, 1-35: CarMV izolatları

4.2. Tersine Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT – PCR)

Total RNA izolasyonu sonucu elde edilen RNA'lardan iki aşamalı tersine transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi kullanılarak önce random primer ile tamamlayıcı (complementer) DNA (cDNA) sentezlenmiştir. Daha sonra kılıf protein geninin 5' ve 3' ucunda bulunan korunmuş bölgelerine spesifik BC 57N ve BC 58 primerleri kullanılarak Antalya ve Isparta illerinin farklı karanfil üretim bölgelerinden elde edilen CarMV örneklerinin kılıf protein genleri RT-PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Gradient PCR yapılan çalışmada kullanılan BC 57N ve BC 58 primerlerinin en yüksek verimde çalıştığı sıcaklık değeri 55°C olarak belirlenmiştir. RT-PCR sonucunda elde edilen PCR ürünlerinin bir kısmı 100 bp plus DNA büyüklük markörüyle birlikte %1'lik agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda tüm örneklerden elde edilen toplam RNA'lardan 1000 bp büyüklüğünde bir bant elde edilmiştir. Buna karşın negatif kontrol olarak kullanılan su ve sağlıklı bitkilerden herhangi bir bant elde edilmemiştir. Antalya ilinin farklı karanfil üretim bölgelerinden elde edilen CarMV örneklerinin RT-PCR yöntemiyle çoğaltılan kılıf protein genleri Şekil 4.2'de gösterilmektedir. Enfekteli dokulardan elde edilen RNA'ların tümünden yaklaşık 1000 bp büyüklüğündeki bandın elde edilmesi, CarMV kılıf protein geninin spesifik olarak çoğaltıldığını göstermiştir.



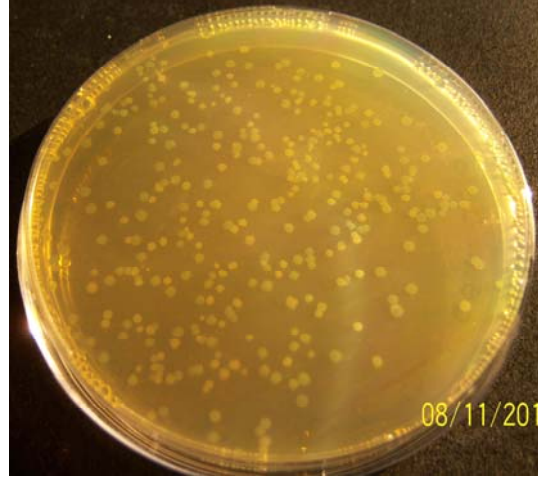
Şekil 4.2. Karanfil üretim alanlarından elde edilen örneklerden CarMV'ne ait yaklaşık 1000 bp uzunluğundaki kılıf protein geninin çoğaltıldığını gösteren jel görüntüsü M: 100 bp plus DNA büyüklük markörü, 1-15: CarMV izolatları Berry, Evita, Morita, Optima, American, Miro, Turbo, Star, Baltico-G, Judith, Loris, Star-G, Baltico-T, Tebe, Turbo

4.3. Kılıf Protein Genlerinin Klonlanması ve DNA Dizilemesi

RT-PCR yöntemiyle çoğaltılan CarMV izolatlarının kılıf protein genlerinin klonlanması T-A klonlama yöntemiyle yapılmıştır. T-A klonlama *Taq* DNA polimeraz gibi 3'→5' eksonükleaz aktivitesi olmayan DNA polimerazlarla yapılan PCR çoğaltımı sırasında çoğaltılan DNA'ların 3' ucuna fazladan bir Adenin (A) eklenmesine dayalı bir yöntemdir. Bu şekilde çoğaltılan 3' ucunda fazladan bir A içeren DNA'lar 5' ucunda bir tane Timin (T) taşıyan TA klonlama vektörleri olarak adlandırılan plazmidlerle birleştirilerek PCR ürünlerinin DNA ligaz enzimi yardımıyla plazmid vektörlerine klonlanması sağlanmaktadır. Antalya ve Isparta illerinin farklı karanfil üretim bölgelerinden elde edilen izolatların kılıf protein genleri yukarıda belirtildiği gibi iki aşamalı RT-PCR kiti kullanılarak yapılmıştır. PCR aşamasında *Ex Taq* DNA polimeraz (Takara, Japonya) enzimi kullanıldığından dolayı PCR'da çoğaltılan CarMV kılıf protein genlerine ait cDNA'ların 3' uçlarına çoğaltım sırasında fazladan bir A eklenmiştir. Bu DNA'lar 5' ucunda fazladan bir T içeren pGEM-T Easy (Promega, ABD) T-A klonlama plazmid vektörüne T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak klonlanmıştır. CarMV kılıf protein genlerini içeren pGEM-T Easy plazmidler ısı şoku transformasyon yoluyla *Escherichia coli* bakterisinin JM109 ırkına aktarılmıştır. Transformasyonu yapılan *E. coli* bakterileri ampisilin ve X-gal içeren LB besi ortamına ekilerek ampisilin antibiyotiğine dayanıklılık ve mavi-beyaz koloni seçimi yoluyla CarMV kılıf protein genlerini içeren plazmidleri taşıyan bakteri kolonilerinin seleksiyonu yapılmıştır. Bu seleksiyon sonucunda çok sayıda mavi ve beyaz bakteri kolonileri elde edilmiştir. Elde edilen mavi koloniler CarMV kılıf protein geni taşımayan pGEM-T Easy plazmidlerini içermekte olup klonlamanın gerçekleşmediğini yani CarMV kılıf protein genleri ile pGEM-T Easy plazmidinin birleştirilemediğini göstermektedir. Elde edilen beyaz koloniler ise CarMV kılıf protein genini taşıyan pGEM-T Easy plazmidlerini içermekte olup klonlanma işleminin başarılı olduğunu göstermektedir. Farklı CarMV izolatlarının kılıf protein genlerinin klonlanması sonucunda her bir izolat için çok sayıda mavi ve beyaz koloniler elde edilmiştir. Farklı izolatlar için farklı sayılarda mavi ve beyaz koloniler görülmesine rağmen her izolat için yeterli sayıda kılıf protein genini içerdiği düşünülen beyaz koloniler elde edilmiştir. Bazı izolatların kılıf protein genlerinin

klonlanması sonucu elde edilen koloniler Şekil 4.3’de gösterilmektedir. Seçilen beyaz kolonilerin daha sonra kullanılmak üzere yedeklenerek tekrar büyütüldüğü petri kapları da Şekil 4.4’de gösterilmektedir.

