

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

ÇANAKKALE İLİNDE PIRASA SARI ÇİZGİ VİRÜSÜ
(*Leek yellow stripe virus*; LYSV)'NÜN BİYOLOJİK VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU

Ezgi KURTULUŞ

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 09.02.2012

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

ÇANAKKALE

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

EZGİ KURTULUŞ tarafından Prof. Dr. SAVAŞ KORKMAZ yönetiminde hazırlanan “**ÇANAKKALE İLİNDE PIRASA SARI ÇİZGİ VİRÜSÜ (*Leek yellow stripe virus*; LYSV)’NÜN BİYOLOJİK VE MOLEKÜLER 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: 09.02.2012

Prof. Dr. İsmet KAYA

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Hazırlanan bu Yüksek lisans Tezi ÇOMÜ BAP tarafından 2010/145 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.

Ezgi KURTULUŞ

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleŐtirilmesinde çalıŐmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Savaş KORKMAZ, tez çalıŐmam süresince bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Bayram ÇEVİK, değerli katkılarından dolayı Doç. Dr. Figen TÜRK ve Yrd. Doç. Dr. Zeliha GÖKBAYRAK, alıŐma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen ArŐ. Gör. H. Tuna TUZLALI, Öğr. Gör. Pınar TURHAN, Ziraat Yüksek Mühendisi Neziha BULUN, Ziraat Mühendisi Kübra MUSLU ve hayatımın her evresinde bana destek olan değerli aileme sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Ezgi KURTULUŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

APS	Amonyum persülfat
Bp	Base pair (baz çifti)
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Santigrad derece
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik asit
CP	Coat Protein (Kılıf protein)
Da	Dalton
Da	Dekar
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotidtrifosfat
DTBIA	Direct Tissue Blot Immunoassay
<i>EcoRI</i>	Endonükleaz restriksiyon enzimi
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
H ₂ O	Su
IC	Immunocapture
IgG	Antibadi
Kb	Kilo base
kDa	Kilo dalton
M	Molarite
mg	Miligram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre

mA	Miliamper
Nt	Nükleotid
ORF	Okunabilir açık alanlar
PBS	Potasyum fosfat tuz tamponu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
pmol	Pikomol
RNA	Ribonükleik asit
RNase	Ribonükleaz
RT-PCR	Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyum dedosil sülfat
TAE	Tris Asetik Asit EDTA
Taq	Termo stabil polimeraz enzimi
TBE	Tris Borik Asit EDTA
TE	Tris EDTA
u	Ünite
V	Hacim
ha	Hektar
ark.	Arkadaşları
FAO	Food and Agriculture Organization
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu

ÖZET

ÇANAKKALE İLİNDE PIRASA SARI ÇIZGI VİRÜSÜ (*Leek yellow stripe virus*; LYSV)'NÜN BİYOLOJİK VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Ezgi KURTULUŞ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

09/02/2012, 56

Bu çalışmada Çanakkale il ve ilçelerinden 2009-2010 üretim yılı içinde bir sorvey çalışması yürütülerek Pırasa sarı çizgi virüsü (*Leek yellow stripe virus*; LYSV)'ne benzer simptom gösteren pırasa bitkilerinden 77 örnek toplanmıştır. Toplanan örnekler LYSV'nin varlığını belirlemek amacı ile DAS-ELISA ve RT-PCR analizleri ile test edilmiştir. DAS-ELISA ve RT-PCR testleri sonucunda 77 örnekten 51 tanesi LYSV ile infekteli bulunmuştur. İnfekteli bulunan örnekler içerisinde elde edildiği ilçeler göz önünde bulundurularak belirli sayıda izolat biyolojik özelliklerini belirlemek amacı ile değişik gösterge bitkilere mekanik inokulasyon yöntemi ile inokule edilmiş, moleküler özelliklerini belirlemek amacı ile kılıf protein genleri klonlanarak nükleik asit dizilimleri belirlenmiştir. Klonlama ve sekans analizi yapılan LYSV izolatlarına özgü kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimleri gen bankasında bulunan ve dünyanın farklı üretim bölgelerinden LYSV izolatlarının CP genleriyle karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalar sonucunda ülkemiz LYSV izolatlarının CP genlerinin nükleotid düzeyinde % 97-98, dünya izolatları ile % 77-95 oranında bir benzerliğe sahip olduğu bulunmuştur. Yapılan filogenetik analizler sonucunda ise Çanakkale izolatlarının dünyanın farklı bölgelerindeki izolatlarla farklı düzeylerde genetik ilişki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca bu izolatlar Western blot analizi yöntemiyle kılıf proteinleri analiz edilmiştir. Western blot analizi çalışmalarında tüm izolatlara özgü 34 kDa ağırlığında kılıf proteini elde edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Pırasa sarı çizgi virüsü, DAS-ELISA, RT-PCR, kılıf protein geni, klonlama.

ABSTRACT

BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION of *Leek yellow stripe virus* (LYSV) in CANAKKALE PROVINCE

Ezgi KURTULUŞ

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Science and Engineering

Plant Protection Department Thesis of Master of Science

Advisor: Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

09/02/2012, 56

In this study, a survey was conducted in Canakkale Province and subprovince in leek plants that shows *Leek yellow stripe virus*-like symptoms in year 2009-2010. A total of 77 samples were collected from these areas and tested by DAS-ELISA and RT-PCR for the presence of LYSV. As a result of the DAS-ELISA and RT-PCR analysis 51 out of 77 samples were found infected with LYSV. The sap of the infected plant samples were inoculated into LYSV sensitive indicator plants to determine the biological characteristics. Isolates obtained as the pure isolates were grouped based on biological characteristics and locations where they were isolated. The coat protein genes of some isolates representing each group were cloned and sequenced. Isolates were further characterized here and the sequences obtained from LYSV isolates of Canakkale were compared with known sequences from other parts of the world to determine the genetic differences and evolutionary relationships among LYSV isolates from Canakkale and the other parts of the world. Comparison of CP genes revealed that CP gene of LYSV isolates from Canakkale Province and subprovince showed 97-98 % and isolates with the world 77-95 % identity in their nucleotide sequences, respectively. Phylogenetic analysis of the CP gene sequences showed that LYSV isolates from Canakkale provinces and subprovinces different level of genetic relationship with LYSV isolates from world. In this case the method isolates proteins were analyzed by Western blot analysis. Western blot analysis studies specific to all isolates were obtained from 34 kDa coat protein.

Keywords: *Leek yellow stripe virus*, DAS-ELISA, RT-PCR, coat protein gene, 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.....	12
3. 1. ARAZİ ÇALIŞMASI	12
3.2. YÖNTEMLER	13
3.2.1. DAS-ELISA Testi	13
3.2.1.1. Plate'in Antibadi İle Kaplanması	13
3.2.1.2. Örneklerin Plate'e Yüklenmesi.....	13
3.2.1.3. Konjugat (Enzimle İşaretlenmiş Antibadi) Eklenmesi	13
3.2.1.4. Substrat Eklenmesi	14
3.2.2. Western Blot Analizi.....	14
3.2.2.1. Örneklerin Hazırlanması	14
3.2.2.2. Jel Hazırlanması.....	15
3.2.2.3. Elektroforez Aşaması	16
3.2.2.4. Blotlama İşlemi.....	16
3.2.2.5. Bloklama	16
3.2.2.6. Özgül Antikorlar İle Kaplama.....	17
3.2.2.7. Proteinlerin Görüntülenmesi	17

3.2.3. Oligonükleotid Primerlerin Hazırlanışı	17
3.2.4. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	18
3.2.4.1. Total RNA İzolasyonu	18
3.2.4.2. Kılıf Protein Genlerinin Çoğaltılması.....	18
3.2.5. Klonlama ve Sekans Analizi	19
3.2.5.1. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	20
3.2.5.2. Kılıf Protein Genlerinin Klonlanması	20
3.2.5.2.1. Ligasyon (Birleştirme)	20
3.2.5.2.2. Transformasyon.....	20
3.2.5.2.3. Rekombinant Kolonilerin Seçimi	21
3.2.5.2.4. Rekombinant Bakteriyel Kolonilerin Belirlenmesi	21
3.2.5.2.5. Plazmid İzolasyonu	22
3.2.5.2.6. <i>EcoR I</i> Restriksiyon Enzimiyle Kesme İşlemi (Digestion).....	23
3.2.6. Kılıf Protein Geninin Dizisinin Belirlenmesi	23
3.2.7. Kılıf Protein Geninin Filogenetik Analizi	24
3.2.8. Mekanik İnokulasyon Çalışmaları.....	24
BÖLÜM 4 – ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	27
4.1. Arazi Çalışmaları.....	27
4.2. DAS-ELISA Testi Bulguları.....	28
4.3. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi Uygulamaları (RT-PCR).....	30
4.4. Western Blot Analizi Uygulamaları	32
4.5. Mekanik İnokulasyon Uygulamaları	33
4.6. Klonlama ve Sekans Analizi Çalışmaları.....	35
4.7. Kılıf Protein Genlerinin Dizi Analizleri.....	39
4.7.1. Nükleotid Dizi Analizi	41

4.7.2. Filogenetik Analizler.....	44
BÖLÜM 5 – SONUÇ VE ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	52
Çizelgeler	I
Şekiller	II
Özgeçmiş.....	IV

BÖLÜM 1**GİRİŞ**

Sebze tarımı bitkisel üretim içerisinde birim alandan en yüksek gelir getiren tarım kolları arasındadır. Sebzeçilik ülkemizde 1970'li yıllardan sonra hızla gelişmiş ve günümüzde yaklaşık 900.000 ha ekiliş alanı ve 24 milyon ton üretim değerine ulaşmıştır. Türkiye'de kişi başına sebze üretimi yeterli düzeyde olmakla birlikte birim alandan sağlanan verimin artırılması, ürün çeşitliliğinin sağlanması, kalitenin iyileştirilmesi, ihracatın artırılması ve hastalıklarla mücadele edilmesi 2000'li yılların en önemli hedefleri arasındadır.

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).

Ülkemizde sebze yetiştiriciliği hemen hemen her bölgemizde yapılmakla birlikte özellikle Marmara, Ege ve Akdeniz Bölgeleri'nde daha yoğun olarak yapılmaktadır. Kışlık sebzeler içerisinde pırasa üretimi ticari ya da aile işletmeciliği şeklinde Çanakkale ilinde yaygın olarak yapılmaktadır.

Pırasa, yılın her mevsiminde veya iki senede bir yetişen ve genellikle yaprakları için yetiştirilen bir bitkidir. Pırasa (*Allium ampeloprasum* (L.) J. Gay), *Liliopsida* sınıfı, *Asparagales* takımı, *Alliaceae* familyasına dahil olan bir sebzedir.

FAO'nun 2009 yılı verilerine göre dünyada toplam 2.004.403 ton pırasa ve diğer soğansız sebze üretimi gerçekleştirilmiştir. Dünya pırasa ve diğer soğansız sebze üretimi içerisinde en fazla paya sahip olan ülkeler sırasıyla; Endonezya (547.743 ton), Türkiye (252.286 ton), Fransa (178.200 ton), Belçika (158.900 ton), Çin (126.963 ton), Kore (116.363 ton), Almanya (114.188 ton), Polonya (106.522 ton), Hollanda (95.000 ton) ve İspanya (79.029 ton)'dır (Anonim, 2009).

TÜİK'nun 2010 yılı istatistiklerine göre Türkiye'de toplam 244.812 ton pırasa üretimi yapılmıştır. Bölgeler bazında pırasa üretim miktarı değerlendirildiğinde Akdeniz Bölgesi 85.474 ton ile birinci sıradadır. 54.896 ton ile Ege Bölgesi, 33.987 ton ile Batı

Karadeniz Bölgesi, 29.639 ton ile Doğu Marmara Bölgesi ve 23.801 ton ile Batı Marmara Bölgesi izlemektedir (Anonim, 2010).

Çanakkale ili ve ilçelerinde 2010 yılında yaklaşık 2692 ton pırasa üretimi yapılmıştır. İlçeler bazında pırasa üretim miktarları değerlendirildiğinde Biga 1100 ton ile birinci sıradadır. Bunu 297 tonla Merkez ilçe, 500 tonla Yenice ve 250 tonla Lapseki izlemektedir (Anonim, 2010).

Tarımsal üretimde ürünün kalite ve kantitesine etki eden birçok faktör vardır. Bu faktörlerden birisi hiç kuşkusuz virüs hastalıklarıdır. Bu gruba giren hastalıkların kimyasal bir mücadelesi olmadığı için diğer hastalık etmenlerine göre daha yıkıcı olabilmekte ve bazen üretimde % 70-80'lere varan kayıplara neden olabilmektedirler. Bunun yanında yetiştirilen ürünün kalite ve pazarlama değerini düşürmektedirler (Lot ve ark., 1998; Conci ve ark., 2002).

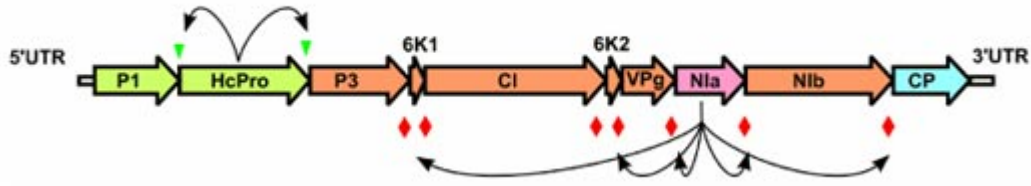
Pırasanın en önemli virüs hastalıklarından birisi Pırasa sarı çizgi virüsü (*Leek yellow stripe virus*; LYSV)'dür. LYSV, pırasa yetiştiriciliği yapılan ülkemizde ve Avrupa ülkelerinde önemli zararlara neden olmaktadır.

LYSV ile bulaşmış bitkiler zayıflık, cücelik ve solgunluk belirtileri göstermektedir. Bunlar pırasanın kalitesi ve kantitesini azalttığı gibi verimde de büyük bir düşüşe neden olmaktadır (Barg ve ark., 1994; Barg ve ark., 1997; Diekmann, 1997; Pringle, 1998).

Bitki virüs hastalıkları arasında potyvirusler büyük ölçüde ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Walkey, 1990; Van Dijk, 1993; Shukla ve ark., 1994; Fauquet ve ark., 2005). LYSV *Potyvirus* cinsine dahil olup bitki virüsleri içinde en büyük grubu oluştururlar ve bu zamana kadar bu gruba dahil olan 180 virüsün olduğu belirlenmiştir (Ward ve Shukla, 1991). LYSV partikülleri (+) ssRNA içeren, kıvrımlı, tek parçalı, zarfsız, 815–820 nm uzunluğunda, 12-15 nm çapındadır. Kılıf protein moleküler ağırlığı 34 kDa'dur (Noda ve Inouye, 1989; Langenberg ve Zhang, 1997).

Potyviridae familyasının üyeleri, 10-11 kilo baz tek poliproteinden oluşan, yaklaşık 3000-3400 amino asit içeren tek parçalı genoma sahiplerdir (Riechmann, et al., 1992; Riechmann et al., 1995). Poliproteinlerin N ucundan C ucuna doğru 10 küçük protein içerdiği yapılan bir dizi çalışma ile belirlenmiştir. Bu proteinler; P1, HCPro (helper component), P3, CI (silindirik inclusion), NIa (nuclear inclusion A), NIb (nuclear inclusion B), VPg, CP (capsid protein) ve olduğu varsayılan ve işlevinin henüz belirlenemediği 6K1

ve 6K2'dir (Riechmann, et al., 1992; Verchot ve Carrington, 1995; Mahajan ve ark.,1996).



Şekil 1.1. Potyviruslerin genom yapısı ve poliproteinlerin bölünüş şeması (Riechmann ve ark., 1995).

LYSV morfolojik özellikleri ve konukçu dizini bakımından Soğan sarı cücelik virüsü (*Onion yellow dwarf virus*; OYDV) ile ilişkilidir. Bunlar serolojik olarak akrabadırlar (Bos ve ark., 1978). LYSV yaprak bitleri ile non-persistent olarak taşınır. LYSV kış süresince infekteli bitkilerde kalır. Daha sonra yaprak bitleri ile baharda sağlıklı bitkilere taşınır. Özellikle *Aphis fabae* ve *Myzus persicae* ile non-persistent olarak taşınır (Noda ve Inouye, 1989). Bu döngü sürekli olarak sebze tarlalarında görülmektedir. Taşınma infekteli bitki özsuyardan olur ancak tohumla taşınma olmaz. Pırasada yaprak bitleri aktif bir grup olduklarından beri, hastalık gelişimindeki epidemik oranlarda artış açık olarak görülmektedir.

LYSV 1937 yılında Almanya'da ilk kayıt olarak rapor edilmiştir. Bu hastalığın 1970'li yıllarda Hollanda'nın güneydoğusunda epidemi yaptığı bilinmektedir (Bos ve ark., 1972; Verhoyen 1973; Bos ve ark., 1978).

1971 yılında Belçika'daki pırasalarda LYSV'nin tespit edilme oranı % 40 iken, 1972 yılında bu oran % 74'e çıkmıştır. 1976 yılında Danimarka'da ise bu hastalığın tespit edilme oranı % 20 iken, 1977 yılında % 12'ye kadar düştüğü, 1978 yılında % 43'e çıktığı belirlenmiştir. Yeni Zelanda'da test edilen tüm pırasa bitkilerinde LYSV'ye rastlandığı tespit edilmiştir. Bu oranlardaki değişimlerin nedeninin virüsün yaprak bitleri ile etkin bir şekilde taşınması ve epidemi yapmasıdır (Mohamed ve Young, 1980; Conci ve ark., 2002).

LYSV'nin en önemli konukçuları pırasa, soğan, sarımsak ve birçok yabancı ot olup bu virus hastalığı bitkilerin yetiştirildiği yerlerde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

LYSV ile infekteli bitkilerin yapraklarının alt kısmına yakın yerlerde kolayca görülebilen klorotik lekeler bulunmaktadır. Bu lekeler yavaş yavaş yaprakların uç kısımlarına doğru yayılmaktadır. Uzun ya da kısa çizgi şeklindeki bu lekeler bitkinin yeşil renginin sarıya dönüşmesiyle oluşmakta ve bu sarı çizgiler hastalık gelişimi süresince yayılarak tüm yaprakları kuşatmaktadır. Yapraklarda kırışma, bükülme ve yaprak yüzeyinde gevrekleşme görülmektedir. Bundan dolayı bitki strese girmekte ve gelişmesi zayıflamaktadır. LYSV enfeksiyonu gelişme sezonu boyunca görülmesine rağmen, simptomları daha çok Kasım-Aralık aylarında görülmektedir.

Bu çalışmada Çanakkale ili ve ilçelerinde Pırasa sarı çizgi virüsü simptomlarına benzer simptom gösteren pırasa bitkilerinden örnekler alınarak ELISA ve RT-PCR ile test edilmiş ve pozitif çıkan örneklerden bazıları klonlanarak nükleik asit dizilimleri belirlenmiş ve soyağacı çıkarılmıştır.

BÖLÜM 2**ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

Bos ve ark. (1978), Hollanda'nın güneydoğusunda 1970 yılından beri pırasa üretiminin yapıldığı yerlerde sarı çizgi hastalığının epidemik olarak arttığını tespit etmişlerdir. İlk kez 1937 yılında Almanya'da rapor edilen LYSV'nin Avrupa ülkelerinde de hızla yayıldığını belirlemişlerdir. LYSV'nin soğan ve arpacık soğanına hemen hemen hiç bulaşmadığını OYDV'nin pırasa bitkilerinde oluşturduğu belirtilerin LYSV ile benzer özellikler gösterdiğini tespit etmişlerdir. LYSV, *Allium fistulosum* ve lokal lezyonlara neden olan *Chenopodium amaranticolor* ve *C. quinoa* bitkilerinde OYDV'den daha farklı belirtiler meydana getirdiğini, bu iki virüsün farklı konukçularda aynı belirtileri gösterdiğini fakat morfolojik ve parçacık uzunlukları bakımından farklılıkların olduğu bildirmişlerdir (LYSV 820 nm, OYDV 833 nm). Kılıf protein ağırlıklarının (LYSV 34000 da, OYDV 30000 da) da farklı olması nedeniyle biyofiziksel açıdan da bu iki virüsün farklı olduğunu tespit etmişlerdir. Serolojik olarak bu iki virüsün birbiri ile yakından ilişkili olduğu belirtilmiştir. LYSV'nin tohum ile taşınmadığı, yaprak bitleri ile non-persistent olarak taşındığı, yaz sonu ve sonbahar döneminde epidemik olduğu tespit edilmiştir. İnfeksiyonun tek kaynağının pırasanın yakınlarındaki bitkiler olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar pırasa yetiştiricilerine ürünlerini tohum yataklarına dikkatli bir şekilde zarar vermeden ekme ve yaz boyunca infekteli bitkilerden kaçınmayı tavsiye etmişlerdir.

