

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇANAKKALE İLİNDE KARNABA HAR
MOZAİK VİRÜSÜ (*Cauliflower mosaic virus*; CaMV)
İZOLATLARININ TANILANMASI
VE KARAKTERİZASYONU

Hasan Tuna TUZLALI
Bitki Koruma Anabilim Dalı
Tezin Sunulduğu Tarih: 26.06.2012

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

ÇANAKKALE

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

HASAN TUNA TUZLALI tarafından **Prof. Dr. SAVAŞ KORKMAZ** yönetiminde hazırlanan “**ÇANAKKALE İLİNDE KARNABAHAAR MOZAİK VİRÜSÜ (Cauliflower mosaic virus; CaMV) İZOLATLARININ TANILANMASI VE KARAKTERİZASYONU**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

Danışman

Doç. Dr. Figen TÜRK

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Zeliha GÖKBAYRAK

Jüri Üyesi

Sıra No:

Tez Savunma Tarihi: 26/06/2012

Prof. Dr. İsmet KAYA

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Hazırlanan bu Yüksek Lisans Tezi ÇOMÜ BAP tarafından 2011/052 no’lu proje ile desteklenmiştir.

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Hasan Tuna TUZLALI

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleŐtirilmesinde, çalıŐmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Savaş KORKMAZ'a, çalıŐmama bilgi ve deneyimleriyle katkıda bulunan Doç. Dr. Bayram ÇEVİK'e değerli katkılarından dolayı Doç. Dr. Figen TÜRK ve Yrd. Doç. Dr. Zeliha GÖKBAYRAK'a ve çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen Ziraat Yüksek Mühendisi Ezgi KURTULUŞ'a, Öğr. Gör. Pınar TURHAN'a, Ziraat Mühendisi Esra KUNDAKÇI'ya, Ziraat Mühendisi Burçin SOYLU'ya ve hayatımın her evresinde bana destek olan değerli aileme sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Hasan Tuna TUZLALI

SİMGELER VE KISALTMALAR

APS	Amonyum persülfat
Bp	Base pair (baz çifti)
Bç	Baz çifti
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Santigrad derece
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik asit
CP	Coat Protein (Kılıf protein)
Da	Dalton
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotidtrifosfat
<i>EcoRI</i>	Endonükleaz restriksiyon enzimi
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzım Linked Immunosorbent Assay
FAO	Food and Agriculture Organization
H ₂ O	Su
IgG	Antibadi
IPTG	isopropyl β-D-1- thiogalactopyranoside
Kb	Kilo baz
kDa	Kilo dalton
M	Molarite
mg	Miligram
μl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
mA	Miliamper
Nt	Nükleotid
ORF	Açık okuma alanı
PBS	Potasyum fosfat tuz tamponu

PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
Pmol	Pikomol
RNA	Ribonükleikasit
RNAse	Ribonükleaz
SDS	Sodyum dedosil sülfat
TAE	Tris Asetik Asit EDTA
Taq	Termo stabil polimeraz enzimi
TBE	Tris Borik Asit EDTA
TBS	Tris buffer saline
TBS-T	Tris buffer saline-Tween 20
TE	Tris EDTA
TEMED	n,n,n,n tetrametiletilediamin
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu
ark.	Arkadaşları
ha	Hektar
rpm	returns per munite
u	Ünite
V	Hacim

ÖZET

ÇANAKKALE İLİNDE KARNABAHAAR MOZAİK VİRÜSÜ (*Cauliflower mosaic virus*; CaMV) İZOLATLARININ TANILANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Hasan Tuna TUZLALI

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

26/06/2012, 50

Bu çalışmada Çanakkale ili ve ilçelerinde 2010-2011 üretim yılları içinde bir sörvey çalışması yürütülerek Karnabahar mozaik virüsü (*Cauliflower mosaic virus*; CaMV)'ne benzer simptom gösteren karnabahar ve lahanada bitkilerinden 84 örnek toplanmıştır. Toplanan örnekler CaMV'nin varlığını belirlemek amacıyla DAS-ELISA ve/veya PCR yöntemiyle test edilmiştir. DAS-ELISA ve/veya PCR testleri sonucunda 84 örnekten 63 tanesi CaMV ile infekteli bulunmuştur. İnfekteli bulunan örnekler içerisinde elde edilen bazı izolatların moleküler özelliklerini belirlemek amacıyla kılıf protein (CP) genleri klonlanarak nükleik asit dizilimleri belirlenmiştir. Klonlama ve sekans analizi yapılan CaMV izolatlarına özgü nükleotid dizilimleri gen bankasında bulunan ve dünyanın farklı üretim bölgelerinden CaMV izolatlarının kılıf protein genleriyle karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalar sonucunda ülkemiz CaMV izolatlarının CP genlerinin nükleotid düzeyinde % 93-100, dünya izolatları ile % 92-97 oranında bir benzerliğe sahip olduğu bulunmuştur. Yapılan filogenetik analizler sonucunda Çanakkale izolatlarının dünyanın farklı bölgelerindeki izolatlarla farklı düzeylerde ilişki gösterdiği saptanmıştır. Bazı izolatlara yapılan Western blot analizi sonucunda 44 kDa, 39 kDa ve 37 kDa ağırlığında proteinler elde edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Çanakkale, Karnabahar mozaik virüsü, DAS-ELISA, PCR, Klonlama

ABSTRACT

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) ISOLATES IN ÇANAKKALE PROVINCE

Hasan Tuna TUZLALI

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Plant Protection Department Thesis, Master of Science

Advisor: Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

26/06/2012, 50

In this study, a survey was conducted in Çanakkale Province and sub province on cauliflower and cabbage plants that show *Cauliflower mosaic virus*-like symptoms between the years 2010-2011. A total of 84 samples were collected from these areas and tested by DAS-ELISA and/or PCR for the presence of CaMV. As a result of the DAS-ELISA and/or PCR analysis 63 out of 84 samples were found infected with CaMV. The coat protein genes of some isolates were cloned and sequenced. Isolates were further characterized and the sequences obtained from CaMV isolates of Çanakkale were compared with known sequences from other part of the world to determine the genetic differences and evolutionary relationships among CaMV isolates from Çanakkale and the other parts of the world. Comparison of CP genes revealed that CP gene of CaMV isolates from Çanakkale Province and sub provinces showed 93-100 % and isolates with the world 92-97 % identity in their nucleotide sequence, respectively. Phylogenetic analysis of the CP gene sequences showed that CaMV isolates from Canakkale provinces and sub provinces displayed different level of genetic relationship with CaMV isolates from those of the world. In this case the method isolates proteins were analyzed by western blot analysis. As a result of western blot analysis of some isolates with 44 kDa, 39 kDa and 37 kDa weight proteins were obtained.

Keywords: Çanakkale, *Cauliflower mosaic virus*, DAS-ELISA, PCR, Cloning

İÇERİK	Sayfa
TEZ SINAVI SONUÇ FORMU	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
BÖLÜM 1 – GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2 – ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
BÖLÜM 3- MATERYAL ve YÖNTEM.....	15
3.1. ARAZİ ÇALIŞMASI	15
3.2. DAS-ELISA Testi.....	15
3.2.1. Plate'in Antibadi İle Kaplanması	15
3.2.2. Bitki Örneklerinin Plate'e Yüklenmesi	16
3.2.3. Konjugat (Enzimle İşaretlenmiş Antibadi) Eklenmesi	16
3.2.4. Substrat Eklenmesi	16
3.3. Western Blot Analizi	16
3.3.1 Örneklerin Hazırlanması	17
3.3.2. Jel Hazırlanması.....	17
3.3.3. Elektroforez Aşaması	18
3.3.4. Blotlama İşlemi.....	18
3.3.5. Bloklama	19
3.3.6. Özgül Antikorlar İle Kaplama.....	19
3.3.7 Proteinlerin Görüntülenmesi	19
3.4. Oligonükleotid Primerlerin Hazırlanışı	19
3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	19
3.5.1. DNA İzolasyonu.....	19
3.5.2. Kılıf Protein Genlerinin Çoğaltılması.....	20
3.6. Klonlama ve Sekans Analizi	20
3.6.1. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	20
3.6.2. Kılıf Protein Genlerinin Klonlanması	21
3.6.2.1. Ligasyon (Birleştirme)	21
3.6.2.2. Transformasyon.....	21
3.6.2.3. Rekombinant Kolonilerin Seçimi (Seleksiyon)	21

3.6.2.4 Koloni PCR	22
3.6.2.5. Plazmid İzolasyonu	23
3.6.2.6. EcoR I Restriksiyon Enzimiyle Kesme İşlemi (Digestion).....	23
3.6.3. Kılıf Protein Geninin Dizisinin Belirlenmesi.....	24
3.6.4. Kılıf Protein Geninin Filogenetik Analizi.....	24
BÖLÜM 4 – ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	26
4.1. Arazi Çalışmaları	26
4.2. DAS-ELISA Testi Bulguları	27
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizi Uygulamaları.....	29
4.4. Western Blot Analizi Uygulamaları.....	31
4.5. Klonlama ve Sekans Analizi Çalışmaları	32
4.6. Kılıf Protein Genlerinin Dizi Analizleri	35
4.6.1. Nükleotid Dizi Analizi	36
4.6.2. Filogenetik Analizler	38
BÖLÜM 5 – SONUÇ VE ÖNERİLER	42
KAYNAKLAR.....	45
Çizelgeler	I
Şekiller	II
Özgeçmiş	III

BÖLÜM 1**GİRİŞ**

Tüm Dünyada ve ülkemizde önemli bir yer tutan sebze tarımı günümüzde gerek birim alandan elde edilen yüksek getirisi ile gerekse de hızla artan nüfusun ihtiyaçlarının karşılanması adına son derece önem arz etmektedir. Bununla birlikte günümüzde sağlıklı ve dengeli beslenmek için mutlak suretle sebzelere de ihtiyacımız olduğu net olarak bilinmektedir. Tüm bu ihtiyaçların karşılanması için sebze üretiminde en yüksek verim ve kaliteyi elde etmek zorunlu hale gelmiştir. Bu bağlamda ülkemizde ve diğer bazı ülkelerde yüksek verim ve kaliteyi elde etme adına yapılan çalışmalar hızla devam etmektedir.

İçerdiği vitamin, mineral madde, karbonhidrat ve protein ile insan yaşamında dengeli beslenmenin vazgeçilmez unsurlarından olan sebzelerin kök, gövde, sürgün, yaprak, çiçek, meyve ve tohum gibi kısımlarından yararlanılmaktadır. Tüm bu faydalarının yanı sıra hem taze olarak hem de pişirilerek tüketilen sebzeler düşük yağ içeriğine sahiptirler ve bu özellikleri nedeni ile de sebzeler aynı zamanda diyet yiyeceklerinin vazgeçilmez unsurları arasında yer alırlar.

Ülkemiz çok büyük bir ekolojik zenginliğe sahiptir. Bu özellik birçok alanda ve diğer bitkisel üretim dallarında olduğu gibi sebze yetiştiriciliğinde de önemli bir avantaj sağlamakta, ülkemizi bir sebze cenneti konumuna getirmektedir. Ülkemizde ılıman iklim türlerinden tropik iklim türlerine kadar uzanan yazlık ve kışlık 50 civarında sebze türü yetiştirilmektedir. Buna ek olarak 20 kadar bitkinin de kültürü yapılmamakla birlikte doğadan toplanıp sebze şeklinde tüketildiği bilinmektedir (Korkmaz ve ark., 2010).

Bu sebze türleri içerisinde yer alan karnabahar (*Brassica oleraceae* L. Convar. *Botrytis* (L) Alef. var. *Botrytis*) ve lahanagiller, *Rhoadales* takımı, *Brassicaceae* familyasında yer alırlar. Önemli bir kalsiyum, vitamin C ile A ve selüloz kaynağı olan karnabahar ve lahana, kışlık sebzeler grubunda yer almakta ve üretimleri ise yaz sonu, sonbahar ve kış aylarında yapılmaktadır (Erkan ve ark., 1990).

2010 yılı FAO istatistiklerine göre Dünya karnabahar üretiminde Çin 7.555.242 ton ile birinci sırada yer almaktadır. Çin'i takiben sırasıyla Hindistan (5.988.000 ton), İspanya (511.100 ton) ve İtalya (427.407 ton) yer almaktadır (Anonim, 2010a). Ülkemiz ise 158.579 ton ile karnabahar üretiminde 11. sırada yer almaktadır. Aynı yıl verilerine göre bölgeler bazında en fazla üretim 44.279 ton ile Ege Bölgesi'nde yapılırken Akdeniz Bölgesi'nde 40.488 ton ve Doğu Marmara Bölgesi'nde ise 35.637 ton karnabahar üretimi yapılmıştır. Çanakkale ilinde ise 3.275 ton üretim yapılmıştır ve üretimin yoğun olduğu ilçeler, Ezine

(1.250 ton) ve Ayvacık (663 ton) ilçeleridir (Anonim, 2010b).

Lahana üretiminde ise 2010 yılı FAO verilerine göre Dünya üretiminde Çin 25.156.578 ton ile birinci sırada yer almakta ve ardından Hindistan (6.356.800 ton), Rusya (2.732.510 ton) ve Japonya (2.247.700 ton) gelmektedir. Ülkemiz ise 693.002 ton üretim ile 13. sırada yer almaktadır (Anonim, 2010a). Aynı yıl verilerine göre ülkemizde lahana üretimi başta 249.645 ton ile Batı Karadeniz Bölgesi'nde yapılırken bu bölgeyi Ege Bölgesi (89.106 ton) ve Orta Anadolu Bölgesi (81.826 ton) izlemektedir. Çanakkale ilinde ise 6.438 ton lahana üretimi yapılmıştır ve üretimin yoğun olarak yapıldığı ilçeler ise Ayvacık (1.932 ton) ve Gelibolu (1.890 ton) ilçeleridir (Anonim, 2010b).

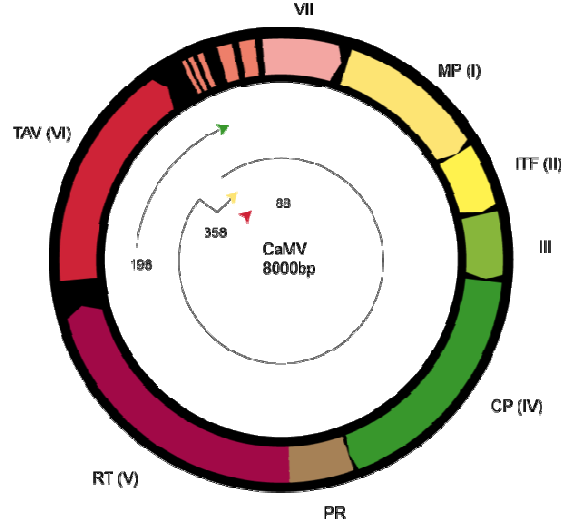
Tüm kültür bitkilerinde olduğu gibi sebzelerde de üretimde kalite ve verimi etkileyen faktörler bulunmaktadır. Bu faktörleri biyotik ve abiyotik faktörler altında incelemek mümkündür. Abiyotik faktörlerin yanı sıra ekonomik anlamda kayıplara neden olan birçok fungal, bakteriyel ve viral patojenler ile zararlılar bulunmaktadır.

Viral etmenler, bitkiden bitkiye mekanik yollardan kolaylıkla bulaşabilmeleri, tohum, vejetatif üretim materyalleri veya vektörler aracılığıyla çok daha geniş alanlara kısa sürede yayılabilmeleri ve özellikle diğer etmenlerde olduğu gibi bunlara karşı kullanılacak etkili bir kimyasal mücadele yönteminin bulunmaması nedeni ile ayrıca bir öneme sahiptirler.

Karnabahar ve lahananın ülkemizde ve dünyada konukçusu olduğu birçok hastalık ve zararlı vardır. Bu hastalık ve zararlılar karnabahar ve lahana üretimini azaltmakta, kalite ve pazarlama değerlerini düşürmektedirler. Bu etmenlerden bir tanesi de Karnabahar mozaik virüsü (*Cauliflower mosaic virus*; CaMV) 'dür.

Karnabahar mozaik virüsü, *Caulimovirus* grubu üyesi olup dünya genelinde *Brassicaceae* familyasına ait bitkilerde en sık rastlanan ve en önemli virüstür. CaMV ilk olarak Amerika'da *Brassica campestris* ve *Brassica oleracea*'da rapor edilmiştir (Tompkins, 1937).

CaMV, *Brassicaceae* familyasına ait bitkilerin yetiştiriciliğinin yapılabildiği uygun iklim koşullarına sahip her yerde görülebilmektedir (Sutic ve ark., 1999). CaMV karakteristik olarak *Caulimovirus* grubu üyesi ve çift sarmal DNA içeren bir virüstür (Sephard, 1981). CaMV 50 nm çapında izometrik partiküllere sahiptir ve alt birimi 420 kapsid proteinden oluşmuştur. Dairesel çift sarmal genomu 8 kb'dir (Cheng ve ark., 1992). Viral partiküllerinin % 16-17'si nükleik asit, % 83-84'ü protein içermektedir (Shephard ve ark., 1970). CaMV genomu 7 major ORF (Open reading frame) (I-VII) içerir (Şekil 1).



Şekil 1.1 Karnabakar mozaik virüsü genomu.

Bu ORF'ler RNA'nın ters transkripsiyonu aracılığıyla replike olurlar (Mason ve ark., 1987; Haas ve ark., 2002). CaMV genomu 6 protein tarafından kodlanır. ORF I (40 kDa) hücreden hücreye taşınma proteinlerini içerir (Thomas ve ark., 1993). ORF II (18 kDa) ve ORF III (15 kDa) afitlerle taşınmada rol oynar. (Dautel ve ark., 1994; Leh ve ark., 1999). ORF IV (57 kDa) kılıf protein genini kodlar (Daubert ve ark., 1982), ORF V (78 kDa) proteinase enzimlerin içerir reverse transkripsiyonda rol oynar (Torruella ve ark., 1986). ORF VI (62 kDa) ise konukçu dizini ve simptomoloji ile ilişkili multifonksiyonel proteinleri üretir (Schoelz ve Shephard, 1988). CaMV aynı zamanda transgenik bitki teknolojisinde kullanılmaktadır ve transgenik bitki teknolojisinde bitkiye aktarılan genin aktivitesini yönlendirmek için ek bir DNA parçası kullanılmaktadır. Bu gen parçasına promoter denmektedir. CaMV 35S promoter, transgenik bitki teknolojisinde sıklıkla kullanılmaktadır.

CaMV'nin konukçu dizini genel olarak *Brassicaceae* familyası ile sınırlandırılmıştır ve birçok ülkede sebzelerde ekonomik anlamda büyük problemler oluşturmaktadır (Tomlinson, 1987). Hastalığın oluş sıklığı % 70'i geçebilir ve karnabaharların verimleri % 50'den % 20'ye düşebilir. (Shephard, 1981; Sutic ve ark., 1999).

Bu virüs daha çok *Brassica campestris* ve *Brassica oleraceae*'da birçok sistemik enfeksiyona (kloroz, mozaik, damar açılması ve bodurlaşma) neden olur ve sıklıkla *Turnip mosaic virus* (TuMV) ile karışık enfeksiyon halinde görülebilmektedir (Shephard, 1981). Tüm CaMV izolatları dünya genelinde *Brassicaceae* familyasına ait bitkileri infekte edebilmektedir. Fakat bu izolatlar içerisinde sadece D4 ve W260 izolatları ayrıca *Solanaceae* familyasına ait türleri, *Datura stramonium* ve bazı tütün türlerini de infekte edebilmektedir. (Daubert ve ark.,

1984; Daubert ve Routh, 1990; Anderson ve ark., 1991; Qiu ve ark., 1997).