Mavi-beyaz koloni seleksiyonu klonlanan genleri içeren bakterilerin belirlenmesinde kullanılmasına rağmen beyaz kolonilerin istenilen CarMV kılıf protein genlerini gerçekten içerip içermediğini kesin olarak belirlemek amacıyla beyaz kolonilerin koloni PCR yöntemiyle taraması yapılmıştır. Bu amaçla her bir izolat için elde edilen beyaz kolonilerden en az beş tanesi seçilerek pGEM-T Easy plazmidine spesifik M13F (ileri) ve M13R (geri) primerleri kullanılarak bunlardan primerlerin bağlanma bölgeleri arasında kalan ve plazmid içerisindeki CarMV kılıf protein genini ve vektör dizilerini içeren DNA’nın çoğaltılması yapılmıştır. Her bir izolat için en az beş beyaz koloninin koloni PCR yöntemiyle taraması yapılmış ve her bir izolatın kılıf protein genini içeren en az iki beyaz koloni belirlenene kadar taramalara devam edilmiştir. Koloni PCR’ın tamamlanmasından sonra elde edilen PCR ürünleri DNA büyüklük markörleriyle birlikte %1’lik agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında görüntülenerek analiz edilmiştir. Farklı CarMV izolatlarının kılıf protein genlerini içeren kolonilerin belirlenmesi için yapılan koloni PCR sonuçları Şekil 4.5’de gösterilmektedir. Sonuçlar incelendiğinde 10 örnek için taranan kolonilerden en az 4 tanesinden yaklaşık 1200 bp’lık bir DNA bantı çoğaltılarak pozitif sonuç verdiği yani bu kolonilerin CarMV kılıf protein genini içerdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.3. Transformasyonu yapılan *E. coli* bakterilerinin ampisilin ve X-gal içeren LB besi ortamında oluşturdukları mavi ve beyaz koloniler

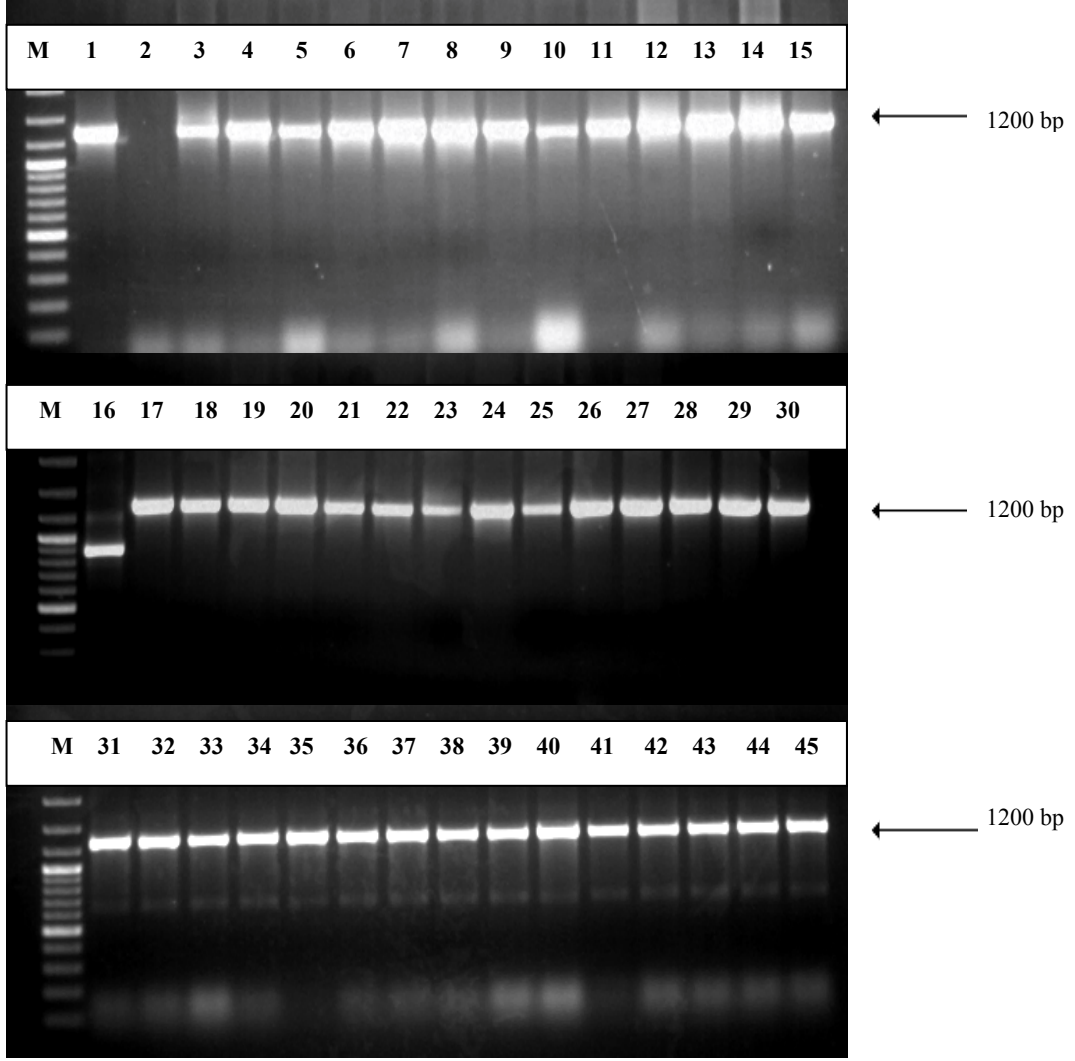


Şekil 4.4. Seçilen beyaz kolonilerin daha sonra kullanılmak üzere tekrar büyütüldüğü LB besi ortamı içeren petri kabı

Koloni PCR'da pozitif sonuç vererek CarMV kılıf protein genlerini içerdiği kesin olarak belirlenen beyaz kolonilerden her bir izolat için iki tanesi seçilerek ampisilin içeren LB sıvı ortamı içerisinde 37°C'de çalkalamalı inkübatörde 16 saat boyunca büyütülmüştür. Bunların hepsinden bir kısmı alınarak gliserol stok hazırlanıp daha sonra kullanılmak üzere -80°C derin dondurucuda saklanmıştır. Büyütülen ve gliserol stokları hazırlanan bakteri kolonilerinden ikisi seçilerek bunlardan MiniPrep

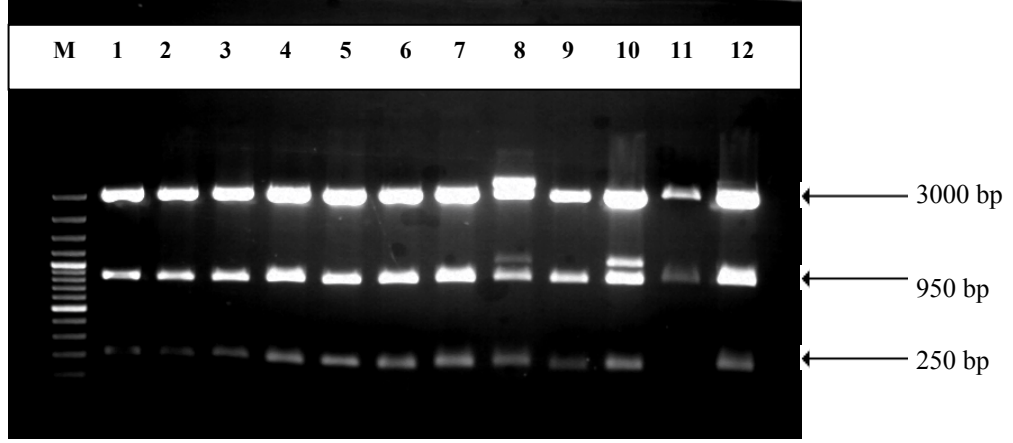
plazmid DNA izolasyon kiti (BioBasic, Kanada) kullanılarak plazmid izolasyonu yapılmıştır.