Noda ve Inouye (1989), Japonya'da, yapraklarında mozaik ve nekrozlar gösteren ve süs olarak yetiştirilen pırasa (*Allium ampeloprasum*) bitkisinden LYSV'yi teşhis etmişlerdir. LYSV'nin 11 familyaya ait 49 türde yaprak bitleri ile (*Myzus persicae* ve *Aphis gossypii*) non-persistent olarak taşındığını belirtmişlerdir. Yapraklarda sistemik bir şekilde mozaik belirtisi gösteren *Allium ampeloprasum* ve *A. giganteum*'u infekte ettiğini mekanik inokulasyon çalışmalarıyla tespit etmişlerdir. Ayrıca *C. amaranticolor* ve *C. quinoa*'da lokal lezyonlar oluşturduğunu saptamışlardır.

Tsuneyoshi ve Sumi (1996), Japonya'da infekteli sarımsak bitkilerinden alınan örneklerle üç farklı cinse ait 6 virüs tespit etmişlerdir. Bu virüslerin *Potyvirus*, *Carlavirus* ve tanımlanmamış bir cinse dahil olduğu tespit edilmiştir. İnfekteli bitkilerden alınan örneklerden bir kısmının cDNA'sı klonlanmış ve genomların sekans analizleri yapılmıştır. Bahsedilen 6 virüsün tanımlanmasında kombine edilmiş RT-PCR testi ile restriksiyon

enzimi kullanılmıştır. İlgili viral kılıf protein genleri füzyon proteinleri ile *Escherichia coli* bakterisine aktarılmış ve viral partiküllere karşı antibadi üretimi sağlanmıştır. Üç tip çubuk şeklinde virüs partikülü elektron mikroskobu ile tespit edilmiş, ayrıca serolojik bir yöntem olan direkt doku bastırma yöntemi ile de analizi yapılmıştır. DTBIA (Direct Tissue Blot Immunoassay) ve RT-PCR analizleri sonucu sarımsak bitkilerinde karışık infeksiyonların olduğu tespit edilmiştir.

Lot ve ark. (1998), iki potyvirus olan OYDV ve LYSV'nin simptomları, gelişimleri ve potansiyel ürün kayıplarını belirlemek amacı ile bir çalışma yürütmüşlerdir. Araştırmacılar Fransa'da Messidrome, Germidour ve Printour olmak üzere üç sarımsak çeşidinin yetiştiğini, arka arkaya iki sene yapılan değerlendirmelere göre bahsedilen iki virüsün mekanik inokulasyon uygulaması sonucunda sarımsak çeşitlerindeki yaprak uzunluğuna etkileri, pseudostem çapına ve sarımsak başının ağırlığına olası etkilerini araştırmışlardır. OYDV'den dolayı Germidour çeşidi sarımsağın baş ağırlığının % 39, diğer iki çeşidin ise % 60 oranında azaldığını bildirmişlerdir. LYSV için sarımsak baş ağırlığının azalma oranı Messidrome çeşidinde % 17, Germidour çeşidinde % 26 ve Printanor çeşidinde ise % 54 olduğu bu çalışma ile bildirilmiştir. Araştırmacılar dikimi yapılacak olan sarımsak dışlarında bu virüslerden herhangi birisinin bulunması veya iki virüs ile karışık infeksiyonların olduğu durumlarda sarımsaklarda kronik infeksiyonun meydana geldiği ve ürün miktarında azalmaların olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar LYSV ile inokulasyonlarda en düşük ürün kaybının geç dönemlerde olduğunu, Fransa'nın güneyinde ürün kayıplarının % 30'dan fazla olduğu inokulasyonların ise Nisan ayının sonlarına doğru doğal bulaşmalar ile meydana geldiğini tespit etmişlerdir.

Chen ve Adams (2001) Çin'in Zhejiang şehrinde sarımsak bitkilerinden örnekler alarak OYDV ve LYSV'ye ait dejenere primerler ile cDNA sentezlemişler ve klonlama ve sekans analizleri yapmışlardır. Klonlama ve sekans analizleri çalışmalarında birbirinden bağımsız 12 LYSV izolatı ve 33 OYDV izolatı kullanılmıştır. OYDV izolatları kendi arasında OYDV-YH1(15 izolat), OYDV-YH2 (10 izolat) ve OYDV-YH3 (8 izolat) olmak üzere 3 grup oluşturmuştur. Kılıf protein bölgelerine göre yapılan amino asit dizi analizi sonuçlarına göre 14 OYDV izolatında % 80-98, 9 LYSV izolatında ise % 78-92 değişen oranlarda benzerlikler olduğu tespit edilmiştir.

Dovas ve ark. (2001), Yunanistan'da sarımsak, soğan ve pırasada virüs hastalıklarını belirlemek amacıyla ELISA, immunoelektron mikroskobu ve bazen de RT-PCR yöntemini kullanarak bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışmada örnekleme yapılan yörelerdeki bitkilerde

yüksek oranda (% 98.5 ve % 83.7) OYDV ve LYSV'ye ait virüs hastalıkları belirlenmiştir.

Fajardo ve ark. (2001), sarımsak virüslerinin doğada karışık infeksiyonlar halinde görülebildiğini bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada Brezilya'daki sarımsak üretim alanlarında sörveyler yapılmış ve toplanan infekteli izolatlardan virüsler elde edilmiştir. OYDV-G (sarımsak streyni) ve LYSV'ye ait kılıf protein genlerine özgü primerler dizayn edilerek RT-PCR analizi yapılmıştır. *Garlic common latent virus* (GCLV)'ye ait cDNA'ların sentezi oligo-dT ve Random primerler kullanılarak yapılmış, toplanan sarımsak izolatlarının virüs genomlarına ait sekans analizleri yapılmıştır. Nükleotid sekans analizine göre *Potyvirus* cinsine dahil olan OYDV-G ve LYSV'nin, *Carlavirus* cinsine dahil olan GCLV ile serolojik olarak aynı gruplarda bulunduğu tespit edilmiştir. Brezilya izolatlarının amino asit sekans sonuçlarına göre dünyanın farklı coğrafik bölgelerindeki izolatlar ile akrabalık dereceleri karşılaştırılmıştır.

Conci ve ark. (2002), Arjantin'deki sarımsak üretim alanlarının hemen hemen tümünde LYSV benzeri simptom gösteren bitkilerden örnek almışlardır. Araştırmacılar bu bölgede yetiştirilen beyaz-kırmızı tipi ve Rosado Paraguay çeşitlerinin yılın her döneminde yetiştirilen sarımsak çeşitleri olduğunu bildirmektedirler. Toplanan bu bitki örneklerine DAS-ELISA analizi uygulanmış ve bu analizin sonucuna göre iki beyaz tip sarımsak çeşidinde Mayıs ayında viral konsantrasyonun en yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. İki kırmızı tip sarımsak çeşidinde ise Kasım ayında virüs konsantrasyonunda artış gözlenmiş, Rosado Paraguay çeşidinde ise Ekim ayında virüs konsantrasyonun en yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Yapılan sörveylerde Arjantin'in 14 farklı bölgesinden rastgele 3066 örnek toplanmış ve analiz edilmiştir. Tüm bölgelerde LYSV'nin bulunma oranının % 80 ile % 98 arasında değiştiği, Santa Cruz çeşidinde ise LYSV'nin bulunma oranının % 34 olduğu bildirilmiştir.

Dovas ve ark. (2002), sarımsakta dünya çapında en önemli viral patojenler olarak bilinen OYDV ve LYSV'nin sarımsak üretim alanlarından gelişme periyoduna bağlı olarak virüs konsantrasyon oranlarını belirlemek amacıyla farklı yaprak kısımlarından örnekler alarak DAS-ELISA testi ile test etmişlerdir. İki virüsün de sarımsak bitkisinde dağılımlarının düzgün olmadığını tespit etmişlerdir. Yaşlı yaprakların uç kısmından alınan örneklerdeki virüs konsantrasyonunun genç yapraklardan alınan örneklerdeki virüs konsantrasyonundan daha düşük olduğu bu çalışma ile belirlenmiştir. Sarımsak bitkilerinin genç yapraklarının uç kısmından elde edilen virüs konsantrasyonunun yaprağın orta kısmından elde edilen virüs konsantrasyonundan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Yaşlı yapraklardaki virüs konsantrasyonunun yaprağın üç kısmında düzgün biçimde dağıldığı tespit edilmiştir. Yaşlı yaprakların uç kısmındaki virüs seviyelerinin zamanla önemli oranlarda düşüş gösterdiği, sarımsak bitkisindeki OYDV ve LYSV konsantrasyonlarının Mart ayına kadar artış gösterdiği daha sonraki aylarda ise düşüş gösterdiği belirlenmiştir. Yaprak örnekleri 6°C’de 15 gün tutulduğunda iki virüse ait antijenlerin % 80 oranında kaybedildiği fakat -30°C’de 109 gün saklanan örneklerin ise % 90 oranında kayba uğradığı tespit edilmiştir.

Lunello ve ark. (2002), LYSV’nin pırasa ve sarımsaklarda mozaik şeklinde belirtilere neden olduğunu belirtmişlerdir. Potyviruslerin yanı sıra Carlavirusler ve Allexivirusler de pırasa ve sarımsak gibi bitkilerde hastalığa sebep olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir. Pırasa bitkilerinden alınmış LYSV izolatlarında tipik sarı çizgiler şeklinde simptom gözlenmiş, Arjantin’in Kordoba yakınlarında virüsün mekanik olarak taşındığı belirlenmiş ve *C. amaranticolor* ve *C. quinoa*’da klorotik lokal lezyonlara sebep olduğu bildirilmiştir. Soğan bitkilerine yapılan mekanik inokulasyon sonucu 40 izolat içerisinde sadece iki izolatta bulaşma meydana gelmişken, bahsedilen bu izolatlar sarımsak bitkilerine mekanik ve yaprak bitleri yardımıyla bulaştırılmıştır. Mekanik olarak bulaştırılan 20 bitkiden 14’ünde belirtilen virüsler bulunmuştur. Yaprak bitleri ile yapılan taşıma denemesi sonucu 10 bitkiden sadece iki tanesinin infektelendiği tespit edilmiştir. *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum maidis*, *R. padi*, *Schizaphis graminum*, *Aphis gossypii*, *A. nerii*, *Uroleucon sonchi* ve *Hyperomyzus carduellinus* gibi vektörler kullanılarak virüs taşıma denemeleri yürütülmüştür. LYSV virionlarının 825 nm uzunluğunda ve 34 kDa ağırlığında kapsid protein içerdiği SDS-PAGE yöntemiyle bulunmuş, pırasadan alınan LYSV izolatları ile OYDV’nin antiserumları karşılaştırılmış ve serolojik açıdan aralarında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Elde ettikleri izolatlardan (Accession no. AY007693) 3’-NTR (Non-translated region) bölgesinin başka bir LYSV izolatı (Accession no. X89711) ile arasında % 94 oranında benzerlik olduğu tespit edilmiştir. Kılıf proteinin amino asit sekans sonuçlarına göre ise % 97 oranında benzerlik olduğu bildirilmiştir.

Lunello ve ark. (2005), sörvey sırasında toplanan bitki örneklerini DAS-ELISA ile test etmişler ve virüs hastalıklarının teşhisinde daha duyarlı yöntemler geliştirmeye çalışmışlardır. Bahsedilen yöntemlerin infekteli bitkilerden elde edilen virüs konsantrasyonu düşük olduğu durumlarda bile iyi bir şekilde çalıştığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar dejenere primerler dizayn ederek LYSV ile OYDV’nin tek ve karışık infeksiyonları IC-RT-PCR yardımıyla belirlemişlerdir. Tekli infeksiyonlarda LYSV’nin

korunmuş bölgesi 566 baz çifti içerirken, OYDV'nin ise 489 baz çifti içerdiği tespit edilmiştir. Farklı *Allium* türlerine ait karışık infeksiyon meydana gelmiş izolatlarda ise aynı büyüklükte iki bant görülmüştür. ELISA sonucunda negatif ya da şüpheli çıkan örnekler RT-nested-PCR uygulanmıştır. DAS-ELISA'dan sonra yapılan RT-nested-PCR'in DAS-ELISA'ya göre 10^2 kez daha duyarlı bir yöntem olduğu tespit edilmiştir. Buna paralel olarak mikrosantrifüj tüplerde yapılan IC-RT-nested PCR, DAS-ELISA'dan 10^4 kez daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. DAS-ELISA'da negatif ya da şüpheli çıkan örneklerin RT-nested-PCR ve IC-RT-PCR ile tekrar analizi yapıldığında bazılarının pozitif çıktığı ve hastalıklı bitki oranında yüksek oranda artışlar olduğu tespit edilmiştir.

Park ve ark. (2005), Carlavirüs (*Garlic mosaic virus*; GarMV ve *Garlic latent virus*; GarLV), Allexivirüs (*Garlic virus X*; GarV-X ve *Garlic mite-borne filamentous virus*; GarMbFV) ve Potyvirüs (*Leek yellow stripe virus*; LYSV ve *Onion yellow dwarf virus*; OYDV) cinslerine ait 6 virüsün Kore sarımsak bitkilerinde mozaik semptomlara neden olduğunu tespit etmişlerdir. Bu semptomları gösteren bitkilere multiplex RT-PCR analizi ve daha sonrasında sekans analizi uygulamışlar, IC-RT-PCR analizleri sonucunda GarLV, LYSV ve OYDV kolaylıkla tespit etmişlerdir. Kore izolatlarından elde edilen sarımsak virüslerinin kılıf proteinlerinin filogenetik analizleri Çin, Japonya, Brezilya ve Arjantin izolatları ile yakından ilişkili oldukları bildirilmiştir. Bu çalışma ile Kore izolatlarındaki 6 sarımsak virüsü eş zamanlı olarak multiplex RT-PCR analizi ile tespit edilmiştir.

Takaki ve ark. (2005), yaptıkları bir çalışmada LYSV'ye ait üç izolatın nükleotid dizilerini belirlemeye çalışmışlardır. Sarımsaklarda mozaik hastalığına sebep olan bu virüsün Japonya'nın kuzeyindeki Aomori bölgesinde yaygın olarak bulunduğunu saptamışlardır. Bu izolatların 10.296-10.297 nükleotid içerdiği ve 3215 amino asit kodladığı yapılan bir dizi çalışmayla tespit edilmiştir. Üç izolat arasındaki amino asit ve nükleotid sekans varyasyonu % 1.5 olarak tespit edilmiştir. Bu üç LYSV izolatı daha önceden tanımlanmış olan Çin'den elde edilmiş LYSV izolatıyla yüksek düzeyde farklılıklar içerdiği bulunmuştur. 5'-UTR (Untranslated region) ve P1 bölgeleri arasındaki sekans benzerliklerini sırasıyla % 56-57 ve % 52-53 olarak tespit etmişlerdir.

Navratil ve ark. (2006), sarımsak bitkilerinden alınmış iki LYSV Çek izolatı (LYSV-5CZ ve LYSV-22CZ) ve bir LYSV Çin izolatının (LYSV-16) spesifik Nib (nuclear inclusion b) ve kılıf protein genlerini kullanarak RT-PCR analizi yapmışlardır. Daha sonra RT-PCR ürünlerinden klonlama yaparak sekans analizi yapmışlardır. Filogenetik analizler sonucunda Çek izolatlarının Nib-CP bölgeleri amino asit sekanslarına göre LYSV grup

1'de yer aldığı, Çin izolatının ise grup II'de yer aldığını bildirmişlerdir.

Moreno-Perez ve ark. (2006), sarımsağın çeşitli virüs grupları tarafından infektelendiğini bildirmişlerdir. Bu gruplar içinde *Potyvirus* cinsine ait iki önemli virüs olan OYDV, LYSV ve *Carlavirus* cinsine ait iki önemli virüs olan GCLV ve SLV bulunduğunu bildirmişlerdir. Guanajuato'dan elde edilen sarımsak bitkilerindeki virüs komplekslerini tanımlamak için bir dizi çalışma yapmışlardır. 2004 yılının Aralık ayında 6 farklı lokasyonda virüs belirtileri gösteren bitkilerden örnekler alınmış, alınan örnekler ELISA testi uygulanmış ve ELISA testi sonucunda bitkilerin LYSV, OYDV, GCLV ve SLV ile infekteli olduğu tespit edilmiştir. Toplanan 195 sarımsak bitkisinin yapraklarında sarı çizgiler, mozaik, deformasyon veya cücelik belirtileri gözlemlenmiştir. LYSV'nin kılıf proteinine spesifik primerler dizayn edilerek RT-PCR'da kılıf protein geni sentezlenmiştir. pGEM T-Easy Plazmidi yardımıyla kılıf protein klonlanarak sekans analizleri yapılmıştır (Accession No. DQ841554). Sekans analizleri sonucuna göre Guanajuato'dan elde edilen LYSV izolatının Okinawa'dan elde edilen LYSV No.3 izolatı ile % 97 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Conci ve ark. (2007), Arjantin'de sarımsakta (*Allium sativum*) ürün kayıplarına neden olan LYSV izolatları üzerinde bir çalışma yürütmüşlerdir. Sarımsak bitkisinin doğal olarak *Potyvirus*, *Carlavirus*, *Allexivirus* gibi birçok kompleks virüsle infektelendiğini belirtmişlerdir. Virüsten arı sarımsak bitkisi ile LYSV ile infekteli olan sarımsak bitkilerini karşılaştırmışlardır. LYSV ile infekteli davranış gösteren soğancıkların ağırlığında % 74, veriminde ise % 80 ile % 100 arasında kayba uğradığını tespit etmişler, ayrıca LYSV ile infekteli bitkilerde % 50-60 oranında Soğan sarı cücelik virüsüne de rastlamışlardır.

Shahraeen ve ark. (2008), soğan, sarımsak ve İran pırasasında virüs hastalıklarını tanımlamak için 1999-2002 yıllarında bir sörvey yapmışlardır. Sörveyler İran'ın Tahran, Naushahr, Raudbar, Hamadan gibi farklı bölgelerinden yapılmıştır. Virüs belirtisi gösteren 1285 sarımsak, 525 soğan ve 230 pırasa olmak üzere toplamda 2045 örnek toplanmış ve ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Bazı *Allium* virüslerinin immünoelektron mikroskobu (IEM) ile varlıkları tespit edilmiştir. ELISA sonuçlarına göre toplanan örneklerde Soğan sarı cücelik virüsü (OYDV), Pırasa sarı çizgi virüsü (LYSV) Sarımsak common latent virus (GarCLV), Shallot latent virüsü (SLV), Sarımsak D virüsü (GarV-D), Sarımsak B virüsü (GarV-B) ve Sarımsak virüsü C tipi (GarV-C) gibi bir çok sayıda virüs hastalığı teşhis edilmiştir. Örneklerden hiç birinde Shallot yellow stripe virus (SYSV), Shallot X virüsü (ShVX) ve Sarımsak A virüsü (GarV-A) bulunmamıştır.

Fidan ve Baloğlu (2009), Türkiye’de yaptıkları çalışmada sarımsaktaki verim ve kalite düşüşlerinin virüs enfeksiyonu nedeniyle ciddi düzeylerde olduğunu öne sürmüşlerdir. Yaptıkları çalışmada sarımsağın iki önemli patojeninin Soğan sarı cücelik virüsü (OYDV) ve Pırasa sarı çizgi virüsü (LYSV) olduğunu saptamışlar, topladıkları bitki örneklerinden 57’sinin OYDV, 43 örneğin ise LYSV ile infekteli olduğu tespit etmişlerdir. Ayrıca 23 örneğin her iki virüs ile infekteli olduğu yapılan çalışmalar sonucunda kaydedilmiştir.

Korkmaz ve Çevik (2009), Marmara Bölgesi’nde 2007 yılı üretim sezonu içerisinde pırasa bitkilerinde LYSV’nin neden olduğu semptomlara benzer mozaik, sarı çizgi, zayıflama ve bodurluk semptomları gözlemlemişlerdir. Gözlem yapılan Çanakkale, Bursa ve Balıkesir illerindeki pırasa tarlalarından toplam 42 örnek toplanmış ve LYSV’nin varlığını belirlemek için ticari poliklonal antiserumlar kullanılarak DAS-ELISA ile test edilmiştir. ELISA testi sonucunda 42 örneğin 39’u LYSV ile infekteli bulunmuş, bu bulguları konfirme etmek için bazı infekteli örnekler RT-PCR ile test edilmiş ve virüsün kılıf proteini ile ilişkili 300 baz çifti uzunluğunda DNA elde edilmiştir.

