T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇANAKKALE İLİNDE MARUL MOZAİK VİRÜSÜ (*Lettuce mosaic virus*; LMV) İZOLATLARININ TANILANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Ali KARANFİL

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: **01/07/2014**

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

ÇANAKKALE

Ali KARANFİL tarafından Prof. Dr. Savaş KORKMAZ yönetiminde hazırlanan ve **01/07/2014** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan "**Çanakkale İlinde Marul Mozaik Virüsü (*Lettuce mosaic virus*; LMV) İzolatlarının Tanılanması ve Karakterizasyonu**" başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Bitki Koruma Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. Savaş KORKMAZ ……
Başkan

Prof. Dr. Kenan KAYNAŞ ……
Üye

Doç. Dr. Figen TÜRK ……
Üye

Sıra No:……

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.

Ali KARANFİL

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde beni yönlendiren, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Savaş KORKMAZ'a ve bu çalışmaya zaman ayırarak değerli bilgi ve deneyimleri ile katkıda bulunan Prof. Dr. Bayram ÇEVİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin değerlendirilmesi ve katkılarından dolayı Prof. Dr. Kenan KAYNAŞ'a ve Doç. Dr. Figen TÜRK'e teşekkür ederim. Çalışmam süresince benden yardımlarını ve tecrübelerini esirgemeyen Arş. Gör. Hasan Tuna TUZLALI'ya ve arazi çalışmalarını beraber yürüttüğümüz Ziraat Mühendisi Seyda GÖKDAĞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca hayatımın her evresinde bana destek olan değerli aileme bu süreçte göstermiş oldukları anlayışlarından dolayı teşekkür ederim.

Ali KARANFİL

Çanakkale, Temmuz 2014

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bp	Base pair (Baz çifti)
Bç	Baz çifti
BSA	Bovine Serum Albumin
^{o}C	Santigrad derece
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleikasit
CP	Coat Protein (Kılıf protein)
da	Dekar
Da	Dalton
DNA	Deoksiribonükleikasit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
EcoRI	Endonükleaz restriksiyon enzimi
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzim Linked Immunosorbent Assay
FAO	Food and Agriculture Organization
H_2O	Su
IgG	Antibadi
IPTG	İsopropyl β-D-1- thiogalactopyranoside
Kb	Kilo baz
kDa	Kilo dalton
M	Molarite
mg	Miligram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
mA	Miliamper
Nt	Nükleotid

ORF	Açık okuma bölgesi
PBS	Potasyum fosfat tuz tamponu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
pmol	Pikomol
RNA	Ribonükleikasit
RNAse	Ribonükleaz
SDS	Sodyum dedosil sülfat
TAE	Tris Asetik Asit EDTA
Taq polimeraz	Termo stabil polimeraz enzimi
TBE	Tris Borik Asit EDTA
TBS	Tris buffer saline
TBS-T	Tris buffer saline-Tween 20
TE	Tris EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamin
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu
ha	Hektar
rpm	Dakikadaki devir sayısı
V	Hacim

ÖZET

ÇANAKKALE İLİNDE MARUL MOZAİK VİRÜSÜ (*Lettuce mosaic virus*; LMV) İZOLATLARININ TANILANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Ali KARANFİL
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Prof. Dr. Savaş KORKMAZ
01/07/2014, 79

Bu çalışma kapsamında marul yetiştiriciliği yapılan Çanakkale ili ve ilçelerinde sörveyler yürütülerek Marul mozaik virüsü (*Lettuce mosaic virus*; LMV)'ne benzer simptom gösteren bitkilerden büyük bir kısmı 2013-2014 üretim sezonuna ait olmak üzere toplam 77 örnek alınmıştır. Toplanan örnekler LMV'nin varlığını belirlemek amacı ile DAS-ELISA ile testlenmiştir. Yapılan testler sonucunda 77 örnekten 13 tanesi LMV ile enfekteli bulunmuştur. Enfekteli bulunan örnekler içerisinden 9 tanesi elde edildikleri bölgeler göz önünde bulundurularak seçilmiş ve moleküler özelliklerinin belirlenmesi amacı ile RT-PCR analizleri yapılarak, kılıf protein (CP) genleri klonlanmıştır. Klonlanan bu izolatların CP genlerinin dizilimleri çıkarılarak nükleotid ve amino asit dizilimleri ortaya konmuştur. Elde edilen nükleotid ve amino asit dizilimleri kullanılarak LMV izolatlarının kendi aralarında ve dünyadaki diğer LMV izolatları ile benzerlik oranları ve filogenetik ilişkileri ortaya konmuştur. Çalışmalar sonucunda Çanakkale LMV izolatları nükleotid dizilimleri bakımından kendi aralarında % 97-100, dünya izolatları ile % 88-100, amino asit dizilimleri bakımından ise kendi aralarında % 95-100, dünya izolatları ile % 91-100 oranlarında benzerlik göstermiştir. Ayrıca filogenetik analizler sonucunda Çanakkale LMV izolatlarının birbirleri ve dünya izolatları ile farklı düzeylerde ilişkili olduğu ortaya konmuştur.

Anahtar sözcükler: Çanakkale, Marul Mozaik Virüsü, DAS-ELISA, RT-PCR, Klonlama

ABSTRACT

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *Lettuce mosaic virus* (LMV) ISOLATES IN THE PROVINCE OF ÇANAKKALE

Ali KARANFİL
Çanakkale Onsekiz Mart University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Master of Science Thesis in Plant Protection
Advisor: Prof. Dr. Savaş KORKMAZ
01/07/2014, 79

In this study, surveys were conducted in Çanakkale. Seventy-seven suspected lettuce plants that show *Lettuce mosaic virus* (LMV) and LMV-like symptoms collected from lettuce fields. Large number of these samples belongs to 2013-2014 production season. Collected samples were tested by DAS-ELISA to determine the presence of LMV. As a result of analysis, 13 out of 77 samples were found infected with LMV. Based on the areas where the samples were collected, we chose 9 isolates representing different lettuce production areas of Çanakkale among positive isolates. In order to determine molecular properties of isolates, RT-PCR analysis were conducted and their coat protein (CP) genes were cloned and sequenced. Their nucleotide and deduced amino acid sequences were determined. The nucleotide and deduced amino acid sequences of the CP gene of LMV isolates from Çanakkale were compared with each other and LMV isolates from other different lettuce production regions of the world. While sequence analysis of CP genes showed 97-100 % (at nucleotide level) and 95-100 % (at amino acid level) identities among all 9 Çanakkale LMV isolates, LMV CP genes of Çanakkale and isolates from different lettuce producing regions of the world ranged 88-100 % (at nucleotide level) and 91-100 % (at amino acid level) identities. According to the phylogenetic trees, different phylogenetic relationships were determined both among LMV isolates from Çanakkale and with other isolates from different parts of the world.

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

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAV SONUÇ FORMU ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI iii
TEŞEKKÜR iv
SİMGELER VE KISALTMALAR v
ÖZET vii
ABSTRACT viii
ŞEKİLLER DİZİNİ xi
ÇİZELGELER DİZİNİ xiii
BÖLÜM 1 – GİRİŞ 1
BÖLÜM 2 – ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 4
2.1. Dünyada LMV ile İlgili Yapılan Çalışmalar 4
2.2. Ülkemizde LMV ile İlgili Yapılan Çalışmalar. 12
BÖLÜM 3 – MATERYAL VE YÖNTEM 15
3.1. Arazi Çalışmaları 15
3.2. Labaratuvar Çalışmaları 15
3.2.1. DAS-ELISA 15
3.2.1.1. Plate'in antibadi ile kaplanması 16
3.2.1.2. Örneklerin plate'e yüklenmesi 16
3.2.1.3. Konjugat (enzim ile işaretlenmiş antibadi) eklenmesi 16
3.2.1.4. Substrat eklenmesi 17
3.2.2. Oligonükleotid primerlerin hazırlanması 17
3.2.3. Ters Transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) 17
3.2.3.1. Total RNA izolasyonu 18
3.2.3.1.1. Basitleştirilmiş doğrudan tüpe bağlanma yöntemi 18
3.2.3.1.2. Total RNA ekstraksiyon kiti ile RNA ekstraksiyonu 18
3.2.3.2. Denatürasyon aşaması 19
3.2.3.3. Ters transkripsiyon aşaması (RT) 19
3.2.3.4. PCR aşaması (amplifikasyon) 19
3.2.3.5. Agaroz jel elektroforezi 20
3.2.4. Klonlama ve sekans analizi 20
3.2.4.1. PCR ürünlerinin saflaştırılması 20

3.2.4.2. Kılıf protein genlerinin klonlanması 21
3.2.4.2.1. Ligasyon 21
3.2.4.2.2. Transformasyon 21
3.2.4.2.3. Rekombinant kolonilerin seçimi 22
3.2.4.2.4. Koloni PCR 22
3.2.4.2.5. Plazmid izolasyonu 23
3.2.4.2.6. EcoRI restriksiyon enzimi ile kesme işlemi (digestion) 24
3.2.5. Kılıf protein geninin dizininin belirlenmesi 24
3.2.6. Kılıf protein geninin filogenetik analizi 25
BÖLÜM 4 – ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 26
4.1. Arazi Çalışmaları 26
4.2. DAS-ELISA testi 27
4.3. Total RNA İzolasyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması 31
4.4. RT-PCR Analizi 32
4.5. Klonlama ve Sekans Analizi Çalışmaları 33
4.6. Kılıf Protein Genlerinin Dizi Analizleri 38
4.6.1. Nükleotid dizi analizleri 38
4.6.2. Amino asit dizi analizleri 53
4.7. Filogenetik Analizler 63
4.7.1. Nükleotid dizilimlerine göre filogenetik soy ağaçlarının oluşturulması 63
4.7.2. Amino asit dizilimlerine göre filogenetik soy ağaçlarının oluşturulması 67
BÖLÜM 5 – SONUÇLAR VE ÖNERİLER 71
KAYNAKLAR 75
EK ÇİZELGE 1 I
EK ÇİZELGE 2 IV
ÖZGEÇMİŞ V

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 4.1. Arazide diğerlerinden farklı olarak görülen ve örnekleme yapılan bazı marul bitkileri 26
Şekil 4.2. Arazi çalışmalarının gerçekleştirildiği Çanakkale ili ve ilçeleri 27
Şekil 4.3. *Marul mozaik virüsü* ile enfekteli bulunan kuyulardaki renk değişimleri 29
Şekil 4.4. Arazi çıkışlarında virüs ve virüs benzeri hastalık ile enfekteli olduğu düşünülen marul bitkileri 30
Şekil 4.5. *Marul mozaik virüsü* ile enfekteli marul bitkilerinde görülen belirtiler 31
Şekil 4.6. Total RNA ekstraksiyonunda doğrudan tüpe bağlanma (SDT) yöntemi ve hazır total RNA ekstraksiyon kiti kullanımı sonucunda oluşan bant görünümleri 32
Şekil 4.7. RT-PCR testi sonucunda elde edilen bantlar 33
Şekil 4.8. Transformasyon yapılan *Eschericha coli* bakterilerinin ampisilin, X-Gal ve IPTG içeren LB besi ortamında oluşturdukları mavi-beyaz koloniler 35
Şekil 4.9. Ampisilin içeren LB besi ortamına ekim yapılan beyaz kolonilerin petriler içindeki görünümü 35
Şekil 4.10. *Marul mozaik virüsü* izolatlarının koloni PCR sonuçlarını gösteren jel fotoğrafları 36
Şekil 4.11. Saflaştırılan plazmidlerin EcoRI restriksiyon enzimi ile kesimlerinin yapıldığı jel görüntüsü 37
Şekil 4.12. Çanakkale *Marul mozaik virüsü* izolatlarının kılıf protein geninin nükleotid dizimleri kullanılarak Neighbor Joining yöntemi ile oluşturulan ve TreeView programı ile görüntülenen filogenetik soy ağacı 64
Şekil 4.13. Çanakkale *Marul mozaik virüsü* izolatları ile dünyadaki LMV izolatlarının kılıf protein geninin nükleotid dizilimi kullanılarak Neighbor Joining yöntemi ile oluşturulan ve TreeView programı ile görüntülenen filogenetik soy ağacı. 66

Şekil 4.14. Çanakkale *Marul mozaik virüsü* (LMV) izolatlarının kılıf protein geni amino asit dizilimi kullanılarak Neighbor Joining yöntemi ile oluşturulan ve TreeView programı ile görüntülenen filogenetik soy ağacı. 68
Şekil 4.15. Ülkemiz *Marul mozaik virüsü* (LMV) izolatları ile dünyadaki LMV izolatlarının kılıf protein geni amino asit dizilimi kullanılarak Neighbor Joining yöntemi ile oluşturulan ve TreeView programı ile görüntülenen filogenetik soy ağacı. 70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. RT-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere tasarlanan *Marul mozaik virüsü*'nün kılıf protein genine spesifik primer çifti 17

Çizelge 4.1. Çanakkale ili ve ilçelerinden yapılan örnekleme sayıları, enfekteli örnek sayısı ve enfeksiyon oranı 28

Çizelge 4.2. Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen ve klonlama çalışmalarında kullanılan *Marul mozaik virüsü* izolatları. 34

Çizelge 4.3. Dünyanın diğer bölgelerindeki *Marul mozaik virüsü* izolatlarının numaraları ve orijinleri 39

Çizelge 4.4. Çanakkale *Marul mozaik virüsü* izolatlarının kendi aralarında 726 baz çiftlik kılıf protein genine ait çoklu nükleotid dizi karşılaştırmaları 40

Çizelge 4.5. Çanakkale *Marul mozaik virüsü* (LMV) izolatları ile dünyadaki LMV izolatlarının 726 baz çiftlik kılıf protein genine ait çoklu nükleotid dizi karşılaştırmaları 42

Çizelge 4.6. Çanakkale ili ve ilçelerine ait marul üretim alanlarından toplanan *Marul mozaik virüsü* izolatlarının nükleotid dizilerinin % benzerlik oranları 49

Çizelge 4.7. Çanakkale *Marul mozaik virüsü* izolatları (LMV) ile dünyadaki LMV izolatlarının kılıf protein geni nükleotid dizilerinin benzerlik oranları 52

Çizelge 4.8. Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen *Marul mozaik virüsü* izolatlarının kılıf protein genine göre çıkarılmış amino asit dizilerinin kendi aralarında gösterdikleri benzerlik oranları. 54

Çizelge 4.9. Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen *Marul mozaik virüsü* izolatlarının kılıf protein genine göre çıkarılmış amino asit dizilerinin kendi aralarında çoklu dizi karşılaştırmaları. 56

Çizelge 4.10. Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen *Marul mozaik virüsü* (LMV) izolatları ile dünyadaki LMV izolatlarının kılıf protein genine göre çıkarılmış amino asit dizilimlerine ait çoklu dizi karşılaştırmaları 57

Çizelge 4.11. Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen *Marul mozaik virüsü* (LMV) izolatları ile dünyadaki diğer LMV izolatlarının kılıf protein genine göre çıkarılmış amino asit dizilimlerine göre benzerlik oranları.....62

BÖLÜM 1
GİRİŞ

Avrupa ve Asya'da 2500 yıldan daha fazla bir geçmişe sahip olan marul, tarım sektörü ve tıbbi alanlarda kullanılan bir bitkidir. Kültürü alındığına dair ilk kayıtlar M.Ö. 600'lü yıllarda bulunan Perslere ait olan kayıtlardır. Antik Yunanlı, Romalı ve Mısırlılar devrinde marul tarımına ait bilgiler yer almaktadır. Marulun anavatanı olarak genellikle Avrupa, Kuzey Afrika ve Asya ülkeleri olarak ifade edilmektedir (Aybak, 2002).

Marul ve salatalık sebzeler olarak bilinen yeşil sebzeler dünyada olduğu gibi ülkemizde de en çok üretimi ve tüketimi gerçekleştirilen sebzeler olarak bilinmektedir. Geliştirilen yeni çeşitlerin sayesinde günümüzde neredeyse her ay marul üretimi yapılabilmekte ve her an da pazarda tüketicilere sunulmaktadır. Yetişme süresinin 2 veya 3 ay gibi kısa bir süreye indirilmesi, açık alanlar ve örtü altında seralarda farklı sezonlarda yetiştirilmeye uygun olarak geliştirilen çeşitlerin yardımıyla hem insan beslenmesinde hem de üreticiler için önemli bir sebze olmuştur.

Ülkemizde de dünyadaki gelişmelere paralel olarak, sebzelerin insan beslenmesindeki öneminin giderek artması sonucu sebze tarımı hızlı bir şekilde gelişmektedir. Özellikle beslenme uzmanlarının dengeli bir beslenme için öğünlerde mutlaka sebze alınması şeklindeki tavsiyeleri sonucunda insanların da sebze tüketim alışkanlıkları bu doğrultuda giderek artmaktadır. Bunlara bağlı olarak dünyada ve ülkemizde verim ve kaliteyi arttırmaya yönelik çalışmalar hız kazanmıştır.

Dünyada marul yetiştiriciliği yapılan ülkelere bakıldığında Çin yaklaşık olarak 14.000.000.00 tonluk üretimi ile birinci sırayı almaktadır. Çin'i 3.875.000.00 tonluk üretimi ile ABD ve 1.075.000.00 tonluk üretimi ile Hindistan takip etmektedir. Türkiye ise 419.066.00 tonluk üretimi ile dünya marul üretimi gerçekleştirilen ülkeler arasında kendine 9. sırada yer bulmuştur (Anonim, 2012). Ülkemizdeki marul üretim miktarının üst sıralarda bulunan ülkelere göre nispeten daha düşük olmasının nüfus ve beslenme alışkanlıkları ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Ülkemizde 2013 yılı verilerine göre 213.239 da alanda marul yetiştiriciliği yapılmaktadır. Toplam üretim miktarı ise 436.785 ton olarak ifade edilmiştir. Çanakkale'nin ise ülkemiz iller sıralamasında yüksek bir yerde olmamasına rağmen

marul üretiminde genel olarak kendine yeten bir il olduğu söylenebilir. Çanakkale'de 1.810 da alandan 2.841 ton marul üretimi sağlanmaktadır. Dekara verim genel olarak Türkiye altında gözükmektedir. Burada da üretimin genel olarak ev bahçeleri tarzında açık alanlarda yapılmasının etkili olabileceği düşünülmektedir. Genellikle marulun ülkemizde 3 farklı çeşidinin yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bunlar kıvırcık, göbek ve aysberg çeşidi marullardır. Ülkemizde en fazla göbek marul yetiştiriciliği yapılmakta bunu takiben kıvırcık ve aysberg gelmektedir. Çanakkale'de ise ülkemizdeki diğer bölgelerden farklı olarak en fazla kıvırcık daha sonra ise göbekli ve aysberg yetiştiriciliği gelmektedir (Anonim, 2013).

Ekonomik olarak işletmelere önemli bir getiri kaynağı olan marul tarımında ekonomik kayba neden olan sorunların başında bitki koruma problemleri ile ilgili olanlar gelmektedir. Bu sorunlara hastalık, zararlı ve yabancı otlar neden olmaktadır. Bu organizmalardan savaşılması en güç olan grubu hastalık etmenleri oluşturmaktadır. Özellikle toprak kökenli fungal hastalıklar ve virüs hastalıkları marul tarımında verim kaybına neden olan başlıca organizma grubunu oluşturmaktadır. Ancak genel olarak fungal hastalıklara karşı kullanılabilecek kimyasalların varlığı nedeniyle, virüs hastalıkları sadece marul üretimi için değil gerçekleştirilen tüm bitkisel üretim faaliyetlerinde mücadelesi olmadığı için ayrı bir öneme sahiptir. Marul alanlarında verim kaybına neden olan viral etmenlerin başında ise Marul mozaik virüsü (*Lettuce mosaic virus*; LMV) gelmektedir (Dinant ve Lot, 1992).

LMV dünyada potansiyel olarak marulun en yıkıcı virüs hastalığı olarak tanımlanmakta ve dünya genelinde dağılım göstermektedir (Dinant ve Lot, 1992; Zerbini ve ark. 1995). LMV, 750x13 nm çapında ipliksi partiküllere sahiptir. Tek sarmal pozitif duyarlılıkta RNA (+ssRNA) içermektedir. Bu +ssRNA 10.080 nükleotid içermekte olup, protein kılıfı (CP) ise 33 kDa ağırlığındadır (Dinant ve Lot, 1992). Patojenin termal inaktivasyon noktası 55-60 ^{o}C, son sulandırma noktası ise 10^{-1}-10^{-2}'dir (Fidan ve Türkoğlu, 1988). Etmen tohum ve non-persistent şekilde yaprak bitleri ile taşınmaktadır (Tomlinson, 1970; Dinant ve Lot, 1992).

LMV, marul yetiştiriciliği yapılan her yerde yaygın olarak bulunmaktadır. Marul bitkilerinde ciddi ekonomik kayıplara neden olabilmektedir. Genel olarak LMV enfeksiyonlarında damar açılmaları görülen ilk simptomlar olarak tanımlanmaktadır. Bunu takiben koyu veya açık yeşil lekeler şeklinde mozaik simptomları görülmektedir.

Mozaik simptomlar genellikle damarlar etrafında görülür. Enfekteli bitkiler sağlıklı bitkilere göre bariz şekilde küçük kalır. Eğer bitkiler erken dönemlerinde enfeksiyona uğrarsa cücelik, baş bağlamama ve sağlıklı bitkilerin ancak yarısı kadar gelişme gösterilebileceği bildirilmiştir. Bu durumda meydana gelen kayıpların % 50'ye kadar çıkabileceği, aynı zamanda tohum verimini de önemli ölçüde azalttığı belirtilmiştir (Sutic ve ark., 1999).