CaMV doğada yaprak bitleriyle taşınabilmektedir (Palacios ve ark., 2002) CaMV'nin vektörü olduğu bilinen en az 27 tür yaprak biti tanımlanmıştır (Kennedy ve ark., 1962). Fakat bazı izolatlar yaprak bitleriyle doğal olarak taşınmamakta (Lung ve Pirone, 1973) ve doğal olmayan koşullarda taşınma işlemi gerçekleşmektedir (Pirone ve Blanc, 1996; Gray ve Banerjee, 1999). Mekanik olarak da taşınabilen CaMV, tohumla ve polenle taşınmamaktadır (Blanc ve ark., 2001). Karnabahar mozaik virüsü konukçularında strainlere, konukçu ve çevre koşullarına bağlı olarak ılımlıdan şiddetliye doğru değişen çeşitli kloroz, mozaik, damar açılması ve bodurlaşma gibi sistemik semptomlara neden olur (Melcher, 1989; Wintermantel ve ark., 1993).

Bu çalışmada Çanakkale ili ve ilçelerinde Karnabahar mozaik virüsü (CaMV) semptomlarına benzer semptom gösteren karnabahar ve lahanalar bitkilerinden örnekler alınarak DAS-ELISA ve PCR yöntemleri ile test edilmiş enfekteli çıkan örneklerden bazıları klonlanarak nükleik asit dizimleri belirlenmiş ve soyağacı çıkarılmıştır.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Xiong ve ark. (1982) yaptıkları çalışmada şalgam bitkisinde benzer semptomlar (bodurlaşma, mozaik ve yaprak deformasyonları) oluşturan iki CaMV izolatını elektron mikroskobu kullanarak karşılaştırmışlardır. Çalışma kapsamında her iki izolatı da aynı koşullarda (21°C, 2000 lux 16 sa/gün) genç şalgam bitkilerinde çoğaltmışlardır. Bu izolatlardan Cabb-S infekteli hücrelerde daha yoğun elektronlara sahip ve daha az sayıda partikül içerirken bunun aksine Cabb-D/H ise infekteli hücrelerde sayıca daha fazla partikül barındırdığını ve daha az yoğunlukta elektron içerdiğini belirtmişlerdir. Cabb-S izolatının inokulasyondan sonra varlığını 3 gün içinde saptamışlar, Cabb-D/H izolatında ise inokulasyondan 6 gün sonra saptayabilmişlerdir. Her iki izolatı birden inokule ettiklerinde ise inokulasyondan yaklaşık olarak 10 gün sonra infekteli hücrelerde virüs varlığını saptamışlardır. Sonuç itibariyle her iki virüsün yaklaşık aynı boyutlarda olduğunu fakat gelişimlerinin ve bileşenlerinin farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir.

Schoelz ve ark. (1985) CaMV'nin bilinmeyen bir ırkının özellikleri üzerine bir çalışma yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada doğal olarak *Brassica campestris*'i infekteleyen ve aynı zamanda, sistemik olarak *Datura stramonium* (şeytan elması) ve bazı *Solanaceae* familyasından bitkileri infekte edebilen bir virüsü araştırmışlardır. Çalışma kapsamında mekanik inokulasyon, serolojik testler, yaprak bitleriyle taşıma denemeleri ve klonlama çalışmaları yapmışlardır. Virüsün yaprak bitleriyle taşınabiliyor olması ve *Brassicaceae*'nin yanı sıra *Solanaceae* familyasına ait bitkileri de infekte etmesinden dolayı CaMV'nin D4 streyni olabileceğini düşünmüşler fakat bu virüsün *Brassicaceae* familyasında alışagelmemiş olan damarlar arası nekrozlar oluşturduğunu ve yapılan mekanik inokulasyonlar sonucunda diğer familyalardan bitkileri infekte etmediğini gözlemlemişlerdir. Saflaştırdıkları virüs partiküllerinin yuvarlak ve yaklaşık 50 nm çapında olduğunu, CaMV antiserumuna reaksiyon gösterdiğini ve inclusion badilerinin karakteristik olarak *Caulimovirus*'lere ait olduğunu bildirmişlerdir. Şalgam bitkisinden saflaştırdıkları virüsü, *E. coli* bakterisine aktarmışlar ve elde edilen klonlarının *Brassica campestris*'i infektelediğini ve orjinal virüs ile aynı belirtileri gösterdiğini belirtmişlerdir. Klonlanmış DNA'nın endonükleaz restriksiyon haritasının CaMV ile benzerlik taşıdığını ve alışagelmemiş semptomları ve konukçusu olan bu virüsün CaMV'nin bir streyni olduğunu bildirmişlerdir.

Schoelz ve ark. (1986) yaptıkları çalışmada CaMV'nin, *Solanaceae* familyasından konukçuları üzerindeki semptomların belirlenmesinde önemli rol oynayan ORF VI üzerine bir

çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma kapsamında *D. stramonium* ve *N. bigelovii*'nin de dahil olduğu *Solanaceae* familyasından bir çok bitkiyi infekte edebilen CaMV D4 streyni ile CM 1841, Cabb-B streynleri ve bu streynlerin 9 rekombinant genomlarını kullanmışlar ve *Solanaceae* familyasından konukçuları infekte edebilme özelliklerini test etmişlerdir. Çalışmalarında mekanik inokulasyon, ELISA testi ve klonlama çalışmalarından faydalanmışlardır. Saflaştırdıkları virüsü *Escherichia coli* bakterisine aktarmışlar ve bunlardan elde ettikleri plasmidleri çalışma materyali olarak kullanmışlardır. Çalışma sonucunda *Solanaceae* familyasından bitkilerde lokal lezyon ve virüsün sistemik olarak yayılmasına neden olan ve CaMV'nin 496 bç içeren ORF VI genomunun ilk yarısını kapsayan segmentte meydana gelen değişimlerin CaMV ırkları arasında konukçu reaksiyonlarında değişime yol açtığını belirlemişlerdir. Sonuç itibariyle bu segmentte meydana gelen değişimlerin *Solanaceae* familyasından bitkilerde aşırı duyarlı reaksiyonları baskı altına alınıp yerine normal duyarlılıkta reaksiyonlar oluşturduğunu saptamışlardır.

Erkan ve ark. (1990) yaptıkları çalışmada 1989 ve 1990 yıllarında Ege ve Akdeniz Bölgeleri'nde karnabahar ve lahanalarda bir sörvey yürüterek virüs benzeri simptom gösteren bitkiler toplamış ve bunlardan elde edilen bitki özularını *Brassica campestris* subsp. *pekinensis* (Çin lahanası), *B. campestris rapa* (Şalgam), *B. oleracea* var. *botrytis* (karnabahar), *B. oleracea* var. *capitata* (baş lahana), *B. oleracea* var. *italica* (brokoli), *Datura stramonium* ve *Nicotinia clevelandii* gibi bitkilere mekanik olarak taşımışlardır. Mekanik inokulasyondan sonra karnabahar ve lahanadan izole edilen etmenlerin aynı tipte olduğunu saptamışlardır. Test bitkileri üzerindeki simptomlar ve sonuçlar bunun karnabahar mozaik virüsü olduğunu gösterdiğini bildirmişlerdir. Serolojik çalışmalarda CaMV ve TuMV'ye spesifik antibadi kullanılarak çift yönlü agar testi uygulanmıştır. Elde edilen veriler, karnabahar ve lahana bitkilerindeki etmenin CaMV antiserumu ile kesin ve net çökelti hatları oluşturduğunu ortaya koymuştur. Elektron mikroskopta yapılan ISEM testleri sonucunda etmenin yaklaşık 50 nm çapında küresel şekilli partiküllere sahip olduğunu saptamışlardır. Karnabahar ve lahana üzerindeki virüs simptomları ilk defa Türkiye'de bu çalışma ile gösterilmiştir.

Daubert ve Routh (1990) Karnabahar mozaik virüsü ORF VI üzerinde oluşan nokta mutasyonu sonucunda konukçu spesifitesi ve simptom değişikliği üzerine yaptıkları çalışmada CaMV D4 streyninin mutasyonu sonucunda viral DNA sekansındaki değişikliklerle ilişkili olarak konukçu spesifitesi üzerine değişimleri irdelemişlerdir. Virüsün mutasyona uğramış ve uğramamış tiplerini *Brassicaceae* familyasından konukçularına infekte etmişler ve sistemik olarak gelişen ve birbirinden ayırt edilemeyen simptomlar oluştuğunu gözlemlemişlerdir.

Bununla birlikte mutasyona uğramamış virüs, *Solanaceae* familyasından olan *Datura stramonium*'u sistemik olarak infekte ederken, mutantının ise 21°C ve üzeri sıcaklıklarda nekrotik lokal lezyonlar, daha az sıcaklıklarda ise damarlar arasında nekrozlar oluşturduğunu saptamışlardır. D4 streyninin mutantının, gen VI üzerindeki değişikliklerden dolayı orijinal streynden farklılık gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Çalışmada Mutant streyn ile infekteli bitkilerin ekstraktlarından yapılan western blot analizi ile 62 kDa ağırlığındaki gen VI ile aynı kodlama bölgesinden diğer mutantlara ait 25 kDa ve 35 kDa ağırlığında olan iki küçük protein daha saptadıklarını bildirmişler ve bu değişimlerin ORF VI üzerindeki mutasyondan kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Mevel ve Kerlan (1990) *Solanaceae* familyasından konukçularda CaMV'nin farklı izolatlarının biyolojik özellikleri belirlemek amacı ile yaptıkları çalışmada CaMV izolatlarını farklı tütün türlerine ve *D. stramonium*'a inokule etmişlerdir. Fransa'da karnabahar bitkisinden elde ettikleri 11 CaMV izolatı ve 2 Arjantin streynini daha önceden bilinen 5 streyn (Cabb-S, Cabb-B, Cabb-BJI, PV-45, CM4-184) ile kıyaslamışlardır. 6 Fransız izolatı ile iki Arjantin streyni ve Cabb-BJI izolatının *Datura stramonium*'u sistemik olarak infektelediğini ve yapraklarda klorotik ve/veya nekrotik beneklenmeler oluşturduğunu ve ayrıca zaman zaman bu nekrotik alanların birleştiğini gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte sistemik reaksiyonları 3 tütün türünde gözlemlemişler ve bunlardan *N. bigelowii*'ye inokule ettikleri French 1 ve bir Arjantin izolatının, inokule edilmeyen yapraklarda da nekrotik lekelenmeler gösterdiğini bildirmişlerdir. Sistemik nekrotik lekelenmeleri iki Arjantin izolatının inokule edildiği *N. clevelandii*'de de gözlemlemişlerdir. Üç Fransız izolatı, her iki Arjantin streyni ve de Cabb-BJI izolatının, *N. benthamiana*'ya inokulasyonu sonucunda ise ilk defa CaMV'nin sistemik olarak damar açılması ve/veya klorotik lekelenmeler gösterdiğini kaydetmişlerdir. Yapılan çalışmalarda *N. edwardsonii*, *N. glutinosa*, *N. glauca*, *N. tabacum* (*Turkish*, *Samsun* ve *Xanthi*) ve *N. rustica* türlerinde sadece klorotik veya nekrotik lezyonlar oluştuğunu belirlemişlerdir. Test edilen bütün streynlerin en azından bir konukçu türünü infekte edebildiğini, fakat konukçuların hepsinin bu streynlere duyarlı olmadığını belirlemişlerdir. *D. Stramonium*'da yaprak, meyve ve tohumlarda görülen belirtilerin pratikte izolatlar arasındaki farklılıkların belirlenmesini sağladığını ve sadece *N. debneyi*'nin yapılan tüm testler sonucunda tüm izolat ve streynlere reaksiyon verdiğini bildirmişlerdir. Çalışma sonunda en azından karnabahar yetiştirilen alanlarda CaMV izolatlarının, sistemik olarak infekteledikleri *Solanacea* konukçularında CaMV'nin bilinenden daha sık görüldüğünü bildirmişlerdir.

Anderson ve ark. (1991) hastalık şiddeti ve virüs konantrasyonunun belirlenmesi üzerine yaptıkları bir çalışmada CaMV'nin CM 1841 ve W260 ırklarını şalgam bitkisine inokule ettiklerinde çok farklı belirtiler gösterdiğini saptamışlardır. Cm 1841 ırkı infekteli bitkilerde orta derecede bodurlaşma gösterirken, W260 ırkında ise yoğun biçimde bodurlaşma görülmüştür. CM 1841, W260 ırkına göre daha az zarar yapmasına rağmen infekteli yapraklardaki virüs konantrasyonu Cm 1841'de daha yüksek bulunmuştur. W260 ırkının hastalık yapma yoğunluğunu belirlemek amacıyla her iki ırk kullanılarak hibrid virüsler üretilmiştir. Yapılan demeler sonucunda virüs konantrasyonu ve bodurlaşma derecesinin CaMV ORF VI tarafından yönetildiği, bunun yanı sıra CaMV izolatları tarafından gerçekleştirilen bodurlaşmanın derecesinin, viral genin ifade edilmesi ve viral genin konukçu metabolizmasını etkilemesine bağlı olarak değiştiği bildirmişlerdir.

Hardwick ve ark. (1994) İngiltere ve Galler'de 1992 ve 1993 yıllarında kolzalarda CaMV, *Beet western yellows virus* (BWYV) ve TuMV'nin varlığı ve şiddeti üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma kapsamında örnekleri ELISA ile test etmişlerdir. BWYV için indirect ELISA, CaMV ve TuMV için ise DAS-ELISA yöntemlerini uygulamışlardır. 1992'de yapılan sörveyler sonucu toplanan 118 örneğin 73'ü BWYV ile infekteli (% 62) 16'sı (% 14) CaMV ile infekteli (% 14) ve 3 tanesi de TuMV ile infekteli olarak bulmuşlardır. 1993 yılında yapılan sörveylerde ise 128 adet örneği test etmişler ve BWYV ile infekteli 54 örnek (% 42), CaMV ile infekteli 32 örnek (% 25) ve TuMV ile infekteli 18 örnek (% 14) elde etmişlerdir. Yapılan testler sonucunda karışık infeksiyon şeklinde BWYV+CaMV+TuMV, BWYV+CaMV, BWYV+TuMV, CaMV+TuMV ile infekteli olan örnekler elde etmişler, aynı zamanda şiddetli virüs simptomları gösteren bitkilerde verim kaybının % 70'den % 79'lara kadar çıkabildiğini bildirmişlerdir.

Al-Kaff ve Covey (1994) Karnabahar mozaik virüsü klonlarının biyolojik özelliklerinin varyasyonları üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma kapsamında 3 CaMV izolatının (11/3, XJ ve Aust) DNA'larının patojenik varyanslarını belirlemek amacıyla infektiyöz klonlarını elde etmişlerdir. 11/3 izolatından 10 klon elde etmişler ve mekanik inokulasyon çalışmalarında bu klonlardan 4'ünün şalgam bitkisinde klonlanmamış olduğunu ve 11/3 izolatına göre farklı simptom oluşturduğunu belirlemişlerdir. Yaptıkları taşıma denemelerinde 4 klondan sadece 2'sinin virüsü taşıyabildiklerini saptamışlardır. XJ izolatından 2 grup halinde olmak üzere toplam 5 infektiyöz klon elde etmişler ve bu iki gruptan biri, klonlanmamış XJ izolatından farklı simptomlar göstermiştir. Aust izolatından sadece 1 klon elde etmişler ve bu klonun Aust izolatıyla benzerlik gösterdiğini bildirmişler ve klonlarda bulunan restriksiyon enzimlerinin varlığını simptom değişikliği ile ilişkilendirmişlerdir. Bu

virüslerin diğer CaMV izolatlarıyla kıyaslanmasında gözlenen bir başka varyasyonu da afitle taşımadan sorumlu ORF II'den kaynaklandığını öne sürmüşler ve yaprak bitleriyle taşınmayan klonların ORF II'lerde meydana gelen silinmeden kaynaklandığını bildirmişler ve varyasyonları genomlarda oluşan ufak değişimlerle ilişkilendirmişlerdir.

Al-kaff ve Covey (1995) Karnabahar mozaik virüsü izolatlarının biyolojik çeşitliklerinin iki *Brassica* türü üzerindeki etkilerini belirlemek amacı ile Avusturya, Almanya, Danimarka ve Çin'in dahil olduğu 15 farklı ülkeden elde edilen 39 CaMV izolatını duyarlı *Brassica rapa rapifera* (şalgam) ve tolerant *Brassica oleracea gongylodes* (Alabaş) konukçularına infekte etmişler ve infeksiyonu takiben oluşan patolojik karakteristiklerini ve simptomları karşılaştırmışlardır. Çalışmada belirgin simptomları duyarlı olan şalgam bitkisinde gözlemlenmiştir. Elde edilen lokal simptomlar 4-10 gün arasında sistemik olanlar ise 10-20 gün arasında ortaya çıkmıştır. Sistemik infeksiyonlar, damar açılmaları, damar bantlaşmaları ve şiddetli klorozlar şeklinde oluşmuştur. Şalgam bitkilerinde orta şiddetliden şiddetliye doğru değişen oranlarda bodurlaşma, yaprak kıvrıcıklığı ve buruşukluklar gözlenmiştir. Bunun aksine alabaşlarda aynı CaMV izolatlarının neden olduğu belirtiler yaşlı yapraklarla sınırlı kalmış ve bitki yapısında bozulma olmadığı gibi orta şiddette damar açılması ve az oranda kloroz oluşmuştur. CaMV ile infekteli bitkilerdeki DNA miktarını belirlemek için dot-blot yöntemini kullanmışlar ve tüm şalgam ve alabaş izolatları arasında büyük farklılıklar elde etmişlerdir. Alabaşta infeksiyondan sonra viral DNA miktarında artış gözlenmezken şalgamda ise virüs miktarı ile simptom çeşidi ya da şiddeti arasında bir bağlantı kurulmadığını bildirmişlerdir.

Cecchini ve ark. (1998) Karnabahar mozaik virüsü varyantları ile *Arabidopsis thaliana* arasındaki patojenik interaksiyonları belirlemek üzere bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma kapsamında *A. thaliana* Col-0 *g/l* ekotipinde 30 CaMV izolatının neden olduğu simptom karakterlerini kaydetmişlerdir. 13 izolat simptom oluşumunda başarısız olmuş, geriye kalan izolatlar ise orta şiddetliden aşırı şiddetliye doğru değişen belirtiler göstermişlerdir. Bazı CaMV izolatları, *A. thaliana* bitkisinde, şalgamda oluşturdukları simptomlardan farklı olarak belirgin, karakteristik olan ya da daha şiddetli simptomlar oluşturmuşlardır. İzolatlar içerisinde Bari-1 izolatı Col-0 *g/l* ekotipinde simptom oluşturmamasına rağmen bu izolata ait virüs partikülleri bu ekotipte belirlenmiş, aynı izolat Ler *g/l* ekotipinde ise orta şiddette simptomlara neden olmuştur. CaMV izolatlarından Cabb B-JI ve Bari-1'den edilen hibrit virüsün, her iki virüsün orijinininden daha şiddetli simptomlara neden olduğunu belirlemişlerdir. Mutasyon çalışmaları sonucunda ise elde edilen Col-0 *dv1* ekotipinin, CaMV Bari-1 izolatı ile infeksiyonu sonucunda ekotipin mutanlığı olmayan Col-0 *g/l* ekotipininin

aksine simptom oluşturabildiğini gözlemlemişlerdir.