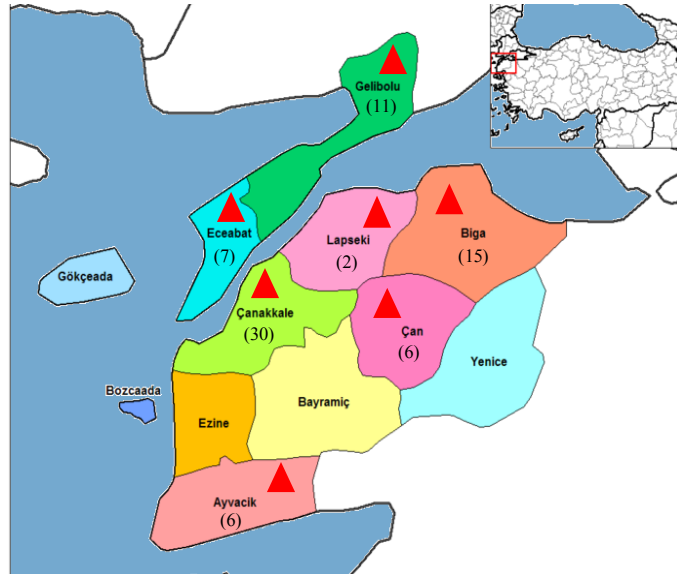
Zhang ve ark. (2010), LYSV’nin sarımsak alanlarına çok hızlı yayılabilmesi, kalite ve verimde düşüslere neden olmasından dolayı önemli bir virüs hastalığı olduğunu bildirmişlerdir. RT-PCR yönteminin ve CP sekans analizlerinin hastalığın yayılmalarını tespit etme açısından önemli olduğunu bildirmişlerdir. LYSV’nin CP genlerine ait bir çift primer dizayn ederek Heilongjiang izolatu RT-PCR yöntemi ile klonlanmış ve sekans analizi yapılmıştır. Bu analizin sonuçlarına göre LYSV-HLJ’nin CP geni 885 nükleik asit içerdiği ve 295 amino asit kodladığı tespit edilmiştir. LYSV-HLJ’nin nükleik asit sekanslarına bakılarak gen bankasındaki diğer LYSV izolatları ile arasında % 79.7’den % 88.6 ya varan benzerlikler tespit edilmiştir. CP’lerin amino asitlerinin sekanslarında ise % 83.7 ile % 93.1 arasında benzerlik tespit edilmiştir. LYSV CP amino asitlerinin filogenetik soyağaçları oluşturulmuş ve 4 grupta kümelenmeler belirlenmiştir. LYSV-HLJ izolatu Güney Kore ve Japonya izolatları ile 4. grupta yer aldığı tespit edilmiştir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. ARAZİ ÇALIŞMASI

Arazi çalışması 2009 ve 2010 yıllarında pırasa üretiminin yapıldığı Çanakkale ili ve ilçelerinde yürütülmüştür (Şekil 3.1). Üretim sezonu süresince pırasa tarlalarına arazi çıkışları yapılmış, bitkiler görsel olarak incelenmiş ve LYSV semptomlarına benzer semptom gösteren bitkilerden örnekler alınmıştır. Pırasa tarlalarının seçimi tamamen tesadüfi olarak yapılmış ve her bir üretim bölgesinden örnekleme yapılmaya özen gösterilmiştir. Arazi çıkışları sonucunda toplam 77 bitki örneği toplanmıştır. Toplanan örnekler soğuk zincirde muhafaza edilerek laboratuvara getirilmiş ve testlenene kadar buzdolabında bekletilmiştir. Toplanan örneklerde LYSV'nin varlığını belirlemek için önce DAS-ELISA testi uygulanmış, ELISA testinde şüpheli bulunanlar ile negatif sonuç verenler ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile analiz edilmiştir. LYSV ile infekteli bulunan örneklerden beş tanesi seçilerek pGEM-T Easy plazmid vektörüne klonlanarak nükleotid dizi analizi yapılmıştır. Ayrıca pozitif çıkan bazı örnekler western blot analizi ile virüsü özgü kılıf proteinleri elde edilmiştir. Yine bazı örnekler mekanik inokulasyon yöntemiyle pırasa bitkilerine taşınmaya çalışılmıştır.



Şekil 3.1. Pırasa sarı çizgi virüsü izolatlarının toplandığı Çanakkale ili ve ilçeleri (Parantez içindeki sayılar toplanan örnek sayılarını göstermektedir).

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. DAS-ELISA Testi

Pırasa sarı çizgi virüsü serolojik bir yöntem olan ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) testi ile tanınmasında 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.

3.2.1.1. Plate'in Antibadi İle Kaplanması

ELISA testinin ilk aşamasında plate virüse spesifik antibadi ile kaplanmıştır. Her bir çukura önceden hazırlanmış kaplama solüsyonu 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 gitmesi için plate 4'er dakika arayla 3 kez yıkama işlemi yapılmıştır.

3.2.1.2. Örneklerin Plate'e Yüklenmesi

Arazi çalışmalarında 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 gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek için iki çukur kullanılmış ve çukurlara örneklerden 200 µl ilave edilmiştir. Örnek yükleme işlemi gerçekleştirildikten sonra plate'e pozitif ve negatif kontrol konulmuş ve buzdolabında +4 °C'de bir gece bekletilmiştir.

3.2.1.3. Konjugat (Enzimle İşaretlenmiş Antibadi) Eklenmesi

Bir gün süre ile +4 °C'de bekletilen örneklerle kaplı plate çıkarılarak 4'er dakika ara ile üç 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.

3.2.1.4. Substrat Eklenmesi

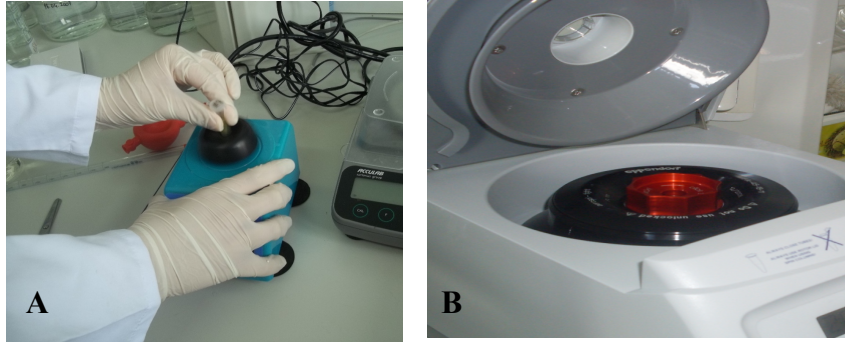
İnkübasyon işleminden sonra plate 4'er dakika ara ile üç kez yıkanmıştır. Substrat solüsyonu (1 M diethanolamine pH: 9.8, % 0.02 NaN₃,) 1:5 oranında sulandırılıp içerisine bir plate için bir adet olmak üzere pNPP tablet (p-nitro-phenyl-phosphate) (Bioreba, İsviçre) eklenmiştir. Hazırlanan substrat çözeltisi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

3.2.2. Western Blot Analizi

Western blot yöntemi çeşitli aşamalardan meydana gelmiştir. İlk olarak örneklerin ezilmesi aşaması gerçekleştirilmiştir. Ezilen örnekler eppendorf tüpler içine konulmuş ve buz kabı içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra elektroforez işlemi için jel hazırlanmıştır. Elektroforezden sonra blotlama ve bloklama işlemleri yapılmıştır. Son olarak özgül antikorla kaplama işlemi yapılmış ve ardından nitroselüloz membrana aktarılan proteinlerin görüntülenmesi ile yöntem sonuçlandırılmıştır.

3.2.2.1. Örneklerin Hazırlanması

Materyal olarak kullanılan LYSV ile infekteli bitkilerin yaprak dokularından yaklaşık olarak 100 mg alınıp havan ve havaneli yardımıyla ezilmiştir. Ezilen örnekler eppendorf tüpler içerisine konulup bir sonraki kullanıma kadar bir buz kabı içerisinde bekletilmiştir. Ardından 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 bu örnekler vortekslenmiştir. Karışım 95 °C'de 3-5 dakika kaynatıldıktan sonra direkt olarak buz içine alınmış ve tekrar vortekslenip düşük hızda santrifüj edilmiştir. Örnekler elektroforez aşamasına kadar tekrardan buz kabı içerisinde bekletilmiştir.



Şekil 3.2. A. Örneklerin vortekslenmesi B. Santrifüj işlemi.

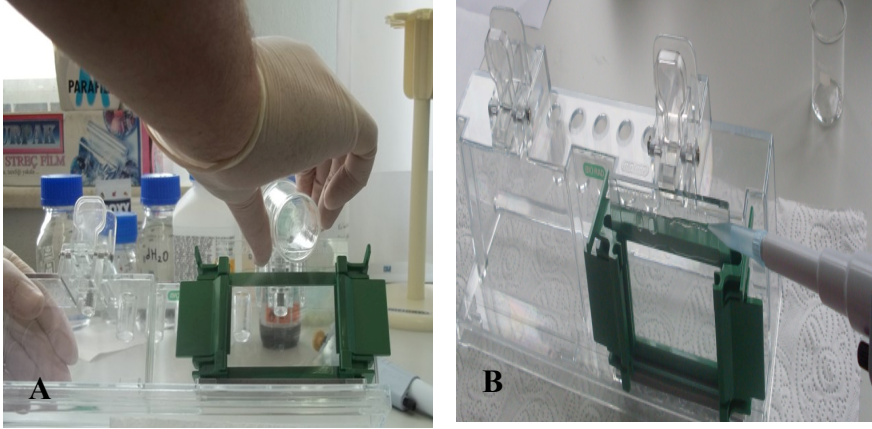
3.2.2.2. Jel Hazırlanması

Seperating jel ve stacking jel olmak üzere iki farklı jel hazırlanmıştır. İlk olarak seperating jel hazırlanmış ve polimerize olduktan sonra stacking jel hazırlanıp sisteme yüklenmiştir.

Seperating Jel Hazırlanması (% 12'lik SDS Jel)

- 1400 µl Acrylamide monomer solution
- 1200 µl dH₂O
- 900 µl 4X Gel Running Buffer
- 40 µl % 10'luk Sodyum Dedosil sülfat (SDS)
- 18 µl Amonyum Persülfat (APS)
- 2 µl TEMED eklenerek jel hazırlanmıştır.

Hazırlanan solüsyon jel aparatına eklenmiş ve jelin üst kısmında kalan 1-2 cm'lik boşluğa bir pipet yardımıyla saf su eklenmiştir. Daha sonra jelin polimerize olması için bir süre beklenmiştir. Polimerize olan jelin sonrasında stacking jel hazırlanmıştır.



Şekil 3.3. Seperating jel hazırlanması. A: Jelin aparata dökülmesi, B: Yüklenen jele saf su eklenmesi.

Stacking jel hazırlanması

- 500 µl 4X Stacking gel buffer
- 1200 µl dH₂O
- 280 µl Acrylamide monomer solution
- 10 µl APS
- 2 µl TEMED eklenerek jel hazırlanmıştır.

Öncelikle seperating jelin polimerize olması için eklenen su dökülmüş ve bir kurutma kağıdı yardımıyla jel kurulanmıştır. Hazırlanan stacking jel, seperating jel üzerine dökülüp polimerize olması için 20-30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra jel aparatı elektroforez setine yerleştirilmiştir.

3.2.2.3. 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.

3.2.2.4. Blotlama İşlemi

Elektroforez işlemi bittikten sonra jel çıkarılıp üst fazı (stacking jel) seperating jelden ayrılmıştır. Daha sonra jel transfer buffer içine aktarılmıştır. Ardından jeli nitroselüloz membrana aktarmak için gerekli işlemler yapılmıştır. Bu işlemler sırasıyla; jel boyutunda nitroselüloz membran kesilmiştir. En alta pad onun üzerine filtre kağıdı, onun üzerine de jel yerleştirilmiştir. Pad ve filtre kağıtları yerleştirilmeden önce transfer bufferına batırılmıştır. Jelin üzerine nitroselüloz membran ve tekrardan filtre kağıdı ile pad konulup jel holder kaset kapatılmıştır. Kapatılan jel holder kasetin beyaz kısmı tankın kırmızı yüzeyine, siyah kısmı da siyah yüzeye gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Tankın içerisi transfer buffer ile tamamen doldurulmuştur. 30 voltta 90 miliamperde tüm gece elektroforez yapılmıştır.

3.2.2.5. Bloklama İşlemi

Elektroforez işlemi bittikten sonra nitroselüloz membran çıkarılmıştır. Membran TBS buffer içerisine alınıp bir çalkalayıcıda 2-3 dakika çalkalanmıştır. Daha sonra bloklama solüsyonu hazırlanmıştır. Bu solüsyon için 0.6 g süt tozu, 0.2 g albümin tartılıp

TBS buffer içerisine alınmıştır. Bloklama solüsyonu içinde 30-45 dakika çalkalanmıştır.

Bloking yapılan şerit membranlar, 3 kez Tris buffer salin-Tween 20 (TBS-T) ile 3'er dakika ara ile yıkanmıştır

3.2.2.6. Özgül Antikorlar İle Kaplama

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

3.2.2.7. Proteinlerin Görüntülenmesi

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

3.2.3. Oligonükleotid Primerlerin Hazırlanışı

Çalışma kapsamında iki farklı primer çifti kullanılmıştır. ELISA testinde şüpheli ya da negatif çıkan örnekler için Dovas ve ark. (2001) tarafından tasarlanan ve kılıf protein geninin bir kısmını içeren LYSV1 5' CACATCAAGAACCAGTTAGAGC 3' ve LYSV2 5' GTAGAACTGCCTTGAACGAGTG 3' adı ve dizisine sahip spesifik primerler kullanılmıştır.

Kılıf protein genlerinin çoğaltılması için kullanılan oligonükleotid primerler ise, kılıf protein geninin 5' ve 3' ucunda bulunan korunmuş bölgelere spesifik ve daha önce LYSV'nin klonlanmasında kullanılan primerlerine dayanarak SK1LYSV 5' ATGAATTAGATGCAGGCATG 3' ve SK2LYSV 5' CATCAAGATGGTGCATCCG 3'adı ve dizisine sahip bir çift primer tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler primer sentezi konusunda faaliyet gösteren bir ticari firma (Iontec, Türkiye) tarafından sentezlenmiştir. Tasarlanan primer dizileri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tasarlanan primer dizileri

Kod	Primer Dizisi	Sense	Spesifik Geni
SKLYSV1 ¹	5' ATGAATTAGATGCAGGCATG 3'	Forward (ileri)	CP (846 bp)
SKLYSV2 ¹	5' CATCAAGATGGTGCATCCG 3'	Reverse (geri)	
LYSV1 ²	5' CACATCAAGAACCAGTTAGAGC 3'	Forward (ileri)	CP (304 bp)
LYSV2 ²	5' GTAGAAACTGCCTTGAACGAGTG 3'	Reverse (geri)	

¹ SKLYSV1 ve SKLYSV2 primerleri bu çalışma kapsamında tasarlanmıştır.

²LYSV1 ve LYSV2 primerleri ise Dovas ve ark. (2001) tarafından tasarlanmıştır.

3.2.4. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

RT-PCR yöntemi Suehiro ve ark. (2005) tarafından geliştirilen basitleştirilmiş doğrudan tüpe bağlanma (Simple-direct-tube, SDT) yöntemi esas alınarak yapılmıştır. RT-PCR yönteminde kullanılan kitler TaKaRa (Japonya) firmasından temin edilmiş ve önerileri doğrultusunda kullanılmıştır.

3.2.4.1. Total RNA İzolasyonu

DAS-ELISA testi için kullanılan ve örnek tamponu içinde ezilen örneklerden 200 µl alınarak eppendorf tüplerine yerleştirilmiş ve daha sonra tüpler buzdolabında +4 °C'de bir gün süreyle bekletilmiştir. Bir gün sonunda +4 °C'den alınan örnekler 4'er dakika arayla 3 kez yıkanmıştır. Daha sonra eppendorf tüplerinin içine 50 µl steril distile su konularak 95 °C'de 1 dakika tutulmuştur. Bu sürenin sonunda tüpler direkt olarak buz içersine alınarak 10-15 dakika tutulmuş ve daha sonra RNA'lar -80 °C'ye konularak kullanılıncaya kadar bekletilmiştir.

3.2.4.2. Kılıf Protein Genlerinin Çoğaltılması

Kılıf protein genlerinin çoğaltılması iki aşamalı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi (RT-PCR) ile yapılmıştır. RNA izolasyonu sonucu elde edilen RNA'lardan Random primer ve Power Script reverse transkriptaz enzim kullanılarak

komplementer DNA (cDNA) sentezlenmiştir.

Bu amaçla 5 µl total RNA, 20 pmol random primerden 1 µl, 10 mM dNTP'den 1 µl olmak üzere bir tüp içerisine konularak su ile 10 µl'ye tamamlanmıştır. Karışım 65 °C'de 5 dakika bekletildikten sonra buza konulup 2 dakika bekletilerek RNA'ların denatürasyonu sağlanmıştır. Denatürasyonu yapılan RNA ve primer karışımına Reverse transkriptaz tampon solüsyonundan (50 mM Tris HCl pH:8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂) 0.5 µl, 5x Prime script buffer'dan 4 µl, RNAz inhibitörden 0.5 µl eklenerek toplam hacim 20 µl olacak şekilde su eklenerek RT-karışım hazırlanmıştır. PCR makinesi 30 °C 10 dakika 45 °C 1 saat ve 75 °C 15 dakika daha sonra da 4 °C sürekli olarak kalacak şekilde programlanarak cDNA sentezi yapılmıştır.

Daha sonra sentezlenen cDNA'lardan LYSV kılıf protein genine spesifik SK1LYSV ve SK2LYSV primerleri kullanılarak kılıf protein geni çoğaltılmıştır. Bu amaçla 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 solüsyonundan 1 µl, LYSV kılıf protein genine spesifik primerlerden 0.5 µl, Taq polimeraz solüsyonundan 0.25 µl, cDNA'lardan 5 µl ve sudan 15.25 µl eklenerek toplam hacim 25 µl olacak şekilde 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 30 sn, 72 °C'de 5 dakika daha sonra da 4 °C'de bekleyecek şekilde programlanan PCR makinesine konularak kılıf protein genlerinin çoğaltılması yapılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri 100-1000 DNA büyüklük markörleriyle birlikte % 1 agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında Major Science UVDI jel görüntüleme sisteminde görüntülenerek 846 bp büyüklüğündeki LYSV kılıf protein geninin çoğaltıldığı belirlenmiştir.

3.2.5. Klonlama ve Sekans Analizi

Çanakkale ili ve ilçelerinden toplanan farklı üretim bölgelerinden elde edilen 5 LYSV izolatının kılıf protein genlerini içeren korunmuş bölgeleri RT-PCR yoluyla yukarıda belirtildiği gibi çoğaltıldıktan sonra Çevik ve ark., (1995) ve Jiang ve ark., (2008) tarafından rapor edilen yöntem modifiye edilerek aşağıda belirtildiği şekilde klonlanarak DNA dizileri belirlenmiş, LYSV izolatlarının genetik farklılık ve benzerlikleri ortaya konmuştur.

3.2.5.1. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Çoğaltılmış LYSV kılıf protein genlerinin PCR ürünleri EZ-10 Column PCR pürifikasyon kiti (BioBasic, Kanada) kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda saflaştırılmıştır. Bu amaçla 40 µl PCR ürününe 120 µl Binding I solüsyonu eklenerek 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 yıkama 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. Kolonlara elution solüsyonundan 20 µl eklenerek 2 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Son olarak tüpler 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Saflaştırılmış PCR ürünleri kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.5.2. Kılıf Protein Genlerinin Klonlanması

RT-PCR yöntemiyle çoğaltılan ve daha sonra saflaştırılan LYSV kılıf protein genleri T-A klonlama yöntemiyle Promega (ABD) firmasından sağlanmış olan pGEM-T Easy plazmid vektörüne klonlanmıştır. Klonlamanın aşamaları aşağıda kısaca açıklamıştır.

3.2.5.2.1. Ligasyon (Birleştirme)

Ligasyon PCR'la çoğaltılan ve klonlanacak olan LYSV kılıf protein genlerinin, pGEM-T Easy plazmid vektörü ile birleştirilmesi işlemidir. Bu aşamada PCR ile çoğaltılan LYSV kılıf protein geninden çoğaltılan genin miktarını gösteren bantların yoğunluğuna bağlı olarak 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.

3.2.5.2.2. Transformasyon

Transformasyon işlemi, ligasyon karışımının bir kısmının hücre duvarı geçirgen hale getirilmiş (competent) *Escherichia coli* bakterisine aktarılmasıdır. Bu amaçla *E. coli* bakterisinin JM109 ırkının -80 °C'de dondurulmuş ve buzda çözdürülmüş competent hücrelerinden 50 µl alınarak 1.5 ml tüpe konulmuştur. pGEM-T Easy plazmidi ve LYSV kılıf protein genlerini içeren ligasyon karışımından 5 µl alınarak tüplerdeki *E. coli* JM109

competent hücrelere eklenerek 30 dakika boyunca buzda bekletilmiştir. Daha sonra karışım 42 °C'de 1 dakika süreyle bekletilerek ısı şoku uygulanmıştır ve tekrar 2-3 dakika buza konularak transformasyon işlemi tamamlanmıştır.