Elde edilen bu plazmid DNA'lar T-A klonlaması yapılan bölgenin her iki yanında bulunan *EcoRI* restriksiyon enzimi kesme bölgelerinden kesim yaparak klonlanan DNA parçasını plazmitten ayıran *EcoRI* restriksiyon enzimiyle kesilmiştir. Kesilen DNA'lar daha sonra %1'lik agaroz jelinde büyüklük markörleriyle birlikte yürütülerek etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında incelendiğinde pozitif olan yaklaşık 1500 bp büyüklüğünde pGEM-T Easy plazmid DNA'sı ve yaklaşık 1000 bp büyüklüğünde CarMV kılıf protein genine ait bant elde edildiği görülmüştür.



Şekil 4.5. Farklı CarMV izolatlarının kılıf protein genlerini içeren kolonilerin belirlenmesi için yapılan koloni PCR yardımı ile yaklaşık 1200 bp'lik bantların elde edildiğini gösteren jel fotoğrafları M: 100 bp plus DNA büyüklük markörü, 1-15 CarMV izolatları: Baltico-G1, 2, 3, 4, 5, Baltico-T1, 2, 3, 4, 5, Evita1, 2, 3, 4, 5; 16-30 CarMV izolatları: Lior1, 2, 3, 4, 5, Miro1, 2, 3, 4, 5, Star-G1, 2, 3, 4, 5; 31-45 CarMV izolatları: Donetello1, 2, 3, 4, 5, American 1, 2, 3, 4, 5, Judith 1, 2, 3, 4, 5

Tüm CarMV izolatlarının kılıf protein genlerini içeren plazmidlerin *EcoRI* enzimiyle kesilmesi sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Bu sonuçlar yakından incelendiğinde bazı örneklerden 1000 bp bant yerine daha küçük iki bant olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6.). Bu sonuçlar bu CarMV izolatlarının kılıf protein genlerinde *EcoRI* enzimi kesme bölgesinin bulunduğunu göstermiştir. Bunun sonucunda ise seçilen plazmidlerden klonlanan CarMV izolatlarının kılıf protein genini taşıdıkları kesinleşmiştir.



Şekil 4.6. *EcoRI* restiriksiyon enzimiyle yapılan kesimden sonra pGEM-T Easy plazmitlerinin CarMV'nün 1000 bp'lık kılıf protein genini içerdiğini gösteren jel fotoğrafları M: 100 bp plus DNA büyüklük markörü; 1-12 CarMV izolatları: Baltico-G1, 4, Baltico-T1, 2, Evita3, 5, Lior2, 5, Miro1, 4, Star-G1, 2

4.4. Kılıf Protein Genlerinin Dizi Analizi

Saflaştırılan ve *EcoRI* enzimiyle kesilerek CarMV kılıf protein genini taşıdığı kesin olarak belirlenen plazmidlerden 10 tanesi seçilerek DNA dizilimi belirlenmesi amacıyla Refgen Biyoteknoloji (Ankara) firmasına gönderilmiştir. CarMV kılıf protein genlerini içeren pGEM-T Easy plazmidlerinin DNA dizilimi M13F ve M13R primerleri kullanılarak döngü dizileme yöntemiyle otomatik DNA dizileme cihazıyla yapılmıştır. Her bir izolat için elde edilen DNA dizilerinden öncelikle plazmide ait bölgeler temizlenerek CarMV kılıf protein genine ait diziler elde edilmiştir. DNA dizileri Vector NTI (Invitrogen, ABD) dizi analiz programlarında incelenmiştir.

4.4.1. Nükleotid dizi analizi

Bu çalışmada yapılan DNA dizi analizleri sonucunda Antalya ve Isparta'dan elde edilen CarMV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimleri kendi aralarında karşılaştırıldığında, izolatların kılıf protein genlerinin %91-%98 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek benzerlik %98'lik oranla American ile Turbo izolatları ve Baltico-T ile Evita izolatları arasında iken en düşük benzerlik %91'lik oranla Baltico-G ile Donetello izolatları arasında olduğu

tespit edilmiştir. İzolatlar illere göre incelendiğinde, aynı ilden alınan Baltiko-T ve Evita izolatları %98'lik oranla en fazla benzerliğe sahip olmuşlardır. Gen bankası veritabanlarında dünyanın farklı karanfil üretim bölgelerinden elde edilen 9 farklı izolatin kılıf protein geninin dizilimi bulunmaktadır. Gen bankasında bulunan bu CarMV protein genlerinin nükleotid dizilimleri alınarak Antalya ve Isparta illerinden elde edilen CarMV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimleriyle karşılaştırarak benzerlik oranları belirlenmiştir. GenBank veritabanlarında bulunan uluslararası izolatların CP genleri ile yapılan karşılaştırmalar Türkiye izolatlarının uluslararası izolatlarla %92-%100 arasında değişen oranlarda dizi benzerliği olduğunu göstermiştir. En yüksek benzerlik oranı bir İtalyan izolatu ile Turbo izolatu arasında gözlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan 10 CarMV izolatu ile dünyada bulunan 9 farklı CarMV izolatu arasındaki benzerlik oranları Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Çizelge yakından incelendiğinde nükleotid dizi benzerliği bakımından ülkemiz izolatlarıyla en çok benzerlik gösteren izolatin %100 oranında İtalya'dan EF622208 ve EF622209 izolatları olduğu belirlenmiştir. İran'dan DQ092486 izolatu %99 oran ile ülkemiz izolatlarından Baltiko-T ile en fazla benzerliğe sahip ikinci izolat olmuştur. Çin'den AJ489479 izolatu ülkemiz izolatlarından Baltiko-G ve Donetello ile gösterdiği %92'lik benzerlik oranıyla en fazla farklılığa sahip olan izotlar olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Antalya ve Isparta illerindeki CarMV izolatları ile dünyadaki CarMV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimlerinin benzerlik oranları

	AJ489479 ÇİN	MIRO	LIOR	SHAKIRA-M	BALTIKOG	DONETELLO	BALTIKOT	DQ092486 İRAN	DQ092485 İRAN	EF622210 HOLLANDA	EF622211 HOLLANDA	EVITA	AMERICAN	EF622207 ITALY	EF622208 ITALY	EF622209 ITALY	TURBO	JUDITH	STARG
AJ309510 SPAIN	96	96	96	96	93	93	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96
AJ489479 ÇİN		96	95	95	92	92	96	96	95	95	95	95	95	96	96	96	96	95	95
MIRO			95	95	93	92	96	96	95	96	96	96	96	96	96	96	96	96	95
LIOR				96	93	92	95	96	95	95	95	95	95	95	96	96	96	95	95
SHAKIRA-M					92	92	96	96	95	96	95	95	95	95	96	96	96	96	95
BALTIKOG						91	94	94	94	94	94	94	95	92	93	93	93	93	92
DONETELLO							94	94	93	94	94	93	92	92	92	92	92	92	92
BALTIKOT							99	97	98	98	98	96	96	96	96	96	96	96	96
DQ092486 İRAN								98	98	98	98	96	96	96	96	96	97	96	96
DQ092485 İRAN									98	98	97	95	96	96	96	96	96	96	96
EF622210 HOLLANDA											99	97	96	96	96	96	97	96	96
EF622211 HOLLANDA												97	96	96	96	96	96	96	96
EVITA													96	95	96	96	96	96	96
AMERICAN														97	98	98	98	96	96
EF622207 ITALY															99	99	99	96	96
EF622208 ITALY																100	100	96	96
EF622209 ITALY																	100	96	96
TURBO																		96	96
JUDITH																			96