Leh ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada CaMV'nin yaprak bitleri ile taşınmasında ORF III'ün fonksiyonu üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. CaMV'nin yaprak bitleri ile taşınmasında sorumlu olan bölgenin ORF II olduğunu, fakat taşınmada daha önceleri rolü tam olarak anlaşılmamış olan ORF III'ünde taşınmanın gerçekleşebilmesi için bir yardımcı unsur olarak gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma kapsamında yaprak biti denemelerinde PII proteinleri kusurlu olan CM4-184 streynini kullanmışlar ve verimli olarak taşınmayı ancak PIII varlığında gerçekleştirebilmişlerdir. Bu çalışmada CaMV PIII proteinlerinin kapasitesini ve diğer proteinlerle ilişkisini belirlemek amacı ile sağlıklı ve infekteli şalgam yapraklarından ekstraktlar elde etmişler ve daha sonra şalgam bitkisinden elde ettikleri proteinleri SDS-PAGE ile ayırıp nitroselüloz membrana aktarmışlardır. Western blot analizi sonucunda P III'e ait 15 kDa ve P II'ye ait 18 kDa ağırlığında iki ayrı bant gözlemlemişlerdir. Çalışma sonucunda PII ve PIII arasında bir interaksiyon olduğunu ve yaprak bitleri ile CaMV'nin taşınabilmesi için ikincil yardımcı unsur olan PIII'ünde gerekli olduğunu bildirmişlerdir.

Agama ve ark (2002) Karnabahar mozaik virüsü'ne dayanıklı *Arabidopsis thaliana* Tsu-0 Ekotipinin CaMV'ye olan direncini kırmak üzere bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma kapsamında *A. thaliana* Tsu-0 ve Col-0 ekotipleri ile farklı CaMV izolatlarını kullanmışlardır. Tüm izolatları şalgam bitkisinden elde etmiş ve mekanik inokulasyon çalışmalarını ekotipler 6 yapraklı iken yapmışlardır. Biyolojik testleri doğrulamak için moleküler bir yöntem olan PCR yöntemini kullanmışlardır. Cabb-S, CaN, CM1841, CMV-1, D/H, NY8153, NY8158 ve W260 izolatlarından plasmid DNA elde etmişler ve spesifik primerler kullanarak yaptıkları PCR çalışmaları sonucunda tüm virüsler için 724 bp büyüklüğünde bantlar elde ederken sadece CaN izolatında 430 bp büyüklüğünde bant elde etmişlerdir. Araştırmalarında temel aldıkları ve Tsu-0 ekotipinin CaMV'nin CM1841 ve CM4-184 izolatlarına dayanıklı olup, W260 izolatına ise duyarlı olmasından yola çıkarak W260 izolatının pasif bir mekanizma ile Tsu-0 ekotipinin dayanıklılığını kırdığını belirlemişlerdir. ORF VI geninin 5'- 3' haritasını çıkarmışlar ve RBR-1 olarak adlandırdıkları bölgenin CaMV'nin *Solanaceae* familyasından farklı bitkileri infekte edebilme yeteneğinden sorumlu olduğunu belirlemişlerdir.

Shahraeen ve ark. (2003) İran'nın bazı ili ve ilçelerinde yürüttükleri çalışmada kolzalarda CaMV, BWYV, TuMV, Hıyar mozaik virüsü (CMV) ve Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV)'nün varlığını belirlemek amacı ile 1999-2001 yılları arasında bir sörvey çalışması yürüterek 581 örnek toplamışlar ve toplanan bu örnekleri DAS-ELISA yöntemi ile test etmişler ve çalışmalarında elektron mikroskobu kullanmışlardır. Yapılan testler sonucunda 581 örnekten 243'ü bu virüslerle infekteli bulunmuştur. DAS-ELISA sonuçlarına

göre örneklerin % 14.45'i BWYV ile % 12.9'u CaMV ile % 9.3'ü TuMV ile % 4.6'sı CMV ve % 0.51'i TSWV ile infekteli olarak bulmuşlardır. Çalışma sonucunda CaMV'nin kolzalarda TuMV, BYMV ve CMV ile karışık infeksiyon olarak bulunabileceğini ve aynı zamanda BYWV, CaMV ve TuMV'nin varlığının kolzalar ve diğer duyarlı sebze türleri için büyük tehlike oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Moreno ve ark. (2004) İspanya'nın farklı il ve bölgelerinde marul, karnabahar, brokoli, lahana gibi kültür bitkilerinin yanı sıra bazı yabancı otlar da dahil olmak üzere bu bitkilerde çeşitli virüslerin varlığını, dağılımını ve yaygınlığını belirlemek amacıyla 2001 ve 2002 yılları üretim sezonları içerisinde bir sörvey çalışması yürütmüşlerdir. Virüs semptomu gösteren bitkileri ticari spesifik antiserumlar kullanarak CaMV, Yonca mozaik virüsü (AMV), *Broad bean wilt virus 1* (BBWV 1), BWYV, CMV, *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV), TuMV ve TSWV'ye karşı ELISA ile test etmişlerdir. Bu çalışmada CaMV'nin varlığını sorgulamak için karnabahar, lahana, brokoli ve yabancı otlara yapılan ELISA sonuçlarında 2001 ve 2002 ilkbahar döneminde toplanan 127 örnekten 24'ü pozitif sonuç verdiğini, aynı yıllara ait sonbahar döneminde toplanan 239 örnekten ise 16'sını CaMV ile infekteli olarak bulmuşlardır.

Farzadfar ve ark. (2005) tarafından İran'nın Fars şehrinde CaMV'nin varlığını belirlemek amacıyla 2003 yaz süresince ve sonbahar başlarına kadar arazi çalışmaları yürütülmüştür. Çalışmada beneklenme, bantlaşma, mozaik, nekrotik lekeler, şekil bozuklukları ve kloroz belirtisi gösteren *Brassica oleracea* var. *acephala* (yaprak lahana), *B. oleracea* var. *botrytis* (karnabahar) *B. oleracea* var. *capitata* (baş lahana) *B. oleracea* var. *italica* (brokoli) ve *B. rapa* (şalgam) bitkilerinden yaprak örnekleri toplanmış ve CaMV'nin varlığını sorgulamak için spesifik antiserumlar kullanılarak DAS-ELISA ile test edilmiştir. Çalışmada belirti gösteren bitkilerin yapraklarından şalgam, kolza, Çin lahanası, turp ve *Datura metel* bitkilerine yapılan mekanik inokulasyonlar sonucu CaMV izolatlarının hepsi *Brassicaceae* familyasından bitkilerde mozaik belirtilerine sebep olurken sadece bir izolat (Ca-Sh1) *D. metel*'de sistemik infeksiyona sebep olmuştur. Biyolojik ve serolojik bulguları desteklemek için yapılan ve ORF II'ye göre modifikasyonu yapılan, spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunda 750 bp büyüklüğünde bant elde etmişler ve çalışma sonucunda İran'da CaMV'nin bu bitkilerde ilk kez rapor edildiğini bildirmişlerdir.

Farzadfar ve ark. (2007a) tarafından yapılan çalışmada İran'nın farklı coğrafik bölgelerinden toplanan 9 CaMV izolatının moleküler özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada yapraklarında deformasyon, mozaik, beneklenme, nekroz, buruşukluk, bodurlaşma, damar bantlaşmaları, damar açılmaları veya sararma gibi belirtiler

gösteren karnabahar örnekleri toplanmıştır. Bu örnekler spesifik antibadiler kullanılarak DAS-ELISA ile test edilmiş ve pozitif çıkan 9 CaMV izolatu indikatör bitkilere inokule edilmiştir. Mekanik inokulasyon çalışmalarında şalgam, hardal, Çin lahanası, alabaş, turp gibi bitkilerin yanı sıra, *Datura stramonium* bitkisi kullanmıştır. Yaptıkları denemelerde tüm izolatlar başarılı bir şekilde taşınırken, bazı izolatlar alabaş (*Brassica oleracea gongylodes*) ve *Datura stramonium*'a taşınmamıştır. *Myzus persica* ile yapılan taşıma denemelerinde ise tüm CaMV izolatları başarılı şekilde taşınmışlardır. ORF VI geni modifiye edilerek yapılan PCR sonucunda 1.580 bp büyüklüğünde bant elde etmişleridir. Filogenetik analizler sonuçlarında, elde edilen izolatların Kuzey Amerika dışındaki bölgelerden elde edilen izolatlarla büyük benzerlik gösterdiği ve CaMV-D/H (Macaristan) izolatu ile % 96.1-% 96.7 oranında benzerlik gösterdiği belirtilmiştir.

Farzadfar ve ark. (2007b), İran'da *Brassicaceae* familyasına ait bitkilerde CaMV'nin varlığını ve yayılmasını belirlemek amacı ile bir survey çalışması yürütmüşlerdir. 2004 ve 2005 üretim sezonu içerisinde yürüttükleri sorveylerde İran'nın 10 farklı ilinde *Brassicaceae* familyasına ait ve yapraklarında deformasyon, mozaik, beneklenme, nekroz, buruşukluk, bodurlaşma, damar bantlaşmaları, damar açılmaları veya sararma gibi belirtiler gösteren toplam 1048'i kültür bitkisi, 403'ü ise kültür bitkisi olmayan toplam 1451 örnek toplamışlar ve bu örnekleri spesifik antibadiler kullanarak CaMV'nin varlığını sorgulamak için ELISA ile test etmişlerdir. Kültür bitkilerinin % 57.7'sini infekteli olarak bulmuşlardır. CaMV ile infekteli örneklerde en yüksek infekteli oranı karnabahar (% 90.4) oluştururken bunun yanı sıra bazı lahana çeşitleri, brokoli, şalgam, turp gibi kültür bitkileri ile yine aynı familyaya ait *Rapistrum rugosum* (küçük turp), *Raphanus raphanistrum* (yabani turp) ve *Sisymbrium loeselii* (bülbul otu) gibi yabancı otlarda da değişen oranlarda CaMV gözlenmiştir. ELISA bulgularını doğrulamak için örneklerin bir kısmını polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile test etmişler ve 720 bp uzunluğunda bant elde etmişlerdir. Aynı zamanda tüm bu çalışmalarını elektron mikroskobu çalışmaları ile desteklemişlerdir. Alınan örnekleri elektron mikroskopunda incelemişler ve yaklaşık olarak 50 nm olan dairesel partiküller gözlemlemişlerdir.

Spence ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada Kenya'da sera koşullarında lahanalarda ve karalahanalarda CaMV ve TuMV'nin, pazılarda ise Şekerpancarı mozaik virüsü (BtMV)'nün infeksiyonlar sonucu verim ve ağırlıklarındaki azalmalara bakarak ekonomik anlamda oluşturduğu kayıpları incelemişlerdir. Çalışma kapsamında sağlıklı bitkilere bu virüsleri inokule etmişler ve virüslere karşı spesifik antibadiler kullanarak örnekleri DAS-ELISA ile test etmişlerdir. Lahana fidelerine TuMV, CaMV ve her iki virüsü eş zamanlı olarak infekte

etmişler ve lahanaların verimlerini ve buna bağlı olarak da pazar değerlerindeki değişimi incelemişlerdir. Virüsleri eş zamanlı inokule ettiklerinde lahanaların % 25'inin hiçbir pazar değeri kalmadığını ve bu kaybın kontrollü koşullara oranla 20 kat daha fazla olduğu, aksine sadece CaMV ile infekte edildiğinde ise çok önemli kayıplar yaşanmadığını tespit etmişlerdir. TuMV'nin erken infeksiyonlarının geç oluşan infeksiyonlara göre daha şiddetli olduğunu ve meydana gelen kayıpların, geç infeksiyon sonucu oluşan kayıplara oranla erken infeksiyonlarda % 50 daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. TuMV infeksiyonlarından ise karalahananın, lahanaya göre daha az etkilendiği, karalahananın lahanaya oranla daha fazla simptom göstermesine karşın pazar değerinin lahanaya göre daha yüksek olduğunu ve karalahanalarda infeksiyon zamanı ile infeksiyon şiddeti arasında bir ilişki kurulmadığını belirtmişlerdir. Aynı zamanda bu çalışmada BtMV'nin erken infeksiyonlarının pazılarda yaprak kalitesini % 50 oranlarında azalttığı ve bitki olgunken yapılan inokulasyonun bitkide en fazla zararı ortaya çıkardığını gözlemlemişlerdir.

Dikova (2008) Sofya'da yürüttüğü çalışmada yapmış olduğu surveyler sırasında kolza üretiminin yapıldığı alanlarda ve hatta üretim dışı alanlarda da görülen yabancı hardallarda (*Sinapsis arvensis* L.) şiddetli mozaik simptomları gözlemlemiş, mekanik inokulasyon ve DAS-ELISA bulguları sonucunda da bu virüslerin CaMV ve TuMV olduğunu belirlemiştir. Aynı zamanda her iki virüsün çoğunlukla karışık infeksiyon şeklinde görüldüğünü fakat Şalgam sarı mozaik virüsü (*Turnip yellow mosaic virus*; TYMV)'nün ise bulunmadığını belirtmiştir. Mekanik inokulasyon çalışmalarında CaMV ve TuMV'yi konukçuları olduğu karnabahar ve lahana, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* ve tütün (*N. rustica*, *N. tabacum* cv. *Samsun*) türlerine inokule etmiştir. Bölgede ekonomik olarak önemi bulunan kolzaya, yabancı hardalda bulunan virüsü inokule etmiş ve kolza yapraklarında lokal ve sistemik klorotik beneklenmeler ve bariz şekilde yaprak petiollerinde mozaikler meydana geldiğini gözlemlemiştir. Tüm bulgular sonucunda yaprak bitlerinin virüsü taşıması durumunda kolza yetiştiriciliği yapılan alanlarda yabancı hardalların varlığının TuMV ve CaMV infeksiyonları için önemli bir kaynak oluşturduğu belirtmiştir.

Korkmaz ve ark. (2011) tarafından Güneybatı Marmara Bölgesi'nde 2007-2008 üretim sezonu içinde yetiştirilen *Alliaceae* ve *Brassicaceae* familyasına ait bazı sebzelerde ve yabancı otlarda virüs hastalıklarını belirlemek amacıyla bir sörvey çalışması yürütülmüştür. Çalışma kapsamında Çanakkale, Bursa ve Balıkesir illerinden virüs hastalığı belirtisi gösteren toplam 167 adet bitki örneği toplanmıştır. Toplanan *Brassicaceae* ve yabancı ot örnekleri Şalgam mozaik virüsü, karnabahar ve lahana bitkileri Karnabahar mozaik virüsü için *Alliaceae* bitkileri ise Pırasa sarı çizgi virüsü (*Leek yellow stripe virus*; LYSV) için ticari

poliklonal antibadiler kullanılarak DAS-ELISA ile test edilmiştir. DAS-ELISA testleri sonucunda 167 örnekten 33'ü TuMV, 72 örnekten 47'si CaMV ve 37 örnekten 28'i ise LYSV ile infekteli olarak bulunmuştur. Aynı antibadiler kullanılarak yapılan Western blot analizi çalışmalarında CaMV'ye ait 44 kDa, 39 kDa ve 37 kDa ağırlığında proteinler elde edilmiştir.

Taberestani ve ark. (2011) İran'nın Golestan ilinde kanola bitkisinde yaprak bitleri ile taşınan 3 virüsün dağılımı üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. 2008 ve 2009 üretim sezonları içerisinde örnekler toplamışlar ve TuMV, CaMV ve BWYV'ye karşı DAS-ELISA ile test etmişlerdir. Yapılan testler sonucunda 2008 yılında toplanan örneklerde infeksiyon oranlarını TuMV'de % 4.5 , CaMV'de % 2.5 ve BWYV'de ise % 6 olarak belirlemişlerdir. 2009 yılında yapılan sörveyler sonucunda ise TuMV'de % 8.33, CaMV'de % 1.66 ve BWYV'de ise % 6.33 olarak belirlemişlerdir. Aynı zamanda BWYV bulgularını RT-PCR yöntemi ile de desteklemişlerdir. Yapılan bu çalışmada kanola bitkisinde TuMV, CaMV ve BWYV infeksiyonları Golestan ilinde ilk kez rapor edilmiştir.

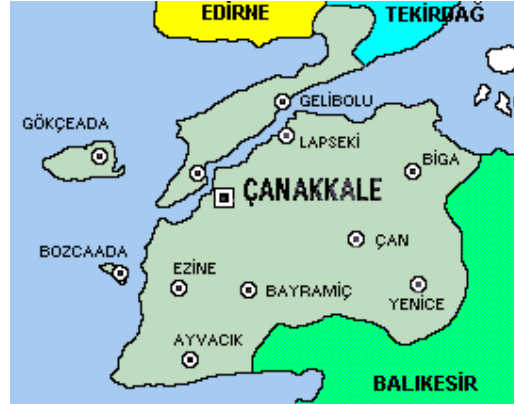
Shahraeen (2012) İran'da kanola bitkisinde görülen virüs hastalıkları üzerine bir çalışma yürütmüştür. 11 farklı ilden mozaik, yaprak ve gövdede nekrotik lekeler, yaprak deformasyonları, sararma ve yaprak kıvrıcıklığı belirtileri gösteren toplam 790 örnek toplamış ve bu örnekleri BWYV, CaMV, TuMV, *Turnip crinkle virus* (TCV), TYMV, *Radish mosaic virus* (RaMV), TsWV ve CMV'ye karşı spesifik antibadiler kullanarak test etmiştir. Yapılan testler sonucunda infeksiyon oranlarına bakıldığında ekonomik anlamda sorun oluşturan virüslerin başta CaMV (% 40.2) olmak üzere BWYV (% 17.8) ve TuMV (% 6.2) olduğunu belirlemiştir. Viral hastalıklar ve ilişkili izolatlarla yapılan çalışmalarda sera koşullarında Hyola 401, Hyola 308, Option ve PF çeşitlerine farklı illerden elde ettiği CaMV izolatlarını inokule etmiş ve inokulasyondan 35 gün sonra Hyola 308 çeşidinde CaMV'nin neden olduğu belirtilerin geriye dönüşümünün diğer çeşitlere göre daha iyi ve hızlı olduğunu belirlemiştir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Arazi Çalışması

Arazi çalışması karnabahar ve lahanaya üretiminin yapıldığı Çanakkale ili ve ilçelerinde 2010 ve 2011 üretim sezonlarında yürütülmüştür (Şekil 3.1). Üretim sezonu boyunca arazi çıkışları yapılmış, bitkiler görsel olarak incelenmiş ve CaMV symptomlarına benzer symptom gösteren bitkilerden örnekler alınmıştır. Karnabahar ve lahanaya üretimi yapılan tarlaların seçimi tamamen tesadüfi olarak yapılmış ve her bir üretim bölgesinden örnekleme yapılmasına özen gösterilmiştir. Yapılan arazi çıkışları sonucunda 85 bitki örneği toplanmıştır. Toplanan örnekler soğuk zincirde muhafaza edilerek laboratuara getirilmiştir. Bu örnekler arasında infekteli olanları belirlemek amacıyla önce DAS-ELISA testi uygulanmış daha sonra bu bulguları doğrulamak için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile test edilmiştir. PCR sonucunda da CaMV ile infekteli olduğu belirlenen örneklerden 7 tanesi seçilerek pGEM-T Easy plazmid vektörüne klonlanarak nükleotid dizi analizi yapılmıştır.



Şekil 3.1. Karnabahar mozaik virüsü izolatlarının toplandığı Çanakkale ili ve ilçeleri.

3.2. DAS-ELISA Testi

Karnabahar mozaik virüsü'nün serolojik bir yöntem olan ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) testi ile tanılanmasında Bioreba (İsviçre) firmasından sağlanan ELISA komple kiti ve 96 çukur içeren Microtiter plate'ler kullanılmıştır. Toplanan örnekler serolojik yöntem olan DAS-ELISA ile test edilmiştir. ELISA testi üretici firmanın önerileri doğrultusunda Clark ve Adams (1977)'in belirttiği yöntem temel alınarak yapılmıştır.