3.2.5.2.3. Rekombinant Kolonilerin Seçimi

Transformasyonu yapılan bakterilere LB bakteriyel sıvı besi ortamından 750 µl eklenerek bakteriler 37 °C'de 180 rpm hızlı çalkalamalı inkübatörde 1 saat süreyle büyütülmüştür. Son olarak büyütülen bakteriler 60 µg/ml ampisilin 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 inkübasyona bırakılmıştır. LYSV 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 LYSV kılıf protein genini içeren ve içermeyen bakteri kolonileri renklerine göre belirlenmiştir. Böylece LYSV kılıf protein genini içeren plazmidleri taşıyan beyaz kolonilerin seçimi yapılmıştır.

3.2.5.2.4. Rekombinant Bakteriyel Kolonilerin Belirlenmesi (Koloni PCR)

Mavi-beyaz koloni seçimi istenilen genleri içeren rekombinant plazmidleri taşıyan bakteriyel kolonilerin seçiminde yararlı olmasına rağmen bazen mavi koloniler hedef genleri içerebileceği gibi bazı beyaz kolonilerde istenilen geni içermeyebilir. Bu nedenle oluşan beyaz renkli kolonilerin gerçekten LYSV kılıf protein genini taşıyan pGEM-T Easy plazmidini içerip içermediği daha hassas bir yöntem olan koloni PCR yöntemiyle taranarak daha kesin olarak belirlenmiştir. 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 10 mM dNTP, 2.5 µl 25 mM MgCl₂, 20 pmol plazmid T-A klonlaması yapılan bölgenin alt ve üst kısımlarına spesifik SK1LYSV ve SK2LYSV primerlerden 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 de 3 dakika, 40 defa tekrarlanan 94 °C de 30 saniye, 50 °C de 30 saniye, 72 °C de 1 dakika ve 72 °C de 5 dakika daha sonra da 4 °C'de bekleyecek şekilde programlanan PCR makinesinde yapılmıştır.

Her bir izolat için en az dört beyaz koloni seçilerek koloni PCR yöntemiyle test edilmiştir. Koloni PCR'ın 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.

3.2.5.2.5. Plazmid İzolasyonu

Koloni PCR'dan elde edilen sonuçların elektroforez yöntemiyle analiz edilmesinden sonra LYSV kılıf protein genini içeren pGEM-T Easy plazmidini içerdiği kesin olarak belirlenen koloniler seçilerek bunlardan plazmid izolasyonu yapılmıştır. Her bir izolat için koloni PCR'da pozitif sonuç veren en az iki koloni seçilerek plazmid izolasyonu yapılmıştır. Her bir LYSV izolatı 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 mikrofuj tüpüne 500 µl gliserol ve 500 µl büyütülen bakterilerden alınarak gliserol stokları hazırlanmıştır. Geriye kalan kısmı BioBasic (Kanada) firmasından sağlanan plazmid saflaştırma kiti kullanılarak plazmid izolasyonu yapılmıştır. Plazmid izolasyonu üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

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 eklenip tekrar 1 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir. Daha sonra 700 µl solüsyon III eklenip örnekler 12000 rpm ve 4 °C'de 5 dakika santrifuj yapıp kolona dökülmüştür. Kolonlar 10000 rpm ve 4 °C'de 2 dakika santrifuj yapılmıştır. Daha sonra plazmidi diğer maddelerden temizlemek için 500 µl yıkama solüsyonu eklenip yine 10000 rpm ve 4 °C de 2 dakika süreyle santrifuj 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.

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

Elde edilen bu pGEM-T Easy plazmit DNA'larından 10 µl, 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. Bu karışım 37 °C'de 5 saat bekletilerek plazmitlerin 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 846 bp'lik LYSV CP genini taşıyıp taşımadıkları kesin olarak belirlenmiştir.

3.2.6. Kılıf Protein Geninin Dizisinin Belirlenmesi

LYSV kılıf protein genlerini kesin olarak taşıdıkları belirlenen saflaştırılmış plazmidlerden 5 tanesi seçilerek LYSV kılıf protein genlerinin dizilimi yapılmıştır. DNA dizilimi Refgen Biyoteknoloji (Ankara) firmasında hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. DNA dizilimi pGEM-T Easy plazmidinin T-A klonlama bölgesinin yaklaşık 50 bp üst ve alt kısmındaki bölgelere spesifik M13F ve M13R universal primerleri kullanılarak döngü dizileme yöntemiyle otomatik DNA dizileme cihazıyla yapılmıştır. Her bir izolat için bir klonun iki yönden M13F ve M13R primerleri kullanılarak LYSV 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 LYSV kılıf protein genine ait nükleotid dizilimi elde edilmiştir. Çanakkale ili ve ilçelerinin farklı bölgelerinde pırasa 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 bölgelerinde elde edilen LYSV 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 LYSV izolatlarının dünya izolatlarıyla benzerlik gösterip göstermediği ve benzerlik oranları yüzde olarak belirlenmiştir. Ayrıca Çanakkale ilinde ve ilçesinde bölgesel olarak elde edilen LYSV izolatlarının kendi aralarında benzerlik gösterip göstermediği ve benzerlik oranları yine yüzde olarak belirlenmiştir.

3.2.7. Kılıf Protein Geninin Filogenetik Analizi

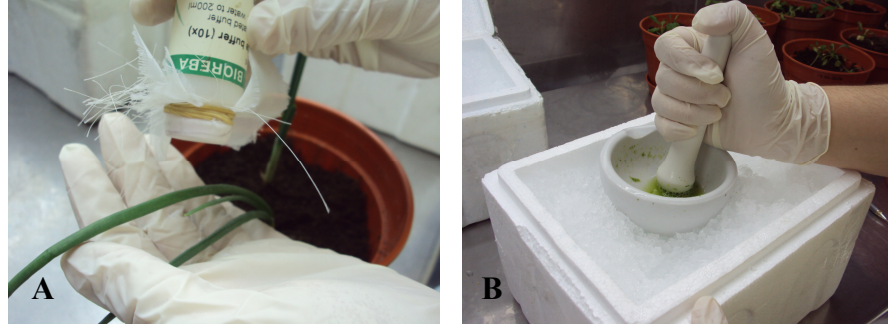
Çanakkale ili ve ilçelerinin farklı pırasa üretim bölgelerinden alınan LYSV Align X programında çoklu nükleotid dizi karşılaştırmaları yapılan LYSV kılıf protein genine ait çoklu karşılaştırma dosyaları Clustal X programına aktarılarak filogenetik analizler yapılmıştır. Filogenetik analiz verileri kullanılarak Kiamura iki parametre alogaritması uygulanan neighbor-joining yöntemiyle filogenetik soyağacı oluşturulmuştur. Oluşturulan soyağacının doğruluğunu istatistiki olarak belirlemek amacıyla 100 tekerrürlü bootstrap analizi yapılmıştır. Son olarak oluşturulan soyağaçları TreeView soyağacı görüntüleme programı kullanılarak görüntülenerek Çanakkale ili ve ilçelerinin pırasa üretim bölgelerinden toplanan LYSV 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 dizilerinin çoklu karşılaştırmaları yukarıda belirtildiği gibi filogenetik analizlere tabi tutulup soy ağaçları oluşturularak TreeView programında görüntülenmiştir.

3.2.8. Mekanik İnokulasyon Çalışmaları

Mekanik inokulasyon çalışmalarında pırasa fideleri (*Allium porrum*) indikatör bitki olarak kullanılmıştır. Bu fideler saksılara dikilerek 15-18 °C sıcaklığında 16 saat ışıklandırma süresine ayarlı Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji İklim odasında inkübe edilmiştir. Bitkiler yaprak oluşturduğunda inokulasyon işlemi uygulanmıştır.

Mekanik inokulasyon çalışmaları 2009-2010 yıllarında DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile test edilen ve hastalıklı olduğu belirlenen 8 farklı LYSV izolatı kullanılarak yapılmıştır.

İnokulasyon çalışmaları için her bir örnekten 0.5 g tartılmış ve tartılan bu örnekler bir havan içerisinde 0.01 M'lık fosfat tampon çözeltisinden (pH:7.4) 4.5 ml ilave edildikten sonra iyice ezilerek bitki özsuyu elde edilmiştir. Bitki sıvısı bir tülbentten geçirilerek diğer bitki parçacıkları ortamdaki uzaklaştırılmıştır. İnokulasyon yapılacak olan pırasa bitkilerinin yapraklarında yara oluşumunu sağlamak için karborandum tozu serpiştirilmiştir (Şekil 3.4.).



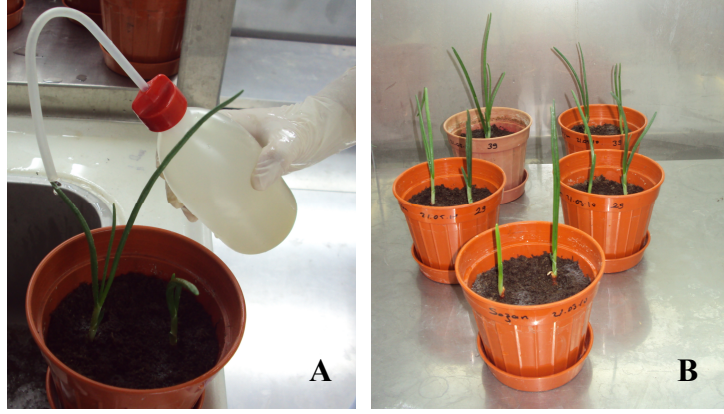
Şekil 3.4. A. İndikatör bitkilere karborandum uygulaması, B. İnfekteli bitki örneğinin fosfat buffer yardımıyla ezilmesi.

Elde edilen bitki özsuyu bir pamuk yardımıyla bu yapraklara hafifçe ovularak bitkide yara oluşumu sağlanan yerlerden bitki özsuyu içerisindeki virüsün sağlıklı olan indikatör bitkiye inokulasyonu sağlanmıştır (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Ezilen infekteli bitki örneğinin indikatör bitkiye inokule edilmesi.

Her bir izolat için belirtilen test bitkilerinin her birinden üç bitki kullanılmıştır. İnokulasyonun sonunda pırasa bitkileri, virüsle birlikte virüsü inhibe edebilecek maddelerin ortamdan uzaklaştırılması için musluk suyu ile yıkanmıştır. Bu işlemin hemen ardından mekanik inokulasyon yapılan indikatör bitkiler gölge bir yerde tutularak belirtilen belirtiler gözlenmiştir (Şekil 3.6.). Kontrol grubu olarak üç pırasa bitkisi kullanılmış ve bitkilere sadece su uygulaması yapılmıştır.



Şekil 3.6. A. İndikatör bitkinin çeşme suyu ile yıkanması, B. İnokulasyon yapılan bitkiler.

İnokulasyon yapılan bitkiler 2-4 hafta süreyle periyodik olarak gözlenmiş ve bu gözlemler sonucunda oluşan belirtiler not edilmiştir. Ayrıca enfekteli bitkiler ile kontrol grubu arasındaki farkları görsel olarak kıyaslamak amacıyla inokulasyon yapılan bitkiler fotoğraflandırılmıştır.

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

Arazi çalışmaları pırasa üretiminin yapıldığı Çanakkale ili ve ilçelerinde 2009-2010 üretim sezonunda yapılmıştır. Üretim sezonu süresince tesadüfi olarak seçilmiş pırasa tarlalarına arazi çıkışları gerçekleştirilmiş, bitkiler görsel olarak incelenmiş ve LYSV simptomlarına benzer simptom gösteren bitkilerden örnekler alınmıştır. Arazi çıkışları sonucunda 2009 yılında 42, 2010 yılında ise 35 olmak üzere toplam 77 örnek toplanmıştır. Örneklerin ilçeler bazında dağılımı Çizelge 4.1’de görülmektedir. En fazla örnek 30 örnek ile Çanakkale Merkez ilçeden alınırken, bunu 15 örnek ile Biga ve 11 örnek ile Gelibolu ilçesi izlemiştir. Eceabat’tan 7, Ayvacık ve Çan ilçelerinden 6’şar örnek alınırken en az örnek ise iki ile Lapseki ilçelerinden alınmıştır. Örnekleme yapılırken tarla seçimi ilçe bazında üretim miktarına bağlı olarak yapılmamış, tesadüfi olarak girilen tarlalardan simptom gösterenlerden örnekler alınmıştır. Tarla büyüklüğüne bağlı olarak her bir tarladan en az bir en fazla üç örnek alınmıştır. Sörvey süresince bazı tarlalarda çok yoğun hastalık simptomu gösteren bitkiye rastlanırken, bazı tarlalarda hiç simptom gözlenmemiştir. Örnekleme pırasa çeşidi dikkate alınmamıştır. Bazı tarlalarda çok bazılarında ise az simptom görülmesi olasılıkla hastalığın yaprak bitleri ile taşınması ve çeşitler arasında hastalığa tolerant ya da duyarlı çeşitlerin bulunması ile ilişkilidir.

Çizelge 4.1. Çanakkale ili ve ilçelerindeki pırasa üretim alanlarından elde edilen Pırasa sarı çizgi virüsü izolatlarının dağılımı

İzolatların Toplandığı Yer	Toplanan Örnek Sayısı (2009)	Toplanan Örnek Sayısı (2010)	Toplam
Çanakkale Merkez	6	24	30
Biga	15	-	15
Lapseki	2	-	2
Ayvacık	1	5	6
Gelibolu	11	-	11
Eceabat	7	-	7
Çan	-	6	6
Toplam	42	35	77

4.2. DAS-ELISA Testi Bulguları

Çanakkale ili ve ilçelerinde 2009-2010 yıllarında yapılan arazi çıkışları sonucunda toplanan 77 pırasa örneği DAS-ELISA ile test edilmiştir. Testlemeler sonucunda 2009 yılı üretim sezonunda toplanan 42 örnekten 25'i, 2010 yılı üretim sezonunda toplanan 35 örnekten ise 26'sı LYSV ile infekteli bulunmuştur. Arazi çıkışı sonucunda toplanan 77 bitki örneğinden 51'inde LYSV tespit edilmiştir. Toplanan örnekler bazında ortalama enfeksiyon oranı % 66.2 olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 4.2).

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

İzolatların Toplandığı Yer	İnfekteli Örnek /Toplam Örnek	% İnfeksiyon Oranı
Çanakkale Merkez	21/30	70.0
Biga	8/15	53.3
Lapseki	1/2	50.0
Ayvacık	5/6	83.3
Gelibolu	8/11	72.7
Eceabat	4/7	57.1
Çan	4/6	66.7
Toplam	51/77	66.2

İlçeler bazında toplanan örneklerde enfeksiyon oranlarına bakıldığında en yüksek enfeksiyon oranı % 83.3 ile Ayvacık'tan toplanan örneklerden elde edilmiştir. Bu ilçeden toplanan 6 örnekten 5'i infekteli bulunmuştur. İkinci en yüksek enfeksiyon oranına sahip ilçe ise Gelibolu olmuştur. Bu ilçede toplanan 11 örnekten 8'i infekteli bulunurken enfeksiyon oranı da % 72.7 olarak gerçekleşmiştir. Çanakkale Merkez ilçede 30 örnekten 21 infekteli çıkmış ve enfeksiyon oranı % 70.0 ile üçüncü sırada yer almıştır. En düşük enfeksiyon oranları ise % 53.3 ve % 50.0 ile Biga ve Lapseki ilçelerinde gerçekleşmiştir.

Araziden toplanan her 3 örnekten ikisi infekteli bulunmuştur. LYSV belirtilmelerine benzer belirtiler gösteren ancak LYSV için negatif sonuç veren örnekler olasılıkla başka virüs ya da virüsler tarafından infekteli olabilir. Moreno-Perez ve ark. (2006) Meksika'da yaptıkları bir çalışmada virüs ve virüs benzeri belirtiler gösteren 195 sarımsak bitkisi toplamışlar ve ELISA testleri sonucunda bu bitkilerden 41'ini LYSV ile infekteli bulurlarken diğer örneklerin Sarımsak genel latent virüsü, Shallot latent virüsü ve Soğan

sarı cücelik virüsleri ile infekteli olduğunu saptamışlardır. Bu bulgular *Allium* cinsi bitkilerde görülen virüs ya da virüs benzeri simptomların bir çok virüs tarafından oluşturulabileceğini göstermektedir.

ELISA testlerinde infekteli örnekler substrat eklendikten sonra çok kısa süre içinde sarı renk oluşturmaya başlamış ve 30 dakika sonraki okumalarda infekteli örnekler negatif kontrolün iki katı bir değere ulaşmıştır. Bu sonuçlar LYSV için beklenen bir durumdur. Çünkü LYSV Potyvirus grubunda yer alır ve Potyvirusler bitki içinde çok yüksek konsantrasyona ulaşırlar ve serolojik ya da moleküler tanı yöntemleri ile kolaylıkla teşhis edilebilirler (Shukla ve ark. 1994; Dovas ve ark. 2001; Fauquet ve ark., 2005).

Arazi çalışmaları süresince toplanan ve testlemelerde infekteli bulunan örneklerde tipik olarak bodurlaşma, dikine ve düzensiz sarı çizgiler, mozaik desenleri ve bazende genel sararma simptomları görülmüştür (Şekil 4.1). Belirtilen bu simptomlar birçok araştırmacı tarafından bir çok farklı ülkede pırasa, soğan ve sarımsakta rapor edilmiştir (Dovas ve ark. 2001; Conci ve ark., 2002; Lunello ve ark., 2002; Park ve ark., 2005; Takaki ve ark., 2005).



Şekil 4.1. Pırasa bitkisinde Pırasa sarı çizgi virüsü'nün göstermiş olduğu belirtiler.

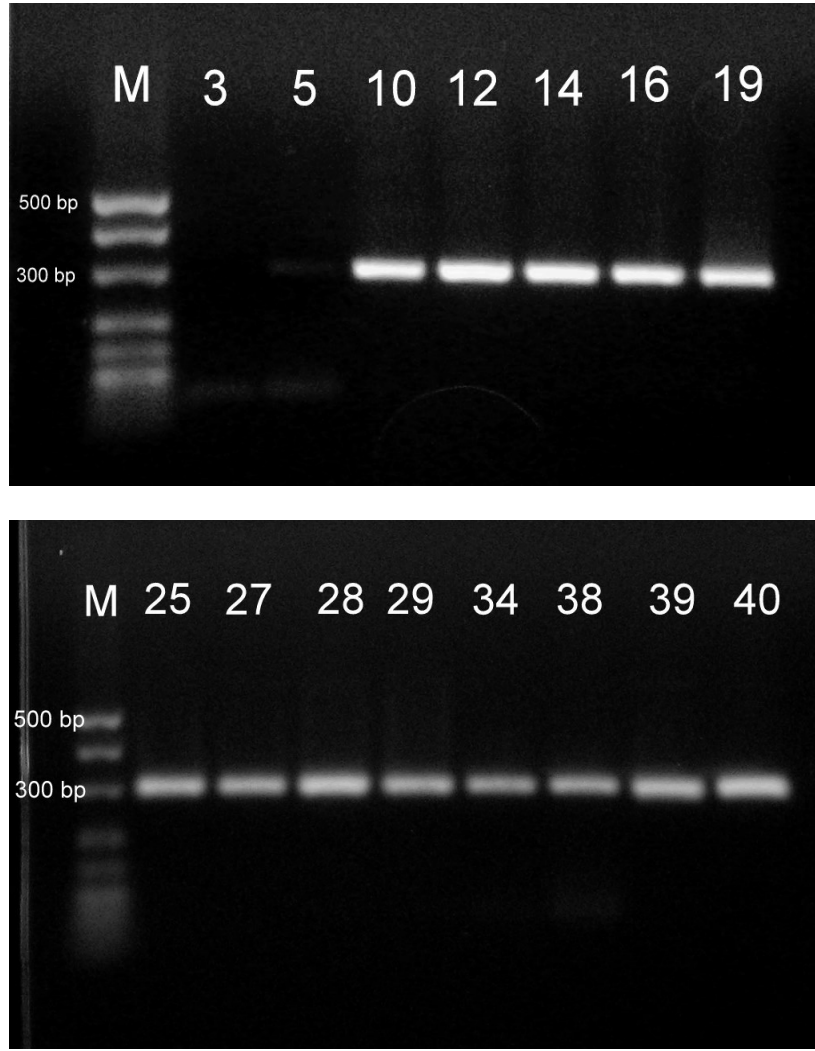
Serolojik bir yöntem olan ELISA testi ilk bulunduğu 1980'li yılların başlarından itibaren bitki virolojisinde virüs hastalıklarının teşhisi için kullanılmaktadır. LYSV'de ELISA testi ile başarılı bir şekilde tanılabilmektedir. Dovas ve ark. (2001), Yunanistan'da sarımsak, soğan ve pırasada virüs hastalıklarını belirlemek amacıyla ELISA, immunoelektron mikroskopu ve bazen de RT-PCR yöntemini kullanarak bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışmada örnekleme yapılan yörelerdeki bitkilerde yüksek oranda (% 98.5 ve % 83.7) OYDV ve LYSV'ye ait virüs hastalıklarını belirlemişlerdir.