4.4.2. Amino asit dizi analizi

Antalya ve Isparta illerinin farklı karanfil seralarından alınan CarMV izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizilimleri kendi aralarında ve uluslararasıdaki diğer CarMV izolatları ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen çoklu dizi karşılaştırmaları Şekil 4.8’de verilmiştir. CarMV izolatları kendi aralarında karşılaştırıldığında izolatların kılıf proteinleri arasında %85 ile %99 arasında değişen oranlarda benzerlik olduğu tespit edilmiştir. Araştırmada kullanılan tüm izolatların birbirleriyle gösterdikleri aminoasit dizi benzerlikleri Çizelge 4.2’de verilmiştir. Donetello izolatı %85 oranında Baltiko-G izolatı ile en çok farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir. Judith, Baltiko-T ve Shakira-M izolatları %99’luk oran ile en fazla benzerliği Turbo izolatı ile gösterdikleri belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, Judith izolatı ile Shakira-M nin de aynı oranla birbirleriyle ile benzer olduğu bulunmuştur. Amino asit dizi karşılaştırması yakından incelendiğinde kılıf proteininin 164. pozisyonlarındaki amino asitin tüm izolatlarda prolin (P) olduğu ancak 331. pozisyondaki amino asitlerin değişken olduğu görülmüştür. Bu pozisyonda Star glutamin (Q), Donetello histidin (H), American ve Baltiko-G izolatlarında serin (S), Judith ve Shakira izolatlarının ise asparajin (N) içerdiği geriye kalan izolatların tamamının lisin (K) içerdiği görülmüştür. Buna göre ülkemiz izolatlarından 4 tanesinin daha önce tanımlanan PK grubundan iki tanesinin Hindistan’da rapor edilen izolatlar gibi PN grubundan diğerlerinin ise daha önce tanımlanmayan PQ, PH ve PS grubuna ait olduğu ortaya çıkmıştır.

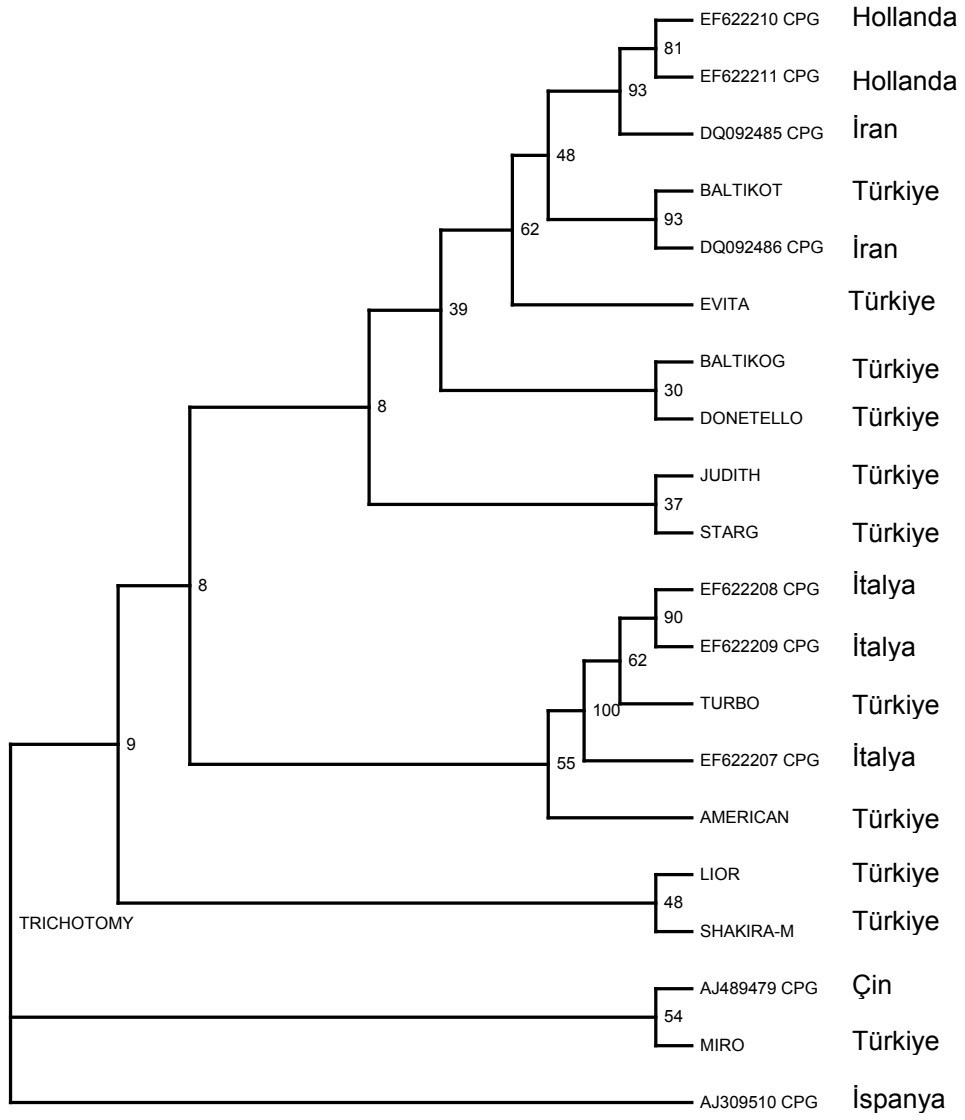
Dünyanın farklı karanfil üretim bölgelerinden elde edilen ve gen bankası veri tabanlarında kılıf protein gen dizilimi bulunan 9 farklı izolatın kılıf protein genlerinin amino asit dizilimleri alınarak Antalya ve Isparta illerinin farklı karanfil seralarından alınan CarMV izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizilimleriyle karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalar sonucunda ülkemizde bulunan CarMV izolatlarının diğer uluslararası izolatlarla benzerlik oranları amino asit düzeyinde de belirlenmiştir. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda Antalya ve Isparta illerinden elde edilen CarMV izolatlarının dünya izolatlarıyla %90 ile %100 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. Bu araştırmada kullanılan 10 CarMV izolatının amino asit dizilimleri ile bunların uluslar arası izolatlar ile benzerlik oranları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, ülkemiz CarMV izolatlarının amino asit dizilimi bakımından %100’lük oranla en fazla İtalya ve İran izolatlarının kılıf protein genleriyle benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu izolatlardan Baltiko-T izolatı İran’dan DQ092486 izolatı ile Turbo izolatı ise İtalya’dan EF622208 izolatı ve EF622209 izolatı ile %100 oranında en fazla benzerliği göstermişlerdir. Ayrıca Baltiko-G izolatı İspanya’dan AJ309510 izolatı ve Hollanda’dan EF622210 izolatı ile %90 oranında en fazla farklılık gösteren izolat olmuştur.