3.2.1. Plate'in Antibadi ile Kaplanması

ELISA testinde ilk adımda plate virüse spesifik antibadi ile kaplanmıştır. Her bir

çukura, önceden hazırlanmış kaplama solüsyonu (50 mM carbonate-bicarbonate buffer pH: 9.6, % 0.02 NaN₃) alınarak içine 1:1000 oranında sulandırılan virüse özgü antibadi eklenmiştir. Bu karışımdan 200 µl alınarak plate'e ekleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra plate 34°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra artık maddelerin temizlenmesi için plate 4'er dakika arayla 3 kez yıkama (10 mM fosfat buffer pH: 7.4, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, % 0.05 Tween 20) işlemi yapılmıştır.

3.2.2. Bitki Örneklerinin Plate'e Yüklenmesi

Gerçekleştirilen sürveyler sonucunda toplanan örnekler havan ve havaneli yardımı ile ekstraksiyon solüsyonu (20 mM Tris buffer pH: 7.4, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, % 2 PVP, % 0.05 mM Tween 20 ve % 0.02 NaN₃) kullanılarak ezilmiştir. Ezilen örnekler tüplere alınmış ve plate'lere yükleme işlemi tamamlanmıştır. Her bir örnek için kontrol amaçlı iki çukur kullanılmış ve çukurlara örneklerden 200'er µl ilave edilmiştir. Örnek yükleme işlemi gerçekleştirildikten sonra plate'e pozitif ve negatif kontrol konulmuş ve buzdolabında +4 °C'de bir gece süreyle bekletilmiştir.

3.2.3. Konjugat (Enzimle İşaretlenmiş Antibadi) Eklenmesi

Bir gece boyunca +4°C'de bekletilen örneklerle kaplı plate çıkarılarak 4'er dakika ara ile 3 kez yıkanmıştır. Konjugat solüsyonu (20 mM Tris buffer pH: 7.4, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM MgCl₂, % 2 PVP, % 0.05 Tween 20, % 0.2 BSA ve % 0.02 NaN₃) 1:10 oranında sulandırılıp 1:1000 oranında konjugat IgG eklenerek plate'lere yükleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu plate 34°C'de 4 saat inkübe edilmiştir.

3.2.4. Substrat Eklenmesi

İnkübasyon işleminin tamamlanmasının ardından plate 4'er dakika ara ile 3 kez yıkanmıştır. Substrat solüsyonu (1 M diethanolamine pH: 9.8, % 0.02 NaN₃) 1:5 oranında sulandırılıp içerisine bir plate için bir adet olmak üzere pNPP tablet (p-nitro-phenyl-phosphate) (Bioreba, İsviçre) eklenmiştir. Hazırlanan substrat çözeltisi plate'e yüklenmiş ve oda sıcaklığında 30-60 dak bekletilmiştir. Bekletilen plate'de CaMV ile infekteli olan örneklerde sararmalar görülmüştür. Daha sonra plate MEDISPEC ESR 200 ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda okuma işlemine tabi tutulmuştur.

3.3 Western Blot Analizi

Çeşitli aşamalardan oluşan Western blot yönteminde öncelikle örneklerin ezilmesi aşaması gerçekleştirilmiştir. Ezilen bu örnekler eppendorf tüpler içine konulmuş ve buz kabı içerisinde bekletilmiş ve ardından elektroforez işlemi için jel hazırlanmıştır. Elektroforez aşamasından sonra ise sırasıyla blotlama ve bloklama işlemleri yapılmıştır. Son aşamada ise

özgül antikorla kaplama işlemi yapılmış ve ardından nitroselüloz membrana aktarılan proteinlerin görüntülenmesi ile yöntem sonuçlandırılmıştır.

3.3.1. Örneklerin Hazırlanması

Western Blot analizi çalışmalarında materyal olarak kullanılan CaMV ile infekteli bitkilerin yaprak dokularından yaklaşık olarak 100 mg alınıp havan ve havaneli yardımıyla ezilmiştir. Ezilen örnekler eppendorf tüpler içerisine konulup, buz içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra her bir örnek üzerine 100 µl Western ekstraksiyon bufferından (0.5 M Tris, % 20 Gliserol, % 1 DDT, % 6 SDS ve % 0.002 Bromophenol blue) eklenmiş ve örnekler vortekslenmiştir. Elde edilen karışım 95°C’de 3-5 dakika kaynatıldıktan hemen sonra buz içine alınmış ve tekrar vortekslenip düşük hızda santrifüj edilmiştir. Örnekler elektroforez aşamasına kadar tekrardan buz kabı içerisinde bekletilmiştir.

3.3.2. Jel Hazırlanması

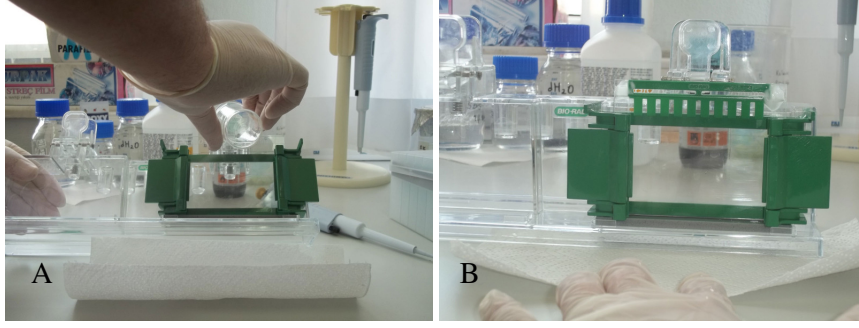
Bu aşamada separating jel ve stacking jel olmak üzere iki farklı jel hazırlanmıştır. Öncelikle seperating jel hazırlanmış ve polimerize olması beklendikten sonra stacking jel hazırlanıp sisteme yüklenmiştir.

Seperating jel hazırlanmasında (% 12’lik SDS Jel); 1400 µl Acrylamide monomer solüsyonu, 1200 µl dH₂O, 900 µl 4X Gel Running Buffer (1.5 M Tris-Cl pH: 8.8), 40 µl % 10’luk Sodyum Dedosil sülfat (SDS), 18 µl Amonyum Persülfat (APS) ve 2 µl TEMED kullanılmıştır.

Hazırlanan solüsyon jel aparatına eklenmiş ve jelin üst kısmında kalan boşluğa pipet yardımı ile saf su eklenmiş ve daha sonra jelin polimerize olması için bir süre beklenmiştir. Jel polimerize olduktan sonra stacking jel hazırlanmıştır.

Stacking jel hazırlanmasında; 500 µl 4X Stacking gel buffer (0.5 M Tris-Cl pH: 6.8), 1200 µl dH₂O, 280 µl Acrylamide monomer solution, 10 µl APS ve 2 µl TEMED kullanılmıştır (Şekil 3.2).

Separating jelin hazırlanması için eklenen su döküldükten sonra kurutma kağıdı yardımı ile jel kurulanmıştır. Ardından hazırlanan stacking jel, separating jel üzerine dökülüp polimerize olması için 20-30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra jel aparatı elektroforez setine yerleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Separating jel hazırlanması (A), Stacking jel hazırlanması (B).

3.3.3. Elektroforez Aşaması

Önceden hazırlanan her bir örnekten 10 µl, boya maddesinden ise 1 µl alınıp karıştırılmıştır. Markerdan ise 5 µl alınıp elektroforez sistemine yüklenmiştir. Tankın içi Tank buffer (0.025 M Tris pH: 3.0, 0.192 M Glycine, % 1 SDS) ile doldurulmuştur ve 100 voltta 1.5 saat elektroforez yapılmıştır.

3.3.4. Blotlama İşlemi

Elektroforez işlemi bittikten sonra stacking jel çıkarılıp separating jelden ayrılmıştır. Ardından jel önce transfer buffer içine daha sonra ise jel nitroselüloz membrana aktarılmıştır. Aktarma işlemi sırasında öncelikle; jel boyutunda nitroselüloz membran kesilmiş, alt kısımda bulunan pad'in üzerine filtre kağıdı konulmuş ve onun üzerine de jel yerleştirilmiştir. Pad ve filtre kağıtları yerleştirilmeden önce transfer bufferına batırılmıştır. Jelin üzerine de nitroselüloz membran ve tekrardan filtre kağıdı ile pad konulup jel holder kaset kapatılmıştır. Kapatılan jel holder kasetin beyaz kısmı tankın kırmızı yüzeyine, siyah kısımda siyah yüzeye gelecek şekilde yerleştirilmiştir (Şekil 3.3). Tankın içerisi transfer buffer ile tamamen doldurulmuştur. 30 Voltta 90 miliamperde tüm gece elektroforez yapılmıştır.



Şekil 3.3. Proteinlerin nitroselüloz membrana aktarılması.

3.3.5. Bloklama İşlemi

Elektroforez işleminin ardından nitroselüloz membran çıkarılmıştır. Membran TBS buffer içerisine alınıp bir çalkalayıcıda 2-3 dakika süreyle çalkalanmıştır. Daha sonra bloklama solüsyonu hazırlanmıştır. Bu solüsyon hazırlanmasında için 0.6 g süt tozu, 0.2 g albümin tartılıp TBS buffer içerisine alınmıştır. Bloklama solüsyonu içerisinde 30-45 dakika süreyle çalkalanmıştır. Bloking yapılan şerit membranlar, 3 kez Tris buffer salin-Tween 20 (TBS-T) ile 3 er dakika ara ile yıkanmıştır.

3.3.6. Özgül Antikorlar İle Kaplama

Membran virüse özgü konjugat antibadisi ile kaplanıp 1 saat inkübe edilmiştir. Membran 3 defa TTBS ile 5 dakika ara ile yıkanmıştır.

3.3.7. Proteinlerin Görüntülenmesi

200 ml saf su içerisinde substrat maddesi (BCIP-NBT) (Sigma, ABD) eritilip membrana karıştırılmış ve ardından renk oluşumu gözlenmiştir.

3.4. Oligonükleotid Primerlerin Hazırlanışı

Bu çalışma kapsamında PCR ve klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere bir primer çifti tasarlanmıştır. Tasarlanan primer CaMV kılıf protein geninin 614 bç'lik bölgesini içeren SK3CaMV CP-F 5' ATG GCC GAA TCA ATT TTA GAC AG 3' ve SK4CaMV CP-R 5' GTA TTT CGG ATT AAC TCC TTG GC 3' adı ve dizisine sahip spesifik primerlerdir.

3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

DAS-ELISA bulgularını doğrulamak ve aynı zamanda klonlama çalışmaları yapmak için PCR analizi yapılmıştır. PCR analizinde kullanılan kitler TaKaRa (Japonya) firmasından edilmiş ve firmanın önerileri doğrultusunda kullanılmıştır. PCR aşamaları aşağıda kısaca özetlenmiştir.

3.5.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunda Suehiro ve ark., (2005) tarafından geliştirilen basitleştirilmiş doğrudan tüpe bağlanma (Simple-direct-tube, SDT) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde DAS-ELISA testi sonucunda pozitif ya da şüpheli olduğu bilinen CaMV örneklerinden 100-200 mg alınarak havan ve havaneli yardımıyla 2 ml ekstraksiyon buffer'ı eklenerek iyice ezilmiştir. Ezilmiş örnekler tüplere konularak 20-30 dakika bekletilmiştir. Tüplere yerleştirilen her örnekten 200 µl alınıp eppendorf tüplerine yerleştirilmiş ve daha sonra tüpler buzdolabında +4°C'de bir gün süreyle bekletilmiştir. Bir gün sonunda buzdolabından alınan örnekler 4'er dakika arayla 3 kez yıkanmıştır. Daha sonra eppendorf tüplerinin içine 50 µl

distile su konularak 95°C’de 1 dakika kaynatma işlemi yapılmıştır. Kaynatma işleminin hemen ardından tüpler alınarak buza konulmuştur. Burada 10-15 dakika bekletildikten sonra tüpler alınarak tekrar -86°C’ye konulup elde edilen komplementer DNA (cDNA) PCR işlemi yapılabildiği kadar bekletilmiştir.

3.5.2. Kılıf Protein Genlerinin Çoğaltılması

Kılıf protein genlerinin çoğaltılması polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi (PCR) ile yapılmıştır. PCR işleminin gerçekleşmesi için öncelikle PCR karışımı hazırlanmıştır. Bu karışımda her bir örnek için 10X PCR tampon solüsyonundan (50 mM KCL, 10 mM Tris HCl 25 °C pH: 9.0, % 1 Triton X-100) 2,5 µl, 10 mM dNTP 1 µl, CaMV kılıf protein geninin bir kısmına spesifik primerlerden 0.5 µl, Taq polimeraz solüsyonundan 0.25 µl, cDNA’lardan 5 µl ve steril sudan 15.25 µl konularak toplam hacim 25 µl olan PCR karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan PCR karışımı 94°C 3 dakika, 40 defa tekrarlanan 94°C’de 30 sn, 55°C’de 30 sn ve 72°C’de 45 sn, 72°C’de 5 dakika ve daha sonra da 4°C’ de bekleyecek şekilde programlanmış olan PCR makinesine konularak kılıf protein genlerinin çoğaltılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri %1’lik agaroz jelde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp etidyum bromür ile boyandıktan sonra Major Science UVDI jel görüntüleme cihazında görüntülenerek 614 bp büyüklüğündeki CaMV kılıf protein geninin çoğaltıldığı belirlenmiştir.

3.6. Klonlama ve Sekans Analizi

Çanakkale ili ve ilçelerinin farklı üretim bölgelerinden elde edilen 7 adet CaMV izolatlarının kılıf protein genlerini içeren korunmuş bölgeleri PCR yoluyla çoğaltıldıktan sonra Çevik ve ark., (1995) ve Jiang ve ark., (2008) tarafından belirtilen yöntem modifiye edilerek aşağıda belirtildiği şekilde klonlanarak DNA dizileri belirlenmiş, CaMV izolatlarının genetik farklılık ve benzerlikleri ortaya konmuştur.

3.6.1. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Çoğaltılmış CaMV kılıf protein genlerinin PCR ürünleri EZ-10 Column PCR pürifikasyon kiti (BioBasic, Kanada) kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda saflaştırılmıştır. Bu amaçla 20 µl PCR ürününe 60 µl Binding I solüsyonu eklenerek hazırlanan karışım EZ kolonuna aktarılmış ve oda sıcaklığında 2 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 10000 rpm’de 2 dakika santrifüj yapılmış ve alt kısımda kalan sıvı dökülmüştür. Daha sonraki aşamada kolona 500 µl wash solüsyonu eklenmiş ve 10000 rpm’de 2 dakika santrifüj yapılmıştır. Kolondan geçen sıvı kısım dökülerek yıkama aşaması tekrarlanmıştır. Kolonlarda kalan etil alkolün tamamen uzaklaştırılması amacı ile tüpler 10000 rpm’de 2 dakika boş

olarak santrifüj yapılmıştır. Kolonlar daha sonra önceden etiketlenmiş olan steril santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Kolonların orta kısmına elution solüsyonundan 25 µl eklenerek 2 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Son olarak tüpler 10000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Safılaştırılmış PCR ürünleri kullanılıncaya kadar -20°C’de saklanmıştır.

3.6.2. Kılıf Protein Genlerinin Klonlanması

PCR yöntemiyle çoğaltılan ve daha sonra safılaştırılan CaMV kılıf protein genleri T-A klonlama yöntemiyle Promega (ABD) firmasından sağlanmış olan pGEM-T Easy plazmid vektörüne klonlanmıştır. Aşağıda klonlanma aşamaları kısaca özetlenmiştir.

3.6.2.1. Ligasyon (Birleştirme)

Ligasyon işlemi PCR’la çoğaltılan ve klonlanacak olan CaMV kılıf protein genlerinin pGEM-T Easy plazmid vektörü ile birleştirilmesi işlemidir. Ligasyon aşamasında PCR ile çoğaltılan CaMV kılıf protein geninden 3 µl alınarak, 1 µl pGEM T Easy plazmidi, 1 µl T4 DNA ligaz enzimi ve 5 µl 2X ligasyon tampon çözeltisi (0.05 M Tris-HCl pH 8.0, 0.01 M MgCl₂ 1 mM ATP ve 50 ug/ml bovine serum albumin) içeren 10 µl’lik ligasyon karışımına eklenerek ligasyon karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım 16 saat süreyle 4°C’de bekletilerek ligasyon işlemi tamamlanmıştır.

3.6.2.2. Transformasyon

Transformasyon işlemi, ligasyon karışımının bir kısmının hücre duvarı kimyasal uygulamalarla geçirgen hale getirilmiş (competent) *Escherichia coli* bakterisine aktarılmasıdır. Bu amaçla *E. coli* bakterisinin JM109 ırkının -86°C’ de dondurulmuş ve buzda çözdürülmüş competent hücrelerinden 50 µl alınarak 1.5 ml tüpe aktarılmıştır. pGEM-T Easy plazmidi ve CaMV kılıf protein genlerini içeren ligasyon karışımından 5 µl alınarak tüplerdeki *E. coli* JM109 competent hücrelere eklenerek 30 dakika buzda bekletilmiştir. Ardından ele edilen bu karışım 42°C’de 1 dakika süreyle bekletilerek ısı şoku uygulanmıştır ve tekrar 2-3 dakika buzda beklenerek transformasyon işlemi tamamlanmıştır.

3.6.2.3. Rekombinant Kolonilerin Seçimi (Seleksiyon)

Transformasyonu yapılan bakterilere LB bakteriyel sıvı besi ortamından 750 µl eklenerek bakteriler 37°C’de 180 rpm hızla çalkalamalı inkübatörde 1 saat süreyle büyütülmüştür. Daha sonra büyütülen bakteriler 60 µg/ml ampicilin ve 80 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indoly-B-galacto-pyranoside (X-gal) ve 0.5 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) maddesi içeren LB katı ortamı (%2 bacto-trytone, % 0.5 bacto-

yeast ekstrakt, 0.05 M NaCl,) bulunan petri kaplarına ekilerek 37°C’de 16 saat inkübe edilmiştir. CaMV kılıf protein genini taşıyan pGEM-T Easy plazmidini içeren bakteriler 100 µg/ml ampisilin ve 20 mg/ml X gal maddesi içeren LB katı ortamında büyüyerek beyaz renkli koloniler oluştururken, sadece pGEM-T Easy plazmidini içerenler ise mavi renkli koloniler oluşturacağından dolayı rekombinant yani CaMV kılıf protein genini içeren ve içermeyen bakteri kolonileri renklerine göre belirlenmiştir. Böylece CaMV kılıf protein genini içeren plazmidleri taşıyan beyaz kolonilerin seçimi yapılmıştır.

3.6.2.4. Koloni PCR

Bu aşamada oluşan beyaz renkli kolonilerin CaMV kılıf protein genini taşıyan pGEM-T Easy rekombinant plazmidleri içerip içermediği daha hassas bir yöntem olan koloni PCR yöntemiyle taranarak kesin olarak belirlenmiştir. Rekombinant kolonilerin seçiminde mavi-beyaz koloni seçimi istenilen genleri içeren rekombinant plazmidleri taşıyan bakteriyel kolonilerin seçiminde yararlı olabilmekte fakat bazen mavi koloniler hedef genleri içerebileceği gibi bazı beyaz kolonilerde istenilen geni içermeyebilir. 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 inkübe ettikten sonra kullanılmak üzere 4 °C’de saklanmıştır. Daha sonra 2.5 µl 10X PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris HCl pH 9.0, % 1 Triton X-100), 0.5 µl 10mM dNTP, 2.5 µl 25 mM MgCl₂, 20 pmol plazmid T-A klonlaması yapılan bölgenin alt ve üst kısımlarına spesifik SK3CaMV ve SK4CaMV primerlerinden 0.5 µl ve 0.125 µl 2.5 ünite Taq DNA polimeraz (Fermentas, Kanada) eklenerek PCR karışımı hazırlanıp PCR tüplerine konulmuştur. Koloni PCR için hazırlanıp PCR tüplerine konulan karışıma çizilerek büyütülen beyaz renkli bakteri kolonilerinden steril bir pipet ucuyla alınarak bakteri kolonisi eklenmiştir. Bakteri eklenen koloni PCR karışımı 94°C 3 dakika, 40 defa tekrarlanan 94°C’de 30 sn, 55°C’de 30 sn ve 72°C’de 45 sn, 7 °C’de 5 dakika ve daha sonra da 4°C’ de bekleyecek şekilde programlanan PCR makinesinde yapılmıştır.