Conci ve ark. (2002), Arjantin'deki sarımsak üretim alanlarının hemen hemen tümünde LYSV benzeri simptom gösteren bitkilerden örnek almışlardır. Araştırmacılar 14 farklı bölgeden rastgele 3066 örnek toplamış ve DAS-ELISA ile analiz etmişlerdir. Tüm bölgelerde LYSV'nin bulunma oranının % 80 ile % 98 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Sadece Santa Cruz çeşidinde LYSV'nin bulunma oranı % 34 gibi diğer çeşitlere göre düşük oranda olduğu bildirilmiştir.

Korkmaz ve Çevik (2009), Marmara bölgesinde 2007 yılı üretim sezonu içerisinde pırasa bitkilerinde LYSV'nin neden olduğu simptomlara benzer mozaik, sarı çizgi, zayıflama ve bodurluk simptomları gözlemlemişlerdir. Gözlem yapılan Çanakkale, Bursa ve Balıkesir illerindeki pırasa tarlalarından toplam 42 örnek toplanmış ve LYSV'nin varlığını belirlemek için ticari poliklonal antibadiler kullanılarak DAS-ELISA ile test edilmiştir. ELISA testi sonucunda 42 örneğin 39'u LYSV ile infekteli bulunmuştur.

4.3. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi Uygulamaları (RT-PCR)

Çanakkale ili ve ilçelerinde 2009 ve 2010 üretim sezonunda toplanan LYSV izolatlarının bir kısmına hem tanı amaçlı hem de ELISA test sonuçlarını doğrulamak için RT-PCR analizi uygulanmıştır. RT-PCR çalışmalarında kılıf protein geninin bir kısmına spesifik olan yaklaşık 304 bp büyüklüğünde korunmuş bir bölgeyi çoğaltan LYSV1 ve LYSV2 primerleri kullanılmıştır. Çalışma kapsamında DAS-ELISA testinde pozitif sonuç veren rastgele seçilmiş 15 LYSV izolatı kullanılmıştır. Bu analizler sonucunda DAS-ELISA testinde pozitif sonuç veren 2009-3 numaralı LYSV izolatı hariç diğer tüm izolatlar RT-PCR analizi sonucunda da pozitif sonuç vermişlerdir. 2009-5 numaralı LYSV izolatı ise çok zayıf bant oluşturmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. RT-PCR analizi sonuçları. M: Marker (100 bp), 3: Negatif LYSV izolatu, 5, 10, 12, 14, 16, 19, 25, 27, 28, 29, 34, 38, 39, 40: Pırasa sarı çizgi virüsü ile infekteli izolatlar (304 bp).

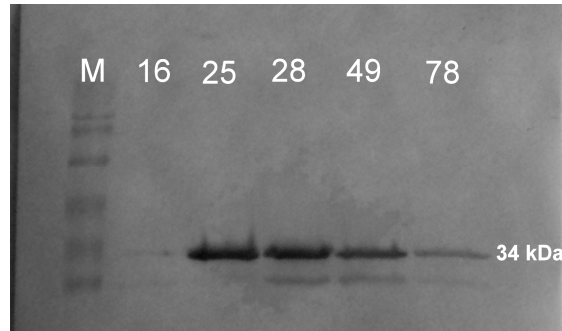
Moleküler bir yöntem olan RT-PCR'in diğer yöntemlere göre duyarlılığının çok daha yüksek olduğu bir çok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Tsuneyoshi ve Sumi, 1996; Takaichi ve ark., 1998; Tsuneyoshi ve ark., 1998a,b; Dovas ve ark., 2001; Shibolet ve ark., 2001). Bu çalışma kapsamında bir örnek hariç ELISA'da pozitif çıkan tüm örnekler RT-PCR'da da pozitif sonuç vermiştir. Bu da toplanan ve LYSV pozitif olan tüm örneklerde virüsün yüksek konsantrasyonda olduğunu göstermektedir. Düşük konsantrasyonlarda ELISA testi her zaman iyi sonuç vermemektedir. RT-PCR'da tek bir örneğin negatif çıkması olasılıkla total RNA izolasyonu ile ilgili bir sorundan kaynaklanmaktadır.

Lunello ve ark. (2005), yaptıkları bir sörvey çalışmasında topladıkları örnekleri önce DAS-ELISA ile test etmişler ve daha sonra da virüs hastalıklarının teşhisinde daha duyarlı

yöntemler geliştirmeye çalışmışlardır. Bahsedilen yöntemlerin infekteli bitkilerden elde edilen virüs konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda bile iyi bir şekilde çalıştığı tespit edilmiştir. ELISA sonucunda negatif ya da şüpheli çıkan örnekler RT-nested-PCR uygulanmıştır. DAS-ELISA'dan sonra yapılan RT-nested-PCR'in 10^2 kez daha duyarlı bir yöntem olduğu tespit edilmiştir. Buna paralel olarak yapılan IC-RT-nested PCR'in ise, DAS-ELISA'dan 10^4 kez daha duyarlı olduğunu bildirilmiştir. DAS-ELISA'da negatif ya da şüpheli çıkan örneklerin RT-nested-PCR ve IC-RT-PCR ile tekrar analizi yapıldığında bazılarının pozitif çıktığı ve hastalıklı bitki oranında yüksek oranda artışlar olduğu tespit edilmiştir.

4.4. Western Blot Analizi Uygulamaları

Western blot analizi çalışmasında DAS-ELISA testlemelerinde kullanılan poliklonal antiserumlar kullanılmıştır. DAS-ELISA ve RT-PCR testi sonuçlarında infekteli olduğu belirlenen 2009-25, 2009-28, 2010-49, 2010-78 numaralı LYSV örnekleri ve 2010-16 numaralı sağlıklı bitki örneği kullanılarak western blot analizi yapılmıştır. Western blot analizi çalışmalarında pozitif örneklerin tamamında 34 kDa moleküler ağırlığa sahip bantlar elde edilirken, sağlıklı bitkide herhangi bir bant elde edilmemiştir (Şekil 4.3.). Western blot analizi çalışmalarında herhangi bir sorun ile karşılaşılmamıştır. Çalışmada kullanılan tüm izolatlarda virüs konsantrasyonunun çok yüksek olması nedeniyle oluşan bantlar belirgin olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.3. Western blot analizi sonuçları. M: Marker, 16: Sağlıklı pırasa izolatı, 25, 28, 49, 78: Pırasa sarı çizgi virüsü ile infekteli pırasa izolatları, (34 kDa).

Bos ve ark. (1978), Pırasa sarı çizgi virüsü ve Soğan sarı cücelik virüsleri ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, her iki virüsün de arazi koşullarında birbirine benzer simptom oluşturduklarını, yapılan karakterizasyon çalışmalarında ise her iki virüsün birbirinden farklı özellikler gösterdiğini ve kılıf proteinlerinin moleküler ağırlıklarının OYDV için 30

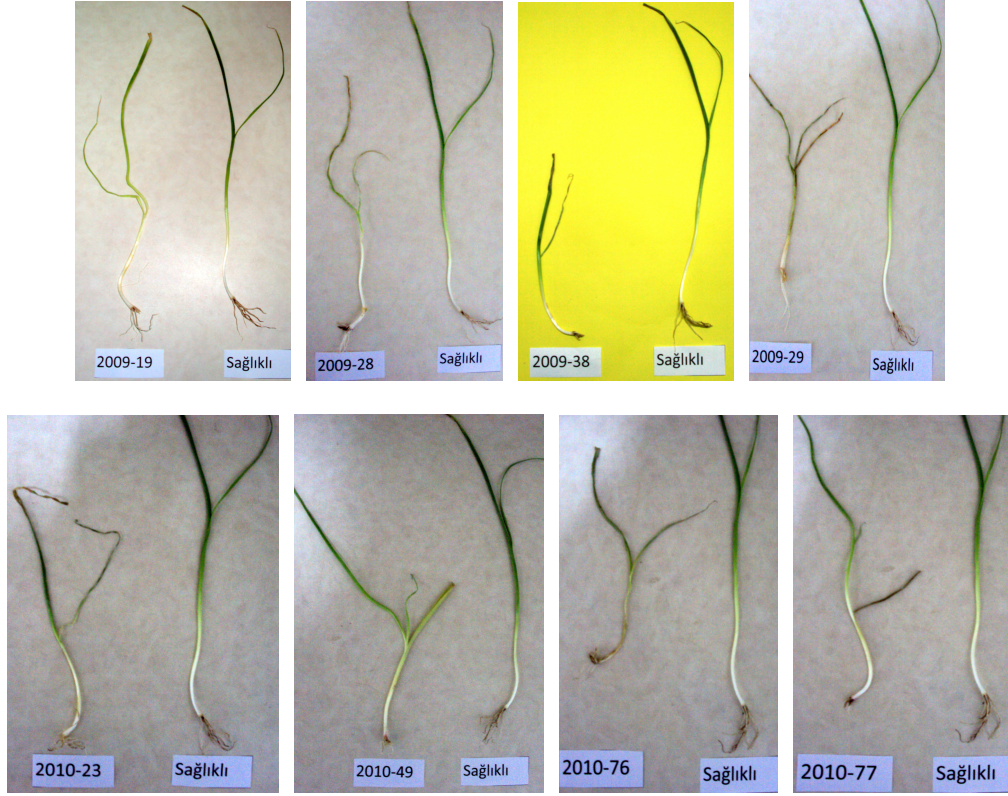
kDa iken LYSV için 34 kDa olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada elde edilen bulgular bu sonuçlarla uyum göstermektedir.

4.5. Mekanik İnokulasyon Uygulamaları

Mekanik inokulasyon çalışmalarında 8 farklı LYSV izolatı kullanılmıştır. İnokule edilen tüm bitkiler simptom oluştururken kontrol grubunda herhangi bir simptom gözlenmemiştir (Çizelge 4.3). Mekanik inokulasyon sonucunda pırasa bitkilerinin yapraklarında sarı çizgi oluşumları, bitkinin genelinde sararma, bitkinin genel görünümünde zayıflıklar, bodurlaşma gibi simptomlar görülmüştür. Mekanik inokulasyon yapılan 2009-19, 2010-49 ve 2010-77 numaralı izolatlarda bitkinin genelinde sararma simptomları görülürken, 2009-28, 2009-29, 2009-38 ve 2010-76 numaralı izolatlarda şiddetli düzeyde sararma ve bodurlaşma simptomları gözlenmiştir. 2010-23 numaralı LYSV izolatında yapraklarda belirgin sararma ve küçülme simptomları görülmüştür (Şekil 4.4).

Çizelge 4.3. Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan LYSV izolatları

İzolat No	Toplandığı Yer	Mekanik İnokulasyon Sonucu
2009-19	Çanakkale-Merkez	+
2009-28	Çanakkale-Eceabat	+
2009-29	Çanakkale-Eceabat	+
2009-38	Çanakkale-Gelibolu	+
2010-23	Çanakkale-Merkez	+
2010-49	Çanakkale-Merkez	+
2010-76	Çanakkale-Ayvacık	+
2010-77	Çanakkale-Ayvacık	+



Şekil 4.4. Pirusa sarı çizgi virüsü izolatlarının mekanik inokulasyon sonucu bitkilerde oluşturdukları belirtiler (Solda LYSV ile infektelenmiş pirusa bitkileri, sağda sağlıklı pirusa bitkileri).

Virüslerin tanısında bir çok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler biyolojik indeksleme, serolojik yöntemler, elektron mikroskobu, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), dsRNA analizi ve vektörlerle taşıma etkinliği gibi yöntemlerdir. Ancak her bir yöntemin kullanımı ve başarılı olma şansı virüse ve konukçuya bağlıdır. Bir konukçu, bir virüsün tanılanmasında uygun olurken başka bir virüsün hatta aynı virüsün farklı bir streyni için uygun olmayabilir

İndikatör bitkiler kullanılarak yapılan tanı yöntemlerinin güvenilirlik düzeyleri düşük olmakta, çok uzun zaman almakta ve maliyeti yüksek olmaktadır. Ayrıca kullanılan indikatör bitkilerin göstermiş olduğu reaksiyon ve belirtiler çevre koşulları, bitki kültüvarı ve virüs streynine göre değişiklik gösterebilmektedir. Tüm bu olumsuzluklarına rağmen bu yöntem özellikle virüslerin biyolojik özelliklerinin belirlenmesinde ve karakterizasyonunda halen kullanılmaktadır (Ross, 1964; Roistacher, 1991; Matthews, 1992; D'Onghia ve ark., 2007).

Bos ve ark. (1978), LYSV'nin OYDV ile olan ilişkilerini, karakteristik özelliklerini, ekolojisini ve mümkün olabilen kontrol yöntemlerini incelemişlerdir. LYSV'nin soğan ve

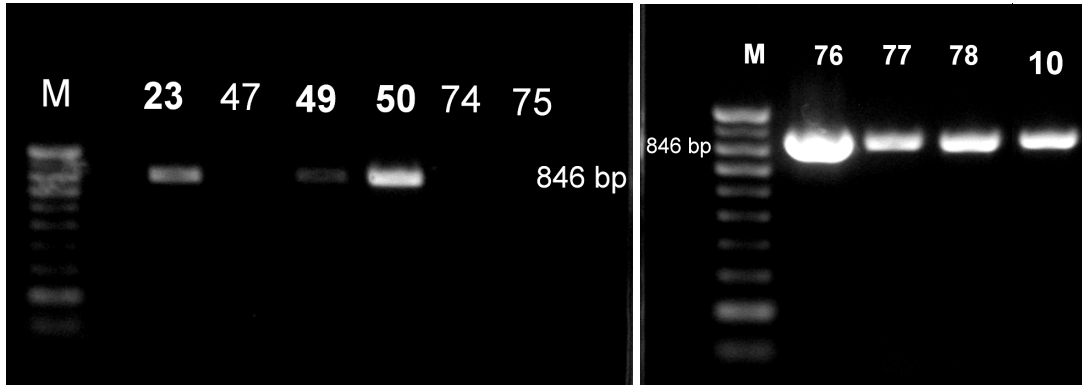
soğancıkta güçlü bir bulaşıklık gösterdiğini, aynı şekilde OYDV'nin de pırasada benzer davranışları gösterdiğini saptamışlardır. Pırasa sarı çizgi virüsü OYDV'den farklı olarak *A. fistulosum*'da enfeksiyon yapmamıştır. Ayrıca kazayağında (*C. amaranticolor* ve *C. quinoa*) farklı lokal lezyonlara neden olmadığını saptamışlardır. Bu iki virüsün birbirlerine semptomları bakımından yakın benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir.

Noda ve Inouye (1989), Japonya'da, yapraklarında mozaik ve nekrozlar gösteren ve süs bitkisi olarak yetiştirilen pırasa bitkisinden LYSV'yi teşhis etmişlerdir. LYSV'nin 11 familyaya ait 49 türde afitlerle (*Myzus persicae* ve *Aphis gossypii*) non-persistent olarak taşındığını belirtmişlerdir. Yapraklarda sistemik bir şekilde mozaik semptomu gösteren *Allium ampeloprasum* ve *A. giganteum*'u infekte ettiğini mekanik inokulasyon çalışmalarıyla tespit etmişlerdir. Ayrıca *Chenopodium amaranticolor* ve *C. quinoa*'da lokal lezyonlar oluşturduğunu saptamışlardır.

Lunello ve ark. (2002), LYSV'nin pırasa ve sarımsaklarda mozaik şeklinde belirtilere neden olduğunu bildirmişlerdir. Potyviruslerin yanı sıra Carlavirusler ve Allexiviruslerin de pırasa ve sarımsak gibi bitkilerde hastalığa sebep olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir. Pırasa bitkilerinden alınmış LYSV izolatlarında tipik sarı çizgiler şeklinde semptom gözlenmiştir. Arjantin'in Cordoba yakınlarında virüsün mekanik olarak taşındığı belirlenmiş ve *Chenopodium amaranticolor* ve *C. quinoa*'da klorotik lokal lezyonlara sebep olduğu bildirilmiştir. Soğan bitkilerine yapılan mekanik inokulasyon sonucu 40 izolat içerisinde sadece iki izolatta bulaşma meydana gelmiştir. Bahsedilen bu izolatlar sarımsak bitkilerine mekanik ve afitler yardımıyla bulaştırılmıştır. Mekanik olarak bulaştırılan 20 bitkiden 14'ünde belirtilen virüsler bulunmuştur.

4.6. Klonlama ve Sekans Analizi Çalışmaları

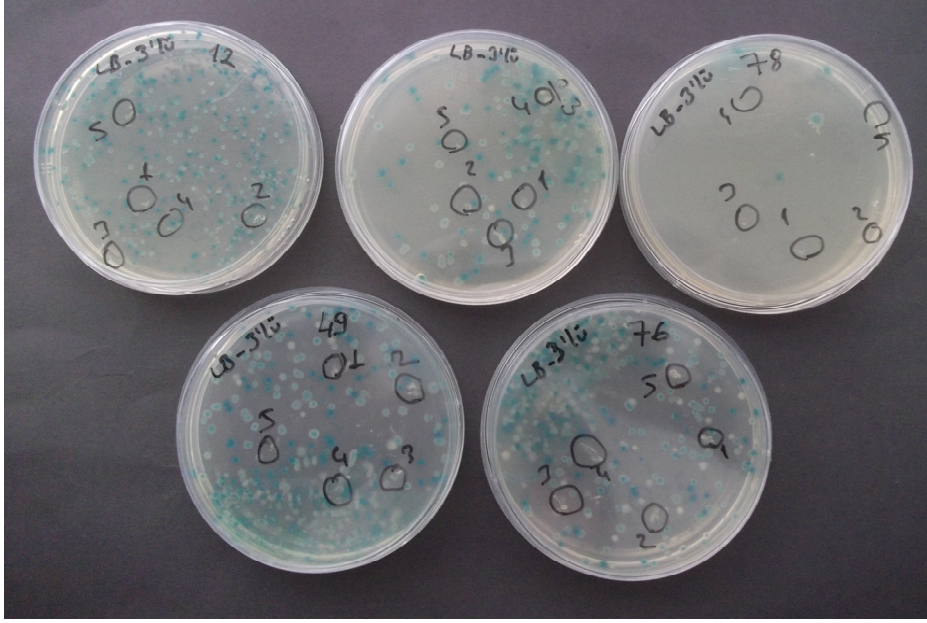
LYSV izolatlarının kılıf protein genleri RT-PCR yöntemiyle çoğaltılarak klonlama için kullanılacak izolatların seçimi yapılmıştır. Bu aşamada kılıf protein geninin 846 baz çiftlik kısmını çoğaltabilen SK1LYSV ve SK2LYSV primerleri kullanılarak RT-PCR yapılmıştır. Yapılan RT-PCR analizlerinin sonuçlarında 846 bp'lik bant oluşturan izolatlar arasında en iyi bant oluşturanlardan 5 izolat seçilerek klonlanma çalışmalarında kullanılmıştır. Şekil 4.5'de klonlanan izolatların klonlama öncesi RT-PCR sonuçları görülmektedir.



Şekil 4.5. Klonlama yapılan izolatların klonlama öncesi RT-PCR sonuçları. M: Marker (100 bp), 10, 23, 49, 50, 76 ve 78: İzolat numaraları (846 bp).

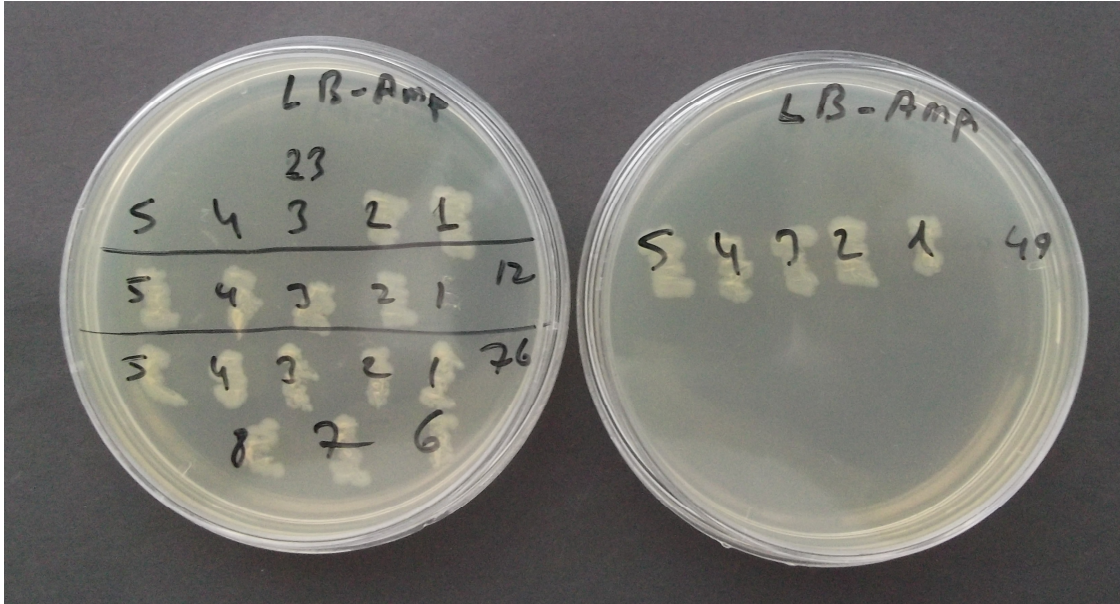
RT-PCR analizi sonucuna bağlı olarak 2009-10, 2010-23, 2010-50, 2010-76 ve 2010-78 numaralı LYSV izolatları T-A klonlama yöntemiyle klonlanmıştır. Bu yöntem, PCR sırasında Taq DNA polimeraz gibi 3'5' ekzonükleaz aktivitesi olmayan DNA polimerazlarla çoğaltılan DNA'ların 3' ucuna fazladan bir Adenin (A) 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 5 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 ligasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. LYSV kılıf protein genlerini içeren pGEM-T Easy plazmidleri ısı şoku transformasyon yoluyla *E. coli* bakterisinin JM109 irkına aktarılmıştır. Transformasyonu yapılan *E. coli* bakterileri ampisilin, X-Gal ve IPTG içeren LB besi ortamına ekilerek mavi-beyaz koloni seçimi yoluyla LYSV kılıf protein genlerini içeren plazmidleri taşıyan bakteri kolonilerinin seçimi yapılmıştır. Elde edilen mavi koloniler LYSV kılıf protein genini taşımayan pGEM-T Easy plazmitlerini içermekte ve klonlamanın gerçekleşmediğini göstermektedir. Elde edilen beyaz koloniler ise LYSV kılıf protein geni taşıyan pGEM-T Easy plazmidlerini içermektedir. Bu beyaz koloniler klonlama işleminin başarılı olduğunu göstermektedir. Farklı LYSV 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 4.6'da gösterilmektedir.