LMV oldukça geniş sayılabilecek bir konukçu dizinine sahiptir. Çoğunluğu *Compositae* familyasına ait ve mekanik olarak da taşınabilen 121 türü enfekte edebilmektedir (Horvath, 1980). Ekonomik olarak önemli konukçuları ise marul, ıspanak ve bezelyedir. Aynı zamanda birçok yabancı otu da doğal olarak enfekte edebilmektedir. Özellikle yabancı otlarda lokal lezyonlar enfeksiyonun gerçekleştiği yapraklarda görülmekte, sistemik enfeksiyonlar ise bitkilerin erken dönemlerinde enfeksiyona yakalanması sonucu görülmektedir (Sutic ve ark., 1999).

LMV'nin 15 yaprak biti türü ile taşınmaktadığı bilinmektedir. Genel olarak *Myzus persicae, Macrosiphum euphorbiae, Aphis gossypii, Pemphigus bursarius* LMV'yi etkin şekilde taşıyan yaprak biti vektörleri olarak tanımlanmaktadır (Messian ve Lafor, 1965). LMV, enfekteli bitkilerin özsuları ile kolaylıkla mekanik olarak taşınabilmektedir. Marul tarımının yoğun şekilde yapıldığı alanlarda bu durum büyük bir sorun oluşturmaktadır.

Etmenin yaptığı epidemiler sonucunda marul alanlarında şiddetli zararlar ve verim kayıpları oluşturarak ekonomik anlamda önemli kayıplara neden olabilmektedir. Etmenin neden olduğu kayıplar tohum sertifikasyonu, ekim nöbetine benzer uygulamalar ile marul yetiştiriciliğinde boş bir periyot bırakılması, yabancı ot kontrolü ve yaprak bitleri ile savaşım gibi önlemler ile azaltılabilir (Fakhfakh ve ark. 2001).

Bu çalışmada Çanakkale ili ve ilçelerinde *Marul mozaik virüsü* simptomlarına benzer simptom gösteren marul bitkilerinden örnekler alınarak DAS-ELISA testi ile *Marul mozaik virüsü*'nün varlığı tespit edilmiştir. Pozitif çıkan örneklerden 9 tanesi toplandığı bölgeler de göz önüne alınarak rastgele seçilmiştir. Seçilen toplam 9 izolat klonlanarak nükleotid (nt) ve amino asit (a.a.) dizilimlerine göre benzerlik çizelgeleri ve soyağaçları çıkarılmıştır. Ayrıca her iki dizilim dünya izolatları ile karşılaştırılmıştır.

BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

LMV, marul virüs hastalıkları içerisinde marulun en yıkıcı hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Hastalık ilk kez 1921 yılında Florida'da tespit edilmiştir (Jagger, 1921). Bu tarihten sonra diğer ülkelerde de tespit edilmeye başlanmış ve etmenin tanılanmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. LMV'nin varlığı ülkemizde ilk kez Florida'da varlığı tespit edildikten yaklaşık 40 yıl sonra 1963 yılında Ege bölgesinden bildirilmiştir (Özalp, 1964). Daha sonralarında da farklı araştırmacılar LMV ile çalışmaya başlamıştır. Yapılan ilk çalışmalar simptomatolojik gözlemler şeklinde başlamış, virüsün bazı biyolojik, serolojik ve biyokimyasal özelliklerini belirleyerek karakterize edilmeye çalışılarak devam edilmiştir. Etmenin özellikle Akdeniz ülkelerinde marul alanlarında epidemilere neden olabileceği ve LMV'nin hem yaprak biti hem de tohum ile taşınmasının ise bu riski giderek arttırdığı vurgulanmıştır (Jafarpour ve ark., 1979; Moreno ve ark., 2012).

LMV izolatları ve ırkları biyolojik olarak virülenslikleri bakımından değişkendir. Tohumla taşınabilen LMV izolatları 'Most' olarak adlandırılan grupta yer alır ve bu grup izolatları LMV'ye karşı dayanıklılık sağlayan "*mo1*^{1}" ve "*mo1*^{2}" genlerini kırma yeteneğine sahiptir. "Most" grup izolatları konukçu bitkiler dayanıklılık genine sahip olsa bile şiddetli enfeksiyonlara neden olabilecek potansiyele sahiptir ve enfekteli tohumlar ile bu izolatlar ve/veya streynler dünya çapında yayılım gösterebilmektedir. Diğer LMV grupları ise "common" ve "diğerleri" olarak gruplandırılmaktadır. LMV ile ilgili yapılan moleküler çalışmalardan elde edilen sekans bilgilerinden LMV izolatlarının filogenetik olarak 3 gruba ayrıldığı söylenebilir. Bu 3 grubun LMV izolatlarının patojenisitesi ve dayanıklılık genleriyle olan ilişkilerinden çok coğrafik orjinleri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Dinant ve Lot, 1992; Revers ve ark., 1997a).

2.1. Dünyada LMV ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Jafarpour ve ark. (1979) tohum kaynaklı LMV ve BCMV (Fasulye adi mozaik virüsü; *Bean common mosaic virus*) etmenlerinin tohumda iken tespiti için yapmış oldukları çalışmada ELISA'nın biyolojik indekslemede kullanılan *Chenopodium quinoa*'ya göre çok daha fazla hassas olduğunu ve bu etmenlerin rutin takiplerinde çok daha kolay izlemeye imkan verdiğini belirtmişlerdir. BCMV için 2000 sağlıklı tohumda

1, LMV için ise 1400 sağlıklı tohum arasından 1 enfekteli tohumu tespit edebildiğini (yaklaşık olarak 10 ng saflaştırılmış virüs) belirtmişlerdir.

Zerbini ve ark. (1995) Salinas vadisinde görülen LMV epidemisini araştırmak için bölgede yetiştiricilik yapılan alanlarda bulunan mozaik, yaprak deformasyonları, bodurluk ve nekrotik leke simptomu gösteren marul bitkilerinden örnekler almışlardır. Biyolojik indeksleme amacıyla *C. quinoa*, *Nicotiana benthamiana* bitkilerine 6 yapraklı olduğu dönemde, "Salinas" çeşidi marul bitkilerine ise 4 yapraklı olduğu dönemde mekanik inokulasyon gerçekleştirmiştir. Ayrıca *N. benthamiana* çeşidinde de belirledikleri izolatları çoğaltmışlardır. Mekanik inokulasyondan 3 hafta sonra simptom gösteren bitkilere yaptığı ELISA testi ile de bu bitkilerdeki LMV'nin varlığını kontrol etmişlerdir. Yapmış oldukları mekanik inokulasyon çalışmaları sonucunda *C. quinoa* bitkilerinin inokulasyon yapılan yapraklarında klorotik lokal lezyon ve yaprak deformasyonlarının da dahil olduğu sistemik belirtiler, *N. benthamiana* ve marul bitkilerinde ise sistemik mozaik belirtiler gözlemlemişler ve izolatlar arasında simptomatolojik olarak bir fark olmadığını belirtmişlerdir. Seçilen izolatların moleküler karakterizasyonunu da gerçekleştirmişlerdir. RT-PCR çalışmalarında LMV spesifik primer, potyvirüs grubuna spesifik primer ve LMV enfeksiyonlarında nekroz oluşumunda rol aldığı düşünülen RNA bölgesini kesen *Bam*HI enzimini kullanarak istenilen bant büyüklüklerini (sırasıyla 1.3 kbp, 2.0 kbp, 1.0 kbp) agaroz jel elektroforezinde görüntülemişlerdir. İzolatların T-A klonlama sistemiyle klonlanması ise ilk olarak içerdikleri yüksek 2.0 kbp değeri nedeniyle başarısız olmuşlardır, daha sonra *Bam*HI kesim enzimi kullanılarak elde edilen yaklaşık 1.0 kbp değerine sahip genom bölgesini kullanarak, CP genine spesifik primerler yardımı ile amplifiye ettikten sonra klonlamışlardır. Yapılan sekans çalışmaları sonucunda izolatların a.a. benzerlik oranlarının % 95 ile % 99 arasında benzerlik oranına sahip ve potyvirüslerin afitler ile taşınımı için gerekli olan DAG a.a. motifini de içerdiğini bildirmişlerdir. LMV izolatlarının moleküler karakterizasyonu sonucunda CP genindeki hypervariable bölgesinde izolatların biyolojik özelliklerini bir değişiklik meydana getirmeksizin izolatlar arasında % 12'lik bir açılma meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca tahminen 278 a.a. içeren protein kılıf geninin yaklaşık olarak da 31 kDa olduğunu belirtmişlerdir.

Revers ve ark. (1997a) LMV'nin ticari olarak marul yetiştiriciliği yapılan alanlarda şiddetli enfeksiyonlara neden olduğunu ve LMV izolatlarının marul

bitkilerindeki dayanıklılık genlerini kırma yeteneği konusunda geniş bir biyolojik çeşitlilik gösterdiğini belirtmişlerdir. LMV ile bitki arasındaki bu etkileşimlerin daha iyi anlaşılabilmesi için farklı virülenslik derecesine sahip 10 LMV izolatının biyolojik ve moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada kullanılan LMV izolatlarından 9 tanesinin Avrupa (Fransa, İspanya, Yunanistan), 1 tanesinin ise Yemen orijinli olduğunu belirtmişlerdir. Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanmak üzere yetiştirilen marul bitkilerine inokulasyon gerçekleştirmişlerdir. İnokulasyondan yaklaşık 22 gün sonra enfekteli bitkileri inokulum kaynağı olarak kullanmışlardır. Yaptıkları bu çalışmaların sonucunda mekanik inokulasyon çalışmalarında birçok marul çeşidinde tipik mozaik simptomları yerine damar açılmaları, sarımtırak lekeler ve bodurluk belirtileri gözlemişlerdir. Moleküler çalışmalarda IC-RT-PCR yöntemi ile tasarladıkları 3 farklı primerleri kullanmışlardır. IC-RT-PCR testleri sonucunda istenilen bant büyüklüklerini elde ederek klonlama ve sekans analizlerini gerçekleştirmişlerdir. IC-RT-PCR çalışmaları sonucunda LMV'ye ait kullandıkları primerlere bağlı olarak 738 bç (bölge 1), 346 bç (bölge 2) ve 297 bç (bölge 3) büyüklüğüne karşılık gelen bant büyüklüklerini elde etmişlerdir. Klonlama çalışmalarını takiben gerçekleştirilen sekans analizleri sonucunda oluşturulan dendogramlarda izolatların 3 farklı gruba ayrıldığını belirtmişlerdir. Birinci grupta Batı Avrupa izolatları, ikinci grupta Yunanistan ve son grupta ise Yemen izolatının yer aldığını bildirmişledir. Sekans analizi gerçekleştirilen bölge 1'de izolatlar arasında benzerlik oranını % 77-99, bölge 2'de % 73-100 ve son olarak bölge 3'te ise % 94-100 arasında bulmuşlardır. Bu sonuçlara göre bölge 3'teki benzerlik oranına dayanarak bu bölgenin en iyi korunan bölge olduğu sonucuna varmışlardır.

Revers ve ark. (1997b) biyolojik özellikleri bakımından farklı 2 LMV izolatının (LMV-0 ve LMV-E) sekans dizilerinin tamamını belirleyerek bu dizilerin karşılaştırmasını yapmışlardır. LMV-0, bazı marul çeşitlerinde bulunan *mo1*^{1}-*mo1*^{2} dayanıklılık genlerini kırma yeteneğinde değilken, LMV-E'nin ise bu dayanıklılık genlerini kırabilme yeteneğinde olduğunu belirtmişlerdir. Her iki izolatın da genomunda Poly-A kuyruğu hariç 10.080 nt içerdiğini, 3255 a.a. kodladığını, açık okuma bölgelerinin (open reading frame; ORF) RNA'nın 5' ucunda bulunan ve kodlanmayan 103 nt içeren bölgeler ile 3' ucunda bulunan ve kodlanmayan 212 nt içeren bölgeler ile sınırlandırıldığını belirtmişlerdir. Bugüne kadar 377 a.a.'le en uzun protein olduğu bilinen P3 yerine ise P1 proteinin 437 a.a. taşıdığını bularak, en uzun proteinin P1

olduğunu belirtmişlerdir. Nt ve a.a. dizilerinin karşılaştırılması sonucunda ise izolatların sırasıyla % 94-97 arasında benzerlik gösterdiklerini, izolatlar arasındaki en büyük farklılığın P1 ile CP'deki N terminal bölgesinde olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu çalışmadan çıkan sonuçların izotların dayanıklılığı kıran genotiplerin ya da tohum ile taşınma gibi özelliklerinin belirlenmesi açısından kesin bir yargı içermediğini sadece bu faktörlerin belirlenmesi açısından ilk basamak olduğunu vurgulamışlardır.

German-Retana ve ark. (2000) marullarda dayanıklılığı sağlayan genleri kıran bir LMV izolatını (LMV-E) yeşil floreans proteini (GFP) ve β-glucuronidase (GUS) kullanarak LMV'nin yardımcı proteinlerinde (HC) ifade edilmesini sağlayacak şekilde modifikasyon gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra bu izolatın LMV'ye karşı duyarlı ve dayanıklı çeşitlerdeki virüsün bitki içindeki dağılımını ve virülensliğini belirlemişlerdir. Konukçu içerisinde virüs birikimini GUS için histokimyasal boyamalar ile GFP için ise UV ışık altında floresanslığına bakarak belirlemeye çalışmışlardır. Çalışmalarının sonucunda GFP ile işaretli izolatın GUS ile işaretli olana göre bitki içinde daha az replike olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca her iki izolatın da orijinal izolata göre simptom şiddetlerinde bir azalma olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak her iki rekombinant izolatın da dayanıklılığı sağlayan *mo1*^{2} genini kıramadığı, GUS ve GFP ile HC'leri işaretlenmiş rekombinant izolatların da virüs biyolojisine önemli ölçüde olumsuz etkide bulunduğunu ve LMV'ye karşı hassas çeşitlerde bile rekombinant izolatların patojenisitelerinin düştüğünü belirtmişlerdir.

Fakhfakh ve ark. (2001) Tunus marul alanlarında yaygın bir şekilde LMV enfeksiyonları görmeleri üzerine, bu enfeksiyonların çok az sayıda enfekteli tohumdan bile kaynaklanabileceğini belirtmiştir. Bu konu üzerinde yaptıkları çalışmalarda LMV enfeksiyonu ile bulaşık alanlardan 9 LMV izolatı elde etmişlerdir. Bu izolatların 2 tanesinin klasik ıslah yöntemleri ile elde edilmiş ve LMV enfeksiyonuna dayanıklı olduğu belirtilen 'Mantali' çeşidi marulda bulunan *mo1*^{1} dayanıklılık genini fenotipik olarak kırabildiğini belirtmişlerdir. Moleküler seviyede bu durumu açıklığa kavuşturmak için bir takım çalışmalar yapmışlardır. RT-PCR çalışmalarında 9 LMV izolatında da başarılı bir şekilde 278 bç'ye karşılık gelen bant büyüklüklerini elde etmişlerdir. Filogenetik çalışmalarda 8 izolatın kısmi sekans analizi çıkarılarak filogenetik ağaçlar ve a.a. yapıları çıkarılmıştır. İzolatların a.a. yapılarının ortaya çıkarılması sonucu, LMV'nin yaprak bitleri ile taşınmasını sağlayan DAG a.a. motifinin 8 LMV izolatının da bulundurduğunu belirtmişlerdir. Filogenetik ağaçların ortaya

çıkarılmasında ise Tunus LMV izolatlarının kendi içlerinde 2 gruba ayrıldığını, ilk grupta bulunan 2 izolatın sekans dizini çıkarılan bölge bakımından LMV-13 ve LMV-AUD (Revers ve ark., 1997a) ile aynı olduğunu belirtmişlerdir. Diğer grupta bulunan izolatların ise birbirlerine çok sıkı bir şekilde benzer olduğunu ve bir önceki grupta olduğu gibi 2 izolatın da sekans dizilerinin benzer olduğunu belirtmişlerdir.

Krause-Sakate ve ark. (2002) farklı ülkelerden elde ettikleri 73 adet LMV izolatının moleküler karakterizasyonunu yapmak amacıyla bir takım çalışmalar yapmışlardır. RT-PCR çalışmalarında LMV genomunun NIb ve CP bölgelerinin bir kısmını içeren, 8936 ile 9151 arasındaki nt dizinini çoğaltan primer çiftleri kullanılmıştır. RT-PCR çalışmalarında bir izolat hariç tüm izolatlarda 216 bç'ne karşılık gelen bant büyüklüklerini agaroz jel elektroforezinde görüntülemişlerdir. Sadece bir izolatta ise 215 bç'ne karşılık gelen bant büyüklüğü görülmemiştir. Bunun sebebini ise bu izolotta gen delesyonu meydana geldiği şeklinde açıklamışlardır. RT-PCR ürünlerini kullanarak yapılan klonlama çalışmalarında ise pZErO-Kan (Invitrogen, San Diego, CA) ya da pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI) vektörlerini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Yapılan sekans analizlerini takiben çıkarılan filogenetik soy ağaçlarında 3 farklı grup oluştuğu belirtilmiştir. Bu filogenetik ağaçta meydana gelen son grubu, LMV izolatlarının en yaygın olduğu grup olarak tanımlamışlar ve 2 alt gruba ayrıldığını belirtmişlerdir. Sırasıyla her bir grupta 1, 10 ve 62 izolat yer almıştır. Birinci grupta sadece Yunanistan'dan elde edilen izolatın yer aldığı belirtilmiştir. Ayrıca 216 nt içinden 119 nt'nin ve 72 a.a.'ten 45 tanesinin tüm izolatlar arasında polimorfik bir yapıya sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Mazier ve ark. (2004) *in vitro*'da yetiştirilen LMV'ye dayanıklı marul kültürlerinin, rekombinant LMV izolatlarına karşı testlenmesi ile ilgili bir takım çalışmalar yapmışlardır. LMV izolatlarının HC'lerini GFP ile işaretlemişlerdir. Elde ettikleri bu yeni rekombinant LMV izolatını LMV'ye karşı farklı duyarlılıktaki marul çeşitlerine *in vitro*'da inokule ederek bitkileri takip etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda bu yöntemin çevresel bakımdan, rekombinant izolatların ve karantinaya dahil olan viral etmenlerin testlenmesinde daha güvenilir olduğunu bildirmişlerdir.

Peypelut ve ark. (2004) birçok LMV izolatının *mo1* dayanıklılık genini taşıyan çeşitleri enfekte edebilme yeteğine sahip olduğunu ve bu izolatların tohumla taşınabildiğini belirtmişlerdir. Yapmış oldukları RT-PCR çalışmalarını bu tip izolatları

tespit edecek şekilde ayarlamışlardır. Bunların yanında LMV izolatlarının genel olarak 3 farklı gruba ayrıldığını, bunların da "most", "common" ve bunların dışında yer alan "diğeri" olarak tanımladıkları 3 farklı gruptan oluştuğunu bildirmişlerdir. Yapmış oldukları bu çalışmalarda 21 adet coğrafi olarak farklı LMV izolatının moleküler çeşitliliğini araştırmışlardır. Bunu yaparken de LMV genomunun merkez kısmını çoğaltacak primer çiftlerini LMV izolatları arasında doğal rekombinasyonları en aza indireceklerini düşünerek seçtiklerini belirtmişlerdir.

Nebreda ve ark. (2004) İspanya'da marul ve brokoli alanlarındaki LMV'nin etkin vektörlerinin tespiti ve populasyon dinamiklerini belirlemek amacıyla yürüttükleri çalışmalarının sonucunda LMV'yi etkin olarak taşıyabilen yaprak biti türlerini *M. persicae, Aphis gossypii* ve *Marcrosiphum euphorbia* olarak belirtirlerken *Aphis fabae* ve *Hyperomyzus lactacae*'nin ise düşük etkinlikte LMV'yi taşıyabildiğini bildirilmiştir. Ayrıca *Rhopalosiphum padi* ve *Nasonovia ribisnigri*'yi ise LMV'nin vektörü olmadığı olarak tanımlamışlardır.

Krause-Sakate ve ark. (2005) elde etmiş oldukları AF199 LMV izolatının "Ithaca" ve "Vanguard 75" çeşidi marul bitkilerinde ilk olarak lokal lezyonlar oluşturduğunu ve bunu takiben sistemik solgunluk sonucu bitkilerde ölümler meydana getirdiğini belirtmişlerdir. Virüsün bu karekteristik fenotipik özelliklerinin P1 proteini ve/veya CI proteininin "Ithaca" çeşidi marul bitkilerindeki AF199'un neden olduğu solgunlukların açıklanmasında yetersiz olduğunu belirtirken, "Vanguard 75" çeşidinde ise durumun tam tersi olduğunu belirtmişlerdir. Bu durumdan her iki çeşitteki bu simptomlara neden olan mekanizmaların farklı olduğu sonucuna varmışlardır. Çeşitlerde solgunluklara neden olan LMV izolatının fenotipik özelliklerinin yukarıda belirtilen 2 farklı protein tarafından direkt olarak ilişkili olmadığını belirtirlerken, simptom şiddetine protein yapısından ziyade RNA'nın daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Ormaz ve ark. (2006) İran'ın 5 farklı ilinden 2004-2005 üretim sezonu boyunca marul alanlarından LMV ile enfekteli olduğunu düşündükleri bitkilerden örnekler almışlardır. Örnekleri ilk olarak ELISA ile testlemişler ve pozitif çıkan örneklerden test bitkilerine mekanik inokulasyon gerçekleştirmişlerdir. Poliakrilamid jel elektroforeziyle (PAGE) etmene ait 30.33 kDa ağırlığında CP genine ait bantları gözlemişlerdir. IC-RT-PCR aşamasında ise Zerbini ve ark. (1995) tarafından belirtilen primer çiftlerini kullanarak 1300 bç'ne karşılık gelen bant büyüklüklerini elde etmişlerdir. Nt dizilerinin

karşılaştırılması sonucunda ise izolatların % 98 oranında benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir.