Her bir izolat için en az 4 adet beyaz koloni seçilerek koloni PCR yöntemiyle test edilmiştir. Koloni PCR aşamasının tamamlanmasından sonra elde edilen PCR ürünleri 100-1000 bp DNA büyüklük markörleriyle birlikte %1’lik agaroz jeline elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında Major Science UVDI jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.

3.6.2.5. Plazmid İzolasyonu

Koloni PCR sonuçlarından sonra CaMV kılıf protein genini taşıyan pGEM-T Easy plazmidini içerdiği kesin olarak belirlenen koloniler seçilerek bu kolonilerden plazmid izolasyonu yapılmıştır. Her bir izolat için koloni PCR’da pozitif sonuç veren en az 2 koloni seçilerek plazmid izolasyonu yapılmıştır. Her bir CaMV izolatu için koloni PCR sonuçlarına göre seçilen koloniler, 2 µl ampisilin içeren 5 ml LB sıvı besi ortamına inokule edilerek 37°C’de 16 saat boyunca 180 rpm hızda çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Steril bir mikrofij tüpüne 500 µl gliserol ve 500 µl büyütülen bakterilerden alınarak gliserol stokları hazırlanmıştır. Geriye kalan kısımdan ise BioBasic (Kanada) firmasından sağlanan plazmid saflaştırma kiti kullanılarak plazmid izolasyonu yapılmıştır. Plazmid izolasyonu üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiş ve bu doğrultuda bakteri hücrelerinin parçalanması için her bir örneğe 200 µl solüsyon I eklenip 1 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir. Parçalanmayan bakteri hücrelerini tamamen parçalamak için 400 µl solüsyon II ekleyip tekrar 1 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir. Daha sonra 700 µl solüsyon III ekleyip eklenip örnekler 12000 rpm ve 4°C’de 5 dakika santrifüj yapıp kolona dökülmüştür. Kolonlar 10000 rpm ve 4°C’de 2 dakika santrifüj yapılmıştır. Daha sonra plazmidi diğer maddelerden temizlemek için 500 µl yıkama solüsyonu eklenip yine 10000 rpm ve 4°C’de 2 dakika santrifüj yapılmıştır. İstenmeyen maddeleri tamamen uzaklaştırmak ve daha temiz bir plazmid elde edebilmek için yıkama solüsyonu ekleme işlemi tekrarlanmış ve son olarak 50 µl elution tampon solüsyonu eklenerek plazmid saflaştırma işlemi tamamlanmıştır.

3.6.2.6. *EcoRI* Restriksiyon Enzimiyle Kesme İşlemi (Digestion)

Bir önceki aşamada saflaştırılan pGEM-T Easy plazmit DNA’larından 10 µl alınarak, 1 µl 20000 ünite *EcoRI* enzimi, 2 µl 10X *EcoRI* enzimi tampon solüsyonu (50 mM NaCl, 100 mM Tris HCl, 10 mM MgCl₂, % 0.025 Triton X-100 pH 7.5) ve 0.2 µl bovine serum albumin (BSA) ve 6.8 µl steril saf su eklenerek bir tüp içerisinde toplam 20 µl’lik bir digestion karışımı hazırlanmıştır. Elde edilen bu karışım 37°C’de 6 saat bekletilerek plazmitlerin *EcoRI* enzimiyle kesilme işlemi tamamlanmıştır. *EcoRI* enzimiyle kesme işleminin tamamlanmasından sonra elde edilen DNA’lar DNA büyüklük markörleriyle birlikte %1’lik agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında Major Science UVDI görüntüleme sisteminde görüntülenmiş ve 614 bp’lik CaMV kılıf protein genini taşıyıp taşımadıkları kesin olarak belirlenmiştir.

3.6.3. Kılıf Protein Geninin Dizisinin Belirlenmesi

CaMV kılıf protein genlerini kesin olarak taşıdıkları belirlenen saflaştırılmış plazmidlerden 7 tanesi seçilerek CaMV kılıf protein genlerinin dizilimi yapılmıştır. DNA dizilimi Refgen Biyoteknoloji (Ankara) firmasında hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. DNA dizilimi pGEM-T Easy plazmidinin T-A klonlama bölgesinin yaklaşık 50 bp üst ve alt kısmındaki bölgelere spesifik M13F ve M13R üniversal primerleri kullanılarak döngü dizileme yöntemiyle otomatik DNA dizileme cihazıyla yapılmıştır. Her bir izolat için bir klonun iki yönden M13F ve M13R primerleri kullanılarak CaMV 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 CaMV kılıf protein genine ait nükleotid dizilimi elde edilmiştir. Çanakkale ili ve ilçelerinin farklı bölgelerinde karnabahar ve lahana üretimi yapılan alanlardan alınan izolatların kılıf protein genlerine ait nükleotid dizileri Align X 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 sebze üretim bölgelerinden elde edilen CaMV izolatlarına ait kılıf protein geni nükleotid dizileri elde edilmiştir. Bu kılıf protein genlerine ait nükleotid dizileriyle Align X programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen tüm CaMV izolatlarının dünya izolatlarıyla benzerlik gösterip göstermediği ve benzerlik oranları yüzde olarak belirlenmiştir. Ayrıca Çanakkale ilinde ve ilçesinde bölgesel olarak elde edilen CaMV izolatlarının kendi aralarında benzerlik gösterip göstermediği ve benzerlik oranları yine yüzde olarak belirlenmiştir.

3.6.4. Kılıf Protein Geninin Filogenetik Analizi

Çanakkale ili ve ilçelerinin farklı karnabahar ve lahana üretim bölgelerinden alınan CaMV izolatlarının Alingn X programında çoklu nükleotid dizi karşılaştırmaları yapılan CaMV kılıf protein genine ait çoklu karşılaştırma dosyaları Clustal X programına aktararak filogenetik analizler yapılmıştır. Filogenetik analiz verileri kullanılarak Kiamura iki parametre alogaritması uygulanan neighbor-joining yöntemiyle filogenetik soyağacı oluşturulmuştur. Oluşturulan soy ağacının doğruluğunu istatistiki olarak belirlemek amacıyla 100 tekerrürlü bootstrap analizi yapılmıştır. Son olarak oluşturulan soy ağaçları TreeView soyağacı görüntüleme programı kullanılarak görüntülenerek Çanakkale ili ve ilçelerinin karnabahar ve lahana üretim bölgelerinden toplanan CaMV izolatlarının birbiriyle yakınlık dereceleri ve genetik ilişkileri ortaya konulmuştur. Aynı şekilde dünyanın diğer üretim bölgelerinden elde

edilen izolatların gen bankasında bulunan kılıf protein genlerinin nükleotid ve amino asit dizilerinin çoklu karşılaştırmaları yukarıda belirtildiği gibi filogenetik analizlere tabi tutulup soy ağaçları oluşturularak TreeView programında görüntülenmiştir.

BÖLÜM 4**ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA****4.1. Arazi Çalışmaları**

Çalışma kapsamında yürütülen arazi çalışmaları karnabahar ve lahana üretiminin yapıldığı Çanakkale ili ve ilçelerinde 2010 ve 2011 üretim sezonlarında yapılmıştır. Üretim sezonları süresince karnabahar ve lahana üretimi yapılan tarlalar rastgele seçilmiş ve arazi çıkışları gerçekleştirilmiştir. Bitkiler görsel olarak incelenmiş ve CaMV semptomlarına benzer semptom gösteren bitkilerden örnekler alınmıştır. Arazi çıkışları sonucunda 2010 yılında 56, 2011 yılında ise 28 olmak üzere toplam 84 örnek toplanmıştır. Örneklerin ilçeler bazında dağılımı Çizelge 4.1’de verilmiştir. Her iki üretim sezonu sonucunda yapılan sorveylerde en fazla örnekleme Çanakkale Merkez ilçe ve bu ilçelere bağlı Halileli ve Kumkale köylerinden yapılmış ve toplam 46 örnek toplanmıştır. Ayvacık ilçesi ve ilçeye bağlı Kösedere köyünden ise toplam 29 örnek toplanmış ve son olarak Çan ilçesinden ise 10 örnek toplanarak örnekleme işlemi tamamlanmıştır. Örnekleme yapılırken tarla seçimi, ilçe bazında üretim miktarına bağlı olarak yapılmamış, tesadüfi olarak girilen tarlalardan semptom gösteren ve CaMV ile şüpheli olduğu düşünülen bitkilerden örnekler alınmıştır. Tarla büyüklüğüne bağlı olarak her bir tarladan en az bir en fazla üç örnek alınmıştır. Sorvey süresince karnabahar ve lahana yetiştiriciliği yapılan tarlalarda özellikle yaprak biti popülasyonunun yüksek olduğu yerlerde CaMV benzeri infekteli bitkilere rastlanırken, lahanalarda CaMV benzeri infeksiyonların türlere göre değişkenlik gösterdiği gözlenmiştir.

Çizelge 4.1. Çanakkale ili ve ilçelerindeki karnabahar ve lahana üretim alanlarından elde edilen Karnabahar mozaik virüsü izolatlarının dağılımı

İzolatların Toplandığı Yer	Toplanan Örnek Sayısı (2010)	Toplanan Örnek Sayısı (2011)	Toplam
Çanakkale Merkez	29	17	46
Ayvacık	17	11	28
Çan	10	0	10
TOPLAM	56	28	84

4.2. DAS-ELISA Testi Bulguları

Çanakkale ili ve ilçelerinde 2010 ve 2011 yıllarında yapılan arazi çıkışları sonucunda toplanan 66'sı karnabahar, 18'i lahana olmak üzere toplam 84 örnek DAS-ELISA ile test edilmiştir. Testler sonucunda 2010 yılı üretim sezonunda toplanan 56 örnekten 41'i, 2011 yılı üretim sezonunda toplanan 28 örneklerden ise 22'si CaMV ile infekteli bulunmuştur. Arazi çıkışı sonucunda toplanan 84 bitki örneğinden 63'ünde CaMV tespit edilmiştir. Toplanan örneklerde ortalama infeksiyon oranı % 75 olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. İlçeler bazında toplanan örnek sayısı ve % infeksiyon oranı

İzolatlardan Toplandığı Yer	İnfekteli Örnek /Toplam Örnek	% İnfeksiyon Oranı
Çanakkale Merkez	32/46	70.0
Ayvacık	25/28	89.2
Çan	6/10	60.0
Toplam	63/84	75

İnfeksiyon oranlarının belirlenmesinde toplam örnek sayısını oluşturan tüm örnekler, CaMV ile infekteli olduğu şüphelenilen örneklerdir. Bu nedenle infekteli örnek sayısının toplam örnek sayısına oranı oldukça yüksek sayılabilecek (% 75) bir değere ulaşmıştır. Bunun en önemli nedenleri, CaMV'nin yaprak bitleriyle taşınması ve birçok tarlada yaprak bitleriyle etkin bir mücadele yönteminin yapılmaması, arazi koşullarında CaMV ile infekteli bitkilerin çok tipik semptom göstermeleri ve bu nedenle teşhislerinin kolay olması gelmektedir. Her iki üretim sezonu boyunca yapılan sorveyler sonucunda toplanan örneklere uygulanan DAS-ELISA bulguları sonucunda en yüksek infeksiyon oranına sahip ilçe Ayvacık (% 89.2) olurken, bu ilçeyi sırasıyla Çanakkale Merkez (% 70) ve Çan (% 60) ilçeleri izlemektedir.

Arazi çıkışları sonucunda 66 karnabahar örneği içerisinde 51'i CaMV ile infekteli bulunurken lahanalarda ise 18 örnekten 12'si CaMV ile infekteli bulunmuştur. İnfeksiyon oranlarının ilçelere dağılımına bakıldığında en yüksek infeksiyon oranı Ayvacık ilçesinden toplanan örneklerden elde edilmiştir. Bu ilçeden toplanan 28 örneğin, 23'ü Kösedere köyünden, kalanı ise ilçe merkezinden toplanmıştır. Kösedere köyünden toplanan 23 örneğin 20'si, ilçe merkezinden toplanan 5 örneğin tamamı infekteli bulunmuştur. Merkez ilçede ise 16'sı Halileli köyünden, 6'sı Kumkale köyünden olmak üzere toplam 46 adet örnek toplanmıştır. Kumkale'de toplanan 6 örnekten 3'ü, Halileli'nde toplanan 16 örnekten 11'i ve

Merkez ilçeden toplanan 24 örnekten 18'i infekteli olarak bulunmuştur. Çan ilçesinde ise 10 adet örnek toplanmış ve 6'sının infekteli olduğu tespit edilmiştir.

Karnabahar mozaik virüsü ile infekteli olduğu ELISA yöntemi ile belirlenen örnekler aynı zamanda bir başka virüs ya da virüslerle de infekteli olabilmektedir. Shephard (1981) yaptığı çalışma sonucunda Karnabahar mozaik virüsü'nün sıklıkla TuMV ile karışık enfeksiyon halinde görülebildiği bildirmiştir. Bu çalışma kapsamında toplanan ve tipik CaMV benzeri simptom gösteren bitkilerden bazılarının negatif sonuç vermesi bu bitkilerin başka virüs yada virüsler tarafından infekteli olabileceğini göstermektedir.

Hardwick ve ark. (1994), İngiltere ve Galler'de kolzalarda yaptıkları çalışmada DAS-ELISA bulguları sonucunda CaMV, TuMV ve BWYV'nin varlığını tespit etmişlerdir. Bu virüslerin karışık enfeksiyon şeklinde bulunabileceğini ve 1992 yılında yaptıkları sorveyde 118 örnekten 16'sında (% 14), 1993 yılında yaptıkları sorveyde ise 128 örnekten 32'sinde (% 25) CaMV'nin varlığını tespit etmişlerdir.

Shahraeen ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada kolzalarda CaMV, BWYV, TuMV, CMV ve TSWV varlığını belirlemek için bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma sonucunda DAS-ELISA bulguları sonucunda 581 örnekten 243'ünü infekteli olarak bulmuşlar ve CaMV'nin, TuMV, BYMV, CMV ve TSWV ile karışık enfeksiyon şeklinde bulanabildiğini ve CaMV enfeksiyonlarının da % 12.9 olduğunu bildirmişlerdir.

Moreno ve ark. (2004), İspanya'da yaptıkları çalışmada marul, karnabahar, brokoli, lahana gibi kültür bitkilerinin yanı sıra bazı yabancı otlar da dahil olmak üzere bu bitkilerde CaMV, AMV, BBWV 1, BWYV, CMV, PSbMV, TuMV ve TSWV varlığını sorgulamışlar ve DAS-ELISA bulguları sonucunda virüslerin farklı bitki türlerinde farklı kombinasyonlarda karışık enfeksiyon şeklinde bulunabileceğini ve 366 örneğin 40'ında (% 10.9) CaMV'nin var olduğunu saptamışlardır.

Karnabahar mozaik virüsü konukçularında streynlere, konukçu ve çevre koşullarına bağlı olarak ılımlıdan şiddetliye doğru değişen çeşitli kloroz, mozaik, damar açılması ve bodurlaşma gibi sistemik simptomlara neden olur (Melcher, 1989; Wintermantel ve ark., 1993). Arazi çalışmaları süresince toplanan ve yapılan testlerde infekteli bulunan örneklerde tipik olarak mozaik, damar açılmaları, damar bantlaşması, nekrotik lekeler, şekil bozuklukları ve kloroz simptomları görülmüştür (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Karnabahar mozaik virüsü'nün karnabahar ve lahanada neden olduğu mozaik, damar açılmaları, damar bantlaşması, nekrotik lekeler, şekil bozuklukları ve kloroz belirtileri.

Farzadfar ve ark. (2005), yaptığı çalışmada karnabahar, lahanada, brokoli ve şalgam bitkilerinde beneklenme, bantlaşma, mozaik, nekrotik lekeler, şekil bozuklukları ve kloroz belirtisi gösteren bitkilerden örnekler almış, bu örneklerle karşı yapmış olduğu mekanik inokulasyon ve ELISA testi bulgularını PCR ile desteklemiş ve CaMV'nin varlığını bildirmişlerdir.

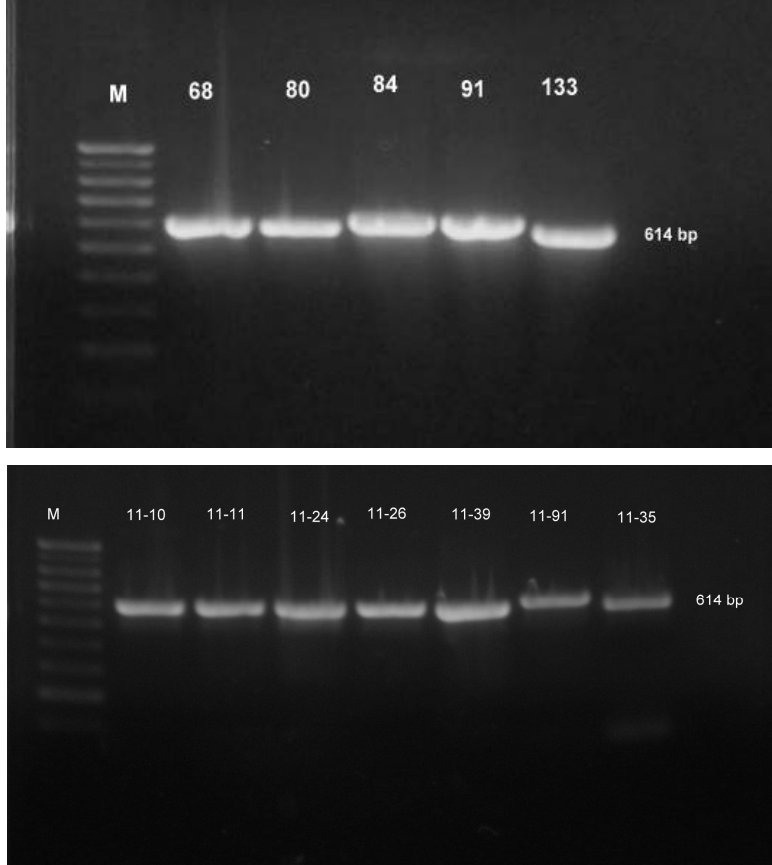
Farzadfar ve ark. (2007b), yürüttükleri bir başka çalışmada *Brassicaceae* familyasına ait bitkilerde yapraklarında deformasyon, mozaik, beneklenme, nekroz, buruşukluk, bodurlaşma damar bantlaşmaları, damar açılmaları veya sararma gibi belirtiler gösteren bitkilere karşı CaMV'nin varlığını sorgulamışlar ve karnabahar bitkilerinde % 90.4 oranında CaMV enfeksiyonu saptamışlardır.