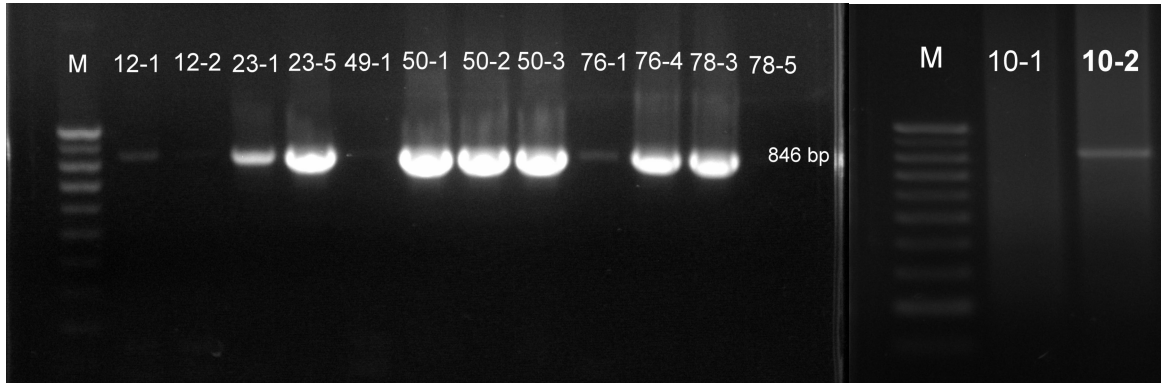
Şekil 4.6. Transformasyonu yapılan *Escherichia coli* bakterilerinin ampisilin, X-Gal ve IPTG içeren LB besi ortamında oluşturdukları mavi-beyaz koloniler.

Mavi-beyaz koloni oluşturan petrilerden beyaz koloniler seçilerek daha sonra kullanılmak üzere ampisilin içeren LB besi ortamında büyütülmesi sağlanmıştır. Şekil 4.7'de beyaz kolonilerin ampisilin içeren LB besi ortamına ekim yapılan petriler gösterilmektedir.



Şekil 4.7. Beyaz kolonilerin ampisilin içeren LB besi ortamına çizimi.

Klonlama yapılan genleri içeren bakterilerin belirlenmesinde mavi-beyaz koloni seçilimi ilk aşamada kullanılmaktadır. Beyaz kolonilerin istenilen LYSV 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 üç 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 4.8'de verilmiştir. LYSV içeren kolonilerde 846 bp büyüklüğünde bant oluşumu görülmüştür. Bazı kolonilerde ise 180 bp'lik bant oluşumu da gözlenmiş ve bu kolonilerde LYSV kılıf protein genini içermediği tespit edilmiştir.

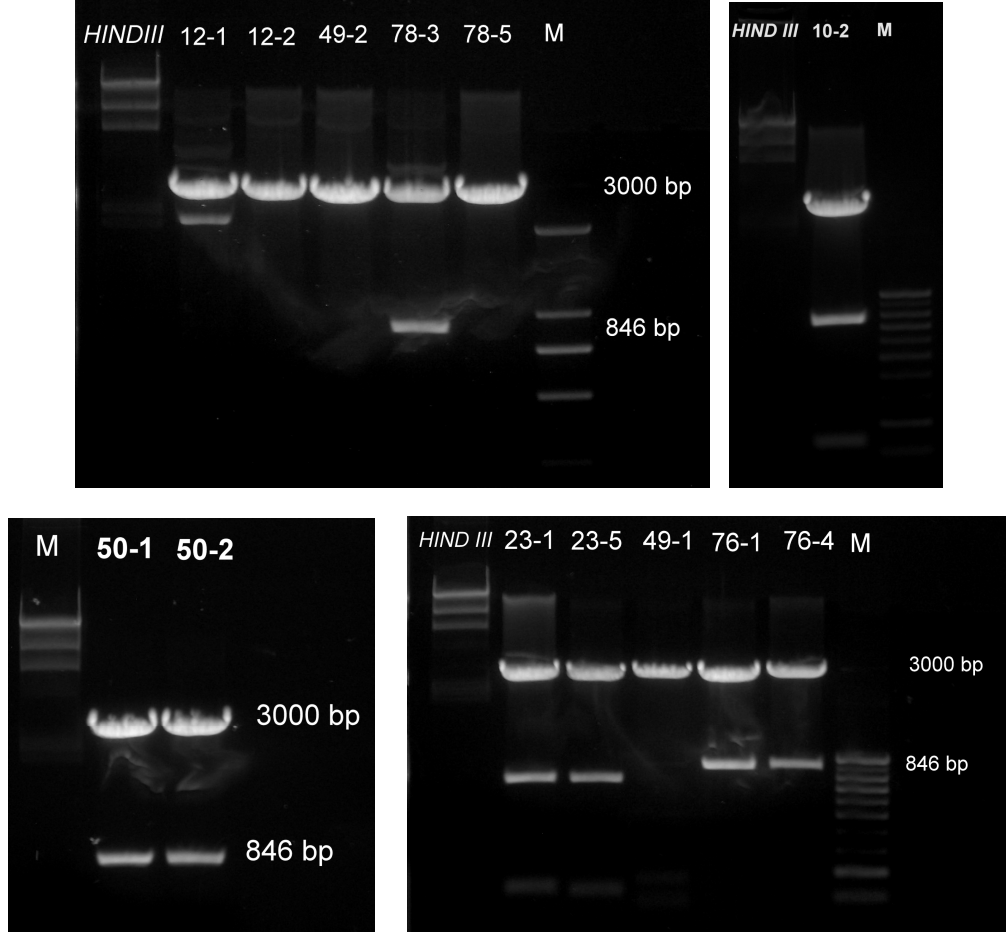


Şekil 4.8. LYSV izolatlarının koloni PCR sonuçlarını gösteren jel fotoğrafları. Sayısal değerler: İzolat numaraları M: Marker (846 bp).

Koloni PCR sonucunda pozitif çıkan LYSV kılıf protein genlerini içeren beyaz kolonilerden seçilen bakteriler ampisilin içeren LB sıvı ortam içerisinde 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde tüm gece boyunca inkübe edilmiştir. 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.

Plazmid izolasyonu yapılan bu plazmid DNA'lar T-A klonlaması yapılan bölgenin her iki yanında bulunan *EcoR I* restriksiyon enzimi kesme bölgelerinden *EcoR I* restriksiyon enzimiyle kesim yapılmıştır ve bu şekilde klonlanan DNA parçası plazmitten 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 846 bp büyüklüğünde LYSV kılıf protein genine ait bantlar görülmüştür. Kılıf protein genlerini içeren plazmidlerin *EcoR I* enzimiyle kesilmesi sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.9'de gösterilmektedir. Bu işlemin sonunda klonlanan LYSV izolatlarının kılıf protein genini taşıdıkları kesin olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Saflaştırılan plazmidlerin *EcoR I* restriksiyon enzimi ile kesimlerinin yapıldığı jel görüntüsü. M: Marker, 10-2, 23-1, 23-2, 50-1, 50-2, 76-1, 76-4, 78-3: Klonlanan izolatlar, 12-1, 12-2, 49-1, 49-2: Negatif sonuç veren izolatlar.

4.7. Kılıf Protein Genlerinin Dizi Analizleri

Saflaştırılan ve *EcoRI* enzimiyle kesilerek LYSV kılıf protein genini taşıdığı kesin olarak belirlenen plazmidlerden bir tanesi seçilerek DNA dizilimi belirlenmesi amacıyla Refgen Biyoteknoloji (Ankara) firmasına gönderilmiştir. LYSV kılıf protein genlerini içeren pGEM-T Easy plazmidlerinin DNA dizilimi M13F ve M13R primerleri kullanılarak döngü dizileme yöntemiyle otomatik DNA dizileme cihazıyla yapılmıştır. Her bir izolat için elde edilen DNA dizilerinden öncelikle plazmide ait bölgeler temizlenerek LYSV kılıf

protein genine ait diziler elde edilmiştir. Elde edilen çoklu dizi karşılaştırmaları Şekil 4.10’da verilmiştir. DNA dizileri Vector NTI (Invitrogen, ABD) dizi analiz programlarında incelenmiştir.

		1	80
LYSV 10 CPG	(1)	ATGAATTAGATGCAGGCATGCAAAACAAATAAGAAACAAAAGGCAACCCAGACAAGTCCATCGAGCAGCGAAACCCAGTA	
LYSV 50-1 CPG	(1)	ATGAATTAGATGCAGGCATGCAAAACAAATAAGAAACAAAAGGCAACCCAGACAAGTCCATCGAGCAGCGAAACCCAGTA	
LYSV 76-1 CPG	(1)	ATGAATTAGATGCAGGCATGCAAAACAAATAAGAAACAAAAGGCAACCCAGACAAGTCCATCGAGCAGCGAAACCCAGTA	
LYSV 78 CPG	(1)	ATGAATTAGATGCAGGCATGCAAAACAAATAAGAAACAAAAGGCAACCCAGACAAGTCCATCGAGCAGCGAAACCCAGTA	
LYSV23-5 CPG	(1)	ATGAATTAGATGCAGGCATGCAAAACAAATAAGAAACAAAAGGCAACCCAGACAAGTCCATCGAGCAGCGAAACCCAGTA	
Consensus	(1)	ATGAATTAGATGCAGGCATGCAAAACAAATAAGAAACAAAAGGCAACCCAGACAAGTCCATCGAGCAGCGAAACCCAGTA	
		81	160
LYSV 10 CPG	(81)	GCACCACGACCAACACCAAGGTGAGAAAGACGGTGAAGGTGTTTCAGCGCTAAGTGAACAAAAGATAGGGATGTAAA	
LYSV 50-1 CPG	(81)	GCACCACGACCAACACCAAGGTGAGAAAGACGGTGAAGGTGTTTCAGCGCTAAGTGAACAAAAGATAGGGATGTAAA	
LYSV 76-1 CPG	(81)	GCACCACGACCAACACCAAGGTGAGAAAGACGGTGAAGGTGTTTCAGCGCTAAGTGAACAAAAGATAGGGATGTAAA	
LYSV 78 CPG	(81)	GCACCACGACCAACACCAAGGTGAGAAAGACGGTGAAGGTGTTTCAGCGCTAAGTGAACAAAAGATAGGGATGTAAA	
LYSV23-5 CPG	(81)	GCACCACGACCAACACCAAGGTGAGAAAGACGGTGAAGGTGTTTCAGCGCTAAGTGAACAAAAGATAGGGATGTAAA	
Consensus	(81)	GCACCACGACCAACACCAAGGTGAGAAAGACGGTGAAGGTGTTTCAGCGCTAAGTGAACAAAAGATAGGGATGTAAA	
		161	240
LYSV 10 CPG	(161)	TGTTGGTACCACAGTACTTTTCAGTGTGCCACGCATTAACAAATCCACAGAAAGGTATATCAATCCCATGGATGGAG	
LYSV 50-1 CPG	(161)	TGTTGGTACCACAGTACTTTTCAGTGTGCCACGCATTAACAAATCCACAGAAAGGTATATCAATCCCATGGATGGAG	
LYSV 76-1 CPG	(161)	TGTTGGTACCACAGTACTTTTCAGTGTGCCACGCATTAACAAATCCACAGAAAGGTATATCAATCCCATGGATGGAG	
LYSV 78 CPG	(161)	TGTTGGTACCACAGTACTTTTCAGTGTGCCACGCATTAACAAATCCACAGAAAGGTATATCAATCCCATGGATGGAG	
LYSV23-5 CPG	(161)	TGTTGGTACCACAGTACTTTTCAGTGTGCCACGCATTAACAAATCCACAGAAAGGTATATCAATCCCATGGATGGAG	
Consensus	(161)	TGTTGGTACCACAGTACTTTTCAGTGTGCCACGCATTAACAAATCCACAGAAAGGTATATCAATCCCATGGATGGAG	
		241	320
LYSV 10 CPG	(241)	GCAAAATCAATACTCAATTTGGACCCTTATTACAGTATAAACCAAGTCAGTTGAACATATCAAACAAGAGCTACAGCA	
LYSV 50-1 CPG	(241)	GCAAAATCAATACTCAATTTGGACCCTTATTACAGTATAAACCAAGTCAGTTGAACATATCAAACAAGAGCTACAGCA	
LYSV 76-1 CPG	(241)	GCAAAATCAATACTCAATTTGGACCCTTATTACAGTATAAACCAAGTCAGTTGAACATATCAAACAAGAGCTACAGCA	
LYSV 78 CPG	(241)	GCAAAATCAATACTCAATTTGGACCCTTATTACAGTATAAACCAAGTCAGTTGAACATATCAAACAAGAGCTACAGCA	
LYSV23-5 CPG	(241)	GCAAAATCAATACTCAATTTGGACCCTTATTACAGTATAAACCAAGTCAGTTGAACATATCAAACAAGAGCTACAGCA	
Consensus	(241)	GCAAAATCAATACTCAATTTGGACCCTTATTACAGTATAAACCAAGTCAGTTGAACATATCAAACAAGAGCTACAGCA	
		321	400
LYSV 10 CPG	(321)	GCTCAATTGAAGACTTGGATAGAAAGAGTGCAGAGGATTATGGTGTACTAAGGATGATATGGGAATCAATTCGAATGG	
LYSV 50-1 CPG	(321)	GCTCAATTGAAGACTTGGATAGAAAGAGTGCAGAGGATTATGGTGTACTAAGGATGATATGGGAATCAATTCGAATGG	
LYSV 76-1 CPG	(321)	GCTCAATTGAAGACTTGGATAGAAAGAGTGCAGAGGATTATGGTGTACTAAGGATGATATGGGAATCAATTCGAATGG	
LYSV 78 CPG	(321)	GCTCAATTGAAGACTTGGATAGAAAGAGTGCAGAGGATTATGGTGTACTAAGGATGATATGGGAATCAATTCGAATGG	
LYSV23-5 CPG	(321)	GCTCAATTGAAGACTTGGATAGAAAGAGTGCAGAGGATTATGGTGTACTAAGGATGATATGGGAATCAATTCGAATGG	
Consensus	(321)	GCTCAATTGAAGACTTGGATAGAAAGAGTGCAGAGGATTATGGTGTACTAAGGATGATATGGGAATCAATTCGAATGG	
		401	480
LYSV 10 CPG	(401)	CTTAATGGTGTGGTGTATAGAAAATGGAACATCCCAAAATATAAACGGAACCTGGACAATGATGGATGGCGACGAGCAAG	
LYSV 50-1 CPG	(401)	CTTAATGGTGTGGTGTATAGAAAATGGAACATCCCAAAATATAAACGGAACCTGGACAATGATGGATGGCGACGAGCAAG	
LYSV 76-1 CPG	(401)	CTTAATGGTGTGGTGTATAGAAAATGGAACATCCCAAAATATAAACGGAACCTGGACAATGATGGATGGCGACGAGCAAG	
LYSV 78 CPG	(401)	CTTAATGGTGTGGTGTATAGAAAATGGAACATCCCAAAATATAAACGGAACCTGGACAATGATGGATGGCGACGAGCAAG	
LYSV23-5 CPG	(401)	CTTAATGGTGTGGTGTATAGAAAATGGAACATCCCAAAATATAAACGGAACCTGGACAATGATGGATGGCGACGAGCAAG	
Consensus	(401)	CTTAATGGTGTGGTGTATAGAAAATGGAACATCCCAAAATATAAACGGAACCTGGACAATGATGGATGGCGACGAGCAAG	
		481	560
LYSV 10 CPG	(481)	TCGTGTATCCTTTACGACCAATTTGTAAGACATGCAAAACCAACCTTACGTCAAATAATGGCGCATTTTTCAGCACTTGCA	
LYSV 50-1 CPG	(481)	TCGTGTATCCTTTACGACCAATTTGTAAGACATGCAAAACCAACCTTACGTCAAATAATGGCGCATTTTTCAGCACTTGCA	
LYSV 76-1 CPG	(481)	TCGTGTATCCTTTACGACCAATTTGTAAGACATGCAAAACCAACCTTACGTCAAATAATGGCGCATTTTTCAGCACTTGCA	
LYSV 78 CPG	(481)	TCGTGTATCCTTTACGACCAATTTGTAAGACATGCAAAACCAACCTTACGTCAAATAATGGCGCATTTTTCAGCACTTGCA	
LYSV23-5 CPG	(481)	TCGTGTATCCTTTACGACCAATTTGTAAGACATGCAAAACCAACCTTACGTCAAATAATGGCGCATTTTTCAGCACTTGCA	
Consensus	(481)	TCGTGTATCCTTTACGACCAATTTGTAAGACATGCAAAACCAACCTTACGTCAAATAATGGCGCATTTTTCAGCACTTGCA	
		561	640
LYSV 10 CPG	(561)	GAGGCTTATATCGAGATGAGAAACTCAGAGCAAGCTTATATGCCAAGGTACGGTTTACAGAGAAATTAACAGACATGGG	
LYSV 50-1 CPG	(561)	GAGGCTTATATCGAGATGAGAAACTCAGAGCAAGCTTATATGCCAAGGTACGGTTTACAGAGAAATTAACAGACATGGG	
LYSV 76-1 CPG	(561)	GAGGCTTATATCGAGATGAGAAACTCAGAGCAAGCTTATATGCCAAGGTACGGTTTACAGAGAAATTAACAGACATGGG	
LYSV 78 CPG	(561)	GAGGCTTATATCGAGATGAGAAACTCAGAGCAAGCTTATATGCCAAGGTACGGTTTACAGAGAAATTAACAGACATGGG	
LYSV23-5 CPG	(561)	GAGGCTTATATCGAGATGAGAAACTCAGAGCAAGCTTATATGCCAAGGTACGGTTTACAGAGAAATTAACAGACATGGG	
Consensus	(561)	GAGGCTTATATCGAGATGAGAAACTCAGAGCAAGCTTATATGCCAAGGTACGGTTTACAGAGAAATTAACAGACATGGG	
		641	720
LYSV 10 CPG	(641)	TCTCGCACGGTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCAAGAACCAGTTAGAGCGCGGAGGCTCACGCACAAATGA	
LYSV 50-1 CPG	(641)	TCTCGCACGGTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCAAGAACCAGTTAGAGCGCGGAGGCTCACGCACAAATGA	
LYSV 76-1 CPG	(641)	TCTCGCACGGTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCAAGAACCAGTTAGAGCGCGGAGGCTCACGCACAAATGA	
LYSV 78 CPG	(641)	TCTCGCACGGTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCAAGAACCAGTTAGAGCGCGGAGGCTCACGCACAAATGA	
LYSV23-5 CPG	(641)	TCTCGCACGGTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCAAGAACCAGTTAGAGCGCGGAGGCTCACGCACAAATGA	
Consensus	(641)	TCTCGCACGGTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCAAGAACCAGTTAGAGCGCGGAGGCTCACGCACAAATGA	
		721	800
LYSV 10 CPG	(721)	AAGCAGCGGCCTTGGCAATTCAGGTCAGACTGTTGGACTAGACGGTAATGTCCACCCCGGATGAGGACCCGGAG	
LYSV 50-1 CPG	(721)	AAGCAGCGGCCTTGGCAATTCAGGTCAGACTGTTGGACTAGACGGTAATGTCCACCCCGGATGAGGACCCGGAG	
LYSV 76-1 CPG	(721)	AAGCAGCGGCCTTGGCAATTCAGGTCAGACTGTTGGACTAGACGGTAATGTCCACCCCGGATGAGGACCCGGAG	
LYSV 78 CPG	(721)	AAGCAGCGGCCTTGGCAATTCAGGTCAGACTGTTGGACTAGACGGTAATGTCCACCCCGGATGAGGACCCGGAG	
LYSV23-5 CPG	(721)	AAGCAGCGGCCTTGGCAATTCAGGTCAGACTGTTGGACTAGACGGTAATGTCCACCCCGGATGAGGACCCGGAG	
Consensus	(721)	AAGCAGCGGCCTTGGCAATTCAGGTCAGACTGTTGGACTAGACGGTAATGTCCACCCCGGATGAGGACCCGGAG	
		801	846
LYSV 10 CPG	(801)	AGACCCCGCACATGACGTGAATGCCGGATGCCCATCTTGATG	
LYSV 50-1 CPG	(801)	AGACCCCGCACATGACGTGAATGCCGGATGCCCATCTTGATG	
LYSV 76-1 CPG	(801)	AGACCCCGCACATGACGTGAATGCCGGATGCCCATCTTGATG	
LYSV 78 CPG	(801)	AGACCCCGCACATGACGTGAATGCCGGATGCCCATCTTGATG	
LYSV23-5 CPG	(801)	AGACCCCGCACATGACGTGAATGCCGGATGCCCATCTTGATG	
Consensus	(801)	AGACCCCGCACATGACGTGAATGCCGGATGCCCATCTTGATG	

Şekil 4.10. LYSV kılıf protein genine ait çoklu nükleotid dizi karşılaştırmaları.