Candresse ve ark. (2007) 8 farklı ülkeden elde ettikleri LMV izolatlarının serolojik olarak birbirleriyle ilişkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla LMV izolatları arasındaki immünolojik çeşitliliği ayırt edebilecek 19 monoklonal antibadi (mAb) kullanmışlardır. Bu 19 mAb'yi kullanarak gerçekleştirdikleri TAS-ELISA (triple-antibody-sandwich; TAS) testleri sonucunda 15 LMV izolatının serolojik olarak 7 farklı gruba ayrıldığını ve izolatların en az 5 farklı bağımsız bağlanma bölgesine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Aynı zamanda bu çalışma LMV izolatlarının epitop yapılarının farklı mAb'ler kullanılarak belirlenmesi ile ilgili ilk çalışma olma özelliğini de taşımaktadır.

Firmino ve ark. (2008) Sao Paulo'da 2002-2005 yıllarında 3 farklı marul üretim bölgesinde sörveyler düzenlemişlerdir. Şüpheli gördükleri 1362 bitkiden örnekler alarak üniversal primerler ile RT-PCR'da bu örnekleri LMV'ye karşı testlemişler ve 504 örnekte enfeksiyon saptamışlardır. Pozitif çıkan örneklere yaptıkları ikinci RT-PCR çalışmalarını ise LMV-most ve LMV-common'a spesifik primerler kullanarak gerçekleştirmişlerdir. 340 örnekte LMV-common, 100 örnekte ise LMV-most enfeksiyonunu tespit etmişlerdir.

Jordan ve ark. (2008) süs bitkilerinde enfeksiyon gerçekleştiren potyvirüslerin tespitini ve moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla mozaik, lekelenme ve çiçeklerinde renk açılması gösteren bitkilerden topladıkları örnekleri ilk olarak potyvirüs grubuna spesifik mAb'ler ile araştırmışlardır. İkinci adım olarak ise serolojik test sonucunda pozitif sonuç veren örneklerden total RNA ektrasyonunu gerçekleştirerek RT-PCR aşamasını potyvirüs grubuna spesifik primer çiftini kullanarak yapmışlar ve sekans analizini gerçekleştirmişlerdir. Sekans analizi sonucunda LMV ile birlikte potyvirüs grubuna ait 10 farklı virüs daha tespit etmişlerdir.

Naidu ve ark. (2008) ABD'de ev bahçeleri ve yol kenarında estetik olarak yaygın şekilde yetiştiriciliği yapılan *Coreopsis auriculata* bitkisinin yapraklarında gördükleri klorotik lekeler ve halkalar sonucu bu bitkilerden örnekler alarak tütün bitkilerine (*Nicotiana benthamiana*) bu örneklerden mekanik inokulasyon gerçekleştirmişler ve tütün bitkilerinde sistemik mozaik belirtiler gözlemlemişlerdir. Bu yapraklara uyguladıkları, potyvirüs grubunu tanıyan antibadi kullanarak gerçekleştirdikleri ELISA

testlerinin de pozitif çıkması üzerine total RNA ektrasyonunu gerçekleştirerek, potyvirüs grubu virüsleri tanıyan dejenere primer kullanarak gerçekleştirdikleri RT-PCR aşaması sonucunda 1000 bç büyüklüğünde bantlar elde etmişlerdir. RT-PCR ürünlerini klonlayarak genom dizilerinin çıkarılması sonucunda bu dizilerin gen bankasında karşılaştırmasını yaparak bu etmenin LMV olduğunu bulmuşlardır. Gen bankasındaki diğer izolatlar ile yaptıkları karşılaştırmalarda ise NIb/CP genleri bakımından Fransa, Çin ve Brezilya izolatı ile % 93-99 arasında benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca bu çalışmanın LMV'nin *C. auriculata* bitkisindeki ilk kayıt olduğunu ve etmenin özellikle bu bitkide afit ile yayıldığını ve tohumla taşınma denemelerinin ise yapılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Soleimani ve ark. (2011) İran'ın Tahran ilindeki marul alanlarından 452 adet viral hastalık simptomu gösteren bitkilerden örnekler toplamışlardır. Topladıkları bu örnekleri DAS-ELISA testi ile LMV, CMV, TSWV, ArMV (*Arabis mosaic virus*)'ye karşı testlemişlerdir. DAS-ELISA testleri sonucunda yukarıda verilen sıra ile tek enfeksiyon oranlarını % 21, % 16 ve % 10 bulurken, ArMV enfeksiyonuna ise rastlamamıştırlar. Ayrıca örneklerin bazılarında ise karışık enfeksiyon bulunmuştur. LMV+CMV enfeksiyonunu % 16, LMV+TSWV enfeksiyonunu % 8 ve CMV+TSWV enfeksiyonunu ise % 8 olarak bulmuşlardır. Örneklerin % 5'inde ise 3 virüsün enfeksiyonunu tespit etmişlerdir. Bu sonuçları referans göstererek Tahran marul alanlarında LMV'nin temel sorun oluşturan etmen olduğu sonucuna varmışlardır. TSWV'nin İran marul alanları, CMV ve LMV'nin ise Tahran marul alanları için ilk kayıt olduğunu belirtmişlerdir. Western blot çalışmaları sonucunda LMV'nin CP'ye ait 29 kDa ağırlığına karşılık gelen, IC-RT-PCR çalışmalarında da LMV'ye ait 1300 bç'ne karşılık gelen bantları elde etmişlerdir.

Sharma ve Jain (2013) Hindistan'da 2012 yılında marul alanlarında gördükleri viral hastalık simptomları üzerine yaptıkları çalışmalar sonucunda bu belirtilere neden olan etmenin LMV olduğunu bulmuşlardır. Yaptıkları çalışmalarda ilk olarak total RNA ekstraksiyon kiti (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen-Valencia-CA) kullanarak enfekteli bitkilerden total RNA'yı ekstre etmişlerdir. RT-PCR çalışmalarında potyvirüs grubuna spesifik primer çiftlerini kullanarak 1.8 kb civarı RT-PCR ürünleri elde etmişlerdir. Elde ettikleri LMV izolatlarından bir tanesinin RT-PCR ürününü pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI) sistemini kullanarak klonlama işlemini gerçekleştirmişler ve bunu takiben sekans analizini yapmışlardır. Gen dizilerinin elde edilmesi sonucunda

LMV CP genlerinin veri tabanında bulunan 2 Amerika, 2 Birleşik Krallık, 2 Brezilya ve 1 Çin izolatı ile karşılaştırılması sonucunda % 90-99 arasında benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. LMV izolatlarının 3'UTR (untranslated region) 245 bç'lik bölgesinin karşılaştırılması sonucunda ise % 99-100 benzerlik gösterdiğini, 654 bç'lik NIb (nuclear inclusion body) bölgesinin ise % 93-99 arasında benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca a.a. dizilerinin ortaya çıkarılması sonucunda afit ile taşınmayı sağlayan DAG ve WCIEN desenini içerdiğini de bildirmişlerdir.

Zangeneh ve ark. (2014) yedi farklı marul çeşidinin coğrafik olarak farklı bölgelerden elde edilmiş 2 adet LMV izolatına (LMV-A, LMV-T) karşı virüs replikasyonu, simptom şiddeti ve enfeksiyon oranı gibi çeşitlerin vereceği tepkileri belirlemeye çalışmışlardır. Çalışma kapsamında yapılan tüm araştırmalar ve istatistiki analizler sonucunda LMV-A'nın, LMV'ye karşı *mo1*^{2} dayanıklılık genini taşıdığı bilinen "Salinas 88" marul çeşidini sistemik olarak enfekte edebilme yeteneğinde olduğu bildirmişlerdir. Aynı zamanda araştırma kapsamında kullanılan tüm marul çeşitlerinin LMV-A enfeksiyonu üzerine hassas olduğunu bildirirken, her 2 izolatın da 7 farklı marul çeşidinde enfeksiyon yapabilme yeteneğinde olduklarını bildirmişlerdir.

2.2. Ülkemizde LMV ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Özalp (1964) Ege bölgesinde virüs hastalıklarının teşhisini yapmak amacıyla 1961 ve 1962 yıllarında bazı sebzelerden aldığı örneklere serolojik testler ve özsuyu taşıma denemeleri gerçekleştirmiştir. Bu çalışmalarının sonucunda çok sayıda farklı virüsün yanında "Yedikule" marul çeşidinde LMV varlığını tespit etmiştir. Aynı zamanda bu çalışma LMV'nin ülkemizde bulunduğuna dair ilk kayıt olma özelliğini taşımaktadır.

Tekinel ve ark. (1969) Türkiye'nin turfanda sebze üretiminin en fazla olarak yapıldığını belirttiği Mersin ilinde biber, patlıcan, fasulye ve marul bitkilerindeki virüsleri tespit etmek amacıyla indikatör bitkilere mekanik taşınma denemeleri ile bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma sonucunda yukarıdaki sebzelerde çok sayıda virüsün varlığını tespit etmişlerdir. Bu virüslerden bir tanesini de LMV olarak bulmuşlardır.

Fidan ve Türkoğlu (1988) 1983 yılında İzmir ili marul alanlarında yapmış oldukları sörveyler sonucunda 165 da marul alanı gezerek toplamda 86 farklı üretim alanından örnekler toplamışlardır. Topladıkları örnekleri mekanik inokulasyon yöntemiyle indikatör bitkilere taşıyarak virüs hastalıklarını tespit etmeye çalışmışlardır.

Çalışmanın sonucunda LMV enfeksiyon oranını % 5.7 olarak tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada LMV'nin fiziksel özelliklerini de karakterize ederek tohumla taşınma denemeleri gerçekleştirmişler ve LMV'nin vektörü olarak ise şeftali yeşil yaprak biti (*Myzus persicae)* türünü bildirmişlerdir.

Özdemir ve Erilmez (2007) Denizli ilinde yapmış oldukları çalışmalarında biber, patlıcan ve marul bitkilerinden örnekler alarak DAS-ELISA testi ile LMV ve farklı 4 virüsün varlığını tespit etmeye çalışmışlardır. Testlenen marul örneklerinde yaklaşık olarak % 6 oranında LMV enfeksiyonu tespit ettiklerini belirtmişlerdir.

Uzunoğulları ve Beşirli (2011) Yalova ilinde 2010 ve 2011 yıllarında önemli bir pazar isteğine sahip olduğunu belirttikleri "Yedikule" marul çeşidinde viral hastalık benzeri simptom görülmesi üzerine marul alanlarına sörveyler düzenleyerek 400 bitkiden yaprak örnekleri toplamışlardır. Topladıkları örnekleri DAS-ELISA testi ile Hıyar mozaik virüsü (*Cucumber mosaic virus*; CMV), Domates lekeli solgunluk virüsü (*Tomato spotted wilt virus*; TSWV) ve LMV'ye karşı testlemişlerdir. Çalışmanın sonucunda örneklerin % 40'ının LMV ile enfekteli olduğunu belirtmişlerdir.

Alan (2012) Doğu Akdeniz bölgesinde yapmış olduğu çalışmalar sonucunda 808 adet marul bitkisinden örnekler almıştır. Alınan örneklerde sararma, mozaik ve kıvrılma benzeri belirtilerin olduğunu gözlemlemiştir. Örneklerin LMV ile enfekteli olup olmadığının tespiti için yapılan ELISA testleri sonucunda 82 bitkide LMV enfeksiyonunu tespit etmiştir, bunların yanında Marul iri damar virüsü (*Lettuce big vein virus*; LBVV) TSWV, CMV ve Pancar batı sarılık virüsü (*Beet western yellow virus*; BWYV)'nün de enfeksiyon oluşturduğunu belirtmiştir. Yapmış olduğu RT-PCR çalışmalarında da istenilen büyüklükte 800 bç'ine karşılık gelen bantlar elde etmiştir. İzolatlardan bir tanesinin sekans analizini yaptırarak, sekans analizi yapılan LMV izolatının NCBI'da dizini bulunan bir Amerikan izolatı ile % 99 oranında benzerlik gösterdiğini belirtmiştir.

Erkan ve ark. (2013) İzmir ilinde yetiştiriciliği yapılan bir takım sebzelerdeki virüs hastalıklarının tanısını yapmak amacıyla 2010-2011 yıllarında sebze alanlarına sörveyler düzenlemişlerdir. Bu sörveyler sonucunda enginar, marul, soğan, pırasa, ıspanak, brokoli, brüksel lahanası, karnabahar ve lahana bitkilerinden örnekler toplamışlardır. Aldıkları örnekleri DAS-ELISA testi ile içlerinde LMV'nin de olduğu farklı virüslere karşı testlemişlerdir. Toplamda 30 adet marul örneği toplamışlar ve bu

örneklerde simptomatolojik olarak cücelik, mozaik ve sararma gibi tipik virüs hastalıkları simptomları yanında baş oluşmama, baş dağılması, küçük baş oluşması ve aşırı kardeşlenme gibi belirtilerin de olduğunu belirtmişlerdir. DAS-ELISA testleri sonucunda 15 tanesinde LMV'nin varlığını tespit etmişlerdir. Yapılan moleküler çalışmalarda ise LMV'ye ait 800 bç'ye karşılık gelen bantları elde ettiklerini belirtmişlerdir.

BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar temel olarak 4 aşamada yürütülmüştür. İlk olarak Çanakkale ili ve ilçeleri marul alanlarına arazi çıkışları yapılarak, virüs ve virüs benzeri hastalık ile infekteli olduğu düşünülen marul bitkilerinden örnekler alınmış ve laboratuvara getirilmiştir. İkinci aşamada toplanan örneklerde LMV varlığını belirlemek amacı ile serolojik bir yöntem olan DAS-ELISA ile testlenmesi gerçekleştrilmiştir. DAS-ELISA testleri sonucunda LMV ile infekteli olduğu belirlenen örnekler, moleküler analizlerin yapılması için silika jel içinde +4 ^{o}C'de saklanmıştır. Çalışmanın üçüncü aşamasını oluşturan klonlama çalışmalarına DAS-ELISA testi sonuçları pozitif olan örneklerin RT-PCR ile testlenmesi ile başlanmıştır. Elde edilen RT-PCR ürünleri kullanılarak, örneklerin toplandığı bölgeler göz önünde bulundurularak seçilen izolatlar klonlanmıştır. Son aşamada klonlaması yapılan izolatların CP genlerine ait nt ve a.a. dizilimleri belirlenerek, filogenetik analizleri yapılmıştır.

3.1. Arazi Çalışmaları

Tez kapsamında yürütülen arazi çalışmaları 2013-2014 yıllarında marul üretiminin yapıldığı Çanakkale ili ve ilçelerinde ticari üretim alanları (açık ve kapalı alanlar) ve ev bahçelerinde yürütülmüştür. Üretim sezonu boyunca marul alanlarına arazi çıkışları yapılarak bitkiler görsel olarak incelenmiş ve viral hastalık belirtilerine benzer belirti gösteren bitkilerden bitkinin büyüklüğüne göre yaprak örnekleri ya da bitkinin tamamı olacak şekilde örnekler alınmıştır. Marul üretim alanlarının seçimi tesadüfi olarak yapılmış ve her bir üretim bölgesinden örnekleme yapılmaya özen gösterilmiştir. Arazi çıkışlarında örneklemeler yapılırken, aynı alanda birden fazla bitkide LMV ve benzeri simptom görülmesi durumunda en fazla 3 bitkiden örnek alınmıştır. Alınan örnekler buz kutusunda muhafaza edilerek laboratuvara getirilmiştir. Arazi çalışmaları sonucu 71 örnek alınmıştır.

3.2. Laboratuvar Çalışmaları

3.2.1. DAS-ELISA

2013-2014 yıllarında Çanakkale ili ve ilçelerinde üretim sezonu süresince marul üretim alanlarında yapılan sörveyler sonucunda LMV'ye benzer simptom gösteren

bitkilerden alınan örnekler LMV'nin varlığını belirlemek amacıyla serolojiye dayalı bir yöntem olan DAS-ELISA (Double-Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ile test edilmiştir. Bu amaçla Bioreba (İsviçre) firmasından sağlanan LMV'ye spesifik ELISA kiti ve 96 çukur içeren Microtiter plate'ler kullanılmıştır. Yöntem, Clark ve Adams (1977)'ın belirttiği temel yöntem esas alınarak, ELISA kitlerinin alındığı firmanın (Bioreba, İsviçre) önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde antibadi, konjugat antibadi ve substrat belirtilen tampon çözeltilerde sulandırılarak uygulanmıştır. DAS-ELISA testleri sonucunda pozitif ve/veya şüpheli bulunan örnekler silika jel içinde +4 ^{o}C'de moleküler analizlerin yapılması için saklanmıştır.

3.2.1.1. Plate'in antibadi ile kaplanması

ELISA testinin ilk aşamasında plate LMV'ye spesifik antibadi ile kaplanmıştır. İlk olarak kaplama solusyonuna (Na_2CO_3, $NaHCO_3$, NaN_3,dH_2O) 1:1000 oranında IgG antibadi eklenmiştir. Daha sonra her bir çukura 200 µl eklenmiştir. Daha sonra plate 36 ^{o}C'de 4 saat inkubasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra plate'e 4'er dakika arayla 3 kez yıkama solusyonu (PBS-T) (NaCl, KH_2PO_4, Na_2HPO_4, KCl, Tween 20) ile yıkama işlemi yapılmıştır.

3.2.1.2. Örneklerin plate'e yüklenmesi

Arazi çalışmalarında toplanan örnekler ELISA "bag" adı verilen poşetler içinde homojenizatör yardımı ile ELISA kitinde bulunan ekstraksiyon solusyonu (TRIS, NaCl, PVP K25 (MW 24000) Tween 20 KCl, NaN_3) firmanın önerileri doğrultusunda sulandırılarak örnek ezme işlemi gerçekleştirilmiştir. Ezilen örnekler tüplere alınarak numaralandırılmış ve plate'lere yükleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek için iki çukur kullanılmış ve çukurlara örneklerden 200 µl alınıp eklenmiştir. Örnek yükleme işlemi gerçekleştirildikten sonra plate'e pozitif ve negatif kontrol konularak buzdolabında +4 ^{o}C'de 1 gece bekletilmiştir. Bu işlemin ardından plate, 4'er dakika ara ile 3 kez PBS-T ile yıkanmıştır.

3.2.1.3. Konjugat (enzimle işaretlenmiş antibadi) eklenmesi

Konjugat solüsyonu firmanın önerileri doğrultusunda sulandırılarak LMV'ye özgü konjugat IgG antibadi eklenerek plate'e yükleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Diğer aşamalardakine benzer olarak her bir çukura 200 µl koyulmuştur. Daha sonra bu plate

36 ^{o}C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra plate 4'er dakika ara ile 3 kez PBS-T ile yıkanmıştır.

3.2.1.4. Substrat eklenmesi

Bu işlem için tablet substrat (para-nitrophenyl-phosphate; pNPP) kullanılmıştır. Tablet substrat firmanın önerileri doğrultusunda sulandırılarak her bir plate çukuruna 200 µl ilave edilmiştir. Plate'te renk değişimi gözlenen örneklerde, LMV'nin kesin olarak belirlenmesi için plate Medispec ESR 200 ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda okuma işlemine tabi tutularak absorbans değerleri belirlenmiştir. Absorbans değerlerine göre negatif kontrolün iki katı ve üzerindeki değerlere sahip olan örnekler LMV ile enfekteli olarak kabul edilmiştir.

3.2.2. Oligonükleotid primerlerin hazırlanması

Oligonükleotid primer çiftleri izolatların klonlanması amacı ile gerçekleştirilecek olan RT-PCR analizlerinde kullanılmak üzere, bitki virüslerinin genomunda rekombinasyon ve mutasyondan en az etkilenerek, kendi aralarında en fazla benzerliğe sahip olduğu düşünülen CP genine spesifik olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu amaçla DNA'nın 5' ve 3' ucunda bulunan korunmuş CP geni referans alınarak bu bölgenin tamamını çoğaltacak şekilde, LMV genomundaki CP genini oluşturan 9035 ile 9868 nt'lik kısmını çoğaltan SK11 LMV F ve SK12 LMV R isimli primer dizileri tasarlanmıştır (Çizelge 3.1). Tasarlanan bu primer çifti ticari bir firmadan (Iontec, Türkiye) hizmet alımı gerçekleştirilerek bu çalışma kapsamında sentezlettirilmiştir.