4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizi Bulguları

Çalışma kapsamında 2010 ve 2011 üretim sezonları içerisinde Çanakkale ili ve ilçelerinden toplanan örneklerin bir kısmına DAS-ELISA bulgularını doğrulamak ve aynı zamanda klonlama çalışmalarında kullanmak üzere moleküler bir yöntem olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizi yapılmıştır. PCR çalışmalarında kılıf proteininin 614

BÖLÜM 4 – ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Hasan Tuna TUZLALI

bç'lik korunmuş bir bölgeyi çoğaltan SK3CaMV ve SK4CaMV primerleri kullanılmıştır. Daha öncesinde yapılan DAS-ELISA bulgularında pozitif sonuç vermiş örnekler arasından seçilen 13 örneğe PCR analizi uygulanmış ve örneklerin tamamında 614 bp büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir.



Şekil 4.2. PCR analizi sonuçları. M: Marker (100-1000 bp) 10-11: Lahana, 24, 26, 35, 39, 68, 80, 84, 91, 133: Karnabahar. CaMV ile infekteli izolatlar.

Agama ve ark (2002), *Arabidopsis thaliana* Tsu-0 Ekotipinin CaMV'ye olan direncini kırmak üzere bir çalışma yürütmüşler ve *A. thaliana* Tsu-0 ve Col-0 ekotipleri ile farklı CaMV izolatlarını kullanmışlardır. Çalışma kapsamında yapılan biyolojik testleri doğrulamak için moleküler bir yöntem olan PCR yöntemini kullanmışlardır. Spesifik primerler kullanarak yaptıkları PCR analizleri sonucunda tüm ekotiplerde 724 bp büyüklüğünde bantlar elde ederken, sadece bir ekotipte 430 bp büyüklüğünde bant elde etmişlerdir.

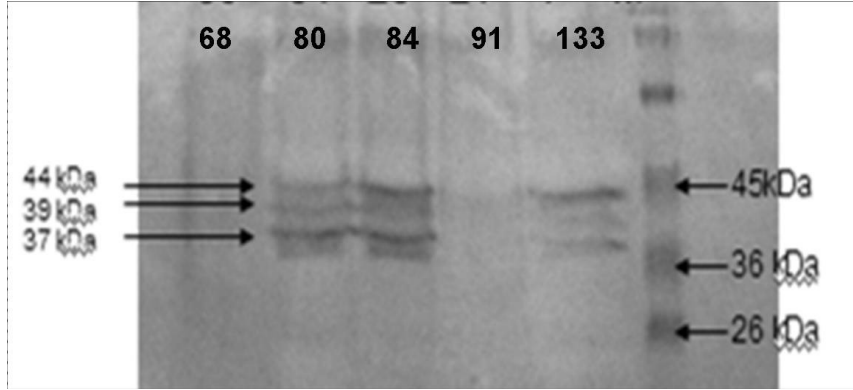
Farzadfar ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada İran'ın Fars şehrinde CaMV'nin varlığını belirlemek amacı ile bir arazi çalışması yürütmüşler ve topladıkları örnekleri DAS-ELISA ile test etmişler ve daha sonra ELISA bulgularını doğrulamak amacı ile PCR analizi

yapmışlardır. ORF II genine göre modifikasyonu yapılan ve spesifik primerler kullanarak yaptıkları PCR analizleri sonucunda yaklaşık 750 bp büyüklüğünde bantlar elde etmişleridir.

Farzadfar ve ark. (2007a), tarafından yapılan çalışmada İran'nın farklı coğrafik bölgelerinden toplanan 9 CaMV izolatının moleküler özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada CaMV belirtileri gösteren karnabahar örnekleri toplanmış, bu örnekler spesifik antitadiler kullanılarak DAS-ELISA ile test edilmiş ve pozitif çıkan 9 CaMV izolatı indikatör bitkilere inokule edilmiştir. Biyolojik ve serolojik çalışmaları doğrulamak için ORF VI genine göre modifiye etikleri PCR analizi sonucunda 1580 bp büyüklüğünde bantlar elde etmişleridir.

4.4. Western Blot Analizi Uygulamaları

Çalışma kapsamında yapılan Western blot analizinde DAS-ELISA testlerinde kullanılan poliklonal antitadiler kullanılmıştır. DAS-ELISA ve PCR testi sonuçlarında infekteli olduğu belirlenen ve rast gele seçilen 68, 80, 84, 91 ve 133 numaralı CaMV örnekleri kullanılarak western blot analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda kılıf proteinine ait 44 kDa, 39 kDa, 37 kDa ağırlığında proteinler elde edilmiştir.



Şekil 4.3. Western blot analizi sonuçları.

Pereza ve ark. (2000), CaMV kılıf proteinini üzerindeki etkileşimlerle ilgili olarak yürüttükleri çalışmada CaMV kılıf proteininin aspartik proteinaz enzimi tarafından bir işleme maruz kaldığını ve bu işlem sonucunda ikincil yapılar oluştuğunu bunun sonucunda da kılıf protein genine ait 44 kDa, 39 kDa, 37 kDa moleküler ağırlığında proteinlerin oluştuğunu bildirmişlerdir.

Daubert ve Routh (1990), Karnabahar mozaik virüsü ORF VI üzerinde oluşan nokta mutasyonu sonucunda konukçu spesifitesi ve simptom değişikliği üzerine yaptıkları çalışmada CaMV D4 streyninin mutasyonu sonucunda viral DNA sekansındaki değişiklikle ilişkili

olarak konukçu spesifitesi üzerine değişimleri irdelemişlerdir. Çalışmada Mutant streyn ile infekteli bitkilerin ekstraktlarından yapılan western blot analizi ile 62 kDa ağırlığındaki gen VI'yı saptamışlar ve aynı kodlama bölgesinden diğer mutantlara ait 25 kDa ve 35 kDa ağırlığında olan iki küçük protein daha saptadıklarını bildirmişler ve bu değişimlerin ORF VI üzerindeki mutasyondan kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Leh ve ark. (1999), yaptıkları çalışmada CaMV'nin yaprak bitleri ile taşınmasında ORF III' ün fonksiyonu üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma kapsamında CaMV PIII proteinlerinin kapasitesini ve diğer proteinlerle ilişkisini belirlemek amacı ile sağlıklı ve infekteli şalgam yapraklarından ekstraktlar elde etmişler ve daha sonra şalgam bitkisinden elde ettikleri proteinleri SDS-PAGE ile ayırıp nitroselüloz membrana aktarmışlardır. Western blot analizi sonucunda P III'e ait 15 kDa ağırlığında P II'ye ait 18 kDa ağırlığında iki ayrı bant gözlemlemişlerdir.

4.5. Klonlama ve Sekans Analizi Çalışmaları

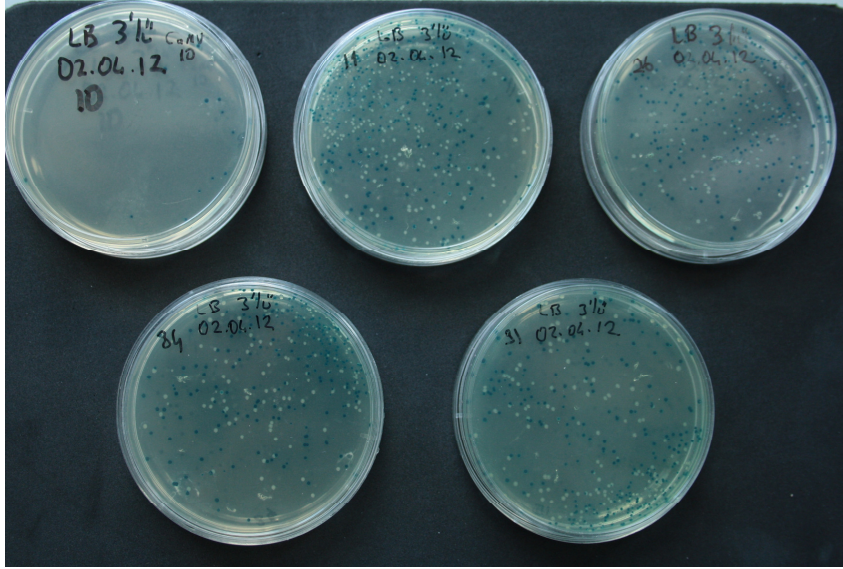
Klonlama çalışmalarında çalışma kapsamında elde edilen CaMV izolatlarına ait PCR ürünleri kullanılmıştır. Yapılan PCR analizleri sonucunda 614 bp uzunluğunda bant oluşturan örneklerden 7 adet seçilerek klonlama çalışmalarında kullanılmıştır.

PCR analizi sonuçlarının pozitif olduğu bilinen 2010-84, 2010-91, 2010-133, 2011-10, 2011-11, 2011-26 ve 2011-41 numaralı CaMV izolatları T-A klonlama yöntemi ile klonlanmış sadece 2010-133 numaralı örnekte klonlama işlemi başarı olarak sonuçlanmamıştır. Bu yöntem, PCR sırasında Taq DNA polimeraz gibi 3'5' ekzonükleaz aktivitesi olmayan DNA polimerazlarla çoğaltılan DNA'ların 3' ucuna fazladan bir Adenin (A) eklenmesine dayanmaktadır. Bu şekilde çoğaltılan 3' ucunda fazladan bir adenin içeren DNA'lar 5' ucunda bir tane Timin (T) taşıyan T-A klonlama vektörleri olarak adlandırılan plazmidlerle birleştirilmekte ve PCR ürünleri DNA ligaz enzimi yardımı ile plazmid vektörlerine klonlanmaktadır. Klonlama işlemine başlamadan önce seçilen 7 izolatın PCR ürünleri EZ Column PCR pürifikasyon kiti kullanılarak saflaştırılmıştır.

Saflaştırma yapılan izolatların DNA'ları 5' ucunda fazladan bir Timin içeren pGEM-T Easy (Promega, ABD) T-A klonlama plazmid vektörüne T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak klonlanmıştır. CaMV kılıf protein genlerini içeren pGEM-T Easy plazmidleri ısı şoku transformasyon yoluyla *Esherichia coli* bakterisinin JM109 ırkına aktarılmıştır. Transformasyonu yapılan *E. coli* bakterileri ampisilin, X-Gal ve IPTG içeren LB besi ortamına ekilerek mavi-beyaz koloni seçimi yoluyla CaMV kılıf protein genlerini içeren plazmidleri taşıyan bakteri kolonilerinin seçimi yapılmıştır. Elde edilen mavi koloniler CaMV kılıf protein genini taşımayan pGEM-T Easy plazmitlerini içermekte ve klonlamanın

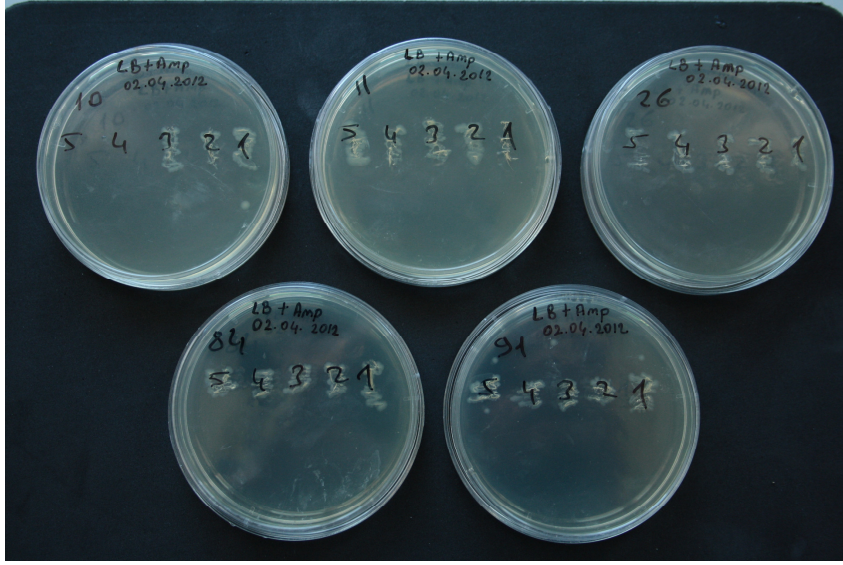
BÖLÜM 4 – ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Hasan Tuna TUZLALI

gerçekleşmediğini göstermektedir. Elde edilen beyaz koloniler ise CaMV kılıf protein geni taşıyan pGEM-T Easy plazmidlerini içermektedir. Bu beyaz koloniler klonlama işleminin başarılı olduğunu göstermektedir. Farklı CaMV izolatlarının kılıf protein genlerinin klonlanması sonucunda her bir izolat için çok sayıda mavi-beyaz koloniler elde edilmiştir. Bazı izolatların kılıf protein genlerinin klonlanması sonucu elde edilen koloniler Şekil 4.4’de gösterilmektedir.



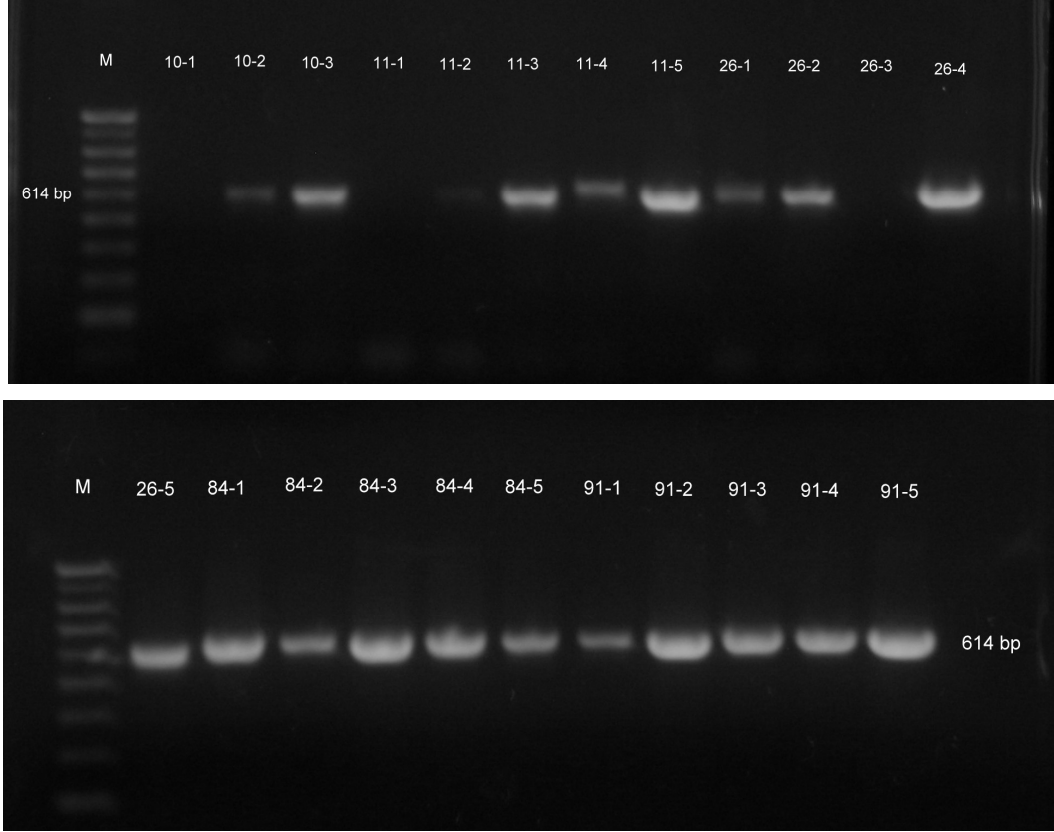
Şekil 4.4. Transformasyon yapılan *Escherichia coli* bakterilerinin ampisilin, X-Gal ve IPTG içeren LB besi ortamında oluşturdukları mavi-beyaz koloniler içeren petri fotoğrafları.

Bu petrilere beyaz koloniler seçilerek daha sonra kullanılmak üzere ampisilin içeren LB besi ortamında büyütülmesi sağlanmıştır. Şekil 4.5’de beyaz kolonilerin ampisilin içeren LB besi ortamına ekim yapılan petrilere gösterilmektedir.



Şekil 4.5. Beyaz kolonilerin ampisilin içeren LB besi ortamına çizimi.

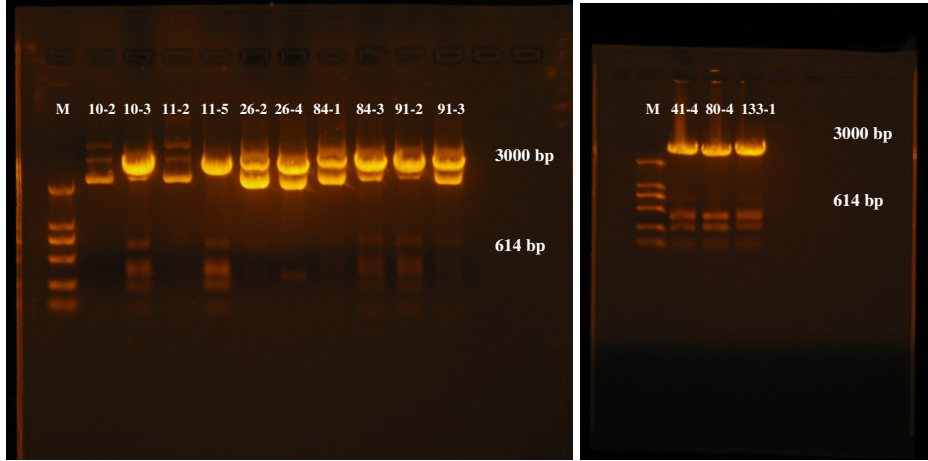
Klonlama yapılan genleri içeren bakterilerin belirlenmesinde mavi-beyaz koloni seçimi ilk aşamada kullanılmaktadır. Beyaz kolonilerin istenilen CaMV kılıf protein genlerini taşıyıp taşımadıklarını kesin olarak belirlemek amacı ile koloni PCR yöntemi ile beyaz kolonilerin taraması yapılmıştır. Koloni PCR yapılırken her bir izolat için elde edilen beyaz kolonilerden en az 3 en fazla 5 tane seçilmiştir. Koloni PCR'ın tamamlanmasından sonra elde edilen PCR ürünleri 100-1000 bp DNA büyüklük markörü ile birlikte % 1'lik agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında görüntülenerek analiz edilmiştir. Kolonilerin belirlenmesi için yapılan koloni PCR sonuçları Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6 CaMV izolatlarının koloni PCR sonuçlarını gösteren jel fotoğrafları.

Koloni PCR sonucunda pozitif çıkan CaMV kılıf protein genlerini içeren beyaz kolonilerden seçilen bakteriler ampisilin içeren LB sıvı ortam içerisinde 37 °C’de çalkalamalı inkübatörde 16 saat süreyle büyütülmüştür. Seçilen örneklerin bir kısmı ise gliserol stok olarak hazırlanıp daha sonra tekrar kullanılmak üzere -80 °C’ de saklanmıştır. Gliserol stokları hazırlanan ve büyütülen bakteri kolonileri seçilerek bunlardan MiniPrep plazmid DNA izolasyon kiti (Biobasic, Kanada) kullanılarak plazmid izolasyonu yapılmıştır.

Saflaştırılan bu plazmid DNA’lar T-A klonlaması yapılan bölgenin her iki yanında bulunan *EcoRI* restriksiyon enzimi kesme bölgelerinden *EcoRI* restriksiyon enzimiyle kesim yapılmıştır ve bu şekilde klonlanan DNA parçası plazmidten ayrılmıştır. Kesilen DNA’lar daha sonra % 1’lik agaroz jelde büyüklük markörleriyle birlikte koşturularak etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında incelendiğinde pozitif olan yaklaşık 3000 bp büyüklüğünde pGEM-T Easy plazmid DNA’sı ve 614 bp büyüklüğünde CaMV kılıf protein genine ait bantlar görülmüştür. Kılıf protein genlerini içeren plazmidlerin *EcoRI* enzimiyle kesilmesi sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.7’de gösterilmektedir. Bu işlemin sonunda klonlanan CaMV izolatlarının kılıf protein genini taşıdıkları kesin olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7 Saflaştırılan plazmidlerin *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesimlerinin yapıldığı jel görüntüsü. M: Marker, 10-2, 10-3, 11-2, 11-5, 26-2, 26-4, 84-1, 84-3, 91-2, 91-3 / 41-1, 80-4, 133-1.