4.7.1. Nükleotid Dizi Analizi

Çanakkale ili ve ilçelerinde pırasa üretiminin yapıldığı alanlardan alınan LYSV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimleri kendi aralarında karşılaştırıldığında izolatların kılıf proteinleri arasında % 97-98 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Tevfikiye'den alınan LYSV 10 izolatı Ayvacık'tan alınan LYSV 76 izolatı ile % 97 oranında benzerlik göstererek en çok farklılığa sahip olan izolatlardan biri olmuştur. LYSV 23 izolatı ile LYSV 10, LYSV 50, LYSV 76 ve LYSV 78 izolatları arasında % 98 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm izolatların birbirleriyle gösterdikleri nükleotid dizi benzerlikleri Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Çanakkale ili ve ilçelerine ait pırasa üretim alanlarından toplanan LYSV izolatlarının nükleotid dizilerinin benzerlik oranları

	LYSV50 CPG	LYSV76 CPG	LYSV78 CPG	LYSV23 CPG
LYSV10 CPG	98	97	98	98
LYSV50 CPG		98	98	98
LYSV76 CPG			98	98
LYSV78 CPG				98

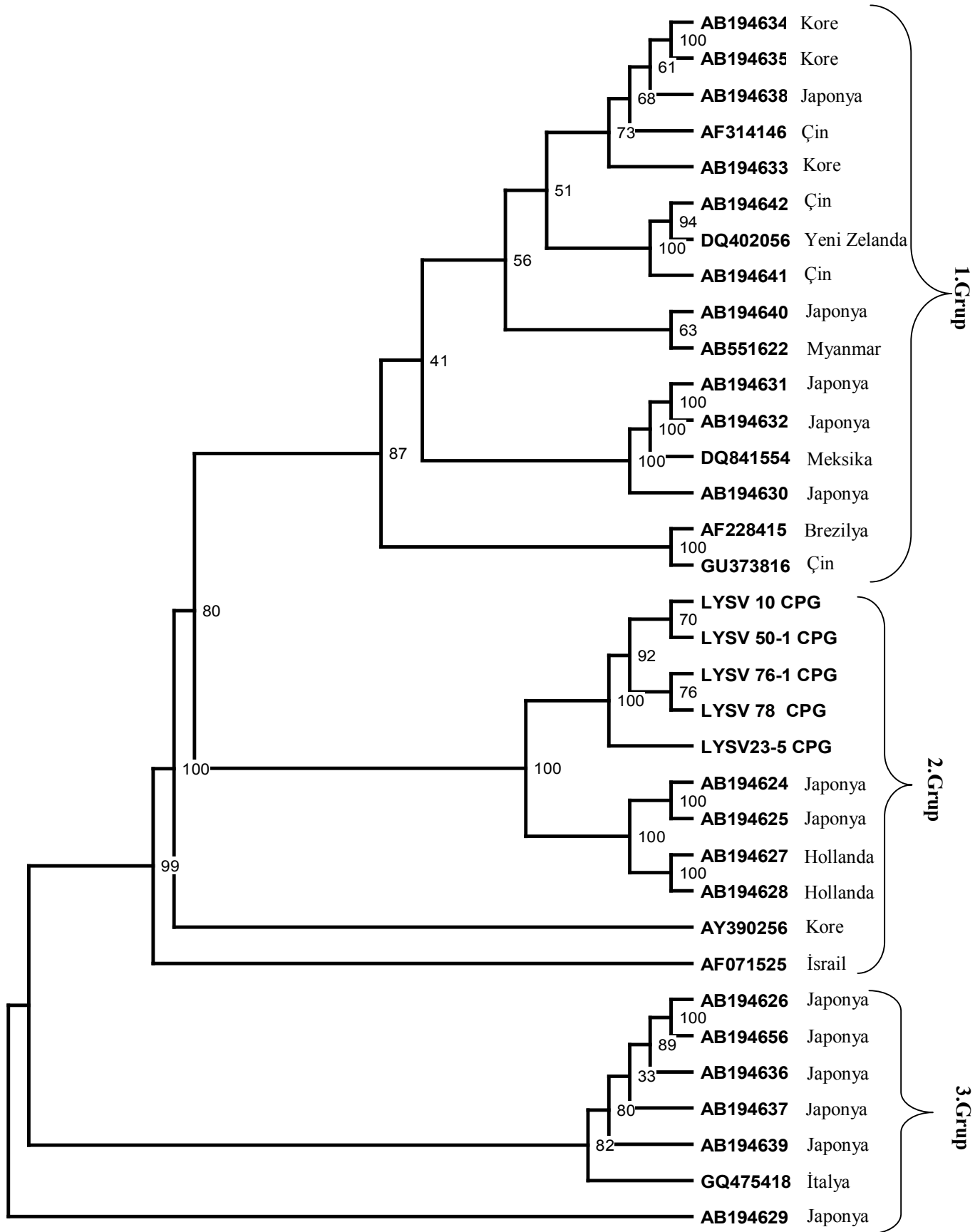
Gen bankası veritabanlarında dünyanın farklı pırasa ve sarımsak üretim alanlarından elde edilen 28 farklı izolatın kılıf protein geninin dizilimi bulunmaktadır. Gen bankasında bulunan bu LYSV kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimleri alınarak Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen LYSV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimiyle karşılaştırılarak benzerlik oranları belirlenmiştir. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda Çanakkale ili LYSV izolatlarının dünya izolatları ile % 77-95 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan 5 LYSV izolatı ile dünyada bulunan 28 farklı LYSV izolatı arasındaki benzerlik oranları Çizelge 4.5'te verilmiştir. Nükleotid dizi benzerlikleri incelendiğinde en fazla benzerliğin LYSV 10, LYSV 23, LYSV 76 ve LYSV 78 izolatları ile AB194624 (Japonya) ve AB194627 (Hollanda) izolatları arasında % 95 oranında olduğu tespit edilmiştir. İkinci en yüksek benzerliğin % 94 oranı ile LYSV 50 izolatı ve AB194624 (Japonya), AB194625 (Japonya), AB194627

(Hollanda) ve AB194628 (Hollanda) izolatları arasında olduğu belirlenmiştir. En fazla farklılığa sahip izolatların ise % 77 benzerlik oranı ile AB194638 (Japonya), AB194640 (Japonya) ve AB551622 (Myanmar) izolatları olduğu tespit edilmiştir.

4.7.2. Filogenetik Analizler

Çanakkale ili ve ilçelerindeki pırasa üretim alanlarından toplanan LYSV izolatlarının birbirleri ile genetik ilişkisini belirlemek amacı ile 5 farklı izolatın kılıf protein genlerine ait nükleotid dizilimleri kullanılarak filogenetik analizler yapılmıştır. Nükleik asit dizileri kullanılarak yapılan filogenetik analizler sonucunda izolatların genetik ilişkisi belirlenmiştir. Analiz edilen izolatlar arasında Merkez LYSV 23 ile Merkez LYSV 10 ve Merkez LYSV 50 izolatlarının genetik olarak birbirinden en uzak izolatlar yani birbirine en az benzeyen izolatlar olduğu belirlenmiştir. Genel olarak izolatlar birbirleriyle genetik olarak yakından ilişkili olduğundan ana gruplar çok belirgin bir şekilde ayrılmamıştır. Oluşturulan soyağacı dalları 70-100 arasında değişen bootstrap değerleriyle desteklenmekte olup değerlendirmelerin tesadüfi olmayıp soyağacındaki dallardan çoğunun istatistiksel açıdan desteklendiğini göstermiştir.

Gen bankası veritabanlarında bulunan dünyanın farklı pırasa üretim alanlarından elde edilen 28 farklı izolatın kılıf protein genlerine ait 846 bp nükleotid dizileri kullanılarak ülkemiz LYSV izolatları ile karşılaştırılmış ve filogenetik analizleri yapılmıştır. Bu izolatlarının CP genlerinin nükleik asit dizilimine göre oluşturulan filogenetik soyağacı Şekil 4.11'de verilmiştir. Filogenetik analizler LYSV izolatlarının kılıf protein genlerine göre üç ana gruba ayrıldığını göstermiştir. Bu gruplardan birincisinde üç Kore, beş Japonya, dört Çin, Brezilya, Meksika, Yeni Zelanda ve Myanmar izolatları olmak üzere toplam 16 izolat yer almıştır. İkinci grupta ise Çanakkale izolatlarının yanı sıra iki Japonya, iki Hollanda, bir Kore ve bir İsrail izolatı yer almıştır. Ülkemiz izolatları ile AB194624 (Japonya), AB194625 (Japonya), AB194627 (Hollanda), AB194628 (Hollanda) izolatları birbirine yakın izolatlar olarak belirlenmiştir. Oluşturulan soyağacı dalları 41-100 arasında değişen bootstrap değerleriyle desteklenmekte olup değerlendirmelerin tesadüfi olmayıp soyağacındaki dallardan çoğunun istatistiksel açıdan desteklendiğini göstermiştir. Oluşturulan soyağacında LYSV izolatları arasında CP genine göre genetik bir varyasyon olduğu ve özellikle Japonya (AB194624 ve AB194625), Hollanda (AB194627 ve AB194628) ve Çanakkale izolatlarının filogenetik olarak birbirlerine daha yakın olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.11. Çanakkale LYSV izolatları ile dünya izolatlarının kılıf protein geninin nükleotid dizilimi kullanılarak görüntülenen filogenetik soyağacı.

Chen ve Adams (2001) Çin'in Zhejiang şehrinde sarımsak bitkilerinden örnekler almışlar, OYDV ve LYSV'ye ait dejenere primerler kullanarak cDNA sentezlemişler ve klonlama ve sekans analizleri yapmışlardır. Klonlama ve sekans analizleri çalışmalarında birbirinden bağımsız 12 LYSV izolatı ve 33 OYDV izolatı kullanılmıştır. OYDV izolatları kendi arasında OYDV-YH1(15 izolat), OYDV-YH2 (10 izolat) ve OYDV-YH3 (8 izolat) olmak üzere 3 grup oluşturmuştur. Kılıf protein bölgelerine göre yapılan amino asit dizi analizi sonuçlarına göre 14 OYDV izolatında % 80-98, 9 LYSV izolatında ise % 78-92 değişen oranlarda benzerlikler olduğu tespit edilmiştir.

Takaki ve ark. (2005), yaptıkları bir çalışmada LYSV'ye ait üç izolatın nükleotid dizilerini belirlemeye çalışmışlardır. Sarımsaklarda mozaik hastalığına sebep olan bu virüsün Japonya'nın kuzeyindeki Aomori bölgesinde yaygın olarak bulunduğunu saptamışlardır. Bu izolatların 10.296-10.297 nükleotid içerdiği ve 3215 amino asit kodladığı yapılan bir dizi çalışmayla tespit edilmiştir. Üç izolat arasındaki amino asit ve nükleotid sekans varyasyonu % 1.5 olarak tespit edilmiştir. Bu üç LYSV izolatı daha önceden tanımlanmış olan Çin'den elde edilmiş LYSV izolatıyla yüksek düzeyde farklılıklar içerdiği bulunmuştur. 5'-UTR ve P1 bölgeleri arasındaki sekans benzerliklerini sırasıyla % 56-57 ve % 52-53 olarak tespit etmişlerdir.

Baghalian ve ark., (2010) OYDV'nin dünyada sarımsak üretiminin yapıldığı yerlerde önemli virüs hastalığı olduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada 2008-2009 yıllarında İran'ın farklı bölgelerinden 26 OYDV izolatı elde etmişlerdir. Rastgele 5 örnek seçilerek elektron mikroskobu yardımıyla OYDV'nin 700-800 nm uzunluğunda ve 12 nm genişliğinde olduğunu belirlemişlerdir. Belirlenen bu özelliklerden dolayı bu virüsün Potyvirus grubuna dahil olduğunu bildirmişlerdir. 26 OYDV izolatına RT-PCR analizi, klonlama ve sekans analizleri uygulanmıştır. Filogenetik analizler sonucunda OYDV'nin kılıf protein genine özgü 235 amino asit içerdiği ve A grubu ve B grubu olmak üzere 2 grup oluşturduğu tespit edilmiştir. A grubu üyelerinin ise A-I ve A-II olmak üzere 2 alt gruba ayrıldığını bildirmişlerdir. A-I alt grubunda 17 İran izolatının olduğu yapılan analizlerle tespit edilmiştir. 26 OYDV izolatının amino asit düzeylerine bakılarak yapılan amino asit dizi karşılaştırma çalışmalarında % 90 ile % 100 arasında benzerliğin olduğu belirlenmiştir. Nükleotid dizi analizlerinde ise 26 İran izolatı arasında % 79-99 değişen oranlarda benzerlik bulunduğunu bildirmişlerdir. Dünya izolatları ile 26 İran izolatları kullanılarak yapılan nükleotid ve amino asit dizi analizleri sonucunda sırasıyla % 79-98 ve % 87-97 gibi değişen oranlarda benzerlik olduğu tespit edilmiştir.

Soliman ve ark. (2012) OYDV simptomsu belirtisi gösteren sarımsaklardan alınan örneklere indirect-ELISA testini uygulamışlardır. *C. amaranticolor* indikatör bitkisine mekanik olarak virüsü bulaştırmışlar ve ISEM (İmmunosorbent elektron mikroskobu) ile virüsün varlığını tespit etmişlerdir. PCR için primerler dizayn ederek RT-PCR çalışmalarını yürütmüşler bununla birlikte klonlama ve sekans analizi çalışmalarını da gerçekleştirmişlerdir. Klonlanan EG (Egyptian izolatu (HM473189)) izolatının nükleotid dizi analizi yapılmış ve gen bankasından elde edilen diğer 10 OYDV izolatu ile arasında % 82-96 değişen oranlarda benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Çanakkale LYSV izolatları arasında nükleik asit dizi analizi bakımından birbirine çok yakın benzerlikler göstermesi (% 97-98) beklenen bir sonuçtur. Bu sonuçlar büyük bir olasılıkla Çanakkale ili ve ilçelerinde bulunan LYSV izolatlarının orijinin aynı olduğunu ve virüsün tek bir kaynaktan yayıldığını göstermektedir. Bununla birlikte bu çalışma kapsamında sadece Çanakkale ilinde 5 LYSV izolatının kılıf protein genlerinin nükleik asit dizi analizleri yapılmıştır. Bu sayı izolatları kıyaslama açısından oldukça azdır. Daha geniş alanlarda daha fazla örneklerle yapılacak bir çalışma LYSV hakkında daha detaylı bilgilerin elde edilmesine olanak sağlayacaktır.

Çanakkale LYSV izolatları ile dünya izolatlarının kılıf protein geninin nükleotid dizilimi kullanılarak görüntülenen filogenetik soyağacında ise Çanakkale izolatları kendi içinde bir alt grup oluşturmuştur. Ana grup içinde Çanakkale izolatları ile aynı grup içinde Japon ve Hollanda izolatları yer almıştır. Bu sonuçlar Çanakkale izolatlarının orijini hakkında biraz bilgi verse de en iyi bulgulara daha fazla izolatlarla yapılan çalışmalarla ulaşılabilecektir.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Çanakkale ili ve ilçelerinde farklı pırasa üretim alanlarından LYSV'ye benzer belirti gösteren 77 bitki örneği toplanmıştır. En fazla örnek 30 örnek ile Çanakkale Merkez ilçeden alınırken, bunu 15 örnek ile Biga ilçesi, 11 örnek ile Gelibolu ilçesi izlemiştir. Eceabat'tan 7, Ayvacık ve Çan ilçelerinden 6'şar örnek alınırken en az örnek ise iki ile Lapseki ilçelerinden alınmıştır.

Sörvey süresince bazı tarlalarda çok yoğun hastalık semptomu gösteren bitkiye rastlanırken, bazı tarlalarda hiç semptom gözlenmemiştir. Örneklemelerde pırasa çeşidi dikkate alınmamıştır. Bazı tarlalarda çok bazılarında ise az semptom görülmesi olasılıkla hastalığın yaprak bitleri ile taşınması ve çeşitler arasında hastalığa tolerant ya da duyarlı çeşitlerin bulunması ile ilişkilidir.

Arazi çalışmaları süresince toplanan ve testlemelerde infekteli bulunan örneklerde tipik olarak bodurlaşma, dikine ve düzensiz sarı çizgiler, mozaik desenleri ve bazen de genel sararma semptomları görülmüştür.

Toplanan 77 bitki örneğine DAS-ELISA testi uygulanmıştır. 2009 üretim sezonunda toplanan 42 bitki örneğinin 25'i, 2010 üretim sezonunda toplanan 35 bitki örneğinin 26'sı DAS-ELISA testinde infekteli bulunmuştur. DAS-ELISA testinde toplamda 77 örnek test edilmiş 51'i LYSV ile infekteli olduğu belirlenmiştir. Toplanan örnekler bazında ortalama enfeksiyon oranı % 66.2 olarak gerçekleşmiştir. İlçeler bazında toplanan örneklerde enfeksiyon oranlarına bakıldığında en yüksek enfeksiyon oranı % 83.3 ile Ayvacık'tan toplanan örneklerden elde edilmiştir. En düşük enfeksiyon oranları ise % 53.3 ve % 50.0 ile Biga ve Lapseki ilçelerinde gerçekleşmiştir. Araziden toplanan her üç örnekten ikisi infekteli bulunmuştur. Toplanan bitkilerin LYSV semptomlarına benzer semptomlar göstermesine rağmen serolojik ve moleküler testler sonucunda negatif sonuç vermesi olasılıkla bitkilerin diğer virüs ve virüs benzeri hastalıklar ile karışık enfeksiyona sahip olmasından kaynaklandığını göstermektedir.

Çanakkale ili ve ilçelerinde 2009 ve 2010 üretim sezonunda toplanan LYSV izolatlarının bir kısmına hem tanı amaçlı hem de ELISA test sonuçlarını doğrulamak için RT-PCR analizi uygulanmıştır. Analiz sonucunda kılıf protein geninin bir kısmına spesifik olan yaklaşık 304 bp büyüklüğünde bant oluşumu görülmüştür. Çalışma kapsamında DAS-ELISA testinde pozitif sonuç veren rastgele seçilmiş 15 LYSV izolatı kullanılmıştır. Bu

analizler sonucunda DAS-ELISA testinde pozitif sonuç veren 2009-3 numaralı LYSV izolatu hariç diğer tüm izolatlar RT-PCR analizi sonucunda da pozitif sonuç vermişlerdir. 2009-5 numaralı LYSV izolatu ise çok zayıf bant oluşturmuştur.

Mekanik inokulasyon çalışmaları DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile test edilen ve hastalıklı olduğu belirlenen 8 farklı LYSV izolatu kullanılarak yapılmıştır. Mekanik inokulasyon uygulamalarında kullanılan 8 LYSV izolatu pırasa bitkilerinde simptom göstermiştir. Bununla birlikte kontrol grubunda hiçbir simptom görülmemiştir. Mekanik inokulasyon sonucunda pırasa bitkilerinin yapraklarında sarı çizgi oluşumları, bitkinin genelinde sararma, bitkinin genel görünümünde zayıflıklar, bodurlaşma gibi simptomlar görülmüştür.