Çizelge 4.2. Antalya ve Isparta illeri CarMV izolatları ile uluslararası CarMV izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizilimlerinin benzerlik oranları

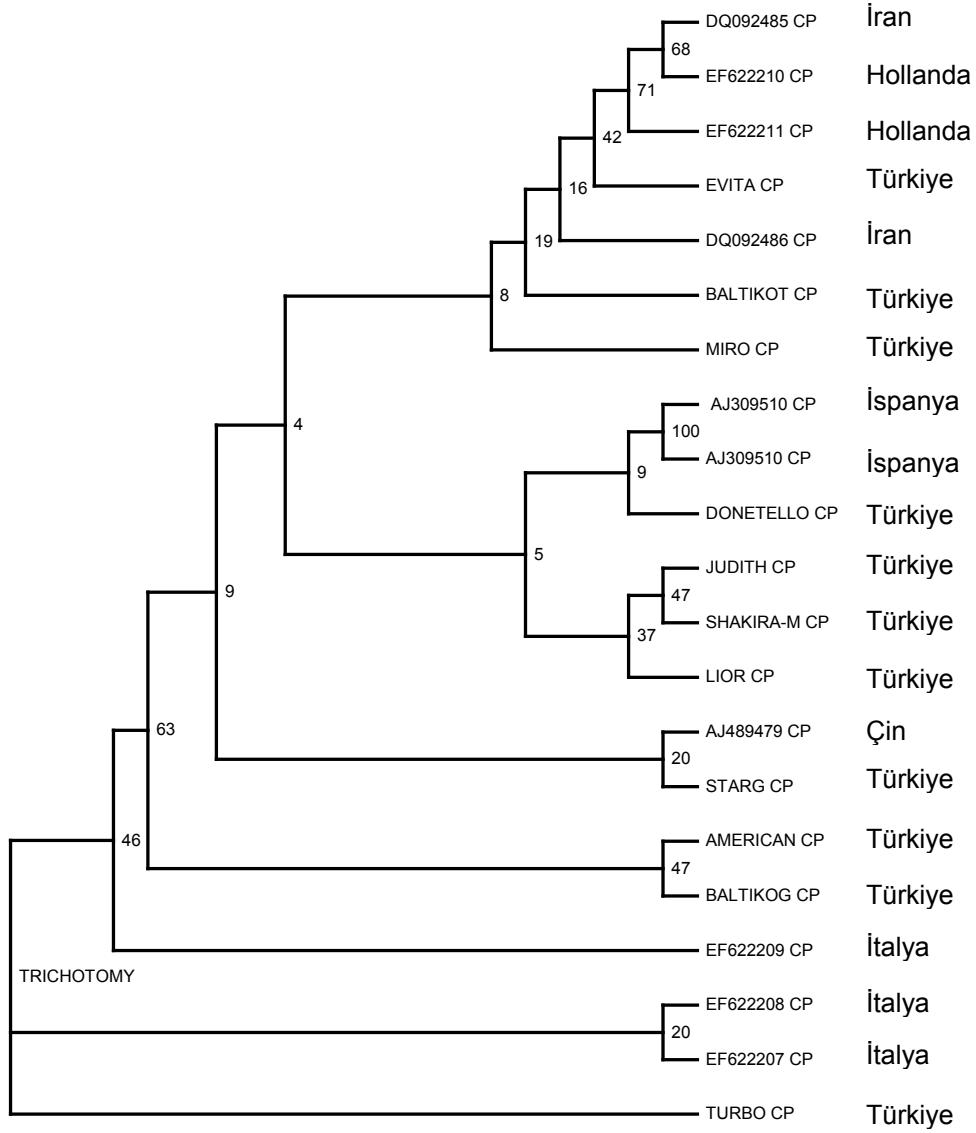
	JUDITH CP	SHAKIRA-M CP	LIOR CP	DONATELLO CP	BALTIKOT CP	DQ092485 İRAN	EF622210 HOLLANDA	EF622211 HOLLANDA	EVITA CP	DQ092486 İRAN	MIRO CP	AJ489479 ÇİN	STARG CP	AMERICAN CP	EF622207 ITALY	EF622209 ITALY	EF622208 ITALY	TURBO CP	BALTIKOG CP
AJ309510 SPAIN	98	98	97	92	98	97	96	97	96	98	98	98	98	98	97	98	98	98	90
JUDITH CP		99	98	92	99	98	97	98	97	99	98	98	98	98	98	99	99	99	91
SHAKIRA-M CP			98	92	98	97	96	97	96	98	98	98	98	98	98	98	99	99	91
LIOR CP				91	97	96	96	96	96	97	97	97	97	97	96	97	97	97	89
DONATELLO CP					93	92	91	92	91	93	92	91	92	92	91	93	93	93	85
BALTIKOT CP						98	98	98	98	100	98	98	98	98	98	99	99	99	91
DQ092485 İRAN							98	99	98	99	98	97	97	98	97	98	98	98	91
EF622210 HOLLANDA								98	97	98	97	96	96	97	96	97	98	98	90
EF622211 HOLLANDA									98	99	98	97	97	98	97	98	98	98	91
EVITA CP										98	97	96	96	97	96	97	98	98	91
DQ092486 İRAN											99	98	98	99	98	99	99	99	92
MIRO CP												98	98	98	97	98	98	98	90
AJ489479 ÇİN													98	98	97	98	98	98	91
STARG CP														98	97	98	98	98	90
AMERICAN CP															98	99	99	99	92
EF622207 ITALY																98	99	99	91
EF622209 ITALY																	100	100	91
EF622208 ITALY																		100	91
TURBO CP																			91

4.5. Filogenetik Analizler

Antalya ve Isparta illerinin farklı karanfil üretim alanlarından elde edilen CarMV izolatlarının birbirleriyle ve Gen bankası veri tabanlarında bulunan ve dünyanın farklı karanfil üretim alanlarından elde edilen 9 farklı izolat ile genetik ilişkisini belirlemek amacıyla kılıf protein genlerine ait nükleotid ve amino asit dizileri kullanılarak filogenetik analizler yapılmıştır. Nükleik asit dizilimine göre oluşturulan filogenetik soy ağacı Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Nükleik asit dizileri kullanılarak yapılan filogenetik analizler sonucunda izolatların genetik ilişkisi belirlenmiştir. Yapılan filogenetik analizler sonucunda dünyadan ve ülkemizden elde edilen CarMV izolatları CP genlerine göre iki ana gruba ayrılmıştır. Birinci grupta Antalya ve Isparta'dan 6 izolat yanında 2 Hollanda ve 2 İran izolatı yer almıştır. İkinci grupta ise Antalya ve Isparta'dan 5 izolat, 3 İtalyan, 1 İspanyol ve 1 de Çin izolatı yer almaktadır. Bu sonuçlar CarMV'nün ülkemize büyük olasılıkla bulaşık bitki materyalleri aracılığıyla İtalya'dan veya Hollanda'dan gelmiş olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle yurt dışından sağlanan yeni çeşit ve üretim materyallerinin karantinelerde daha sıkı bir şekilde PCR ve RT-PCR gibi hassas yöntemler kullanılarak test edildikten sonra ülkeye alınmaları gerekmektedir. Kılıf protein genlerinin amino asit dizilimine göre oluşturulan filogenetik soy ağacı Şekil 4.10'da gösterilmektedir.