4.6. Kılıf Protein Genlerinin Dizi Analizleri

Saflaştırılan ve *EcoRI* enzimiyle kesilerek CaMV kılıf protein genini taşıdığı kesin olarak belirlenen plazmidlerden bir tanesi seçilerek DNA dizilimi belirlenmesi amacıyla Refgen Biyoteknoloji (Ankara) firmasına gönderilmiştir. CaMV kılıf protein genlerini içeren pGEM-T Easy plazmidlerinin DNA dizilimi M13F ve M13R primerleri kullanılarak döngü dizileme yöntemiyle otomatik DNA dizileme cihazıyla yapılmıştır.

4.6.1. Nükleotid Dizi Analizi

Çanakkale ili ve ilçelerinde karnabahar ve lahana üretiminin yapıldığı alanlardan alınan CaMV izolatlarının nükleotid dizimleri kendi aralarında karşılaştırıldığında izolatlar arasında % 93-100 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Benzerlik oranlarına bakıldığında en fazla benzerliğin (% 100) Ayvacık ilçesi merkezinden alınan CaMV 84 izolatı ve yine aynı ilçeye bağlı Kösedere köyünden alınan CaMV 91 izolatı arasında olduğu belirlenmiştir. En fazla farklılık ise (% 93) CaMV 26 izolatı ile CaMV 84 ve CaMV 91 izolatları arasında gerçekleşmiştir.

BÖLÜM 4 – ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Hasan Tuna TUZLALI

Çizelge 4.3. Çanakkale ili ve ilçelerine ait karnabahar ve lahana üretim alanlarından toplanan CaMV izolatlarının nükleotid dizilerinin benzerlik oranları

	CaMV26	CaMV11	CaMV41	CaMV84	CaMV91
CaMV10	96	94	95	94	94
CaMV26		95	94	93	93
CaMV11			94	94	94
CaMV41				95	95
CaMV84					100

Gen bankası veri tabanlarında dünyanın karnabahar ve lahana üretimi yapılan alanlarından elde edilen 9 farklı izolatın kılıf protein geninin dizilimi bulunmaktadır. Gen bankasında mevcut olan bu kılıf protein genlerinin nükleotid dizimleri alınarak Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen CaMV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizimleriyle karşılaştırılarak benzerlik oranları belirlenmiştir. Tüm bu karşılaştırmalar sonucunda Çanakkale ili CaMV izolatlarının dünya izolatları ile % 92-97 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu benzerlik oranları incelendiğinde en fazla benzerliğin % 97 ile CaMV 26 izolatı ile CaMV MCACGDH (Amerika) izolatı arasında olduğu görülmektedir. İkinci en yüksek benzerliğin ise % 96 oranında CaMV 41 izolatı ile CaMV NC_001497 (Amerika) izolatı ve CaMV V00141 izolatları arasında olduğu ve yine aynı oranla CaMV 11 izolatı ile CaMV MCACGDH (Amerika) izolatı arasında olduğu görülmektedir. Bununla birlikte en fazla farklılığa sahip izolatların ise % 92 benzerlik oranı ile CaMV 10 izolatı ile CaMV JF809616 (Arjantin) izolatı arasında olduğu görülmektedir. Bu çalışmada kullanılan 6 CaMV izolatı ile dünyada bulunan 9 farklı CaMV izolatı arasındaki benzerlik oranları çizelge 4.4'te verilmiştir.

BÖLÜM 4 – ARASTIRMA BULGULARI VE TARTISMA Hasan Tuna TUZLALI

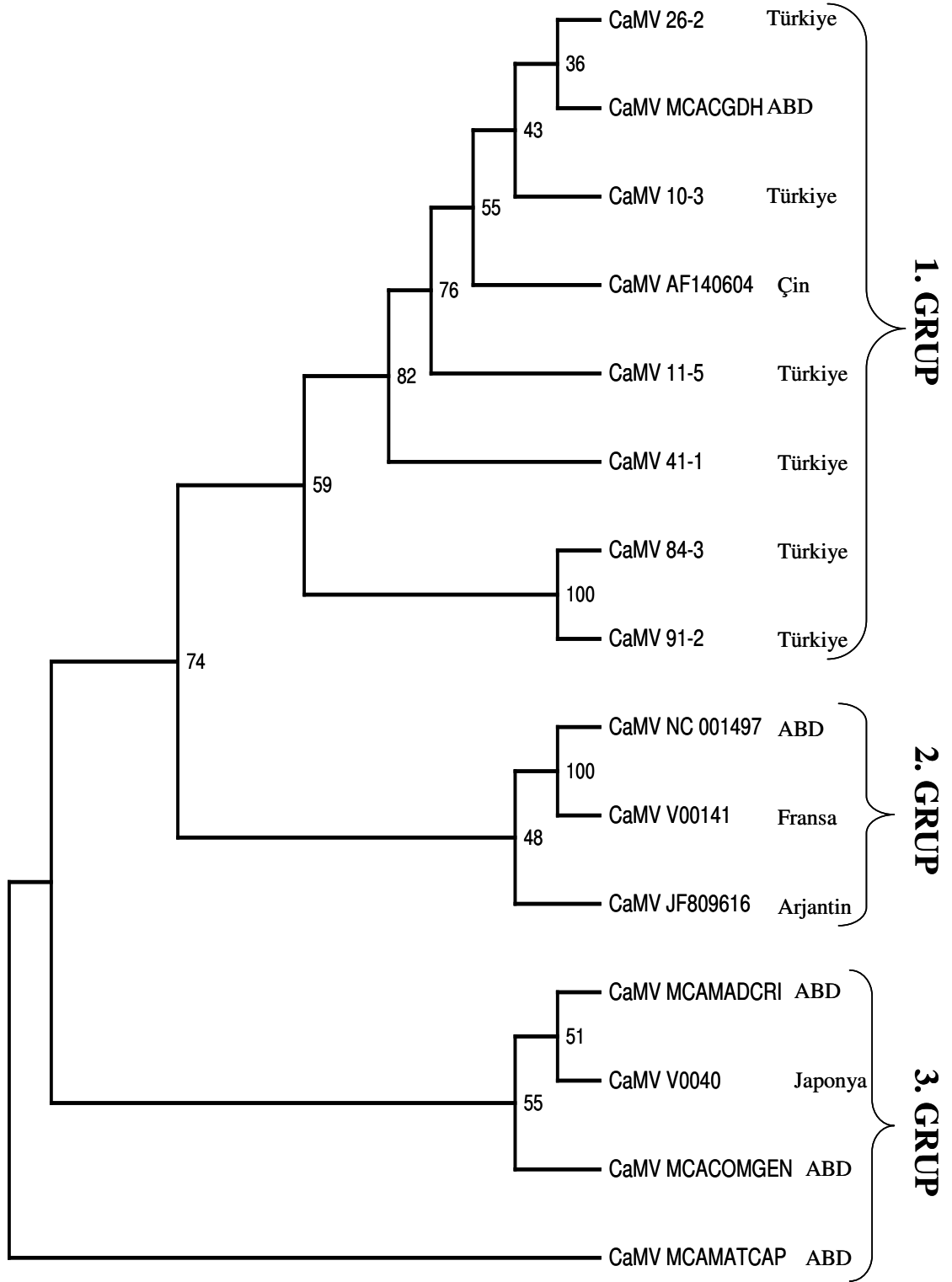
Çizelge 4.4. Çanakkale CaMV izolatları ile dünyadaki CaMV izolatlarının nükleotid dizilerinin benzerlik oranları

	CaMV 26-2	CaMV AF140604	CaMV MCACGDH	CaMV 11-5	CaMV 41-1	CaMV 84-3	CaMV 91-2	CaMV JF809616	CaMV NC_001497	CaMV V00141	CaMV MCAMATCAP	CaMV MCACOMGEN	CaMV MCAMADCRI	CaMV V0040
CaMV 10-3	96	94	96	94	95	94	94	92	93	93	93	93	93	93
CaMV 26-2		95	97	95	94	93	93	93	94	94	94	93	94	94
CaMV AF140604			96	95	93	94	94	93	93	93	93	92	94	94
CaMV MCACGDH				96	95	94	94	93	94	94	94	93	94	93
CaMV 11-5					94	94	94	94	95	95	94	93	94	94
CaMV 41-1						95	95	94	96	96	94	94	94	94
CaMV 84-3							100	95	95	95	94	95	94	95
CaMV 91-2								95	95	95	94	95	94	95
CaMV JF809616									97	97	95	96	96	96
CaMV NC_001497										100	96	95	95	96
CaMV V00141											96	95	95	96
CaMV MCAMATCAP												96	96	96
CaMV MCACOMGEN													97	97
CaMV MCAMADCRI														97

4.6.2. Filogenetik Analizler

Karnabahar ve lahana üretiminin yapıldığı Çanakkale ili ve ilçelerinden toplanan CaMV izolatlarının birbirleri ile genetik ilişkisini belirlemek amacı ile 6 farklı izolatın kılıf protein genlerine ait nükleotid dizilimleri kullanılarak filogenetik analizler yapılmış ve filogenetik analizler sonucunda izolatların genetik ilişkisi belirlenmiştir. Filogenetik analizi yapılan izolatlar arasında birbirine en yakın yani en fazla benzerlik gösteren izolatlar Ayvacık ilçesi merkezinden alınan CaMV 84 izolatı ile yine aynı ilçenin Kösedere köyünden alınan CaMV 91 izolatı olurken birbirine en uzak yani en az benzeyen izolatlar ise Merkez ilçeye bağlı Kumkale köyünden alınan CaMV 26 izolatı ile Ayvacık ilçesinden alınan CaMV 84 ve CaMV 91 izolatları olmuştur.

Gen bankası veri tabanlarında bulunan dünyanın farklı üretim alanların elde edilen 9 farklı izolatın kılıf protein genlerinin nükleik asit dizileri kullanılarak ülkemizde bulunan CaMV izolatlarıyla karşılaştırılmış ve filogenetik analizleri yapılmıştır. Bu izolatların kılıf protein genlerinin nükleik asit dizilimine göre oluşturulan filogenetik soyağacı Şekil 4.8’de verilmiştir. Yapılan filogenetik analizler CaMV izolatlarının üç ana gruba ayrıldığını göstermiştir. Bu gruplardan birincisinde 6 Çanakkale, 1 Amerika ve 1 Çin izolatı olmak üzere 8 izolat bulunmaktadır. İkincisinde ise 1 Amerika, 1 Fransa ve 1 Arjantin izolatı bulunmakta ve son grupta ise 3 Amerika ve 1 Japonya izolatı bulunmaktadır. Bootstrap değerleriyle desteklenen soyağacına göre ülkemiz izolatları ile dünyanın farklı ülkelerinden elde edilen diğer CaMV izolatları değişen oranlarda benzerlik gösterirken en yakın benzerlik Çanakkale CaMV 26 izolatı ile CaMV MCACGDH (Amerika) izolatı arasında gerçekleşmiştir.



Şekil 4.8. Çanakkale CaMV izolatları ile dünya izolatlarının kılıf protein geninin nükleotid dizilimi kullanılarak görüntülenen filogenetik soyağacı.

BÖLÜM 4 – ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Hasan Tuna TUZLALI

Farzadfar ve ark. (2007a), tarafından yapılan çalışmada İran'nın farklı coğrafik bölgelerinden toplanan 9 CaMV izolatının moleküler özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Filogenetik analizler sonucunda soyağacında, İran izolatlarının tek bir grup altında dallandığını ve yine elde edilen izolatların Kuzey Amerika dışındaki bölgelerden elde edilen izolatlarla büyük oranda benzerlik gösterdiği, en fazla benzerliğin CaMV-D/H (Macaristan) izolatı ile % 96.1-% 96.7 oranında olduğunu ve en az benzerliğin ise CaMV XinJing (Japon) izolatı ile % 83.7- % 84.4 oranında olduğunu bildirmişlerdir.

Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen CaMV izolatlarının filogenetik analizler sonucunda benzerlik göstermesi (% 93-100) beklenen bir sonuçtur. Analizler sonucu elde edilen bu yüksek benzerlik oranı büyük ihtimalle elde edilen izolatların orijininin aynı olmasından ve virüsün tek bir kaynaktan yayılmasından kaynaklanmaktadır. Bu çalışma kapsamında Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen izolatların sadece 6 tanesinin kılıf protein genlerinin nükleik asit dizi analizleri yapılmıştır. Bu sayının elde edilen CaMV izolatlarının hem kendi içinde hem de dünyanın diğer bölgelerinden elde edilen izolatlarla kıyaslanması açısından yeterli olmadığı ve bu bağlamda daha geniş alanlarda daha fazla örnekleme yapılarak yürütülecek bir çalışma, CaMV izolatlarının kıyaslanması açısından daha fazla yarar sağlayacaktır. Çanakkale CaMV izolatları ile dünya izolatlarının kılıf protein geninin nükleotid dizilimi kullanarak görüntülenen soyağacında ise Çanakkale izolatlarının kendi arasında bir alt grup oluşturduğu görülmektedir. Bu grup içerisinde bir Çin ve bir Amerika izolatının da yer aldığı görülmektedir. Bu durumun her ne kadar Çanakkale izolatının orijini hakkında bilgi verse de daha net sonuçlar için daha geniş alanlarda daha fazla izolat elde edilmesi gerekmektedir.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çanakkale ili, gerek uygun iklim koşulları gerekse de tarıma elverişli toprak yapısıyla polikültür tarım yapılabilen ve aynı zamanda istihdamın önemli bir kısmının tarımla (% 32.8) sağlandığı bir ildir (Anonim 2008). Çanakkale ilinde 2.795.409 dekar tarım alanı içerisinde ise 201.700 dekarlık bir alanda sebze tarımı yapılmaktadır. Sebze üretimi yapılan kültür bitkilerinde fungus, bakteri, virüs, viroid, fitoplasma gibi hastalık etmenleri önemli oranlarda kayıplara neden olabilmektedirler. Bu hastalık etmenleri arasında virüsler, kimyasal mücadelelerinin olmaması ve aynı zamanda oluşturdukları zarar düzeyleri nedeni ile diğer hastalık etmenlerine göre farklılık gösterirler. Sebzelerde ekonomik anlamda kayıplara neden olan bu hastalık etmenlerden birisi de başta *Brassicaceae* familyasındaki bitkilerde olmak üzere, önemli kayıplara neden olan Karnabahar mozaik virüsü (CaMV)'dür.

Çalışma kapsamında elde edilen CaMV izolatları Çanakkale ili ve ilçelerinde karnabahar ve lahanana üretiminin yapıldığı farklı alanlardan elde edilmiştir. CaMV'ye benzer belirti gösteren ve CaMV ile infekteli olduğu düşünülen toplam 84 adet bitki örneği toplanmıştır. Örnekleme yoğunluğuna bakıldığında en çok örnek Çanakkale Merkez ilçesinden (46) alınmıştır. Bu ilçeyi takiben Ayvacık (28) ve Çan (10) ilçeleri yer almaktadır.

2010 ve 2011 yılları üretim sezonları içerisinde yapılan sörveylerde tesadüfi olarak seçilen tarlalarda hastalık yoğunluğuna bakıldığında karnabaharlarda CaMV yoğunluğunun çeşit özelliğine bakılmaksızın, özen gösterilmemiş ve özellikle yaprak biti popülasyonunun yoğun olduğu yerlerde fazla olduğu görülürken, lahanalarda ise beyaz lahanaların (*Brassica oleraceae* L. *capitata*. (L) Alef. var. *Alba* DC) diğer lahanana çeşitlerine göre daha duyarlı olduğu gözlenmiştir.

Sörveyler süresince toplanan ve yapılan testler sonucunda infekteli olan örneklerde tipik olarak mozaik, damar açılmaları, damar bantlaşması, nekrotik lekeler, şekil bozuklukları ve kloroz belirtileri görülmüştür.

Çalışmanın ana materyalini oluşturan toplam 84 adet bitki örneğine DAS-ELISA testi uygulanmıştır. 2010 yılı üretim sezonunda toplanan 56 örnekten 41'i, 2011 yılı üretim sezonunda toplanan 28 örnekten ise 22'si toplam 84 bitki örneğinin 63'ü DAS-ELISA testi sonucunda CaMV ile infekteli bulunmuştur. Yapılan sörveylerde CaMV belirtileri gösteren bitki örnekleri toplam örnek sayısını oluşturduğundan dolayı enfeksiyon oranı % 75 gibi yüksek bir değer olarak ortaya çıkmaktadır. Enfeksiyon oranının ilçeler bazında dağılımında

ise en yüksek oran Ayvacık (% 89.2) ilçesinde görülürken, bu oran Çanakkale Merkez ilçede % 70, Çan ilçesinde ise % 60 olarak tespit edilmiştir.

Çalışma kapsamında DAS-ELISA bulgularını doğrulamak ve klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere PCR analizi uygulanmıştır. DAS-ELISA sonucu pozitif olan örnekler, kılıf protein geninin 614 bç'lik kısmına spesifik olarak hazırlanan primerlerle yapılan PCR analizleri sonucunda tüm örneklerde istenilen büyüklükte bantlar elde edilmiştir. PCR analizinde, örnekler rastgele seçilmiş ve 11'i karnabahar 2'si lahana olmak üzere toplam 13 CaMV izolatı kullanılmış ve tüm izolatlarda net bant oluşumları gözlenmiştir.

DAS-ELISA ve PCR sonuçları pozitif olduğu bilinen 2010-68, 2010-80, 2010-84, 2010-91 ve 2010-133 numaralı örnekler kullanılarak western blot analizi yapılmıştır. Bu örnekler içerisinde 2010-80, 2010-84 ve 2010-133 numaralı örneklerde bant oluşumları gözlenmiş ve bu örneklerde proteinlerin parçalanması sonucunda 44 kDa, 39 kDa ve 37 kDa molekül ağırlığına sahip bantlar elde edilmiştir.

Klonlama çalışmalarında, PCR sonuçları pozitif olduğu bilinen 7 izolat (2010-84, 2010-91, 2010-133, 2011-10, 2011-11, 2011-26, 2011-41) seçilmiş ve bu izolatlar arasında 2010-133 numaralı izolat dışındaki tüm CaMV izolatları T-A klonlama yöntemiyle başarılı olarak klonlanmıştır.

CaMV kılıf protein genlerini kesin olarak taşıdığı belirlenen 6 CaMV izolatının saflaştırılmış plazmidleri seçilerek CaMV kılıf protein genlerinin dizilimleri yapılmıştır. Dizilimi yapılan bu izolatlar kendi aralarında ve gen bankası veri tabanından elde edilen diğer CaMV izolatları ile karşılaştırılmış ve sonuçları irdelenmiştir. Ülkemiz izolatları arasında yapılan benzerlik ve farklılık kıyaslamaları sonucunda CaMV 84 ve CaMV 91 numaralı izolatların % 100 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ülkemiz izolatları içerisinde ikinci olarak en yüksek benzerliğe sahip izolatlar ise % 96 oranıyla CaMV 10 ve CaMV 26 izolatları olduğu gözlenmekle birlikte en fazla farklılık oranı % 93 ile CaMV 10 izolatı ve CaMV 84 izolatı ile CaMV 10 ve CaMV 91 izolatları arasında olduğu belirlenmiştir.

Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen 6 izolat ile dünyanın farklı bölgelerinden elde edilmiş ve gen bankasındaki veri tabanında nükleotid dizilimleri bilinen 9 CaMV izolatı karşılaştırılmış ve bu izolatların benzerlik oranları belirlenmiştir. Tüm bu verilere göre ülkemiz izolatları ile dünya izolatları arasında % 92-97 arasında benzerlik olduğu belirlenmiştir. En fazla benzerliğin % 97 ile CaMV 26 izolatı ile CaMV MCACGDH (Amerika) izolatı arasında olduğu gözlenmektedir. İkinci en yüksek benzerliğin ise % 96 oranında CaMV 41 izolatı ile CaMV NC_001497 (Amerika) izolatı ve CaMV V00141

izolatları arasında olduğu ve yine aynı oranla CaMV 11 izolatı ile CaMV MCACGDH (Amerika) izolatı arasında olduğu gözlenmektedir. Bununla birlikte en fazla farklılığa sahip izolatların ise % 92 benzerlik oranı ile CaMV 10 izolatı ile CaMV JF809616 (Arjantin) izolatı arasında olduğu görülmektedir.

Çalışma kapsamında dünya izolatları ve ülkemiz izolatlarının nükleotid dizilerine göre filogenetik analizleri yapılmıştır. Filogenetik analizler sonucunda CaMV izolatlarının kılıf protein genlerine göre üç ana gruba ayrıldığı belirlenmiştir. Bu grupların birincisinde 6 ülkemiz izolatının yanı sıra bir Amerika ve Çin izolatı, ikincisinde bir Amerikan, bir Fransa ve bir Arjantin izolatı, üçüncüsünde ise üç Amerika izolatı ile bir Japonya izolatı olmak üzere toplam 15 izolat yer almaktadır. Aynı grup içerisinde yer alan ülkemiz izolatları ile başta CaMV MCACGDH (Amerika) olmak üzere ve CaMV AF140604 (Çin) izolatları birbirine yakın olan izolatlar olarak belirlenmiştir.

Bu çalışma kapsamında Çanakkale ili ve ilçelerinde karnabahar ve lahana üretimi yapılan alanlardan elde edilen CaMV izolatlarının tanılanması ve karakterizasyonu yapılmıştır. Karnabahar ve lahana üretimi ülkemizde ve Çanakkale’de önemli miktarlarda yapılmakta ve bu sebzeler beslenmenin önemli unsurları olmalarının yanı sıra ekonomik anlamda da önem taşımaktadırlar. Tüm bu nedenlerden dolayı bu sebzelerde ekonomik olarak önemli kayıplara neden olan Karnabahar mozaik virüsü’nün yayılmasını önleyecek tüm tedbirlerin alınmasının yanı sıra ileriye yönelik dayanıklılık çalışmalarına katkı sağlamak amacı ile bilimsel çalışmaların tüm hızıyla devam ettirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Agama K, Beach J., Schoelz J., Leisner S.M. 2002. The 5'-third of *Cauliflower mosaic virus* Gene VI Conditions Resistance Breakage in *Arabidopsis* Ecotype Tsu-0. *Phytopathology* 92 p:190–196.
- Al-Kaff N.S., Covev S.N. 1994. Variation in Biological Properties of *Cauliflower mosaic virus* Clones. *Journal of General Virology* 75 (31) p: 37-45.
- Al-Kaff N.S., Covev S.N. 1995. Biological Diversity of *Cauliflower mosaic virus* Isolates Expressed in Two *Brassica* Species. *Plant Pathology*. 44 p: 516-526.
- Anderson E.J., Qiu S.G., Schoelz J.E., 1991. Genetic Analysis of Determinants of Disease Severity and Virus Concentration in *Cauliflower mosaic virus*. *Virology*. 181 (2) p: 647-655.
- Anonim, 2008. <http://www.canakkale.gov.tr/186/canakkale-ve-ekonomik-yapi> Erişim tarihi: 23.04.12
- Anonim, 2010a. <http://faostat.fao.org>. Erişim tarihi: 04.04.2012
- Anonim, 2010b. <http://www.tuik.gov.tr/Veribilgi>. Erişim tarihi: 04.04.2012
- Blanc S., Hebrard E., Drucker M., Froissart R. 2001. Molecular Basis of Vector Transmission *Cauliflower mosaic virus* Cabb-S Strain and S Delta II Hybrid By Two Species of Aphid: *Myzus persicae* (sulzer) and *Brevicoryne brassicae* (L.). *Res. Virol.* 141 p: 677-683.
- Cecchini E., Al-Kaff N.S., Bannister A., Giannakou M.E., NeCallum D.G., Maule A.J., Milner J.J., Covey S.N. 1998. Pathogenic Interactions Between Variants of *Cauliflower mosaic virus* and *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 49 (321) p: 731-737.
- Cheng R.H., Olson N.H., Baker T.S. 1992. *Cauliflower Mosaic Virus*: A 420 Subunit (T=7), Multilayer Structure. *Virology*. 186 p: 655-668.

- Clark M. F. and Adams A.N. 1977. Characteristic of The Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay For The Detection of Plant Viruses. *J. Gen. Virol.* 34 p: 475-483.
- Çevik B., Pappu S.S., Pappu H.R., Benscher D., Lee R.F., Futch S.H., Rucks, P., Niblett C.L. 1995. Molecular Cloning and Sequencing of Coat Protein Genes of *Citrus tristeza virus* Isolated from Meyer Lemon and Homely Tangor Trees in Florida. In: Proc. Intern, Org. Citrus Virologist. IOCV, University of California, Riverside, CA. p: 47-53.
- Daubert S., Routh G. 1990. Point Mutations in Cauliflower mosaic virus Gene IV Confer Host Specific Symptoms Virus Gene IV Confer Host Specific Symptoms Changes. *Mol. Plants Mic. Interac.* 3 p: 341-345.
- Daubert S.D., Schoelz J., Shephard R.J. 1984. Expression of Disease Symptoms in *Cauliflower mosaic virus* Genomic Hybrids. *Journal of Molecular and Applied Genetics.* 2 p: 537-547.
- Dautel S., Guidasci T., Pique M., Mougeot J.L., Lebourier G., Yot P., Mesnard J.M.. 1994. The Full-length Product of *Cauliflower mosaic virus* Open Reading Frame III is Associated With the Viral Partical. *Virology.* 202 p: 1043-1045.
- Dikova A.B. 2008. *Sinapis arvensis* L. as a Source of Viruses – *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) and *Turnip mosaic virus* (TuMV) Infecting Oilseed Rape. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica.* 43 (1) p: 93–99.
- Erkan S., Eşiyok D., ESER B. 1990. A New Viral Agent Affecting Cauliflower and Cabbage Plants in TURKEY. *Journal of Turk Phytopathology.*, 19 (2) p: 95-97.
- Farzadfar Sh., Ahounmanesh A., Mosahebi G.H., Oshima., Koochi-Habibi M., Pourrahim R., Golnaraghi A.R. 2007a. Partial Bioloical and Molecular Characterization of *Cauliflower mosaic virus* Isolates in Iran. *Plant Pathology Journal* 6 (4) p: 291-298.
- Farzadfar Sh., Ahounmanesh A., Mosahebi G.H., Pourrahim R., Golnaraghi A.R. 2007b. Occurance and Distribution of *Cauliflower mosaic virus* on *Cruciferous* Plants in Iran. *Plant Pathology Journal* 6 (1) p: 22-29.

- Farzadfar Sh., Pourrahim R., Golnaraghi A.R., Ahounmanesh A. 2005. Occurrence of *Cauliflower mosaic virus* in Different *Cruciferous* Plants in Iran. *Plant Pathol.* 54 p: 810.
- Gray S.M., Banerjee N. 1999. Mechanisms of Arthropod Transmission of Plant and Animal Viruses. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (63) p: 128-148.
- Haas M., Marin B., Geldrich A., Yot P., Keller M. 2002. *Cauliflower mosaic virus* : Stil in The News. *Mol. Plant Pathol.* (3) p: 419-429.
- Hardwick, N. V., Davies J. M. L., Wright D. M. 1994. The Incidence of Three Virus Diseases of Winter Oilseed Rape in England and Wales in The 1991/92 and 1992/93 Growing Season. *Plant Pathol.* 43 p: 1045–1049.
- Jiang B., Hong N., Wang G.P., Hu J., Zhang J.K., Wang CX., Liu Y., Fan X.D., 2008. Characterization of *Citrus tristeza virus* Strains from Southern China Based on Analysis of Restriction Patterns and Sequences of Their Coat Protein Genes, Virus Genes, 37 (2) p: 185-192.
- Kennedy J.S., Day M.F., Eastop V.F. 1962. A Conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses. *Common Wealth Institute of Entomol.* London, p:114.
- Korkmaz S., Çevik B., Kurtuluş E., Tuzlalı H.T. 2011. Güneybatı Marmara Bölgesi'nde *Brassicaceae* ve *Alliceae* Familyasına Bağlı Bitkilerde Virüs Hastalıklarının Teşhisi. *Çanakkale Tarım Sempozyumu, Dünyü Bugünü Geleceği.* s: 460-467.
- Korkmaz S., Çevik B., Yıldırım İ., Ohshima K. 2010. Ülkemizde *Brassicaceae* Familyası Bitkilerinde Şalgam mozaik virüsü (*Turnip mosaic virus*=TuMV) İzolatlarının Biyolojik ve Moleküler Yapılarının Belirlenmesi. TÜBİTAK TOVAG Proje No: 106O675.
- Leh V., Emmanuel J., Geldreich A., Hermann T., Leclerc D., Cerutti M., Yot P., Keller M., Blanc S. 1999. Aphid Transmission of *Cauliflower mosaic virus* Requires the Viral PIII Protein. *The EMBO Journal* Vol. 18 No.24 p: 7077-7085.

- Lung M.C.Y., Pirone T.P. 1973. Studies on The Reason For Differential Transmissibility of *Cauliflower mosaic virus* isolates of Aphids *Phytopathology*. 63 p: 910-914.
- Mason W.S., Taylor J.M., Hull R. 1987. Retroid Virus Genome Replivation. *Adv. Virus Res.* 32 p: 95-96.
- Melcher U. 1989. Symptoms of *Cauliflower mosaic virus* in Infection *Arabidopsis thaliana* and Turnip. *Bot. Gaz.* 150 p:139-137.
- Mevel S., Kerlan C. 1990. Biological Properties of Different Isolates of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). 1. Solanaceous hosts. *Agronomie*. 10 p: 749-758.
- Moreno A., Blas C.DE., Biurrun R., Nebrada M., Palacios I., Duque M., Ferreres A. 2004. The Incidence and Distribution of Viruses Infecting Lettuce, Cultivated *Brassica* and Associatiated Natural Vegetation in Spain. *Ann. Appl. Biol.* 144 p: 339-346.
- Palacios I., Drucker M., Blanc S., Leite S., Moreno A. 2002. *Cauliflower mosaic virus* is Preferentially Acquired From The Phloem by its Aphid Vectors. *J. Genet. Virol.* 83 p: 3163-3171.
- Pereza O.G., Tapia M., Hohn T., Mieszczak M.H. 2000. Intereaction of the *Cauliflower mosaic virus* Coat Protein Preenomik RNA Leader. *American Society for Microbiology*. 74 (5) p: 2067-2072.
- Pirino T., Blanc S. 1996. Helper Dependent Vector Transmission of Plant Viruses. *Ann. Rev. Phytopathol.* 34 (p): 227-247.
- Qui S.G., Wintermantel W.M., Sha Y., Schoelz J.E. 1997. Light Dependent Systemic Infection of Solanaceous Species by *Cauliflower mosaic virus* can be Conditioned by Viral Gene Encoding an Aphid Transmission Factor. *Virolog.* (236) p: 137-146.
- Schoelz J. E., Shepherd., Richins R.D. 1985. Properties of an Unusal Stain of *Cauliflower mosaic virus*. *Phytopathology*. (76) p: 451-454.
- Schoelz J.E., Shepherd R.J., 1988 Host Range Control of CaMV. *Virology*. (162) p: 30-37.

- Schoelz J., Shepherd, R. J., and Daubert, S. 1986. Region VI of *Cauliflower mosaic virus* Encodes a Host Range Determinant. *Mol. Cell. Biol.* (6) p: 2632-2637.
- Shahraeen N., 2012. An Overview of Oilseed Rape (canola) Virus Diseases in Iran. *International Research Journal of Microbiology*. Vol. 3(1) p: 24-28.
- Shahraeen N., Farzadfar Sh., Lesemann D.E. 2003. Incidence of Viruses Infecting Winter Oilseed Rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) in Iran. *Journal of Phytopathology* p: (151) 614–616.
- Shepherd R.J. 1981. *Cauliflower mosaic virus*. *AAB Descriptions of Plant Viruses*. No. 243.
- Shephard R.J., Hills F.J. 1970. Dispersal of *Beet yellows* and *Beet mosaic viruses* in the Inland Valleys of California. *Phytopathology*. (60) p: 798-804.
- Spence N.J., phiri N.A., Hughes S.L., Mwaniki A., Simons S., Oduor G., Chacka D., Kuria A., Ndirangu S., Kibata G.N., Marris G.C. 2007. Economic Impact of *Turnip mosaic virus*, *Cauliflower mosaic virus* and *Beet mosaic virus* in Three Kenyan Vegetables. *Plant Pathology*. (56) 317-323.
- Suehiro N., Matsuda K., Okuda S., Natsuaki T. 2005. A Simplified Method for Obtaining Plant Viral RNA for RT-PCR. *J Virol Methods*. 125(1) p: 67-73.
- Sutic D.D., R.E. Ford., Totic, M.T. 1999. *Handbook of Plant Virus Diseases*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Tabarestani A.Z., Shamsbakhsh M., Safaei N., (2011). Distribution of three important aphid borne canola viruses in Golestan province. *Iranian journal of Plant Protection Science*. 141 (2) p: 112-118.
- Thomas C.L., Perbal C.,Maule A.J., 1993 A Mutation of *Cauliflower mosaic virus* gene I Interferes with Virus Movement but Not Virus Replication. *Virology*. 192 p: 415–421.
- Tomlinson J.A. 1987. Epidemiology and Control of Virus Diseases of Vegetables. *Annals of Applied Biology* 110 p: 661-681.

Tompkins C.M. (1937). A Transmissible Mosaic Disease of Cauliflower *J. Agric. Res.* **55** p: 33-46

Torruella M., Gordon K., Hohn T., 1986 *Cauliflower mosaic virus* Produces an Aspartic Proteinase to Cleave its Polyproteins. *EMBO J.* 8 p: 2819–2825.

Wintermantel W. M., Anderson, E. J., Schoelz, J. E. 1993. Identification of Domains Within Gene VI of *Cauliflower mosaic virus* That Influence Systemic Infection of *Nicotiana biglovii* in a Light-Dependent Manner. *Virology.* 196 p: 789-798.

Xiong C., Balazs E., Lebeurier G., Hindelang C., Stoeckel M.E., Porte A. 1982. Comparative Cytology of Two Isolates of *Cauliflower mosaic virus*. *J. Gen. Virol.* 61 p: 75-81.

Çizelge 4.1. Çanakkale ili ve ilçelerindeki karnabahar ve lahana üretim alanlarından elde edilen Karnabahar mozaik virüsü izolatlarının dağılımı	26
Çizelge 4.2. İlçeler bazında toplanan örnek sayısı ve % infeksiyon oranı	27
Çizelge 4.3. Çanakkale ili ve ilçelerine ait karnabahar ve lahana üretim alanlarından toplanan CaMV izolatlarının nükleotid dizilerinin benzerlik oranları	37
Çizelge 4.4. Çanakkale CaMV izolatları ile dünyadaki CaMV izolatlarının nükleotid dizilerinin benzerlik oranları	38

ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 1.1. Karnabahar mozaik virüsü genomu	3
Şekil 3.1. Karnabahar mozaik virüsü izolatlarının toplandığı Çanakkale ili ve ilçeleri	15
Şekil 3.2. A: Separating jel hazırlanması, B: Stacking jel hazırlanması	18
Şekil 3.3. Proteinlerin nitroselüloz membrana aktarılması	18
Şekil 4.1. Karnabahar mozaik virüsü'nün neden olduğu belirtiler	29
Şekil 4.2. PCR analizi sonuçları. M: Marker (100-1000 bp) 10-11: Lahana, 24, 26, 35, 39, 68, 80, 84, 91, 133: Karnabahar. CaMV ile infekteli izolatlar	30
Şekil 4.3. Western blot analizi sonuçları	31
Şekil 4.4. Transformasyon yapılan <i>Escherichia coli</i> bakterilerinin ampisilin, X-Gal ve IPTG içeren LB besi ortamında oluşturdukları mavi-beyaz koloniler içeren petri fotoğrafları	33
Şekil 4.5. Beyaz kolonilerin ampisilin içeren LB besi ortamına çizimi	34
Şekil 4.6. CaMV izolatlarının koloni PCR sonuçlarını gösteren jel fotoğrafları	35
Şekil 4.7. Saflaştırılan plazmidlerin <i>EcoR I</i> restriksiyon enzimi ile kesimlerinin yapıldığı jel görüntüsü. M: Marker, 10-2, 10-3, 11-2, 11-5, 26-2, 26-4, 84-1, 84-3, 91-2, 91-3 / 41-1, 80-4, 133-1	36
Şekil 4.8. Çanakkale CaMV izolatları ile dünya izolatlarının kılıf protein geninin nükleotid dizilimi kullanılarak görüntülenen filogenetik soyağacı	40

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Hasan Tuna TUZLALI

Doğum Yeri: Adana

Doğum Tarihi: 24.07.1984

EĞİTİM DURUMU:

Lisans Öğrenimi: Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Makineleri Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: ÇOMÜ Fen Bilimleri Ens. Bitki Koruma Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ:

Katıldığı Kongreler: III. Bitki Koruma Kongresi (Van, 2009)

IV. Bitki Koruma Kongresi (Kahramanmaraş, 2011)

Katıldığı Sempozyumlar: Çanakkale Tarımı Sempozyumu (Çanakkale, 2011)

Korkmaz S., Çevik B., Kurtuluş E., Tuzlalı H.T. 2011. Güneybatı Marmara Bölgesi'nde *Brassicaceae* ve *Alliaceae* Familyasına Bağlı Bitkilerde Virüs Hastalıklarının Teşhisi. Çanakkale Tarımı Sempozyumu. Çanakkale. 460-467.

Korkmaz S., Çevik B., Satar S., Koç N. K., Akdura N., Kurtuluş E., Tuzlalı H.T. 2011. Ülkemizde Bulunan Turunçgil Tristeza Virüsü İzolatlarının Tek Sarmal Konformasyonel Polimorfizm (Single Strand Conformation Polymorphism; SSCP) Profillerinin Belirlenmesi. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi. Kahramanmaraş. 81.

Korkmaz, S., Çevik, B., Kurtuluş, E., Tuzlalı, H.T. 2011. Marmara Bölgesi Soğan Üretim Alanlarında Yeni bir Virüs Hastalığı: Soğan sarı cücelik virüsü. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi. Kahramanmaraş. 397.

Tuzlalı H.T. ve Korkmaz S. 2011. Çanakkale İlinde Karnabahar mozaik virüsü (*Cauliflower mosaic virus*; CaMV)'nün Serolojik ve Moleküler Yöntemlerle Tanılanması. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi. Kahramanmaraş 396.

KİTAPLAR:

Alanında yayınlanan kitaplarda bölüm veya ünite yazarlığı: Domates Yetiştiriciliği El Kitabı

Tuzlalı H.T., Korkmaz S. 2012. Domates Yetiştiriciliğinde Önemli Hastalıklar ve Mücadele Yöntemleri. 35-57.

İLETİŞİM:

E-posta adresi: tunatuzlali@comu.edu.tr.