DAS-ELISA ve RT-PCR testi sonuçlarında infekteli olduğu belirlenen 2009-25, 2009-28, 2010-49, 2010-78 numaralı LYSV örnekleri ve 2010-16 numaralı sağlıklı bitki örneği kullanılarak western blot analizi yapılmıştır. Western blot analizi çalışmalarında pozitif örneklerin tamamında 34 kDa moleküler ağırlığa sahip bantlar elde edilirken, sağlıklı bitkide herhangi bir bant elde edilmemiştir. Western blot analizi çalışmalarında kullanılan tüm izolatlarda virüs konsantrasyonun çok yüksek olması nedeniyle oluşan bantlar belirgin olarak elde edilmiştir.

Klonlama çalışmaları, yapılan RT-PCR sonuçlarına göre 12 pozitif örnekten en iyi bant oluşturan 5 LYSV izolatu seçilerek yapılmıştır. RT-PCR analizi sonucuna bağlı olarak 2009-10, 2010-23, 2010-50, 2010-76 ve 2010-78 numaralı LYSV izolatları T-A klonlama yöntemiyle klonlanmıştır.

LYSV kılıf protein genlerini kesin olarak taşıdıkları belirlenen 5 LYSV izolatının saflaştırılmış plazmidleri seçilerek LYSV kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimleri yapılmıştır. Bu dizilimler kendi aralarında ve gen bankası veritabanlarında nükleotid dizileri bulunan ve dünyanın farklı pırasa ve sarımsak üretim alanlarından elde edilen diğer LYSV izolatlarıyla karşılaştırılarak sonuçları incelenmiştir. İlk olarak ülkemiz izolatlarının kendi aralarında benzerlik ve farklılıkları karşılaştırılmış ve incelenmiştir. Bu çalışmada kılıf protein gen dizilimi karşılaştırılan 5 izolattan üç izolat % 98 oran ile yüksek benzerlik göstermişlerdir. Buna göre Merkez LYSV 23, Merkez LYSV 50 ve Ayvacık LYSV 78 izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimleri arasında % 98 oranında benzerlik olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada Merkez LYSV 10 izolatu Merkez LYSV 50, Merkez LYSV 23 ve

Ayvacık LYSV 78 izolatları ile Ayvacık LYSV 76 izolatı Merkez LYSV 23, Merkez LYSV 50 ve Ayvacık LYSV 78 izolatları % 98 oranında benzer bulunmuştur. Merkez LYSV 10 izolatı Ayvacık LYSV 76 izolatı ile % 97 benzerlik göstererek en fazla farklılığa sahip izolatlar olmuşlardır.

Dünya izolatları ile ülkemiz izolatlarının karşılaştırılmasında gen bankasında bulunan LYSV kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimleri alınarak Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen LYSV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimiyle karşılaştırarak benzerlik oranları belirlenmiştir. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda Çanakkale ili LYSV izolatlarının dünya izolatları ile % 77-95 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan 5 LYSV izolatı ile dünyada bulunan 28 farklı LYSV izolatı arasındaki benzerlik oranları belirlenmiştir. Nükleotid dizi benzerlikleri incelendiğinde en fazla benzerliğin Merkez LYSV 10, Merkez LYSV 23, Ayvacık LYSV 76 ve Ayvacık LYSV 78 izolatları ile AB194624 (Japonya) ve AB194627 (Hollanda) izolatları arasında % 95 oranında olduğu tespit edilmiştir. İkinci en yüksek benzerliğin % 94 oranı ile Merkez LYSV 50 izolatı ve AB194624 (Japonya), AB194625 (Japonya), AB194627 (Hollanda) ve AB194628 (Hollanda) izolatları arasında olduğu belirlenmiştir. En fazla farklılığa sahip izolatların ise % 77 benzerlik oranı ile AB194638 (Japonya), AB194640 (Japonya) ve AB551622 (Myanmar) izolatları olduğu tespit edilmiştir.

Çanakkale ili ve ilçelerindeki pırasa üretim alanlarından toplanan LYSV izolatlarının birbirleri ile genetik ilişkisini belirlemek amacı ile 5 farklı izolatın kılıf protein genlerine ait nükleotid dizilimleri kullanılarak filogenetik analizler yapılmıştır. Nükleik asit dizileri kullanılarak yapılan filogenetik analizler sonucunda izolatların genetik ilişkisi belirlenmiştir. Analiz edilen izolatlar arasında Merkez LYSV 23 ile Merkez LYSV 10 ve Merkez LYSV 50 izolatlarının genetik olarak birbirinden en uzak izolatlar yani birbirine en az benzeyen izolatlar olduğu belirlenmiştir.

Gen bankası veritabanlarında bulunan dünyanın farklı pırasa üretim alanlarından elde edilen 28 farklı izolatın kılıf protein genlerine ait 846 bp nükleotid dizileri kullanılarak ülkemiz LYSV izolatları ile karşılaştırılmış ve filogenetik analizleri yapılmıştır. Filogenetik analizler LYSV izolatlarının kılıf protein genlerine göre üç ana gruba ayrıldığını göstermiştir. Bu gruplardan birincisinde üç Kore, beş Japonya, dört Çin, Brezilya, Meksika, Yeni Zelanda ve Myanmar izolatları olmak üzere toplam 16 izolat yer almıştır. İkinci grupta ise ülkemiz izolatlarının yanı sıra iki Japonya, iki Hollanda, bir Kore

ve bir İsrail izolatu yer almıştır. Ülkemiz izolatları ile AB194624 (Japonya), AB194625 (Japonya), AB194627 (Hollanda), AB194628 (Hollanda) izolatları birbirine yakın izolatlar olarak belirlenmiştir. Oluşturulan soyağacında LYSV izolatları arasında CP genine göre genetik bir varyasyon olduğu ve özellikle Japonya (AB194624 ve AB194625), Hollanda (AB194627 ve AB194628) ve Çanakkale izolatlarının filogenetik olarak birbirlerine daha yakın olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada Çanakkale ili ve ilçeleri pırasa üretim alanlarından elde edilen LYSV izolatlarının biyolojik ve moleküler özellikleri belirlenmiştir. Çanakkale ili ve ilçelerinde pırasa üretimi azımsanmayacak düzeydedir ve bu nedenle LYSV'nin biyolojik ve moleküler karakterizasyonunun yapılması bu virüs hastalığına karşı üreticinin bilinçlendirilmesi ve gerekli tedbirlerin alınması açısından oldukça önemlidir. Bu çalışma hem ülkemizde hem de dünyada LYSV izolatlarındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesini sağlayarak ileride yapılacak dayanıklılık çalışmalarına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Anonim, 2009. <http://faostat.fao.org>. Erişim tarihi: 30.12.2011.
- Anonim, 2010. <http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi>. Erişim tarihi: 30.12.2011.
- Baghalian K., Kim O.K., Natzuaki K.T. 2010. Molecular variability and genetic structure of the population of *Onion yellow dwarf virus* infecting garlic in Iran. *Virus Genes*, 41:282-291.
- Barg E., Lesemann D. E., Vetten H. J., Green S. K. 1994. Identification, partial characterization, and distribution of viruses infecting *Allium* crops in South and South-East Asia. *Acta Hortic.*, 358: 251-258.
- Barg E., Lesemann D. E., Vetten H. J., Green S. K. 1997. Viruses of *Alliums* and their distribution in different *Allium* crops and geographical regions. *Acta Hortic.*, 433: 607-616.
- Bos L., 1972. Ernstige uitbreiding van uiegeelstreepvirus in prei. *Gewasbescherming*, 3: 81-87.
- Bos L., Huijberts N., Huttinga H., Maat D.Z. 1978. Leek yellow stripe virus and its Leek yellow stripe virus and its relationships to onion yellow dwarf virus; characterization, ecology and possible control. *Neth. J. Pl. Path.* 84 :185-204
- Chen J., Adams M.J. 2001. Molecular characterisation of a complex mixture of viruses in garlic with mosaic symptoms in China. *Arch. Virol*, 146: 1841-1853.
- 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: 475-483.
- Conci V.C, Lunello P., Buraschi D., Italia R.R. Nome S.F. 2002 Variations of *Leek yellow stripe virus* concentration in garlic and its incidence in Argentina. *Plant Disease* 86:1085–1088.
- Çevik B., Pappu S.S., Pappu H.R., Benschler 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. Pp: 47-53.
- Diekmann M. 1997. FAO/IPGRI technical guidelines for the safe movement of germplasm. No 18. Allium spp. Food and Agriculture organisation of the United Nations, Rome/International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- D'onghia A.M., Fahmy H., Brandonisio R. and Djelouah K., 2007. Proc. 17th IOCV Conf.
- Dovas C. I., Hatziloukas E., Salomon R., Barg E., Shibolet Y., Katis N. I. 2001. Incidence of viruses infektng Allium spp. in Greece. *European Journal of Plant Pathology*, 107:677-684.
- Dovas C.I., Mamalos A.P., Katis N.I. 2002. Fluctuations in concentration of two potyviruses in garlic during the growing period and sampling for reliable detection by ELISA. *Ann. Appl. Biol.*, 140:21-28.
- Fajardo T. V. M., Nishijima M., Buso J. A., Torres A. C., Avila A. C., Resende R. O. 2001. Garlic viral complex: Identification of potyviruses and Carlavirus in Central Brazil. *Fitopatologia Brasileira*. 26:619-626.
- Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A., 2005. Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Fidan H., Baloğlu S. First report of *Onion yellow dwarf virus* and *Leek yellow stripe virus* in garlic in Turkey. *The American Phytopathological Soc.* 93(6): 672.
- 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), 185-92.
- Korkmaz S., Çevik B. 2009. *Leek yellow stripe virus* newly reported in Turkey. *Plant Pathology*. 58:787-787.
- 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.

- Langenberg W.G., Zhang L. 1997. Immunocytology shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. *Journal of Structural Biology*. 118: 243-247.
- Lot H., Chovelon V., Souche S., Delecolle B. 1998. Effects of *Onion yellow dwarf* and *Leek yellow stripe viruses* on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. *Plant Dis.* 82:1381-1385.
- Lunello P., Ducasse D.A., Helguera M., Nome S.F., Conci V.C. 2002. An Argentinean Isolate of *Leek yellow stripe virus* from Leek Can Be Transmitted to Garlic. *Journal of Plant Pathology*. 84(1):11-17.
- Lunello P., Ducasse D., Conci V. 2005. Improved PCR Detection of Potyviruses in *Allium* Species. *European Journal of Plant Pathology*. 112:371-378.
- Mahajan S.S., Dolja V.V., Carrington J.C. 1996. Roles of the sequence encoding *Tobacco etch virus* capsid protein in genome amplification: requirements for the translation process and a cis-active element. *Journal of Virology*. 70: 4370-4379.
- Matthews R.E.F., 1992. Fundamentals of plant virology. *Academic Press*, San Diego, California, U.S.A. 403 p.j
- Mohamed N., Young B. 1980. *Leek yellow stripe virus* in New Zealand. *N. Z. Agric. Res.* 23:129.
- Navratil M., Safarova D., Tkadlecova E., Klukackova J. 2006. Molecular characterization of Czech and Chinese *Leek yellow stripe virus* isolates from garlic. *Acta Virologica*. 50(3): 207-210.
- Noda C., Inouye N., 1989. *Leek yellow stripe virus* Isolated from an Ornamental *Allium* Plant in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55: 208-215.
- Park K. S, Bae Y.J, Jung E.J, Kang S.J. 2005. RT-PCR-based detection of six garlic viruses and their phylogenetic relationships. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 15(5):1110-1114.
- Perez-Moreno L., Cordova-Rosales Z., Barboza-Corona E., Ramirez-Malagon R. 2006. First report of *Leek yellow stripe virus* in Garlic in the State of Guanajuato, Mexico. *Plant Diseases*. 90 (11): 1458.
- Pringle C. R. 1998. Virus Taxonomy-San Diego. *Arch. Virol.* 143:1449-1460.

- Riechmann J.L., Lain S., Garcia J.A. 1992. Review Article: Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology*: 73:1-16.
- Riechmann J.L., Cervera, M.T., Garcia J.A. 1995. Processing of the *Plum pox virus* polyprotein at the P3-6K1 junction is not required for virus viability. *Journal of General Virology*. 76: 951-956.
- Roistacher C.N., 1991. Graft transmissible diseases of Citrus. Handbook for detection and diagnosis. Publ. Div., FAO, Rome, Italy. p. 1 – 151.
- Ross A.F., 1964. Identification of plant viruses. P. 68 – 92. *Plant Virology*. Univ. Florida Press, Gainesville.
- Shahraeen N., Lesemann D.E., Ghotbi T. 2008. Survey for Viruses Infecting Onion, Garlic and Leek Crops in Iran. *Bulletin OEPP/EPPO*. 38:131-135.
- Shiboleth Y. M., Gal-On A., Koch M., Rabinowitch H. D., Salomon R. 2001. Molecular characterization of *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) infecting garlic (*Allium sativum* L.) in Israel: Thermotherapy inhibits virus elimination by meristem tip culture. *Ann. Appl. Biol.* 138:187-195.
- Shukla D. D., Ward C. W., Brunt A. A. 1994. *The Potyviridae*. Wallingford, UK: CAB International.
- Soliman A.M., Mahmoud S.Y.M., Dawood R. A. 2012. Molecular characterization of *Onion yellow dwarf virus* (Garlic isolate) with production of virus-free plantlets. *International Journal of Virol.*, 8: 61-70.
- 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):67-73.
- Takaichi M., Yamamoto M., Nagacubo T., Oeda K. 1998. Four garlic viruses identified by the reverse transcription-polymerase chain reaction and their regional distribution in northern Japan. *Plant Dis*. 82:694-698.
- Takaki F., Sano T., Yamashita K., Fujita T., Ueda K., Kato T. 2005. Complete Nucleotide Sequences of Attenuated and Isolates of *Leek yellow stripe virus* from Garlic in Northern Japan: Identification of Three Distinct Virus Types in Garlic and Leek World-wide. *Arch. Virol.* 150:1135-1149.

- Tsuneyoshi T., Sumi S. 1996. Differentiation Among Garlic Viruses in Mixed Infections Based on RT-PCR Procedures and Direct Tissue Blotting Immunoassays. *Phytopathology*. 86:253-259.
- Tsuneyoshi T., Matsumi T., Deng T. C., Sako I., Sumi S. 1998a. Differentiation of Allium carlaviruses isolated from different parts of the world based on the viral coat protein sequence. *Arch. Virol.* 143:1093-1107.
- Tsuneyoshi T., Matsumi T., Natsuaki K. T., Sumi S. 1998b. Nucleotide sequence analysis of virus isolates indicates the presence of three potyvirus species in Allium plants. *Arch. Virol.* 143:97-113.
- Van Dijk P. 1993. Survey and characterization of potyviruses and their strains of Allium species. *Neth. J. Plant Pathol.* 99:1-48.
- Verchot J., Carrington J.C. 1995. Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 proteinase-inactivating mutations and restoration by second site modifications. *Journal of Virology*. 69(3): 1582-1590.
- Verhoyen M., 1973. La "Striure chlorotique du Poireau". II. Note concernant l'epidemiologie du virus. *Parasitica* 29: 35-40.
- Walkey D. G. A., 1990. Onions and Allied Crops. CRC Press, Boca Raton, FL. *Virus diseases*. Vol. II. Pages 191-212.
- Ward C.W., Shukla D.D. 1991. Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions. *Intervirology*. 32: 269-296.
- Zhang W., Bai Y., Zhang Y., Shen Y., Gao Y., Geng H., Fan G., Meng X. 2010. Cloning and sequences analysis of CP gene of *Leek yellow stripe* virus Heilongjiang isolate. *Journal of Northeast Agricultural University*. 2010-08.

ÇİZELGELER

Sayfa No

Çizelge 3.1. Tasarlanan primer dizileri	18
Çizelge 4.1. Çanakkale ili ve ilçelerindeki pırasa üretim alanlarından elde edilen Pırasa sarı çizgi virüsü izolatlarının dağılımı	27
Çizelge 4.2. İlçeler bazında toplanan örnek sayısı ve % infeksiyon oranı	28
Çizelge 4.3. Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan LYSV izolatları	33
Çizelge 4.4. Çanakkale ili ve ilçelerine ait pırasa üretim alanlarından toplanan LYSV izolatlarının nükleotid dizilerinin benzerlik oranları.....	41
Çizelge 4.5. Çanakkale LYSV izolatları ile dünyadaki LYSV izolatlarının 846 bp'lik nükleotid dizilerinin benzerlik oranları	43

ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 1.1. Potyviruslerin genom yapısı ve poliproteinlerin bölünüş şeması.....	3
Şekil 3.1. Pırasa sarı çizgi virüsü izolatlarının toplandığı Çanakkale ili ve ilçeleri.....	12
Şekil 3.2. A. Örneklerin vortekslenmesi B. Santrifüj işlemi	14
Şekil 3.3. Separating jel hazırlanması. A: Jelin aparata dökülmesi B: Yüklene jelle saf su eklenmesi	15
Şekil 3.4. A. İndikatör bitkilere karborandum uygulaması, B. İnfekteli bitki örneğinin fosfat buffer yardımıyla ezilmesi	25
Şekil 3.5. Ezilen infekteli bitki örneğinin indikatör bitkiye inokule edilmesi.....	25
Şekil 3.6. A. İndikatör bitkinin çeşme suyu ile yıkanması, B. İnokulasyon yapılan bitkiler	26
Şekil 4.1. Pırasa bitkisinde Pırasa sarı çizgi virüsü'nün göstermiş olduğu belirtiler	29
Şekil 4.2. RT-PCR analizi sonuçları. M: Marker (100 bp), 3: Negatif LYSV izolatı, 5, 10, 12, 14, 16, 19, 25, 27, 28, 29, 34, 38, 39, 40: Pırasa sarı çizgi virüsü ile infekteli izolatlar (304 bp).....	31
Şekil 4.3. Şekil 4.3. Western blot analizi sonuçları. M: Marker, 16: Sağlıklı pırasa izolatı, 25, 28, 49, 78: Pırasa sarı çizgi virüsü ile infekteli pırasa izolatları, (34 kDa).....	32
Şekil 4.4. Pırasa sarı çizgi virüsü izolatlarının mekanik inokulasyon sonucu bitkilerde oluşturdukları belirtiler (Solda LYSV ile infektelenmiş pırasa bitkileri, sağda sağlıklı pırasa bitkileri).	34
Şekil 4.5. Klonlama yapılan izolatların klonlama öncesi RT-PCR sonuçları. M: Marker (100 bp), 10, 23, 49, 50, 76 ve 78: İzolat numaraları (846 bp).....	36
Şekil 4.6. Transformasyonu yapılan <i>Escherichia coli</i> bakterilerinin ampisilin, X-Gal ve IPTG içeren LB besi ortamında oluşturdukları mavi-beyaz koloniler	37
Şekil 4.7. Beyaz kolonilerin ampisilin içeren LB besi ortamına çizimi	37
Şekil 4.8. LYSV izolatlarının koloni PCR sonuçlarını gösteren jel fotoğrafları. Sayısal değerler: İzolat numaraları M: Marker (846 bp).....	38

Şekil 4.9. Saflaştırılan plazmidlerin <i>EcoR I</i> restriksiyon enzimi ile kesimlerinin yapıldığı jel görüntüsü. M: Marker, Sayısal değerler: Klonlanan izolatlar, 49-1: Negatif sonuç veren izolat	39
Şekil 4.10. LYSV kılıf protein genine ait çoklu nükleotid dizi karşılaştırmaları.	40
Şekil 4.11. Çanakkale LYSV izolatları ile dünya izolatlarının kılıf protein geninin nükleotid dizilimi kullanılarak görüntülenen filogenetik soyağacı.....	45

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER:

Adı Soyadı: Ezgi KURTULUŞ

Doğum Yeri: KÜTAHYA

Doğum Tarihi: 20.07.1985

EĞİTİM DURUMU:

Lisans Öğrenimi: ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

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

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ:

Katıldığı Kongreler: II. Bitki Koruma Kongresi (Isparta, 2007)

III. Bitki Koruma Kongresi (Van, 2009)

IV. Bitki Koruma Kongresi (Kahramanmaraş, 2011)

Katıldığı Sempozyumlar: Çanakkale Tarımı Sempozyumu (Çanakkale, 2011)

Kurtuluş, E., Korkmaz, S. Çanakkale İlinde Pırasa Sarı Çizgi Virüsü (*Leek yellow stripe virus*=LYSV)'nün Serolojik ve Moleküler Yöntemlerle Tanılanması. 2011. Çanakkale Tarımı Sempozyumu. 396-401.

Korkmaz, S., Çevik, B., Kurtuluş, E., Tuzlalı, H.T. Güneybatı Marmara Bölgesi'nde *Brassicaceae* ve *Alliaceae* Familyasına Bağlı Bitkilerde Virüs Hastalıklarının Teşhisi. 2011. 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., evik, B., Kurtuluş, E., Tuzlalı, H.T. Marmara Bölgesi Soğan Üretim Alanlarında Yeni bir Virüs Hastalığı: Soğan Sarı Cücelik Virüsü. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi. Kahramanmaraş. 397.

İLETİŞİM:

E-posta adresi: ezgikurtulus@hotmail.com