Çizelge 3.1. RT-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere tasarlanan *Marul mozaik virüsü*'nün kılıf protein genine spesifik primer çifti

Kod	**Primer Dizini**	**Sense**	**Spesifik Geni**
SK11 LMV F	GTAGACACGAAGCTTGATGCA	Forward (İleri)	CP (834 bç)
SK12 LMV R	GTGCAACCCTCTCACGCCTAA	Reverse (Geri)	

3.2.3. Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)

RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) aşamasında kullanılan kitler TaKaRa (Japonya) ve Fermantas (Litvanya) firmalarından temin

edilerek üretici firmaların önerileri dikkate alınarak Thermal cycler'da (Bio-Rad MJ Mini Personal) gerçekleştirilmiştir. İlk olarak marul bitkilerinden total RNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen total RNA'lar thermal cycler'da denatüre edilerek ters transkriptaz poimeraz enzimi ile DNA'ya çevrilmiştir. Son olarak bu DNA'ların çoğaltımı yapılarak agaroz jel elektroforezinde LMV CP geninin tamamına karşılık gelen 834 bç büyüklüğündeki bantların görüntülenmesi ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1 Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu Suehiro ve ark. (2005) tarafından geliştirilen basitleştirilmiş doğrudan tüpe bağlanma (Simple-direct-tube, SDT) yöntemi esas alınarak ve hazır total RNA ekstraksiyon kiti (Qiagen, Almanya) kullanımı ile 2 şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1.1. Basitleştirilmiş doğrudan tüpe bağlanma yöntemi

SDT yöntemiyle total RNA izolasyonunda DAS-ELISA testi için kullanılan ve örnek tamponu içinde ezilen örneklerden 200 µl alınarak eppendorf tüplere yerleştirilmiş ve daha sonra buzdolabında +4 ^{o}C'de bir gün süreyle bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda +4 ^{o}C'den alınan örnekler 4'er dakika arayla 3 kez PBS-T ile yıkanmıştır. Daha sonra eppendorf tüplerin içine 50 µl steril saf su konularak 95 ^{o}C'de 1 dakika tutulmuştur. Bu sürenin sonunda tüpler direkt olarak buz içerisine alınarak 10-15 dakika buz içinde tutulmuş ve daha sonra RNA'lar -80 ^{o}C'ye konularak kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

3.2.3.1.2. Total RNA ekstraksiyon kiti ile RNA ekstraksiyonu

Hazır total RNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilen total RNA ekstraksiyonlarında üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. İlk olarak 20 mg örnek dokusu tartılarak havan içine 600 ml RLT buffer ve 12 ml DDT eklenerek ezilmiştir. Ezilen örnekler 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine alınarak maksimum hızda 3 dk santrifüj yapılmıştır. Bu işlem sonucunda elde edilen supernatant yeni eppendorflara aktarılarak eşit hacimde % 70'lik EtOH ile yıkanmıştır. Daha sonra bu karışımın 700 µl'si "spin column" denilen kolonlara aktarılarak 20 saniye 10.000 rpm'de santrifüj yapılarak spin kolonun alt kısmında toplanan sıvı dökülmüştür. Spin kolona 700 µl RW1 wash buffer eklenerek 20 sn 10.000 rpm'de santrifüj edilerek benzer şekilde spin kolonun alt kısmında biriken sıvı uzaklaştırılmıştır. Spin kolona 500

µl RPE wash buffer eklenerek 20 sn 10.000 rpm'de santrifüj yapılarak kolonun altında biriken sıvı uzaklaştırılmıştır. Yine aynı şekilde spin kolona 500 µl RPE wash buffer eklenerek 20 sn 10.000 rpm'de santrifüj yapılarak kolonun altında biriken sıvı uzaklaştırılmıştır. Son olarak spin kolonun altına 1.5 ml'lik yeni eppendorflar konularak spin kolona 40 µl RNase içermeyen steril saf su konulmuş ve 1 dk 10.000 rpm santrifuj edilmiştir. Eppendorflarda biriken sıvı kısım total RNA'yı oluşturmuştur. Elde edilen total RNA'lar -80 ^{o}C'de saklanmıştır.

3.2.3.2. Denatürasyon Aşaması

Denatürasyon işlemi RNA virüslerinin bağlarının birbirinden ayrılmasına sağlayan bir işlemdir. Denatürasyon işlemi için kullanacak olan mikro PCR tüplerine öncelikle etiketleme işlemi yapılmıştır. Etiketlenen PCR tüplerine örneklere ait 5 µl total RNA, 1 µl dNTP, 1 µl random primer ve 3 µl steril sudan oluşan 10 µl denatürasyon karışımı hazırlanarak thermal cycler'da denatürasyon işlemi 65 ^{o}C'de 5 dk bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin hemen ardından örnekler buzda 2 dk bekletilerek denatürasyon aşaması gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.3. Ters transkripsiyon aşaması (RT)

Bu aşamada denatüre edilmiş RNA'lardan cDNA'lar sentezlenmiştir. Bu amaçla 10 µl denatürasyon karışımına 5X Prime Script Buffer (50 mM Tris HCl pH:8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl2)'dan 4 µl, RNase inhibitör'den 0.5 µl, Prime Script Reverse Transcriptase 0.5 µl, 10 mM dNTP karışımından 1 µl, random primer'den 1 µl ve steril sudan 3 µl eklenerek RT karışım hazırlanmıştır. PCR makinası 30 ^{o}C'de 10 dk, 42 ^{o}C'de 45 dk, 70 ^{o}C'de 15 dk ve +4 ^{o}C'de sonsuz şekilde bekleyecek şekilde hazırlanmış ve cDNA'lar sentezlenmiştir.

3.2.3.4. PCR aşaması (amplifikasyon)

Sentezlenen cDNA'ların çoğaltılması için PCR karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım için 10X PCR Buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris HCl 25 ^{o}C pH: 9.0, % 1 Triton X-100)'dan 2.5 µl, 10 mM dNTP karışımından 1 µl, SK LMV F ve SK LMV R primer çiftlerinin her birinden 0.5 µl, Taq polimeraz enziminden 0.25 µl ve steril sudan 15.25 µl eklenerek oluşturulmuştur. Etiketlenen PCR tüplerine hazırlanan PCR karışımı ve 5 µl cDNA'lar eklenerek karışımı 94 ^{o}C 3 dk, 40 defa tekrarlanan 94 ^{o}C'de 30 sn, 55 ^{o}C'de 30 sn ve 72 ^{o}C'de 30 sn, 72 ^{o}C'de 5 dk daha sonra da 4 ^{o}C'de sonsuz şekilde

bekleyecek şekilde programlanan PCR makinesine konularak LMV CP genlerinin çoğaltılması yapılmıştır.

3.2.3.5. Agaroz jel elektroforezi

Elde edilen PCR ürünleri 100-1000 bç DNA büyüklük markörleriyle birlikte % 1 agaroz jelinde 100 voltta, 45 dakika ayrıştırılıp ethidyum bromür ile boyandıktan sonra Major Science UVDI jel görüntüleme cihazında LMV CP genine ait 834 bç'ne karşılık gelen bantlar fotoğraflanmıştır.

3.2.4. Klonlama ve sekans analizi

Çanakkale ili ve ilçelerinden toplanan ve farklı üretim bölgelerini temsil edecek şekilde seçilen 11 LMV izolatının CP genlerini içeren korunmuş bölgeleri RT-PCR yoluyla yukarıda anlatıldığı şekilde çoğaltıldıktan sonra Çevik ve ark. (1995) ve Jiang ve ark. (2008) tarafından rapor edilen yöntem modifiye edilerek kitlerin sağlandığı firmaların önerileri doğrultusunda aşağıda belirtildiği şekilde klonlanarak DNA dizileri belirlenmiş, LMV izolatlarının genetik farklılıkları ve benzerlikleri ortaya konmuştur.

3.2.4.1. PCR ürünlerinin saflaştırılması

Çoğaltılmış LMV CP genlerinin RT-PCR ürünleri EZ Column PCR pürifikasyon kiti (BioBasic, Kanada) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 20 µl RT-PCR ürününe 60 µl Binding I buffer eklenerek, tamamı EZ kolona aktarılarak oda sıcaklığında 2 dk bekletilmiştir. Bu sürenin ardından 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Kolonun alt kısmı boşaltılarak, 500 µl yıkama solusyonu eklenerek, 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem bir kez daha tekrarlanarak 500 µl yıkama solusyonu eklenerek, 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Alt kısım boşaltılmıştır. Kolon mümkün olduğunca iyice kurutulmak için bir kez de 10.000 rpm'de 1 dk boş santrifüj edilmiştir. EZ kolonun altına örnek numaraları yazılmış 1.5 ml eppendorflar konularak, kolonun içine 25 µl elution solusyon eklenmiş ve oda sıcaklığında 2 dk bekletildikten sonra 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Eppendorflarda toplanan son ürünler saflaştırılmış RT-PCR ürünleri olup, kullanılıncaya kadar -20 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4.2. Kılıf protein genlerinin klonlanması

RT-PCR yöntemiyle çoğaltılan ve daha sonra saflaştırılan LMV CP genleri T-A klonlama yöntemi ile Promega (ABD) firmasından sağlanmış olan pGEM-T Easy plazmid vektörü kullanılarak klonlanma işlemi gerçekleştirilmiştir. Klonlama işleminin aşamaları aşağıda açıklandığı gibi kitlerin sağlandığı firmanın önerileri ve Çevik ve ark. (1995)'nın uyguladığı yöntem esas alınarak bir takım modifikasyonlar sonucu belirtilen şekilde yapılmıştır.

3.2.4.2.1. Ligasyon

Ligasyon aşaması RT-PCR ile çoğaltılan, daha sonra saflaştırması yapılan LMV CP genlerinin, pGEM-T Easy plazmid vektörü ile birleştirilmesidir. Bunun için tüm işlemler buz içerisinde olmak üzere ligasyon karışımı hazırlanmıştır. Bu amaçla 1 µl pGEM-T Easy plazmidi, 1 µl T-4 DNA ligaz enzimi, 5 µl 2X ligasyon tampon çözeltisine (0.05 M Tris-HCl pH 8.0, 0.01 M MgCl2 1 mM ATP ve 50 ug/ml bovine serum albumin) 3 µl saflaştırılmış RT-PCR ürünü eklenerek oda sıcaklığında 1 sa veya +4 ^{o}C'de 16 sa bekletilerek ligasyon işlemi tamamlanmıştır.

3.2.4.2.2. Transformasyon

Transformasyon işlemi, ligasyon karışımının bir kısmının hücre duvarı geçirgen hale getirilmiş (competent) *Escherichia coli* bakterisine aktarılmasıdır. Bu amaçla -80 ^{o}C'de dondurulmuş *E. coli* bakterisinin JM109 ırkının buz içinde çözdürülmüş competent hücrelerinden 30 µl alınarak 1.5 ml eppendorf tüplere konulmuştur. pGEM-T Easy plazmidi ve LMV CP genlerini içeren ligasyon karışımından 5 µl alınarak tüplerdeki *E. coli* JM109 competent hücrelere eklenerek 30 dakika boyunca buzda bekletilmiştir. Daha sonra karışım 42 ^{o}C'de 1 dakika süreyle bekletilerek ısı şoku uygulanmıştır ve tekrar 2-3 dakika buza konularak transformasyon işlemi tamamlanmıştır.

Transformasyonu yapılan bakterilere LB bakteriyel sıvı besi ortamından 750 µl eklenerek bakteriler 37 ^{o}C'de 180 rpm hızda çalkalamalı inkübatörde 1 sa süreyle inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda tüpler 5000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek bakterilerin tüpün altına çökmesi sağlanarak, tüpün üstünde biriken ortamın 500 µl kısmı uzaklaştırılmıştır. Son olarak kalan karışım süspansiyon haline getirilerek 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 ^{o}C'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.4.2.3. Rekombinant kolonilerin seçimi

LMV CP genini taşıyan pGEM-T Easy plazmidini içeren bakteriler 100 µg/ml ampisilin ve 20 mg/ml X gal maddesi içeren LB katı ortamında büyütülmüştür. LB katı ortamında büyüyen rekombinant bakterilerin seçimi oluşturdukları beyaz-mavi renk ayrımına göre yapılmıştır. Bunlardan beyaz renkli koloniler LMV CP genini taşırken, sadece pGEM-T Easy plazmidini içerenler ise mavi renkli koloniler oluşturduğundan dolayı rekombinant yani LMV CP genini içeren ve içermeyen bakteriyel kolonilerinin ayrımı anlatıldığı şekilde oluşturdukları renk farklılığına göre belirlenmiştir. Böylece LMV CP genini içeren plazmidleri taşıyan beyaz kolonilerin seçimi yapılmıştır.

3.2.4.2.4. Koloni PCR

Mavi-beyaz koloni seçimi klonlaması yapılmak istenen genleri içeren rekombinant plazmidleri taşıyan bakteriyel kolonilerin seçiminde ilk aşamayı oluşturmaktadır. Genellikle doğru sonuç vermesine rağmen bazen mavi koloniler hedef genleri içerebileceği gibi bazen de beyaz kolonilerde istenilen genleri içermeyebilir. Bu nedenle oluşan beyaz renkli kolonilerin gerçekten LMV CP genini taşıyan pGEM-T Easy plazmidini içerip içermediği daha hassas bir yöntem olan koloni PCR yöntemiyle testlenerek daha kesin olarak belirlenmiştir. Bu amaçla önce elde edilen beyaz koloniler steril bir pipet ucuyla alınarak LB ortamı içeren yeni bir petri kabına 1 cm^2 büyüklüğünde bir alana çizme yoluyla inokule edilerek 37 ^{o}C'de 16 saat boyunca inkübe ettikten sonra kullanılmak üzere 4 ^{o}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 $MgCl_2$, 20 pmol plazmid T-A klonlaması yapılan bölgenin alt ve üst kısımlarına spesifik SK LMV F ve SK LMV R primerlerinden 0.5 µl, 0.125 µl 2.5 ünite Taq DNA polimeraz (Fermentas, Kanada) ve 18.375 RNase içermeyen steril su eklenerek PCR karışımı hazırlanmış ve 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 ^{o}C'de 3 dakika, 40 defa tekrarlanan 94 ^{o}C'de 30 saniye,

50 ^{o}C'de 30 saniye, 72 ^{o}C'de 1 dakika ve 72 ^{o}C'de 5 dk daha sonra da 4 ^{o}C'de bekleyecek şekilde programlanan PCR makinesinde yapılmıştır.

Her bir izolat için en az 2 beyaz koloni seçilerek koloni PCR yöntemiyle test edilmiştir. Koloni PCR'ın tamamlanmasından sonra elde edilen PCR ürünleri 100-1000 bç DNA büyüklük markörleri ile birlikte % 1'lik agaroz jelinde elektroforez yöntemi ile ayrıştırılarak EtBr ile boyandıktan sonra Major Science UVDI jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.

3.2.4.2.5. Plazmid izolasyonu

Koloni PCR'dan elde edilen sonuçların elektroforez yöntemiyle analiz edilmesinden sonra LMV CP 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 LMV izolatı için koloni PCR sonuçlarına göre seçilen koloniler, 2 µl ampisilin içeren 5 ml LB sıvı besi ortamına inokule edilerek 37 ^{o}C'de 16 saat boyunca 180 rpm hızda çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Steril bir mikrofüj 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.

İlk olarak kültürler 12000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek supernatant uzaklaştırılmıştır. 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 ^{o}C'de 5 dakika santrifüj yapılıp kolona aktarılmıştır. Kolonlar 10.000 rpm ve 4 ^{o}C'de 2 dakika santrifüj yapılmıştır. Daha sonra plazmidi diğer maddelerden temizlemek için 500 µl yıkama solüsyonu eklenip yine 10.000 rpm ve 4 ^{o}C'de 2 dakika süreyle santrifüj yapılmıştır. İstenmeyen maddeleri tamamen uzaklaştırmak ve daha temiz bir plazmid elde edebilmek için yıkama solüsyonu ekleme işlemi tekrarlanmış ve son olarak 50 µl elution tampon solüsyonu eklenerek plazmid saflaştırma işlemi tamamlanmıştır. Elde edilen son ürünler DNA dizi analizine gönderilinceye kadar -20 ^{o}C'de saklanmıştır.

3.2.4.2.6. EcoRI restriksiyon enzimi ile kesme işlemi (digestion)

Elde edilen pGEM-T Easy plazmid 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 hazırlanarak 834 bç'lik LMV klıf protein genini taşıyıp taşımadığı kesin olarak belirlenmiştir. Bu karışım 37 ^{o}C'de 5 saat bekletilerek plazmidlerin kesilme işlemi tamamlanmıştır. EcoRI enzimi ile kesme işleminin tamamlanmasından sonra elde edilen DNA'lar DNA büyüklük markörleri ile birlikte % 1'lik agaroz jelde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak EtBr ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında Major Science UVDI görüntüleme sisteminde görüntülenmiş ve 834 bç'lik LMV CP genini taşıyıp taşımadıkları kesin olarak belirlenmiştir. Pozitif sonuç veren saflaştırılmış plazmid DNA'ları kullanılıncaya kadar -20 ^{o}C'de saklanmıştır.

3.2.5. Kılıf protein geninin dizininin belirlenmesi

LMV CP genlerini kesin olarak taşıdıkları belirlenen saflaştırılmış plazmidlerden farklı 9 izolata ait olanlar seçilerek LMV CP genlerinin dizilimi yaptırılmıştır. Saflaştırılması yapılmış plazmidlerin DNA dizilimi Refgen Biyoteknoloji (Ankara) firmasında hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. DNA dizilimi pGEM-T Easy plazmidinin T-A klonlama bölgesinin yaklaşık 50 bç üst ve alt kısmındaki bölgelere spesifik M13F ve M13R üniversal primerleri kullanılarak döngü dizileme yöntemiyle ve otomatik DNA dizileme cihazıyla yapılmıştır. Her bir izolat için bir klonun iki yönden M13F ve M13R primerleri kullanılarak LMV CP geninin dizilemesi yapılmıştır. Elde edilen ham DNA dizilimleri Vector NTI DNA dizi analiz programına aktarılarak öncelikle pGEM-T Easy plazmid vektörüne ait DNA dizileri temizlenerek LMV CP genine ait nt ve a.a. dizilimleri elde edilmiştir. Çanakkale ili ve ilçelerinin farklı bölgelerinde marul üretimi yapılan alanlardan alınan izolatların CP genlerine ait nt ve a.a. dizileri Align X programında çoklu dizi karşılaştırma yapılarak ilk olarak izolatların kendi içlerindeki benzerlik oranları yüzde olarak belirlenmiştir. Daha sonra gen bankasında DNA ve protein veri tabanlarında araştırma yapılarak dünyanın farklı marul üretim bölgelerinde elde edilen LMV izolatlarına ait CP geni nt ve a.a. dizileri elde edilmiştir. Bu CP genlerine ait nt ve a.a. dizileri Align X programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen tüm LMV izolatlarının dünya izolatlarıyla benzerlik gösterip göstermediği ve benzerlik oranları yüzde olarak

belirlenmiştir. Ayrıca Çanakkale ilinde ve ilçesinde bölgesel olarak elde edilen LMV izolatlarının kendi aralarında benzerlik gösterip göstermediği ve benzerlik oranları yine yüzde olarak belirlenmiştir.

3.2.6. Kılıf protein geninin filogenetik analizi

Çanakkale ili ve ilçelerinin farklı marul üretim bölgelerinden alınan LMV Align X programında çoklu nt ve a.a. dizi karşılaştırmaları yapılan LMV CP genine ait çoklu karşılaştırma dosyaları Clustal X programına aktarılarak filogenetik analizler yapılmıştır. Filogenetik analiz verileri kullanılarak Kiamura iki parametre alogaritması uygulanan Neighbor-Joining yöntemi ile filogenetik soyağacı oluşturulmuştur. Oluşturulan soyağacının doğruluğunu istatistiki olarak belirlemek amacıyla 100 tekerrürlü boostrap analizi yapılmıştır. Son olarak oluşturulan soyağaçları TreeView soyağacı görüntüleme programı kullanılarak görüntülenerek Çanakkale ili ve ilçelerinin marul üretim bölgelerinden toplanan LMV izolatlarının birbiriyle yakınlık dereceleri ve genetik ilişkileri ortaya konulmuştur. Aynı şekilde dünyanın diğer üretim bölgelerinden elde edilen izolatların gen bankasında bulunan CP genlerinin nt ve a.a. dizilerinin çoklu karşılaştırmaları da yukarıda belirtildiği gibi filogenetik analizlere tabi tutulup soy ağaçları oluşturularak TreeView programında görüntülenmiştir.

BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Arazi Çalışmaları

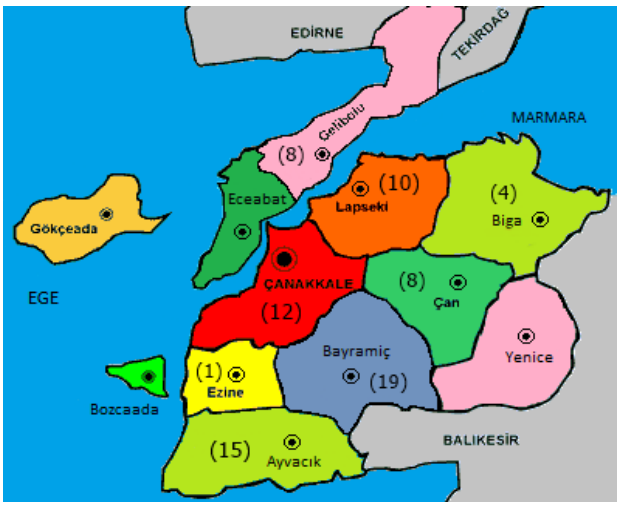
Çalışma kapsamında yapılan arazi çıkışları Çanakkale ve ilçelerinde 2013-2014 yıllarında gerçekleşmiştir. Genel olarak Çanakkale'nin tüm ilçelerine arazi çıkışları yapılmıştır. Arazi çıkışları tesadüfi olarak yapılmış ve genel olarak literatürde anlatılan mozaik, sararma, baş bağlamama, bodurluk vb. LMV simptomları gösteren bitkilerden örnekleme yapılmaya çalışılmıştır. Ancak bu tür tipik virüs simptomlarına bitkilerin içinde bulunduğu fenolojik dönem ve LMV'yi etkin olarak taşıyan yaprak biti vektörlerinin genel arazi çıkışlarında bulunmamasından dolayı çok fazla rastlanılmamıştır. Bu nedenle arazide bariz olarak diğerlerinden renk, boy, kıvırcıklık vb. gibi farklı görünen marul bitkilerinden örnekleme yapılmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Arazide diğerlerinden farklı olarak görülen ve örnekleme yapılan bazı marul bitkileri (A: Boy olarak diğerlerine göre küçük kalan marul bitkisi (Sağda), B: Renk olarak diğerlerinden farklı marul bitkisi)

Arazi çıkışlarında hem açık alanda yetiştiricilik yapılan hem de serada yetiştirilen marullardan örnekleme yapılmıştır. Bu kapsamda Merkez, Çan, Biga, Lapseki, Eceabat, Gelibolu, Ezine, Ayvacık ve Bayramiç ilçelerine arazi çıkışları gerçekleştirilmiş ve 71 LMV enfeksiyon şüphesi taşıyan örnek toplanmıştır. Ayrıca 1060675 nolu TÜBİTAK-TOVAG projesi kapsamında toplanan 6 örnek de çalışmaya dahil edilerek, 77 örnek üzerinden çalışılmıştır. Bozcaada, Gökçeada ve Yenice ilçelerine ise TÜİK verileri göz önüne alınarak arazi çıkışları gerçekleştirilmemiştir. Ayrıca Eceabat'a arazi çıkışı yapılmasına rağmen LMV ile enfekteli olduğu düşünülen şüpheli örnek görülmediği için örnekleme yapılmamıştır.

Arazi çıkışları sonucunda LMV'nin özellikle açık alanda yetiştiricilik yapılan marullarda daha fazla yaygın olduğu görülmüştür. Bunun sebebi olarak da etmenin yaprak bitleri ile etkin bir şeklide taşınma kabiliyetine sahip olduğu ve örtü altı yetiştiricilikte bitki koruma önlemlerine açık alanda yetiştiriciliği yapılan sebzelere göre daha fazla dikkat edilmesi olarak söylenebilir. Örnekleme yapılan Çanakkale ili ve ilçelerinden alınan örnek sayıları Şekil 4.2'de verilmiştir. Arazi çıkışlarında sörvey yapılan alanlar toplanan örnek sayısı ile karşılaştırıldığında çok daha fazladır, ancak belirttiğimiz sebeplerden dolayı örnekleme sayısı gezilen arazi büyüklüğüne göre düşük kalmıştır (Ek çizelge 1 ve ek çizelge 2'de toplanan tüm örneklere ait bilgiler verilmiştir).



Şekil 4.2. Arazi çalışmalarının gerçekleştirildiği Çanakkale ili ve ilçeleri (Parantez içindeki rakamlar toplanan örnek sayılarını göstermektedir)

4.2. DAS-ELISA Testi

DAS-ELISA testi sonuçlarında Çanakkale'nin 8 farklı ilçesinden alınan 77 örneğin 13 tanesi LMV ile enfekteli bulunmuştur. Merkez ilçeden toplanan 12 örneğin 2'sinde, Ayvacık'tan alınan 15 örneğin 6'sında, Biga'dan alınan 4 örneğin 2'sinde, Bayramiç'ten alınan 19 örneğin 2'sinde, ve Ezine'den alınan bir örnekte enfeksiyon saptanmıştır. İlçelere göre şüpheli bitkilerde enfeksiyon oranı ise Merkez'de % 16.00, Ayvacık'ta % 40.00, Biga'da % 50.00, Bayramiç'te % 10.52 ve Ezine'de % 100.00 olarak hesaplanmıştır. Ezine'de enfeksiyon oranının % 100 çıkması ise şüpheli olarak araziden sadece bir örnek alınıp, bunun da pozitif çıkmasından kaynaklanmaktadır. Lapseki'den alınan 10, Çan'dan alınan 8 ve Gelibolu'dan alınan 8 örnekte ise LMV

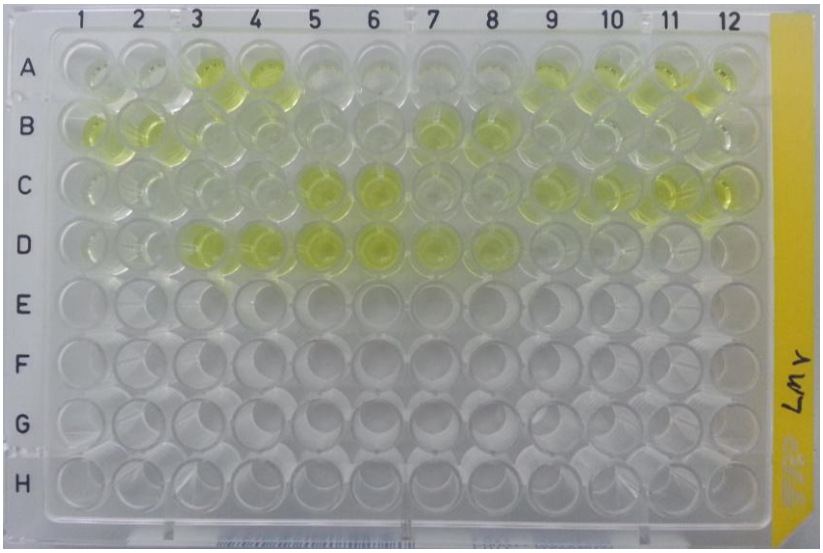
saptanmamıştır (Çizelge 4.1). Bu sonuçla enfeksiyon oranı genel olarak % 16.80 olarak bulunmuştur. Tipik olarak virüs simptomu göstermesine rağmen alınan örneklerin büyük bir çoğunluğunun LMV açısından negatif olarak bulunması büyük bir olasılıkla bu bitkilerin marulu enfekte eden diğer virüslerle ya da virüs benzeri hastalıklarla enfekteli olmasından kaynaklanmaktadır. Bilindiği üzere virüslerin büyük bir çoğunluğu bitkilerde mozaik simptomları, renk açılması, bodurlaşma ve yaprak kıvırcıklığı simptomları göstermektedir. Bu tip simtomlar ayrıca bazı çevresel faktörler tarafından ya da bazı uygulamalar sonucuda oluşabilmektedir.

Çizelge 4.1. Çanakkale ili ve ilçelerinden yapılan örnekleme sayıları, enfekteli örnek sayısı ve enfeksiyon oranı

İzolatların Toplandığı İlçeler	Enfekteli Örnek Sayısı/Toplam Alınan Örnek Sayısı	Örnekleme Yapılan Bitkilerde Enfeksiyon Oranı %
Merkez	2/12	16.60
Ayvacık	6/15	40.00
Lapseki	0/10	0.00
Çan	0/8	0.00
Biga	2/4	50.00
Bayramiç	2/19	10.52
Ezine	1/1	100.00
Gelibolu	0/8	0.00
Toplam	13/77	16.80

Potyvirüs'lerin genel olarak bitki içinde çok yüksek konsantrasyonlara ulaştığı bir çok araştırıcı tarafından belirtilmektedir (Takaki ve ark., 2005). Bu özelliği nedeniyle bu virüslerin DAS-ELISA testlerinde çok kısa süre içinde renk değişimleri kolaylıkla görülebilmektetir (Şekil 4.3). Yaptığımız bu çalışmada da yaklaşık olarak substrat uygulamasından 15 dk sonra belirgin olarak renk değişimleri gözlenmiştir. ELISA okuyucusunda yapılan okumalar sonucunda elde edilen yüksek absorbans

değerleri ile bu gözlemler doğrulanmıştır. Benzer gözlemler farklı araştırmacıların *Potyvirüs* grubuyla yapmış oldukları çalışmalarında da elde edilmiştir (Lunello ve ark., 2002).



Şekil 4.3. *Marul mozaik virüsü* ile enfekteli bulunan kuyulardaki renk değişimleri

Özdemir ve Erilmez (2007) Denizli ilinde yapmış oldukları çalışmada LMV enfeksiyonunu % 6, Erkan ve ark. (2013) ise % 50 oranında olduğunu yapılan DAS-ELISA testleri sonucunda belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise DAS-ELISA testleri sonucunda % 16.8'lik enfeksiyon oranına rastlanılmıştır. Her üç çalışmada da DAS-ELISA testinin LMV'nin tanısında başarı ile kullanıldığı görülmektedir. Çalışmalar arasındaki bu enfeksiyon yüzdesindeki değişkenlikler örnekleme zamanı, marul çeşidi ve mevsimlere bağlı olarak vektör popülasyonları vb. gibi nedenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Diğer yandan LMV az da olsa tohum ile de taşınabilmektedir. Tüm bu çalışmalar Batı Anadolu'da LMV'nin hemen hemen her üretim alanında bulunduğunu göstermektedir.

Soleimani ve ark. (2011) İran'ın Tahran ilindeki marul alanlarından 452 adet viral hastalık simptomu gösteren bitkilerden örnekler toplamışlardır. Topladıkları bu örnekleri DAS-ELISA testi ile içlerinde LMV'nin olduğu farklı virüslere karşı testlemişlerdir. LMV enfeksiyon oranı % 21 olarak bulmuşlardır. Toplanan örneklerin hepsinin virüs ve virüs benzeri hastalık simptomu gösterdiklerini belirttikleri için elde ettikleri LMV enfeksiyon yüzdesi düşük gözükmektedir. Fakat bu araştırmacılar marul alanlarında yalnız LMV enfeksiyonunu araştırmayıp, farklı virüslerin de varlığını

saptamaya çalışmışlardır. Bu kapsamda LMV enfeksiyonunun yanında CMV ve TSWV enfeksiyonlarını da sırası ile % 16 ve % 10 oranlarında bulmuşlardır. Bizim topladığımız örneklerin de bazılarında marul bitkilerinde CMV enfeksiyon belirtisine benzer olan aşırı kıvırcıklıklaşma ve TSWV belirtisine benzer olan marul bitkilerinin yaprak kenarlarında dıştan içe doğru geriye doğru ölümler gözlenmiştir (Şekil 4.4). Nitekim, Soleimani ve ark. (2011)'nın bu çalışması bizim tespit ettiğimiz enfeksiyon oranına benzer özellikler göstermektedir.



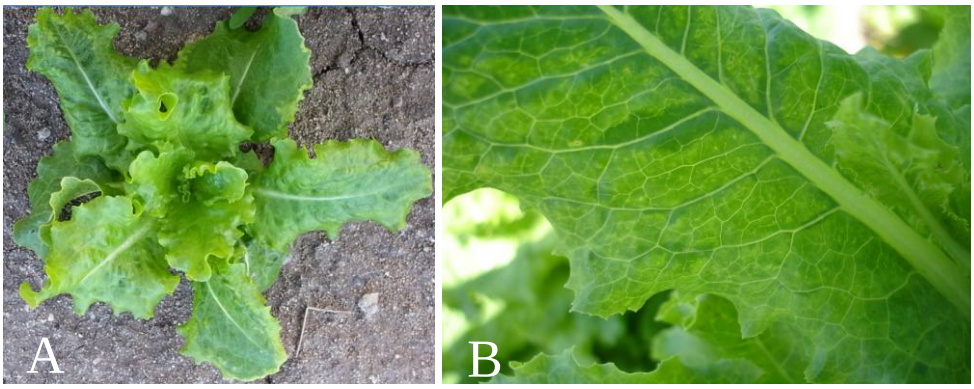
Şekil 4.4. Arazi çıkışlarında virüs ve virüs benzeri hastalık ile enfekteli olduğu düşünülen marul bitkileri (A: Aşırı kıvırcıklaşma gösteren marul bitkisi. B: Yaprak kenarlarından geriye doğru kuruma görülen marul bitkisi)

Uzunoğulları ve Beşirli (2011) Yalova ilinde 2010 ve 2011 yıllarında önemli bir pazar isteğine sahip olduğunu belirttikleri "Yedikule" marul çeşidinde viral hastalık benzeri simptom görülmesi üzerine marul alanlarına sörveyler düzenleyerek 400 bitkiden yaprak örnekleri toplamışlardır. DAS-ELISA testleri sonucunda örneklerin % 40'ında LMV enfeksiyonu tespit etmişlerdir. Enfeksiyon oranının bu kadar yüksek çıkması çalışmanın bitkisel materyalinin LMV'ye oldukça duyarlı olarak bilinen "Yedikule" marul çeşidinin olmasına bağlanabilir.

Alan (2012) Doğu Akdeniz bölgesinde yapmış olduğu çalışmalar sonucunda 808 adet marul bitkisinden örnekler almıştır. Alınan örneklerde sararma, mozaik ve kıvrılma benzeri belirtilerin olduğunu belirtmiştir. Örneklerin LMV ile enfekteli olup olmadığının tespiti için yapılan ELISA testleri sonucunda 82 bitkide LMV enfeksiyonunu tespit etmiştir. Elde edilen enfekteli bitki sayısı 82 gibi yüksek bir rakam

olmasına rağmen, toplanan 808 marul bitkisi ile oranlandığında enfeksiyon oranını % 10.14 olarak bildirmiştir. Enfeksiyon oranının bizim çalışmamızın altında kalması ise Soleimani ve ark. (2011)'nın çalışmasında olduğu gibi Alan (2012)'nin farklı virüs enfeksiyonlarını tespit etmeye yönelik araştırmalar da yapmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca bu araştırmacının örnekleme yapmış olduğu bölgenin ülkemiz açısından ticari olarak yoğun bir tarım alanı olması ve üreticilerin yoğun bir şekilde pestisit kullanımı gerçekleştirmesinden dolayı vektör yaprak bitlerinin de virüsün vektörlüğünü yapamamasından kaynaklanabilir.

Gerçekleştirilen arazi çıkışları ve DAS-ELISA testleri sonucunda marul bitkilerinde LMV simptomu olarak yapraklar açık yeşil mozaik alanların oluştuduğu görülmüştür (Şekil 4.5). Literatürlerde yer verilen marul bitkilerinde kuruma ve baş bağlamama gibi şiddetli LMV enfeksiyonlarına rastlanılmamıştır.

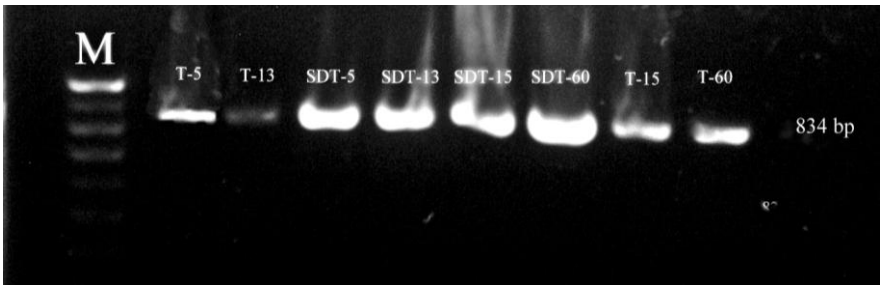


Şekil 4.5. *Marul mozaik virüsü* ile enfekteli marul bitkilerinde görülen belirtiler (A: Yaprak kenarlarında açık-yeşil renk değişimi, B: Yaprak damarları etrafındaki mozaik belirtiler)

4.3. Total RNA İzolasyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Total RNA izolasyonu Suehiro ve ark. (2005) tarafından geliştirilen basitleştirilmiş doğrudan tüpe bağlanma (Simple-direct-tube, SDT) yöntemi esas alınarak ve hazır total RNA ekstraksiyon kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Her iki yöntemde de elde edilen total RNA'lar ön deneme amacıyla RT-PCR aşamasında kullanılmış ve iki yöntem ile de elde edilen total RNA'lar RT-PCR'da pozitif sonuç vermiştir (Şekil 4.6). Ancak SDT yöntemi ile elde edilen total RNA'ların kullanıldığı bantların kit kullanımından daha parlak olması sebebi ve SDT yöntemin hem masrafsız hem de oldukça kolay bir yöntem olması nedeniyle RT-PCR aşamasında

SDT yöntemi tercih edilmiştir. Ancak SDT yönteminde bantların daha parlak çıkması, RNA ekstraksiyonunda kit kullanımının gereksiz olduğu görüşünü doğurmamalıdır. Elbette kit kullanımında da bazı modifikasyonlar ile ekstraksiyon aşamasının optimizasyonunu gerçekleştirilebilirdi, nitekim laboratuvarımızda potyvirüs grubuna dahil olmayan ve bitki içindeki konsantrasyonları düşük olan virüslerin total RNA ekstraksiyonlarında başarı ile kullanılmaktadır.



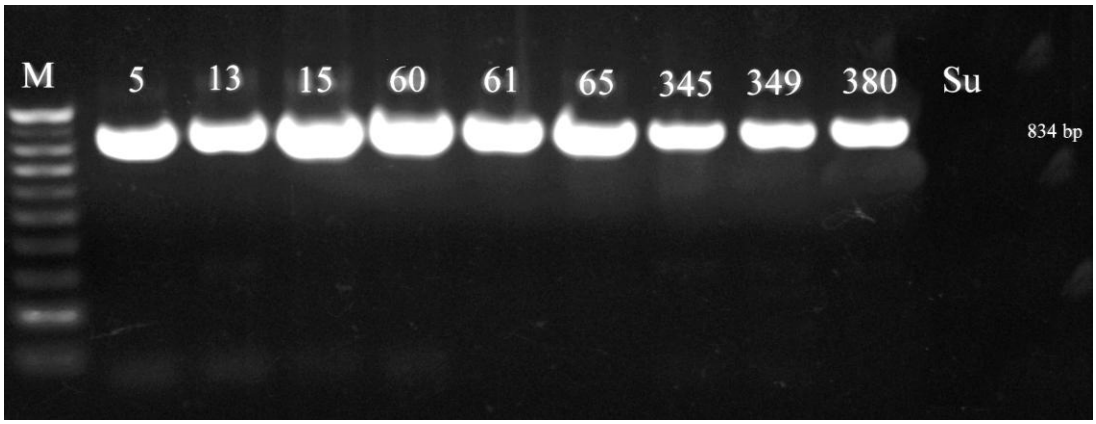
Şekil 4.6. Total RNA ekstraksiyonunda doğrudan tüpe bağlanma (SDT) yöntemi ve hazır total RNA ekstraksiyon kiti kullanımı sonucunda oluşan bant görünümleri **(**M: 1000-100 bç marker; T-5, T-13, T-15 ve T-60: RNA ekstraksiyonunda kit kullanımı; SDT-5, SDT-13, SDT-15 ve SDT-60: RNA ekstraksiyonunda SDT yönteminin kullanılması)

Sharma ve Jain (2013) Hindistan'da 2012 yılında marul alanlarında gördükleri viral hastalık simptomları üzerine yaptıkları çalışmalar sonucunda bu belirtilere neden olan etmenin LMV olduğunu bulmuşlardır. Klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere yaptıkları RT-PCR çalışmalarında enfekteli bitki dokularından total RNA'yı hazır total RNA ekstraksiyon kiti (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen-Valencia-CA) kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Bizim gerçekleştirmiş olduğumuz bu çalışmada da total RNA ekstraksiyon aşamasında SDT ve hazır total RNA ekstraksiyon kiti kullanımı ile gerçekleştirilmiştir. Ancak SDT yönteminin uygulanmasının daha pratik olması, maliyetinin düşük olması ve bu yöntem ile elde edilen total RNA veriminin yüksek olmasından dolayı total RNA ekstraksiyonlarında SDT yöntemi seçilmiştir.

4.4. RT-PCR Analizi

Çanakkale ili ve ilçelerinde 2013-2014 yıllarında yapılan sörveyler sonucunda DAS-ELISA testinde pozitif çıkan bazı örneklere moleküler bir yöntem olan klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere RT-PCR analizi yapılmıştır.

RT-PCR çalışmalarında LMV CP geninin tamamını içeren 834 bç'ne karşılık gelen bantlar DAS-ELISA testinde pozitif bulunan tüm örneklerden elde edilmiştir (Şekil 4.7). İzolatların elde edildikleri bölgeler göz önünde bulundurularak seçilen 11 LMV izolatına ait RT-PCR ürünleri klonlama çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 4.7. RT-PCR testi sonucunda elde edilen bantlar (M: 1000-100 bç marker. 5, 13, 15, 60, 61, 65, 345, 349 ve 380: DAS-ELISA testleri sonucunda LMV ile enfekteli bulunan izolatlara ait numaralar)

Alan (2012) yapmış olduğu DAS-ELISA çalışmalarını takiben bazı örnekleri RT-PCR ile testleyerek 800 bç büyüklüğüne karşılık gelen istenilen bantları elde etmiştir. Bizim çalışmamızda RT-PCR çalışmaları DAS-ELISA testlerini takiben gerçekleştirilmiştir. Böylelikle hem DAS-ELISA testi bulguları doğrulanmış hem de LMV enfeksiyonlarının tanısında RT-PCR testinin başarı ile uygulandığı görülmüştür.