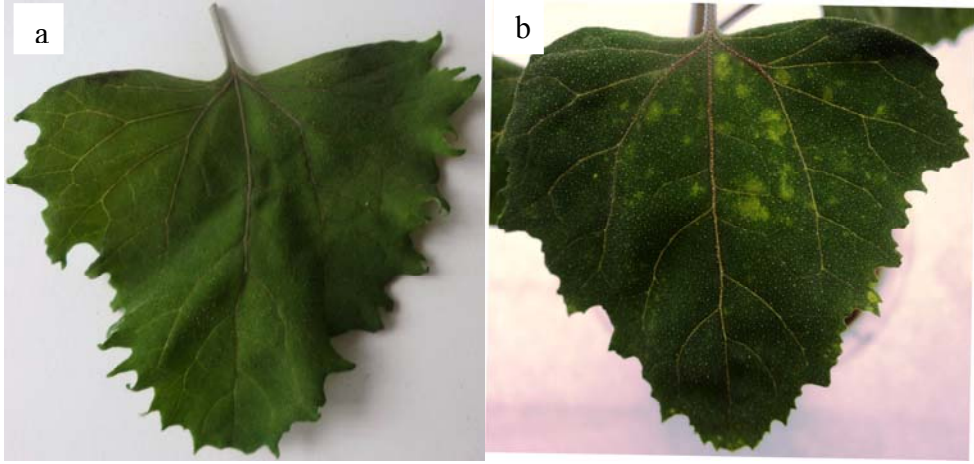
Şekil 4.9. CarMV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilerinin TreeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı



Şekil 4.10. Dünyadaki CarMV izolatları ile ülkemizdeki CarMV izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizi karşılaştırmalarının TreeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı

4.6. Biyolojik İndeksleme

Antalya ve Isparta illerinin farklı karanfil üretim alanlarından elde edilen ve PCR yöntemiyle pozitif olduğu belirlenen Evita, Lior, Miro ve Baltiko çeşitlerinde elde edilen CarMV izolatları mekanik inokülasyon çalışması için kullanılmıştır. Test bitkileri inokülasyon yapıldıktan 2-3 hafta sonra virüsün yol açtığı tipik belirtilerin oluştuğu gözlenmiştir. Mekanik inokülasyonda kullanılan tüm izolatların *C. amaranticolor* bitkisinde lokal klorotik lezyonlar oluşturduğu gözlemlenmiştir. Farklı izolatların oluşturdukları belirtiler birbirlerine ve daha önce rapor edilen klorotik lezyonlara benzerlik göstermiştir. Ancak farklı izolatların oluşturduğu lezyon sayısında ve lezyonların oluşma süreleri arasında farklılıklar gözlenmiştir. Bu farklılıklar orijinal bitkilerdeki virüs yoğunluğundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Mekanik inokülasyon sonucu belirtilerin oluşması enfekteli bulunan bitkilerde virüsün aktif olduğunu ve uzun süreli -80°C'de saklamanın virüsün enfekteleme yeteneğine olumsuz yönde etkilemediğini de göstermiştir. Mekanik inokülasyon sonucu Baltiko çeşidinden elde edilen CarMV izolatının *C. amaranticolor* bitkisinde oluşturduğu simptomlar Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11. a) Sağlıklı *Chenopodium amaranticolor* bitkisi ve b) CarMV'nün *C. amaranticolor* bitkisinde oluşturduğu lokal lezyonlar

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünyada ve ülkemizde kesme çiçekler arasında karanfil üretimi oldukça önemli bir yere sahiptir. Karanfil yetiştiriciliğinde verim ve kaliteyi düşürerek ekonomik kayıplara neden olan birçok fungal, bakteriyel ve viral hastalıklar bulunmaktadır. Viral hastalıklardan karanfil beneklenme virüsü (*Carnation mottle virus*, CarMV) karanfil yetiştirilen birçok ülkede yaygın olarak bulunmaktadır (Cañizares et al., 2001; Singh et al., 2005; Safari et al., 2009). 2008 yılında Antalya karanfil üretim alanlarında CarMV tespiti ilk olarak yapılarak ülkemizde CarMV bulunan ülkeler arasına girmiştir (Çevik vd., 2010). Daha önce yapılan bir çalışmada; Antalya ve Isparta illerinde karanfil üretim alanlarından 33 örnek RT-PCR yöntemiyle test edilerek 31 tanesinin pozitif olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma ile ülkemizde CarMV'nün yaygın olarak bulunduğu ve yetiştirilen çeşitlerin çoğunun CarMV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yapılan çalışmayla virüsün yaygınlığı kesin bir şekilde gösterilmiştir (Çevik vd., 2009).

Bu çalışmada ise ülkemizin karanfil üretim alanlarından elde edilen CarMV izolatlarının moleküler ve biyolojik karakterizasyonu yapılmıştır. Virüsün moleküler ve biyolojik karakterizasyonunun, karanfil sektöründe verimi ve kaliteyi artırmaya yardımcı çalışmalar olacağı düşünülmektedir. Günümüzde gerek virüslerin moleküler ve genetik yapılarının anlaşılması gerekse virüslere karşı dayanıklılık geliştirmek için bu tür çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Antalya ve Isparta'da giderek gelişmekte olan bir karanfil sektörü bulunduğu düşünüldüğünde bu bölge ülkemizde bu tür çalışmaların yapılacağı en ideal bölgeyi oluşturmaktadır.

Yapılan bu çalışmada Antalya ve Isparta illeri üretim seralarından elde edilen 5'er izolat olmak üzere toplam on farklı CarMV kılıf protein genleri klonlanarak dizilimleri belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda dünyanın farklı karanfil üretim bölgelerinden elde edilen izolatların da CP genlerinin baz dizilimleri belirlenmiştir (Cañizares et al., 2001; Singh et al., 2005). Daha önce yapılan çalışmalarda her bölgeyi temsil eden bir veya birkaç CarMV izolatının CP genleri klonlanıp dizilenirken ülkemizde her iki bölgeden 5'er izolat seçilip CP gen

dizilimleri belirlenerek karanfil üretim bölgeleri daha iyi bir şekilde temsil edilmiştir. Bu diziler analiz edilerek ülkemizin farklı bölgelerinden elde edilen CarMV izolatlarının CP gen dizilimleri birbirleriyle ve gen bankası veri tabanından alınan ve dünyanın farklı üretim bölgelerinden elde edilen CarMV CP genleriyle karşılaştırılarak benzerlik oranları ve genetik ilişkileri belirlenmiştir.

Bu çalışmada yapılan DNA dizi karşılaştırmaları sonucunda Antalya ve Isparta'dan elde edilen CarMV izolatları kendi aralarında %85 ile %99 arasında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ülkemiz izolatlarının genetik olarak birbirleriyle yakından ilişkili olduğunu ancak bazı izolatlar arasında da düşük düzeyde genetik varyasyon olduğu belirlenmiştir. Dünya'nın başka karanfil üretim bölgelerinde yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş ve CarMV CP geninin genetik olarak stabil olduğu ve çok fazla bir varyasyon çoğunlukla göstermediği belirlenmiştir.

Dünyanın farklı üretim bölgelerinde yapılan benzer çalışmalarda bazı bölgelerde CP gen nükleotid ve amino asit dizi benzerlik oranları ülkemiz izolatlarından fazlayken bazı bölgelerde de az bulunmuştur. Hindistan'da yapılan bir çalışmada CarMV CP genin nükleotid benzerlik oranı %94-%98 olarak belirlenirken amino asit karşılaştırmasında ise benzerlik oranları %85-%98 olarak bulunmuştur (Singh et al., 2005). Bu sonuçlar dünyada ve ülkemizde CarMV izolatlarının CP genlerinin genellikle korunmuş olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Daha önce yapılan bir çalışmada kılıf protein geninin aminoasit diziliminin 164. ve 331. pozisyonlarındaki amino asitlere göre sırasıyla prolin (P) ve lizin (K) içeren ve alanin (A) ve asparajin (N) içeren izolatlar PK ve AN olarak iki gruba ayrılmışlardır (Cañizares et al., 2001). Ülkemiz CarMV izolatlarının CP geninin amino asit dizi karşılaştırması yakından incelendiğinde kılıf proteininin 164. pozisyonlarındaki amino asitin tüm izolatlarda prolin (P) olduğu ancak 331. pozisyondaki amino asitlerin değişken olduğu görülmüştür. Bu pozisyonda Star glutamin (Q), Donetello histidin (H), American ve Baltiko-G izolatlarında serin (S), Judith ve Shakira izolatlarının ise asparajin (N) içerdiği geriye kalan izolatların tamamının lizin (K)

içerdiği görülmüştür. Buna göre ülkemiz izolatlarından 4 tanesinin daha önce tanımlanan PK grubundan (Cañizares et al., 2001) iki tanesinin Hindistan'da rapor edilen izolatlar gibi PN grubundan (Singh et al., 2005) geriye kalan 4 tanesinin daha önce tanımlanmayan PQ, PH veya PS grubuna ait olduğu ortaya çıkmıştır.