Erkan ve ark. (2013) İzmir ilinde yetiştiriciliği yapılan bir takım sebzelerdeki virüs hastalıklarının tanısını yapmak amacıyla 2010-2011 yıllarında sebze alanlarına sörveyler düzenlemişlerdir. Bu sörveyler sonucunda elde ettikleri 15 LMV izolatının RT-PCR ile de tanısını gerçekleştirmişlerdir. RT-PCR çalışmaları sonucunda 800 bç'lik bantlar elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da RT-PCR çalışmaları sorunsuz bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.5. Klonlama ve Sekans Analizi Çalışmaları

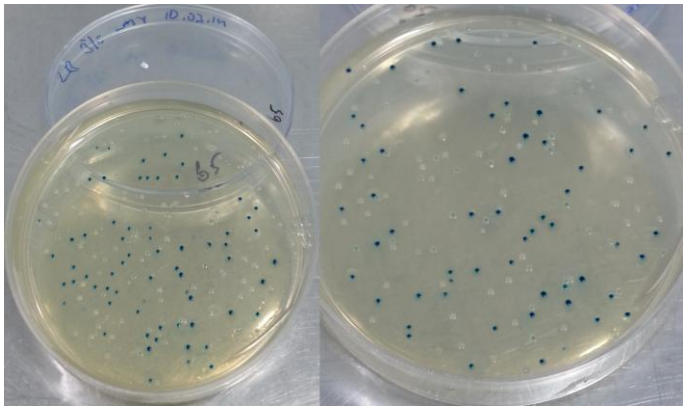
Klonlama çalışmalarında çalışma kapsamında elde edilen LMV izolatlarına ait RT-PCR ürünleri kullanılmıştır. Yapılan RT-PCR analizleri sonucunda 834 bç uzunluğunda bant oluşturan örneklerden elde edildikleri bölgeler göz önünde

bulundurularak seçilen 11 LMV izolatı klonlama çalışmalarında kullanılmıştır. RT-PCR analizi sonuçlarının pozitif olduğu bilinen LMV izolatları (Çizelge 4.2'de klonlaması ve nt dizi analizleri yapılmış LMV izolatları verilmiştir) T-A klonlama yöntemi ile klonlanmış, 2 izolatta ise klonlama işlemi başarısız olarak sonuçlanmıştır.

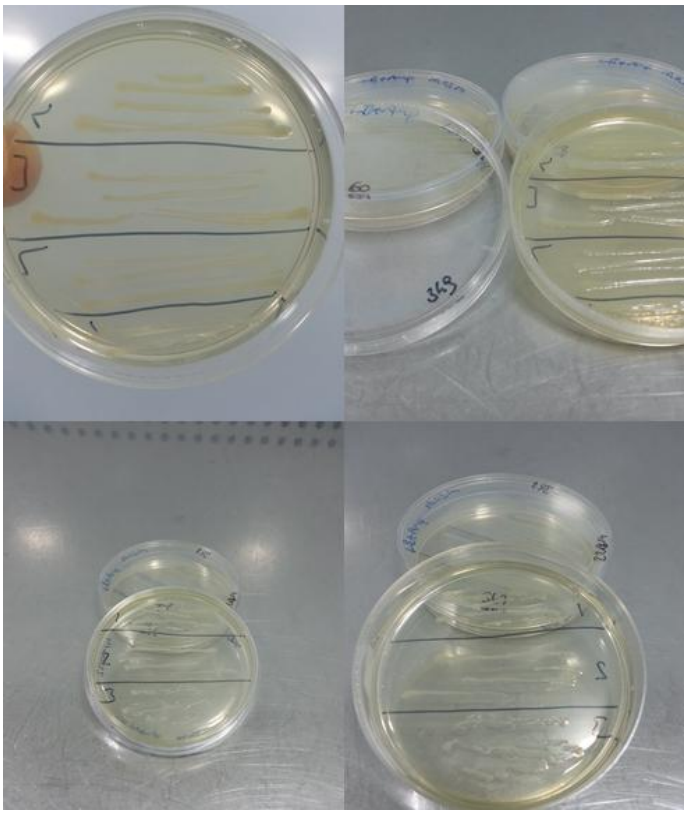
Çizelge 4.2. Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen ve klonlama çalışmalarında kullanılan *Marul mozaik virüsü* izolatları

İzolat Numarası	İzole Edildiği İlçe
LMV 5	Ayvacık
LMV 13	Merkez
LMV 15	Merkez
LMV 60	Ayvacık
LMV 61	Ayvacık
LMV 65	Ayvacık
LMV 345-1	Bayramiç
LMV 349	Ezine
LMV 380	Biga

Ligasyon ve transformasyonu yapılan *E. coli* bakterileri ampisilin, X-Gal ve IPTG içeren LB besi ortamına ekilerek mavi-beyaz koloni seçimi yoluyla LMV CP genlerini içeren plazmidleri taşıyan bakteri kolonilerinin seçimi yapılmıştır. Elde edilen mavi koloniler LMV CP genini taşımayan pGEM-T Easy plazmidlerini içermekte ve klonlamanın gerçekleşmediğini göstermektedir. Elde edilen beyaz koloniler ise LMV CP geni taşıyan pGEM-T Easy plazmidlerini içermektedir. Bu beyaz koloniler klonlama işleminin başarılı olduğunu göstermektedir. Farklı LMV izolatlarının CP genlerinin klonlanması sonucunda her bir izolat için çok sayıda mavi-beyaz koloniler elde edilmişir. Bazı izolatlara ait CP genlerinin klonlanması sonucu elde edilen beyaz-mavi koloniler şekil 4.8 ve LMV CP genlerini içeren beyaz renkli *E. coli* kolonilerinin izolasyonu şekil 4.9'da gösterilmektedir.



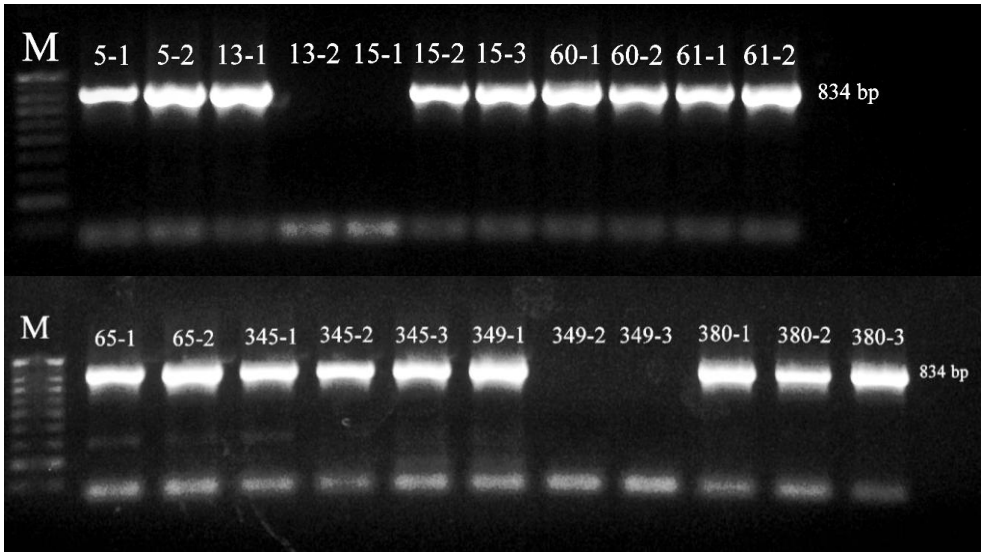
Şekil 4.8. Transformasyon yapılan *Eschericha coli* bakterilerinin ampisilin, X-Gal ve IPTG içeren LB besi ortamında oluşturdukları mavi-beyaz koloniler (Bu petrilerden beyaz koloniler seçilerek daha sonra kullanılmak üzere ampisilin içeren LB besi ortamında geliştirilmiştir)



Şekil 4.9. Ampisilin içeren LB besi ortamına ekim yapılan beyaz kolonilerin petriler içindeki görünümü (Mavi beyaz koloni oluşumundan sonra beyaz kolonilerden koloni PCR yapılırken, aynı zamanda beyaz kolonilerin izolasyonu yapılmaktadır)

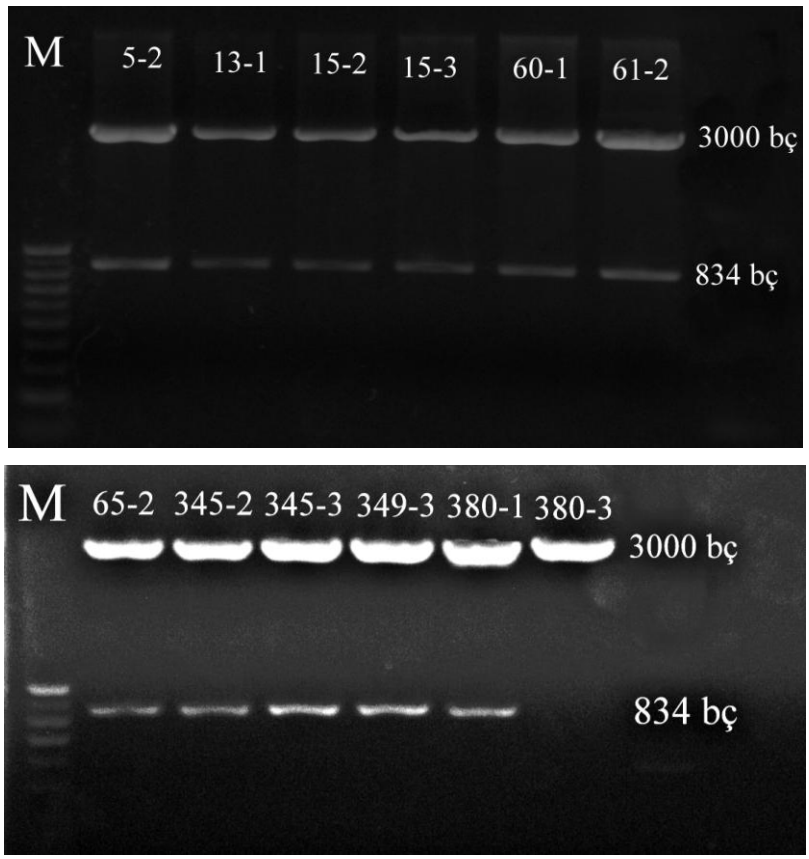
Klonlama yapılan genleri içeren bakterilerin belirlenmesinde mavi-beyaz koloni seçimi ilk aşamada kullanılmıştır. Beyaz kolonilerin istenilen LMV CP genlerini taşıyıp

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 2 tane seçilmiştir. Koloni PCR'ın tamamlanmasından sonra elde edilen PCR ürünleri 100-1000 bç DNA markörü ile birlikte % 1'lik agaroz jelde elektroforez yöntemi ile ayrıştırılarak etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında görüntülenerek analiz edilmiştir. LMV CP genine ait 834 bç büyüklüğünde bant oluşturan kolonilerin görülmesi ile klonlama işleminin bu aşamaya kadar sorunsuz bir şekilde gerçekleştiğini göstermiştir. LMV CP genine ait 834 bç büyüklüğünde bant oluşturan kolonilerden de plazmid izolasyonu için her bir izolat için en parlak bant oluşturanlar seçilmiştir. Kolonilerin belirlenmesi için yapılan koloni PCR sonuçları Şekil 4.10'da verilmiştir. Bazı kuyularda bant oluşumunun gözlenmemesi beyaz koloni olmasına rağmen LMV CP genine spesifik 834 bç büyüklüğündeki bölgeyi taşımadığından ya da koloni PCR esnasında kontaminasyon meydana geldiği için oluşmamış olabilir. Bu nedenle her bir izolat için en az 2 ayrı koloniden koloni PCR yapılmıştır.



Şekil 4.10. *Marul mozaik virüsü* izolatlarının koloni PCR sonuçlarını gösteren jel fotoğrafları (M: marker; 5-1, 5-2, 13-1, 13-2, 15-1, 15-2, 15-3, 60-1, 60-2, 61-1, 61-2, 65-1, 65-2, 345-1, 345-2, 345-2, 345-3, 349-1, 349-2, 349-3, 380-1, 380-2, 380-3: Koloni PCR izolat numaraları) (834 bç büyüklüğünde bant oluşmayan kuyular, beyaz koloni olmasına rağmen LMV CP genini taşımayan kolonilerde herhangi bir bant oluşumu gözlenmemiştir)

Seçilen bakteri kolonileri ampisilin içeren LB sıvı ortam içerisinde 37 ^{o}C'de çalkalamalı inkübatörde 16 saat büyütülmüştür. Daha sonra büyütülen bu kolonilerden Miniprep plazmid DNA izolasyon kiti (Biobasic, Kanada) kullanılarak plazmid izolasyonu yapılmıştır. Saflaştırılan bu plazmid DNA'lar T-A klonlaması yapılan bölgenin her iki yanında bulunan EcoRI restriksiyon enzimi kesme bölgelerinden EcoRI restriksiyon enzimi ile kesim yapılmıştır ve bu şekilde klonlanan DNA parçası plazmidden ayrılmıştır. Kesilen DNA'lar daha sonra % 1'lik agaroz jelde DNA markörleri ile birlikte koşturularak EtBr ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında incelendiğinde pozitif olan yaklaşık 3000 bç büyüklüğünde pGEM-T Easy plazmid DNA'sı ve 834 bç büyüklüğünde LMV CP genine ait bantlar görülmüştür. CP genlerini içeren plazmidlerin EcoRI enzimi ile kesilmesi sonucunda elde edilen sonuçlar şekil 4.11'de gösterilmektedir. Bu işlemin sonunda klonlanan LMV izolatlarının CP genini taşıdıkları kesin olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.11. Saflaştırılan plazmidlerin EcoRI restriksiyon enzimi ile kesimlerinin yapıldığı jel görüntüsü (M: Marker; 5-2, 13-1, 15-2, 15-3, 60-1, 61-2, 65-2, 345-2, 345-3, 349-3, 380-1, 380-3: Saflaştırılması yapılan plazmidlere ait örnek numaraları)

Genel olarak klonlama işlemleri 2 izolat dışında başarı ile tamamlanmıştır. İki izolatın klonlanamamasının ise RT-PCR ürünlerinin klonlamada kullanılmak için saflaştırılması esnasında kaybedilmesi ya da ligasyon aşamasında RT-PCR ürünleri ile plazmid DNA'larının birleştirilmesinde başarısız olunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Zerbini ve ark. (1995) elde ettikleri izolatların T-A klonlama sistemi ile klonlanması ilk olarak içerdikleri yüksek 2.0 kb değeri nedeniyle başarısız olduğunu belirtmişlerdir. Daha sonra *Bam*HI kesim enzimi kullanılarak elde edilen yaklaşık 1.0 kb değerine sahip genom bölgesi kullanarak klonlama işlemini başarı ile gerçekleştirmişlerdir. Sharma ve Jain (2013) klonlama çalışmalarında yaklaşık olarak 1.8 kb'lık RT-PCR ürünlerini kullanmışlar ve başarı ile klonlama çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Her iki çalışmada da ilk başta kullanılan RT-PCR ürünlerinin büyüklüklerinin birbirine oldukça yakın olmasına rağmen Zerbini ve ark. (1995)'nın ilk başta başarısız olması kullandıkları klonlama sisteminin klonlama kapasitesinden olabileceği düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda kullandığımız 0.84 kb'lık RT-PCR ürünleri ise klonlama kitlerinin sağlandığı firmanın belirttiği büyüklükten küçük olması nedeni ile bu açıdan bir sorun yaşanmamıştır.

4.6. Kılıf Protein Genlerinin Dizi Analizleri

Yapılan araştırmalar sonucunda gen bankasında bulunan dünya LMV izolatlarının CP genlerinin kıyaslanmasında genel olarak 726 bç'lik bölgenin kullanılmasından dolayı, Çanakkale LMV izolatların kendi içlerinde ve dünya izolatları ile nt ve a.a. düzeyinde kıyaslanmalarında gen bankasından bu bölgeye ait veriler alınarak kullanılmıştır.

4.6.1. Nükleotid dizi analizleri

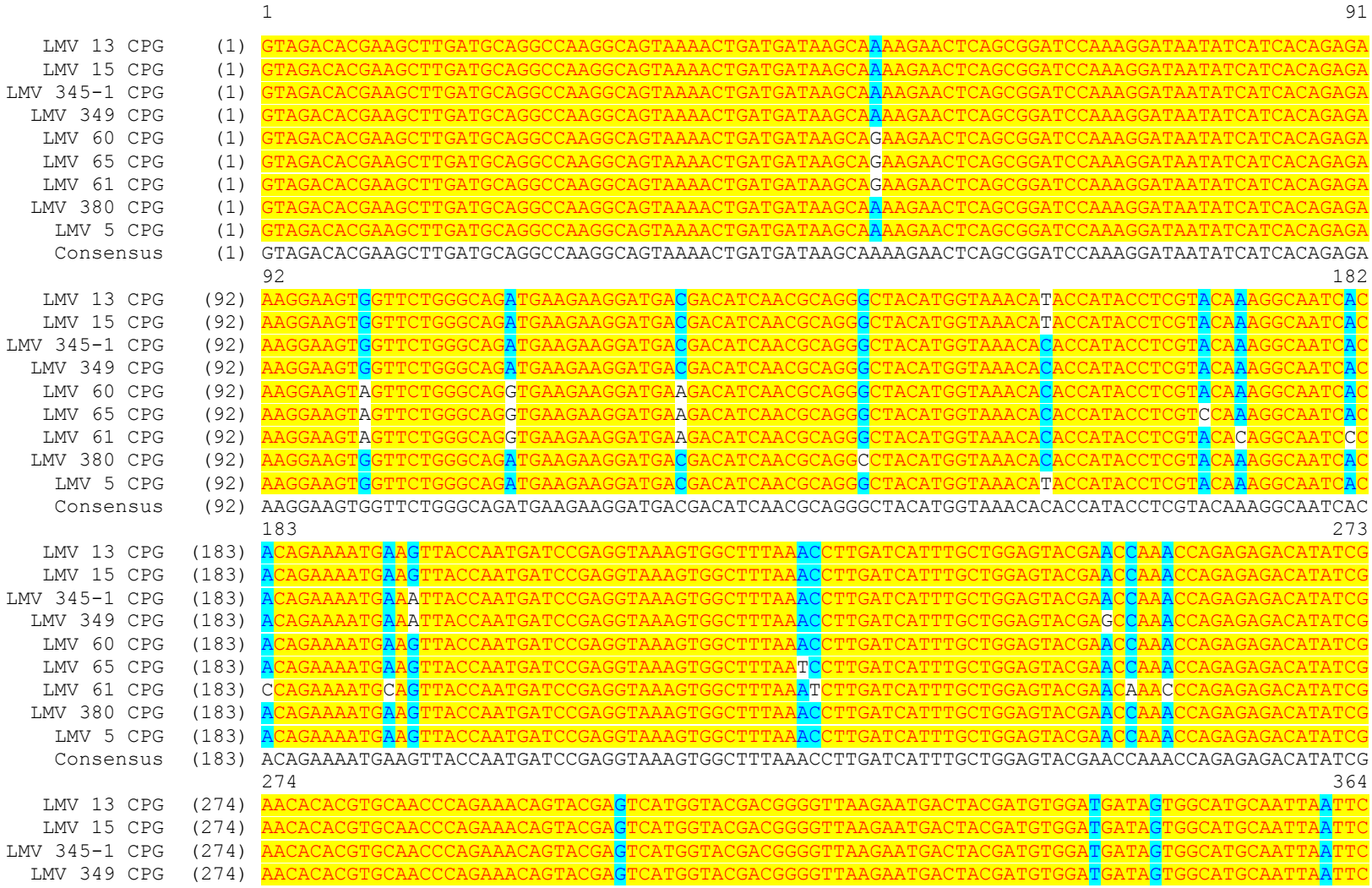
Saflaştırılan ve EcoRI enzimi ile kesilerek LMV CP genini taşıdığı kesin olarak belirlenen plazmidlerden bir tanesi seçilerek toplamda 9 LMV izolatını CP genlerinin DNA dizilimi belirlenmesi amacıyla Refgen Biyoteknoloji (Ankara) firmasına gönderilmiştir. LMV CP genlerini içeren pGEM-T Easy plazmidlerinin DNA dizilimi M13F ve M13R primerleri kullanılarak döngü dizileme yöntemiyle çift yönlü olarak otomatik DNA dizileme cihazı ile yapılmıştır. Her bir izolat için elde edilen DNA dizilerinden öncelikle plazmide ait bölgeler temizlenerek LMV CP genine ait nükleotid

dizileri elde edilmiştir. Çizelge 4.3'te dünya LMV izolatlarının ait olduğu ülkeler verilmiştir. Çanakkale LMV izolatlarının kendi aralarında karşılaştırmaları için elde edilen çoklu nükelotid dizi karşılaştırmaları çizelge 4.4 ve Çanakkale LMV izolatları ile dünya LMV izolatlarının karşılaştırmaları için elde edilen çoklu dizi karşılaştırmaları çizelge 4.5'te verilmiştir. DNA dizileri Vector NTI (Invitrogen, ABD) dizi analiz programlarında incelenmiştir.

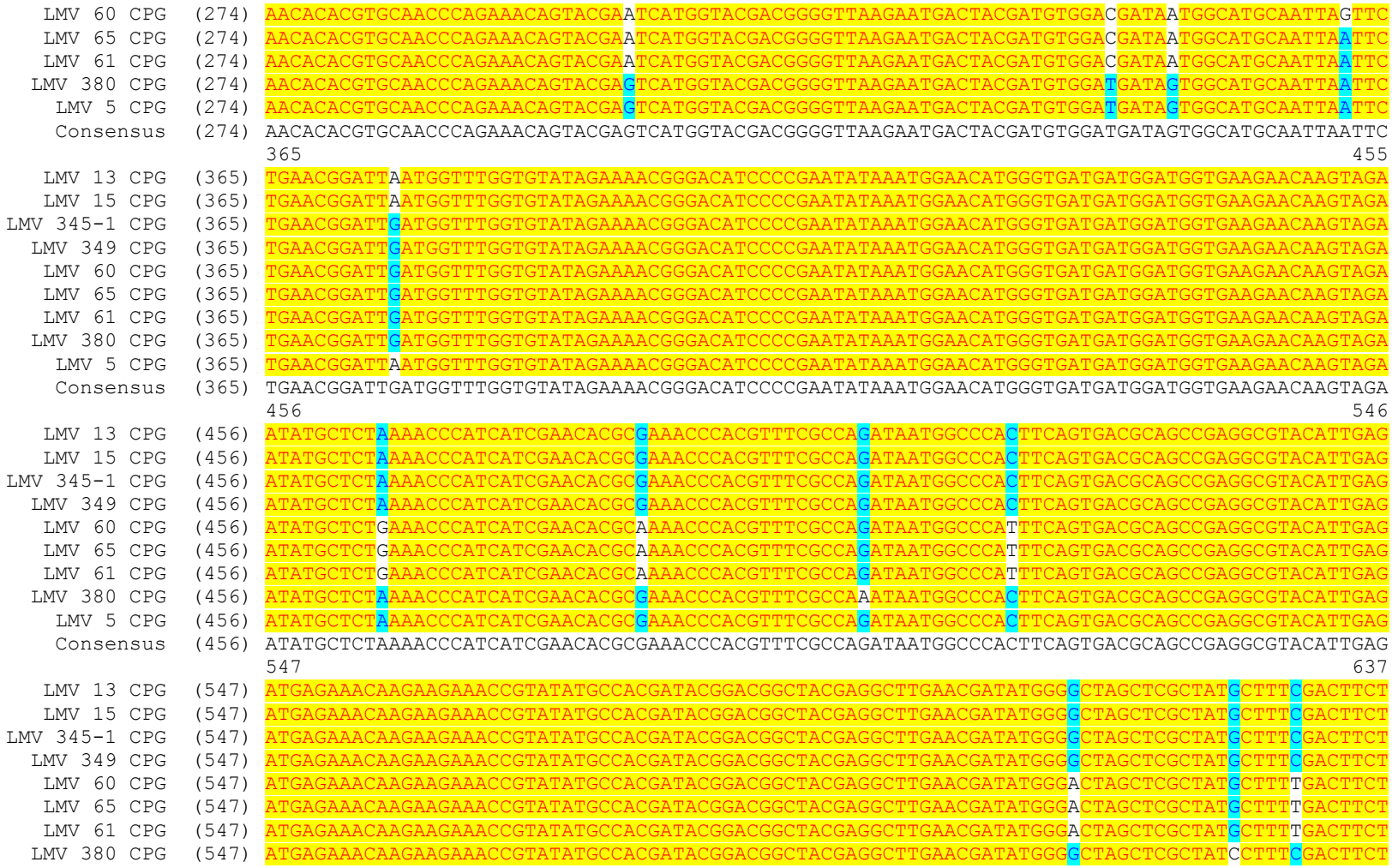
Çizelge 4.3. Dünyanın diğer bölgelerindeki *Marul mozaik virüsü* izolatlarının numaraları ve orijinleri (Numaralar aynı zamanda izolatların NCBI veri tabanındaki erişim numaralarıdır)

İzolat Numaraları	**Elde Edildiği Ülke**	**İzolat Numaraları**	**Elde Edildiği Ülke**
AJ278854.1	Brezilya	U24670.1	İspanya
AJ278855.1	Brezilya	X65652.1	Fransa
AJ297630.1	Çin	X97705.1	İspanya
AJ306288.1	Çin	X97704.2	Fransa
AJ488153.1	Çin	Z78277.1	Yemen
EF423619.1	Çin	Z78228.1	Yunanistan
EF633502.1	Çin	Z78229.1	Yunanistan
JQ794776.1	Hindistan	Z78230.1	Yunanistan
KF955619.1	Kore		

Çizelge 4.4. Çanakkale *Marul mozaik virüsü* izolatlarının kendi aralarında 726 baz çiftlik kılıf protein genine ait çoklu nükleotid dizi karşılaştırmaları



Çizelge 4.4'ün devamı. Çanakkale *Marul mozaik virüsü* izolatlarının kendi aralarında 726 baz çiftlik kılıf protein genine ait çoklu nükleotid dizi karşılaştırmaları



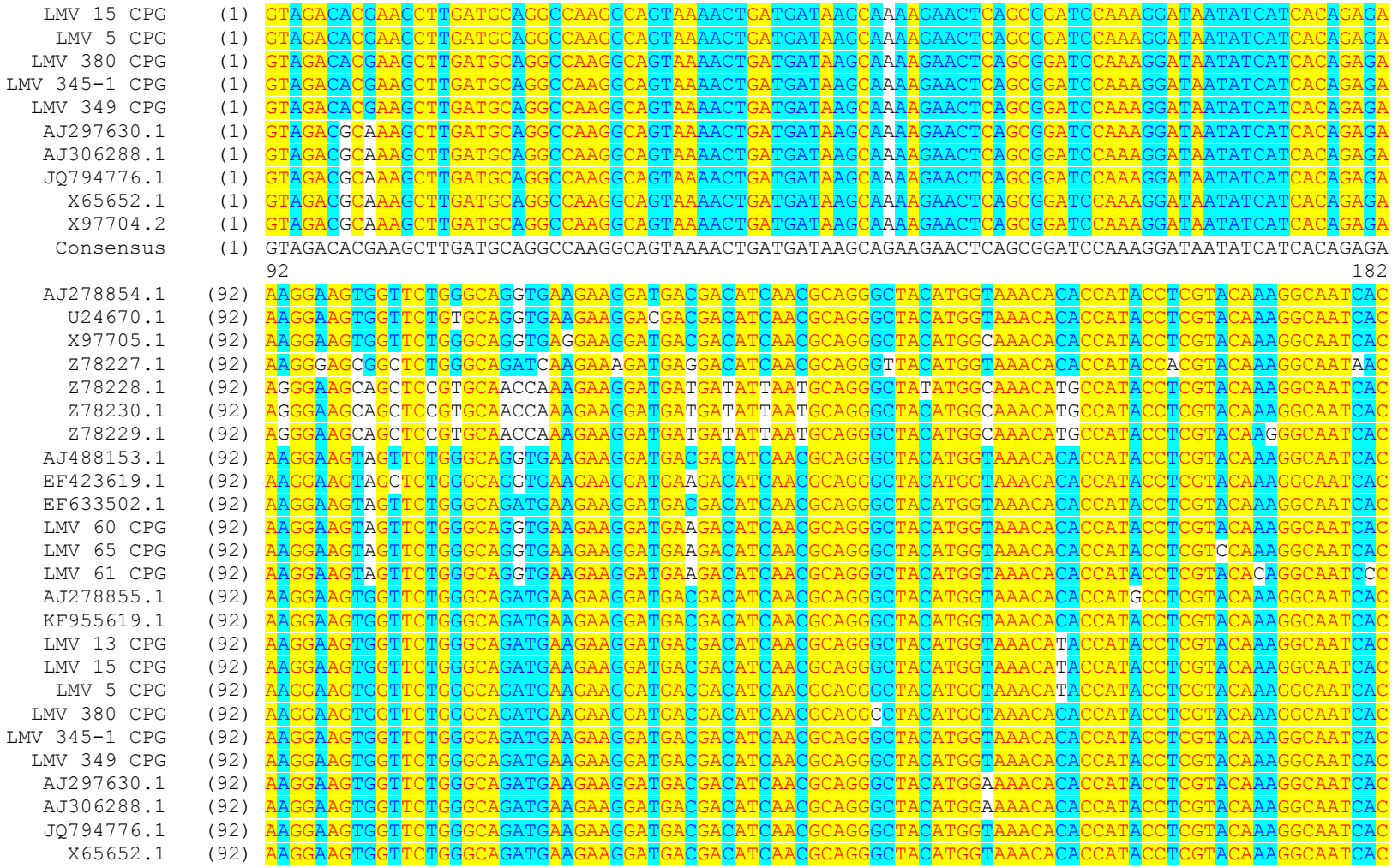
Çizelge 4.4'ün devamı. Çanakkale *Marul mozaik virüsü* izolatlarının kendi aralarında 726 baz çiftlik kılıf protein genine ait çoklu nükleotid dizi karşılaştırmaları

```
    LMV 5 CPG   (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGCTAGCTCGCTATGCTTTCGACTTCT
    Consensus   (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGCTAGCTCGCTATGCTTTCGACTTCT
                      638                                                                                  726
   LMV 13 CPG   (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
   LMV 15 CPG   (638) ACGAAACAACATCAGCTACCCCAAATCGGGCAAGAGAGGCGCACAATCAAATGATGGCAGCTGCTCTAGTGGGACCACAGAACAGACTG
LMV 345-1 CPG   (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
  LMV 349 CPG   (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGGGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
   LMV 60 CPG   (638) ACGAAACCACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGGGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
   LMV 65 CPG   (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGGGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
   LMV 61 CPG   (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
  LMV 380 CPG   (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
    LMV 5 CPG   (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
    Consensus   (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
```


Çizelge 4.5. Çanakkale *Marul mozaik virüsü* (LMV) izolatları ile dünyadaki LMV izolatlarının 726 baz çiftlik kılıf protein genine ait çoklu nükleotid dizi karşılaştırmaları

```
                      1                                                                                   91
  AJ278854.1    (1) GTAGATGCGAAGCTTGATGCAGGCCAAGGCAGCAAGACTGATGATAAACAGAAGAATTCAGCGGATCCAAAGGATAATATCATCACGGAGA
    U24670.1    (1) GTAGACACAAAGCTTGATGCAGGCCAAGGCAGTAAAACTGATGATAGGCAGAAGAACTCAGCGGATCCAAAGAATAATACTATCACAGAGA
    X97705.1    (1) GTAGACACGAAGCTTGATGCAGGCCAAGGCAGTAAAAATGATGATAAACAGAAGAGCTCAGCGGATTCAAAAGATAATGTCATCACGGAGA
    Z78227.1    (1) GTGGATACTAAACTCGATGCGGGCCAAGACAATAAAGCCGACAACAAACTGAAGAACACTGCAGATTCAAAAGATAGTGCCGTCACAGAAA
    Z78228.1    (1) GTTGACACGAAGCTTGATGCGGGACAAGACAATAAAAGCGATAGCAAACAGAAAGGCTCAGCAGAATCAAAGGATATCGCCACCACAGAAA
    Z78230.1    (1) GTTGACACGAAGCTTGATGCGGGACAAGACAATAAAAGCGATAGCAAACAGAAAGGCTCAGCAGAATCAAAGGATATCGCCACCACAGAAA
    Z78229.1    (1) GTTGACACGAAACTTGATGCGGGACAAGACAATAAAGGTGATAGCAAACAGAAAGGCTCAGCAGAATCAAAGGACATCACCACCACCGAAA
  AJ488153.1    (1) GTAGACGCGAAGCTTGATGCAGGCCAAGGCAGCAAAACTGATAATAAGCAGAAGAACTCAGCGGATCCAAAGGATAATATCATCACAGAGA
  EF423619.1    (1) GTAGACGCAAAGCTTGATGCAGGCCAAGGCAGTAAAGCTGATGATAAGCAGAAGAACTCAGCGGATCCAAAGGATAATATCATCACAGAGA
  EF633502.1    (1) GTAGACGCGAAGCTTGATGCAGGTCAAGGCAGTAAAACTGATGATAAGCAGGAGAACTCAGCGGATCCAAAGGATAATATCGTCACAGAGA
  LMV 60 CPG    (1) GTAGACACGAAGCTTGATGCAGGCCAAGGCAGTAAAACTGATGATAAGCAGAAGAACTCAGCGGATCCAAAGGATAATATCATCACAGAGA
  LMV 65 CPG    (1) GTAGACACGAAGCTTGATGCAGGCCAAGGCAGTAAAACTGATGATAAGCAGAAGAACTCAGCGGATCCAAAGGATAATATCATCACAGAGA
  LMV 61 CPG    (1) GTAGACACGAAGCTTGATGCAGGCCAAGGCAGTAAAACTGATGATAAGCAGAAGAACTCAGCGGATCCAAAGGATAATATCATCACAGAGA
  AJ278855.1    (1) GTAGACGCAAAGCTTGATGCAGGCCAAGGCAGTAAAACTGATGATAAGCAAAAGAGCTCAGCGGATCCAAAGGATAATATCATCACAGAGA
  KF955619.1    (1) GTAGACGCAAAGCTTGATGCAGGCCAAGGCAGTAAATCTGATGATAAGCAAAAGAACTCAGCGGATCCAAAGGATAATATCATCACAGAGA
  LMV 13 CPG    (1) GTAGACACGAAGCTTGATGCAGGCCAAGGCAGTAAACTGATGATAAGCAAAAGAACTCAGCGGATCCAAAGGATAATATCATCACAGAGA
```

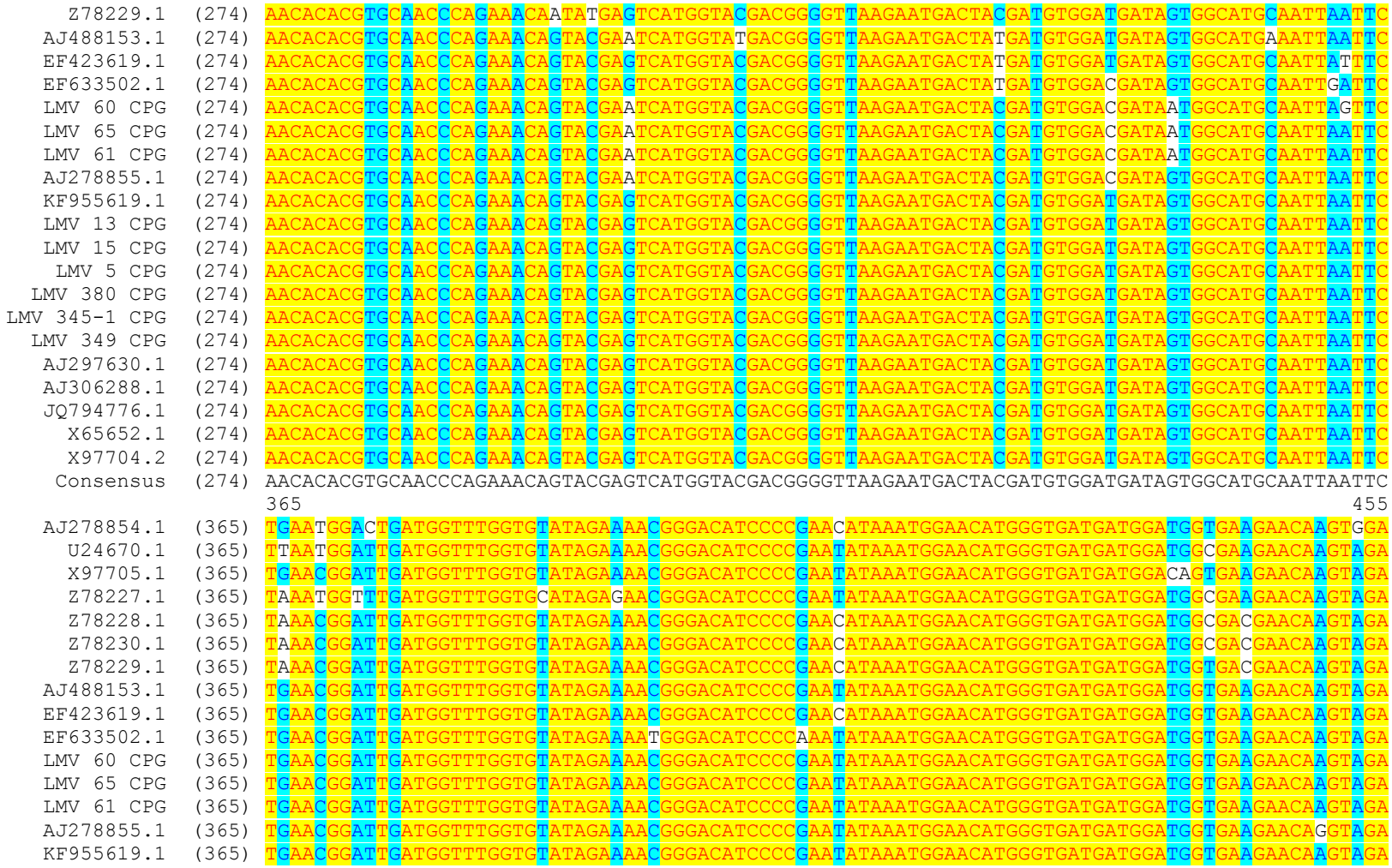
Çizelge 4.5'in devamı. Çanakkale *Marul mozaik virüsü* (LMV) izolatları ile dünyadaki LMV izolatlarının 726 baz çiftlik kılıf protein genine ait çoklu nükleotid dizi karşılaştırmaları