Yapılan filogenetik analizler sonucunda dünyadan ve ülkemizden elde edilen CarMV izolatları CP genlerine göre iki ana gruba ayrılmıştır. Birinci grupta Antalya ve Isparta'dan 6 izolat yanında 2 Hollanda ve 2 İran izolatı yer almıştır. İkinci grupta ise Antalya ve Isparta'dan 5 izolat, 3 İtalyan, 1 İspanya ve 1 Çin izolatı yer almaktadır. Benzer bir gruplandırma daha önce yapılan çalışmalarda da oluşmuş olup CP geninin CarMV izolatının gruplandırılmasında başarılı bir şekilde kullanıldığını ortaya koymuştur (Cañizares et al., 2001; Singh et al., 2005). Filogenetik analizlerin sonuçları CarMV'nün ülkemize büyük olasılıkla bulaşık bitki materyalleri aracılığıyla İtalya'dan veya Hollanda'dan gelmiş olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle yurt dışından sağlanan yeni çeşit ve üretim materyallerinin karantinalarda daha sıkı bir şekilde PCR ve RT-PCR gibi hassas yöntemler kullanılarak test edildikten sonra ülkeye alınmaları gerekmektedir.

Ayrıca Evita, Lior, Miro, Baltiko çeşitlerinden elde edilen CarMV izolatlarının *C. amaranticolor* ve *C. quinoa* test bitkilerine inokülasyonları yapılarak biyolojik özellikleri belirlenmiştir. Test bitkilerinde virüsün oluşturduğu belirtilerin görülmesine kadar geçen sürenin 2-3 hafta arasında değiştiği gözlenmiştir. Tüm izolatların *C. amaranticolor* bitkisinde lokal lezyonlar oluşturduğu gözlemlenmiştir. İran'ın Mahallat bölgesinde yapılan çalışmada serolojik ve moleküler yöntemlerle belirledikleri izolatların bazıları fosfat tamponu (pH 7.0) kullanılarak *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor* ve *Spinacea oleracea* bitkilerine inoküle edilmişlerdir. Inokülasyondan 4-7 gün sonra test bitkilerinin yapraklarında klorotik ve nekrotik lokal lezyonlar oluştuğu saptanmıştır (Safari et al., 2009). Mekanik inokülasyon sonucunda elde edilen belirtiler CarMV'nün tipik belirtisi olup virüsün aktif olarak bitkilerde bulunduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar moleküler teşhisleri destekleyerek karanfil çeşitlerinin çoğunda biyolojik olarak aktif virüsün bulunduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca bu çalışmada kullanılan virüs izolatlarının

yaklaşık iki yıl süreyle -80°C’de saklandığı düşünüldüğünde CarMV’nün uzun süreli aktif olarak saklandığı belirlenmiştir.

Ülkemizde farklı bölgelerde üretim yapılmakla birlikte bu çalışmada CarMV ile ilgili çalışmalar sadece Antalya ve Isparta illeri ile sınırlı kalmıştır. Ancak Türkiye karanfil üretiminin önemli bir kısmının bu bölgeden karşılandığından bu bölgeler yeterli görülmektedir. Antalya ve Isparta’nın dışında CarMV’nün yaygınlığı araştırılarak izolatların biyolojik ve moleküler karakterizasyonu yapılmasıyla CarMV’nün ülkemizdeki profilinin ortaya çıkarılması yararlı olacaktır. Bu çalışma bulguları Antalya ve Isparta illerinde CarMV’nün bulunduğu dair veriler ortaya koyarak, bunlara karşı gerekli önlemlerin alınmasının zorunlu olduğunu ve yayılmalarının engellenmesi gerektiğini ortaya koymuştur. Bu amaçla Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ve yetiştiricilere bu konuda bilgilendirilerek virüsten ari üretim materyali kullanımı teşvik edilmelidir.

6. KAYNAKLAR

- Alagöz, Z., Öktüren, F. ve Yılmaz, E., 2006. Antalya Bölgesinde Karanfil Yetiştirilen Sera Topraklarının Bazı Verimlilik Özelliklerinin Belirlenmesi. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 19(1), 123-129.
- Anonim, 2001. Bitkisel Üretim Özel İhtisas Komisyonu Süs Bitkileri Alt Komisyon Raporu. Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Raporu. <http://ekutup.dpt.gov.tr/bitkiure/sus/oik653.pdf>. Erişim Tarihi: 08.08.2011.
- Anonim, 2008. İnternet Sitesi. <http://www.cicekyetistiriciligi.com/2008/09/karanfil-diantus.html>. Erişim Tarihi: 29.09.2011.
- Anonim, 2010. Karanfil (*Dianthus Caryophyllus L.*) Virüs Hastalıkları. Çiçek Vizyon Dergisi, 42, 2 (8). <http://www.aib.org.tr/html/cicekdergi/mart2010.pdf>. Erişim Tarihi: 09.07.2011.
- Anonim, 2010. Türkiye Süs Bitkileri Sektör Raporu. T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı Antalya İhracatçı Birlikleri Genel Sekreterliği. <http://www.aib.org.tr/raporlar/kc/kcsusbitkileri2010.pdf>. Erişim Tarihi: 07.09.2011.
- Anonim, 2011. İnternet Sitesi. http://www.bitkisagligi.net/Karanfil_CarnationStreakVirus.htm. Erişim Tarihi: 30.09.2011.
- Anonymous, 2005. The Biology and Ecology of *Dianthus caryophyllus L.* (Carnation). İnternet Sitesi. www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.../carnation.../biologycarnation.rtf. Erişim Tarihi: 16.08.2011.
- Anonymous, 2007. Diagnostic kit for detection of carnation mottle virus. International application published under the patent cooperation treaty.
- Aydınşakir, K., 2009. Kesme çiçek karanfil (*Dianthus caryophyllus L.*) yetiştiriciliğinde farklı sulama programlarının verim ve kalite özellikleri üzerine etkisi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Yapılar ve Sulama Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 169s.
- Bennet and Milne, 1976. Carnation viruses in New Zealand. Acta Hort. (ISHS) 59,61-62.
- Cañizares, M. C., Marcos, J. F. and Pallás, V., 2001. Molecular variability of twenty-one geographically distinct isolates of *Carnation mottle virus* (CarMV) and phylogenetic relationships within the *Tombusviridae* family. Archives of Virology 146, 2039-2051.

- Carrington, J.C. and Morris, T.J., 1984. Complementary DNA Cloning and analysis of carnation mottle virus RNA. *Virology*, 139 (1), 22-31.
- Carrington, J.C. and Morris, T.J., 1985. Characterization of the cell-free translation products of carnation mottle virus genomic and subgenomic RNAs. *Virology*, 144 (1), 1-10.
- Carrington, J.C. and Morris, T.J., 1986. High resolution mapping of carnation mottle virus-associated RNAs. *Virology*, 150 (1), 196-206.
- Çevik B., Bakır, T., and Koca G. 2009. Antalya İli Karanfil Üretim Alanlarında Karanfil Mottle Virüsünün Tespiti ve Tanılanması. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi. 15-18 Temmuz. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi.
- Çevik B., Bakır, T., and Koca G. 2010. First report of *Carnation mottle virus* in Turkey. *Plant Pathology*, (59) 394.
- Doldur, H. 2008. Kesme Çiçek Üretimi ve Ticareti. İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Bölümü Coğrafya Dergisi, 16, 26-45.
- Garcia-Castillo, S., Marcos, J. F., Pallas, V. and Sanchez-Pina, M. A., 2001. Influence of the plant growing conditions on the translocation routes and systemic infection of carnationmottle virus in *Chenopodium quinoa* plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 58, 229-238.
- Gosalvez-Bernal, B., Garcia-Castillo, S., Pallas, V. and Sanchez-Pina, M. A., 2006. Distribution of carnation viruses in the shoot tip: Exclusion from the shoot apical meristem. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69, 43-51.
- Guilley, H., Carrington, J. C., Balazs, E., Jonard, G., Richards, K. and Morris, T. J., 1985. Nucleotide sequence and genome organization of carnation mottle virus RNA. *Nucleic Acids Research*, 13 (18), 6663-6677.
- Gürsan, K. 1986. Karanfil Yetiştirme Tekniği TAV Yayınları No. 17.Yalova.
- Gürsan, K. ve Erkal, S., 1998. Dünyada ve Türkiye’de Süs Bitkileri Üretim ve Ticaretindeki Gelişmeler. I. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi, 6-9 Ekim, Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü, Yalova.
- Groot, S.P., 1998. Floriculture Worldwide Trade and Consumption Patterns, World Conference on Horti Research, 17-22 June, Roma.
- Harbison, S.A., Wilson, T.M.A. and Davies, J.W., 1984. An encapsidated, subgenomic Messenger RNA encodes the coat protein of carnation mottle virus. *Bioscience Reports* 4, 949-956.

- Hull, R. , Sadler, J. and Longstaff, M., 1984. The sequence of carnation etched ring virus DNA: comparison with cauliflower mosaic virus and retroviruses. The EMBO Journal, 5(12), 3083-3090.
- Kassanis, B., 1956. Serological Relationship between Potato Paracrinkle Virus, Potato Virus S and Carnation Latent Virus. Journal of General Microbiology. 15, 620-628.
- Kazaz, S., 2006. Farklı Dikim Sistemleri ve Sıklıklarının Yaz Karanfil Üretiminde Verim ve Kalite Üzerine Etkileri. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 194s. <http://www.yok.gov.tr/YokTezSrv>. Erişim Tarihi: 04.09.2011.
- Li, R., Mock, R., Huang, Q., Abad, J., Hartung, J. and Kinard, G., 2008. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. Journal of Virological Methods 154 (2008), 48-55.
- Özkan, B. ve Karagüzel, O., 1997. Antalya'da Kesme Çiçek Üretiminin Mevcut Durumu. Derim Dergisi, 14(2), 50-61
- Raikhy, G., Hallan, V., Kulshrestha, S., Lal Sharma, M., Ram, R., Zaidi, A.A., 2003. Molecular characterization of a Carnation etched ring virus isolate from India Acta Virologica, 47(2), 105-111.
- Raikhy, G., Hallan, V., Kulshrestha, S., Ram, R. and Zaidi, A.A., 2006. Multiplex PCR and genome analysis of *Carnation mottle virus* Indian isolate. Current Science, 90(1).
- Raikhy, G., Hallan, V., Kulshrestha, S., Sharma, M.L., Verma, N., Ram, R., Zaidi, A.A., 2006. Detection of Carnation ringspot and Carnation vein mottle viruses in carnation cultivars in India. Acta Horticulture, 722, 247-258.
- Safari, M., Koochi Habibi, M., Mosahebi, G. and Dizadji, A., 2009. Carnation mottle virus, an important viral agent infecting carnation cut-flower crops in Mahallat of Iran. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 74(3), 861-865.
- Salomon, R., Bar-Joseph, M., Soreq, H., Gozes, I. and Littauer, U.Z., 1978. Translation *in vitro* of carnation mottle virus RNA Regulatory function of the 3'-region. Virology, 90(2), 288-298.
- Sánchez-Navarro, J.A., Cano, E.A. and Pallas, V., 1996. Non-radioactive molecular hybridization detection of carnation mottle virus in infected carnations and its comparison to serological and biological techniques. Plant Pathology, 45(2), 375-382.

- Sánchez-Navarro, J.A. Cañizares, M. C., Cano, E. A. and Pallás, V., 1999. Simultaneous detection of five carnation viruses by non-isotopic molecular hybridization Journal of Virological Methods 82, 167-175.
- Sánchez-Navarro, J. A., Canizares, M. C., Cano, E. A. and Pallas, V., 2007. Plant tissue distribution and chemical inactivation of six carnation viruses. Crop Protection 26, 1049-1054.
- Singh, H. P., Halan, V., Raikhy, G., Kulshrestha, S., Sharma, M. L., Ram, R., Garg, I. D. and Zaidi, A.A., 2005. Characterization of an Indian isolate of Carnation mottle virus infecting carnations. Current Science, 88(4), 594.
- Taşcıoğlu, Y. ve Sayın, C., 2003. Türkiye’de kesme çiçek üretim ve ihracat yapısı. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 18(3), 343-354.
- Tiryakioğlu, Y., 2006. Dondan Koruyucu Bazı Preparat Uygulamalarının Örtüaltında Yetiştirilen Karanfilde (*Dianthus caryophyllus L.*) Düşük Sıcaklığa Dayanım, Verim ve Kaliteye Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Isparta, 81s.
- İnternet Sitesi. <http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/ICTVdB/00.074.0.02.001.htm>. Erişim Tarihi: 22.07.2011.
- İnternet Sitesi. <http://www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=420&figno=02>. Erişim Tarihi: 15.08.2011.
- İnternet Sitesi. <http://www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=7&figno=04>. Erişim Tarihi: 15.08.2011.

ÖZGEÇMİŞ



Adı ve Soyadı: Tuğba BAKIR

Doğum Yeri ve Yılı: Isparta, 02.01.1986

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Burdur Anadolu Lisesi, 2000-2004

Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi, 2005-2009

Yüksek lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi, 2009-2011

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Yayımları (SCI ve diğer makaleler)

1- Çevik B., Bakır, T., and Koca G., 2010. First report of *Carnation mottle virus* in Turkey. *Plant Pathology*, (59) 394.

2- Bakır, T. ve Çevik, B. 2011. Antalya ve Isparta İllerinde Karanfil Üretim Alanlarında Karanfil Beneklenme Virüsü (*Carnation mottle viriis*, CarMV) İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi. 28-30 Haziran. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi (poster sunum).

3- Çevik, B., Korkmaz, S., Bakır, T. ve Koç, N.K., 2011. Turunçgil tristeza virüsü İzolatlarının Varyantlarının Denatüran Gradyan Jel Elektroferez (DGGE) Yöntemiyle Belirlenmesi. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi. 28-30 Haziran. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi (sözlü sunum).