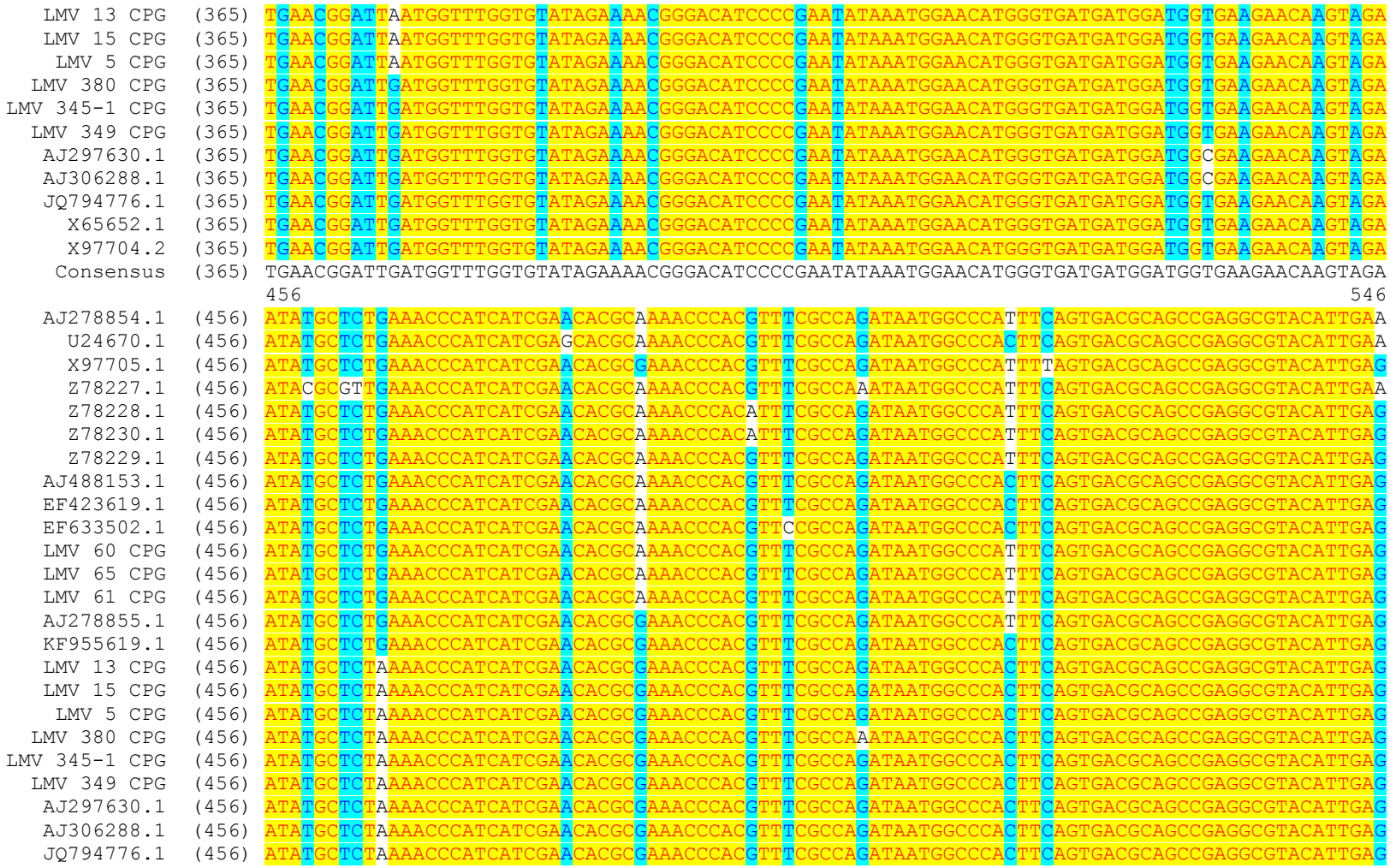
Çizelge 4.5'in devamı. Çanakkale *Marul mozaik virüsü* (LMV) izolatları ile dünyadaki LMV izolatlarının 726 baz çiftlik kılıf protein genine ait çoklu nükleotid dizi karşılaştırmaları

```
      X97704.2   (92) AAGGAAGTGGTTCTGGGCAGATGAAGAAGGATGACGACATCAACGCAGGGCTACATGGTAAACACACCATACCTCGTACAAAGGCAATCAC
     Consensus   (92) AAGGAAGTGGTTCTGGGCAGATGAAGAAGGATGACGACATCAACGCAGGGCTACATGGTAAACACACCATACCTCGTACAAAGGCAATCAC
                      183                                                                                  273
    AJ278854.1  (183) ACAGAAAATGAAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGAGAGACATATCG
      U24670.1  (183) ACAGAAAATGAAGTTACCAATGATTCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGAGAGATATATCA
      X97705.1  (183) ACAGAAAATGAAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTGAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGAGAGACATATCA
      Z78227.1  (183) ACAGAAGATGAAATTACCAATGATTCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTCGAACATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAAAGAGACATATCG
      Z78228.1  (183) ACAGAAAATGAAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGCGAGACATATCG
      Z78230.1  (183) ACAGAAAATGAAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGCGAGACATATCG
      Z78229.1  (183) ACAGAAAATGAAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGCGAGACATATCG
    AJ488153.1  (183) ACAGAAAATGAAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTGAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGAGAGACATATCA
    EF423619.1  (183) ACAGAAAATGAAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTGAACATTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAAAGAGACATATCG
    EF633502.1  (183) GCAGAAAATGAAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGAGAGACATATCG
     LMV 60 CPG (183) ACAGAAAATGAAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGAGAGACATATCG
     LMV 65 CPG (183) ACAGAAAATGAAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAATCCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGAGAGACATATCG
     LMV 61 CPG (183) CCAGAAAATGCAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAATCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACAAACCCAGAGAGACATATCG
    AJ278855.1  (183) ACAGAAAATGAAATTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGAGAGACATATCG
    KF955619.1  (183) ACAGAAAATGAAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGAGAGACATATCG
     LMV 13 CPG (183) ACAGAAAATGAAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGAGAGACATATCG
     LMV 15 CPG (183) ACAGAAAATGAAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGAGAGACATATCG
      LMV 5 CPG (183) ACAGAAAATGAAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGAGAGACATATCG
    LMV 380 CPG (183) ACAGAAAATGAAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGAGAGACATATCG
LMV 345-1 CPG (183) ACAGAAAATGAAATTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGAGAGACATATCG
    LMV 349 CPG (183) ACAGAAAATGAAATTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAGCCAAACCAGAGAGACATATCG
    AJ297630.1  (183) ACAGAAAATGAAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGAGAGACATATCG
    AJ306288.1  (183) ACAGAAAATGAAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGAGAGACATATCG
    JQ794776.1  (183) ACAGAAAATGAAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGAGAGACATATCG
      X65652.1  (183) ACAGAAAATGAAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGAGAGACATATCG
      X97704.2  (183) ACAGAAAATGAAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGAGAGACATATCG
     Consensus  (183) ACAGAAAATGAAGTTACCAATGATCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAAACCAGAGAGACATATCG
                      274                                                                                  364
    AJ278854.1  (274) AACACACGTGCAACCCAGAAACAGTACGAGTCATGGTACGACGGGGGTTAAGAATGACTATGATGTGGACGATAATGGCATGCAATTAATTC
      U24670.1  (274) AACACACGCGCAACCCAGAAACAATACGAGTCATGGTACGACGGGGGTTAAGAATGACTATGATGTGGATGATAGTGGCATGCAATTAATTC
      X97705.1  (274) AACACACGCGCGACTCAAAACAATACGAGTCATGGTACGACGGAGTTAAGAATGACTATGATGTGGATGATAATGGCATGCAATTAATTC
      Z78227.1  (274) AACACACGGTCAACTCAGAAGCAATATGAGTCATGGTATGACGGGGGTCAAGAATGACTATGATGTGGATGATAATGGCATGCAATTAATCC
      Z78228.1  (274) AACACACGTGCAACCCAGAAACAATATGAGTCATGGTACGACGGGGGTTAAGAATGACTACGACGTGGACGATAGCGGCATGCAATTAATTC
      Z78230.1  (274) AACACACGTGCAACCCAGAAACAATATGAGTCATGGTACGACGGGGGTTAAGAATGACTACGATGTGGACGATAGTGGCATGCAATTAATTC
```

Çizelge 4.5'in devamı. Çanakkale *Marul mozaik virüsü* (LMV) izolatları ile dünyadaki LMV izolatlarının 726 baz çiftlik kılıf protein genine ait çoklu nükleotid dizi karşılaştırmaları



Çizelge 4.5'in devamı. Çanakkale *Marul mozaik virüsü* (LMV) izolatları ile dünyadaki LMV izolatlarının 726 baz çiftlik kılıf protein genine ait çoklu nükleotid dizi karşılaştırmaları



Çizelge 4.5'in devamı. Çanakkale *Marul mozaik virüsü* (LMV) izolatları ile dünyadaki LMV izolatlarının 726 baz çiftlik kılıf protein genine ait çoklu nükleotid dizi karşılaştırmaları

```
      X65652.1  (456) ATATGCTCTAAAACCCATCATCGAACACGCGAAACCCACGTTTCGCCAGATAATGGCCCACTTCAGTGACGCAGCCGAGGCGTACATTGAG
      X97704.2  (456) ATATGCTCTAAAACCCATCATCGAACACGCGAAACCCACGTTTCGCCAGATAATGGCCCACTTCAGTGACGCAGCCGAGGCGTACATTGAG
      Consensus (456) ATATGCTCTGAAACCCATCATCGAACACGCGAAACCCACGTTTCGCCAGATAATGGCCCACTTCAGTGACGCAGCCGAGGCGTACATTGAG
                      547                                                                                   637
      AJ278854.1 (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGCTAGCTCGCTATGCTTTCGACTTCT
        U24670.1 (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGTTAGCTCGCTATGCTTTCGACTTCT
        X97705.1 (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGTTAGCTCGCTACGCTTTCGACTTTT
        Z78227.1 (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGACATGGGGTTAGCTCGCTATGCTTTCGATTTTT
        Z78228.1 (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGTTAGCTCGCTATGCTTTCGACTTCT
        Z78230.1 (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGTTAGCTCGCTATGCTTTCGACTTCT
        Z78229.1 (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGTTAGCTCGCTATGCTTTCGACTTCT
      AJ488153.1 (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGCTGGCTCGCTATGCTTTCGACTTCT
      EF423619.1 (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGTTAGCTCGCTATGCTTTCGACTTCT
      EF633502.1 (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGTTAGCTCGCTATGCTTTCGACTTCT
      LMV 60 CPG (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGACTAGCTCGCTATGCTTTTGACTTCT
      LMV 65 CPG (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGACTAGCTCGCTATGCTTTTGACTTCT
      LMV 61 CPG (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGACTAGCTCGCTATGCTTTTGACTTCT
      AJ278855.1 (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGCTAGCTCGCTATGCTTTTGACTTTT
      KF955619.1 (547) ATGAGAAACAGGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGCTAGCTCGTTATGCTTTCGACTTCT
      LMV 13 CPG (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGCTAGCTCGCTATGCTTTCGACTTCT
      LMV 15 CPG (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGCTAGCTCGCTATGCTTTCGACTTCT
       LMV 5 CPG (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGCTAGCTCGCTATGCTTTCGACTTCT
    LMV 380 CPG (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGCTAGCTCGCTATCCTTTCGACTTCT
  LMV 345-1 CPG (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGCTAGCTCGCTATGCTTTCGACTTCT
    LMV 349 CPG (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGCTAGCTCGCTATGCTTTCGACTTCT
      AJ297630.1 (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGCTAGCTCGCTATGCTTTCGACTTCT
      AJ306288.1 (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGCTAGCTCGCTATGCTTTCGACTTCT
      JQ794776.1 (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGCTAGCTCGCTATGCTTTCGACTTCT
        X65652.1 (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGCTAGCTCGCTATGCTTTCGACTTCT
        X97704.2 (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGCTAGCTCGCTATGCTTTCGACTTCT
        Consensus (547) ATGAGAAACAAGAAGAAACCGTATATGCCACGATACGGACGGCTACGAGGCTTGAACGATATGGGGCTAGCTCGCTATGCTTTCGACTTCT
                        638                                                                                 726
      AJ278854.1 (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCGAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTTGTGGGAACACAGAACAGATTG
        U24670.1 (638) ACGAAACAACATCAGCAACCCCAAATCGGGCGAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
        X97705.1 (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCGAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
        Z78227.1 (638) ACGAAACAACATCAGCAACCCCAAATCGGGCAAGGGAGGCGCACAATCAGATGAAGGCAGCTGCTTTAGTGGGAACACAAAACAGACTG
        Z78228.1 (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCGAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
```

Çizelge 4.5'in devamı. Çanakkale *Marul mozaik virüsü* (LMV) izolatları ile dünyadaki LMV izolatlarının 726 baz çiftlik kılıf protein genine ait çoklu nükleotid dizi karşılaştırmaları

```
      Z78230.1  (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCGAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
      Z78229.1  (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCGAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
    AJ488153.1  (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCGAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
    EF423619.1  (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCGAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
    EF633502.1  (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCGAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
    LMV 60 CPG  (638) ACGAAACCACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGGGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
    LMV 65 CPG  (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGGGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
    LMV 61 CPG  (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
    AJ278855.1  (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
    KF955619.1  (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
    LMV 13 CPG  (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
    LMV 15 CPG  (638) ACGAAACAACATCAGCTACCCCAAATCGGGCAAGAGAGGCGCACAATCAAATGATGGCAGCTGCTCTAGTGGGACCACAGAACAGACTG
     LMV 5 CPG  (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
   LMV 380 CPG  (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
LMV 345-1 CPG  (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
   LMV 349 CPG  (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGGGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
    AJ297630.1  (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
    AJ306288.1  (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
    JQ794776.1  (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
      X65652.1  (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
      X97704.2  (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
     Consensus  (638) ACGAAACAACATCAGCGACCCCAAATCGGGCAAGAGAGGCGCACAATCAAATGAAGGCAGCTGCTCTAGTGGGAACACAGAACAGACTG
```

Marul mozaik virüsü izolatlarının CP genlerini içeren bölgenin nt dizilimleri benzerlik oranları çizelge 4.6'da verilmiştir. Çanakkale ili ve ilçelerinin farklı bölgelerinden alınan 9 LMV izolatının CP genlerinin nt dizilimleri kendi aralarında karşılaştırıldığında izolatlar arasında % 97-100 arasında değişen oranlarda benzerlik olduğu bulunmuştur. İzolatlar arasında en çok benzerlik % 100'lük oranla LMV 13 (Merkez) ile LMV 15 (Merkez), LMV 345-1 (Ezine) ve LMV 5 (Ayvacık) izolatları; LMV 5 (Ayvacık) ile LMV 15 (Merkez); LMV 345-1 (Bayramiç) ile LMV 349 (Ezine); LMV 345-1 (Bayramiç) ile LMV 5 (Ayvacık) izolatları arasında bulunmuştur. En düşük benzerlik oranı ise % 97'lik oranla LMV 15 (Merkez) ile LMV 60 (Ayvacık), LMV 61 (Ayvacık) ve LMV 65 (Ayvacık) izolatları; LMV 61 (Ayvacık) ile LMV 5 (Ayvacık) ve LMV 380 (Biga) numaralı izolatlar arasında bulunmuştur.

Ormaz ve ark. (2006) İran'ın 5 farklı ilinden 2004-2005 üretim sezonu boyunca marul alanlarından LMV ile enfekteli olduğunu düşündükleri bitkilerden örnekler almışlardır. Elde etmiş oldukları izolatların nt dizilerini çıkararak karşılaştırılmalarını yapmışlardır. İran izolatlarının % 98 oranında benzerlik gösterdiklerini belirtmişlerdir. Çanakkale LMV izolatlarının da kendi aralarında karşılaştırmalarının yapılması sonucunda elde edilen % 96-100 oranı ile aynı bölge izolatlarının birbirleri ile yüksek oranda benzer oldukları görülmüştür.

Çizelge 4.6. Çanakkale ili ve ilçelerine ait marul üretim alanlarından toplanan *Marul mozaik virüsü* izolatlarının nükleotid dizilerinin % benzerlik oranları

İzolatlar	LMV 15	LMV 345-1	LMV 349	LMV 60	LMV 65	LMV 61	LMV 380	LMV 5
LMV 13	100	100	99	98	98	97	99	100
LMV 15		99	99	97	97	97	99	100
LMV 345-1			100	98	98	97	99	100
LMV 349				98	98	97	99	99
LMV 60					99	99	98	98
LMV 65						99	98	98
LMV 61							97	97
LMV 380								99

Gen bankası veritabanlarında dünyanın farklı üretim bölgelerinden elde edilen çok sayıda farklı LMV izolatının CP genlerini içeren bölgesinin dizilimi bulunmaktadır. Gen bankasında bulunan bu genlerinin nt dizilimleri alınarak Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen LMV izolatlarının CP genlerinin nt dizilimleri ile karşılaştırarak

Çanakkale LMV izolatlarının diğer uluslararası izolatlar ile benzerlik oranları belirlenmiştir (Çizelge 4.7). Yapılan karşılaştırmalar sonucunda ülkemiz Çanakkale LMV izolatlarının dünya izolatları ile % 88-100 arasında değişen oranda benzerlik gösterdiği görülmüştür. LMV 345-1 (Bayramiç) izolatı X65652.1 ile X97704.2 (Fransa) ve JQ794776.1 (Hindistan) izolatları ile % 100'lük benzerlik göstererek dünya LMV izolatları arasında CP genleri nt dizilimleri açısından en fazla benzerlik gösteren izolat olarak bulunmuştur. LMV 61 (Ayvacık) izolatı ise Z78227.1 (Yemen) izolatı ile % 88'lik benzerlik oranı göstererek en düşük benzerlik oranına sahip izolat olarak bulunmuştur. Diğer Çanakkale LMV izolatları ise Z78277.1 izolatı ile % 88-92 arasında benzerlik oranı gösterdiği bulunmuştur.

Zerbini ve ark. (1995) 1991 ve 1992 yılları arasında Salinas vadisinden elde ettikleri LMV izolatların moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. LMV-R izolatının Fransa'dan elde edilen LMV-O izolatı (X65652.1) ile CP genleri nt dizilimleri bakımından % 99 benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Çanakkale LMV izolatlarının da Fransa'dan elde edilen bu izolat ile % 97-99 arasında benzerlik gösterdiği görülmektedir.

Revers ve ark. (1997b) biyolojik özellikleri bakımından farklı 2 LMV izolatının (LMV-0 ve LMV-E) tam sekans dizilerinin tamamını belirleyerek karşılaştırmasını yapmışlardır. İzolatların nt dizilerinin karşılaştırılması sonucunda % 94 oranında benzerlik gösterdiklerini bildirmişlerdir. Çanakkele LMV izolatları ise belirtilen 2 izolat ile (X97704.2 ve X97705.1 sırası ile) CP genleri nt dizilimleri bakımından % 95-100 arasında değişen benzerlik oranına sahiptir.

Naidu ve ark. (2008) ABD'de ev bahçeleri ve yol kenarında yetiştirilen bir süs bitkisinden elde ettikleri LMV izolatının sekanslamasını gerçekleştirmişlerdir. Gen bankasındaki diğer izolatlar ile yaptıkları karşılaştırmalarda ise NIb+CP genleri bakımından Fransa, Çin ve Brezilya izolatı ile % 93-99 arasında benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Çanakkale LMV izolatları ise belirtilen LMV izolatları ile CP genleri nt dizilimleri bakımından % 97-100 arasında benzerlik göstermiştir. ABD LMV izolatının belirtilen LMV izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik oranının, Çanakkale LMV izolatlarına göre daha düşük olması Naidu ve ark. (2008)'nın kıyaslamalarda NIb+CP nt dizilimlerini kullanmaları, bizim ise CP genleri nt dizilimlerini kullamamızdan

kaynaklanmaktadır. Bu sonuçtan LMV CP geninin NIb genine göre daha iyi korunmuş bir bölge olduğu sonucunu da çıkarmaktadır.

Alan (2012) elde ettiği LMV izolatlardan bir tanesinin sekans analizini yaptırarak, sekans analizi yapılan LMV izolatının NCBI'da dizini bulunan bir Amerikan izolatı ile % 99 oranında benzerlik gösterdiğini belirtmiştir. Bizim çalışmamızda Çanakkale LMV izolatları, dünya izolatları ile % 88-100 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. Genel olarak Çanakkale LMV izolatlarının dünya LMV izolatları ile % 96-100 arasında benzerlik gösterdiği söylenebilir. Bizim oluşturmuş olduğumuz benzerlik tablosunda Amerikan izolatlarının bulunmaması nedeni ile Alan (2012)'ın elde etmiş olduğu LMV izolatı ile Çanakkale LMV izolatlarının karşılaştırılmasına yönelik yorumlar yapılamamıştır.

Sharma ve Jain (2013) Hindistan'dan elde ettikleri LMV izolatlarından bir tanesinin klonlayarak sekans dizinini çıkarmışlardır. Gen dizilerinin elde edilmesi sonucunda LMV CP genlerinin veri tabanında bulunan 2 Amerika, 2 Birleşik Krallık, 2 Brezilya ve 1 Çin izolatı ile karşılaştırılması sonucunda % 90-99 arasında benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu izolatlardan 2 Brezilya ve 1 Çin izolatının Çanakkale LMV izolatları ile CP genleri nt dizilimleri bakımından benzerlik oranları % 96-98 arasında bulunmuştur.

Çizelge 4.7. Çanakkale *Marul mozaik virüsü* izolatları (LMV) ile dünyadaki LMV izolatlarının kılıf protein geni nükleotid dizilerinin benzerlik oranları

İZOLATLAR	U24670.1	X97705.1	Z78227.1	Z78228.1	Z78230.1	Z78229.1	AJ488153.1	EF423619.1	EF633502.1	LMV 60	LMV 65	LMV 61	AJ278855.1	KF955619.1	LMV 13	LMV 15	LMV 5	LMV 380	LMV 345-1	LMV 349	AJ297630.1	AJ306288.1	JQ794776.1	X65652.1	X97704.2
AJ278854.1	96	95	89	91	92	91	97	96	96	97	97	96	96	96	96	96	96	96	97	96	96	96	97	97	97
U24670.1		95	90	91	92	91	96	96	96	96	96	95	95	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96
X97705.1			89	91	92	91	96	95	95	95	95	95	95	95	96	95	96	95	96	95	95	95	96	96	96
Z78227.1				88	89	89	89	90	89	89	89	88	89	89	89	89	89	90	90	90	90	90	90	90	90
Z78228.1					100	98	92	92	92	92	92	91	91	91	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92
Z78230.1						99	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92
Z78229.1							92	93	92	92	92	91	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92
AJ488153.1								98	97	97	97	97	97	98	98	97	98	97	98	97	98	98	98	98	98
EF423619.1									97	97	97	96	97	98	97	97	97	97	97	97	98	98	98	98	98
EF633502.1										97	97	96	97	97	97	97	97	97	98	97	97	97	98	98	98
LMV 60											99	99	98	97	98	97	98	98	98	98	97	97	98	98	98
LMV 65												99	98	97	98	97	98	98	98	98	97	97	98	98	98
LMV 61													97	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97
AJ278855.1														98	98	98	98	98	98	98	98	98	99	99	99
KF955619.1															99	98	99	99	99	99	99	99	99	99	99
LMV 13																100	100	99	100	99	99	99	99	99	99
LMV 15																	100	99	99	99	99	99	99	99	99
LMV 5																		99	100	99	99	99	99	99	99
LMV 380																			99	99	99	99	99	99	99
LMV 345-1																				100	99	99	100	100	100
LMV 349																					99	99	99	99	99
AJ297630.1																						100	100	100	100
AJ306288.1																							100	100	100
JQ794776.1																								100	100
X65652.1																									100

4.6.2. Amino asit dizi analizleri

Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen LMV izolatlarının CP genine göre çıkarılmış olan a.a. yapılarının kendi aralarında ve dünya LMV izolatları ile çoklu a.a. dizilerinin karşılaştırılmaları yapılmıştır (Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10). Amino asit dizileri Vector NTI (Invitrogen, ABD) dizi analiz programlarında incelenmiştir.

Çanakkale ili ve ilçelerinin farklı üretim bölgelerinden alınan izolatların CP genlerinin a.a. dizileri kendi aralarında karşılaştırıldığında % 95-100 arasında değişen oranlarda benzerlikler tespit edilmiştir. Çalışılan tüm izolatların birbirleri ile gösterdikleri benzerlik oranları çizelge 4.8'de verilmiştir. Ayvacıktan izole edilen LMV 61 numaralı örnek, Merkez'den izole edilen LMV 15 numaralı örnek ile % 95 oranında benzerlik göstererek CP genleri a.a. dizilimleri bakımından birbirine en uzak izolatları oluşturmuşlardır. LMV 13, 345-1, 349, 380 ve 5 numaralı örnekler arasında ise % 100 oranında benzerlik olduğu tespit edilmiştir.

Zerbini ve ark. (1995) 1991 ve 1992 yılları arasında Salinas vadisinden elde ettikleri LMV izolatlarının moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yapılan sekans çalışmaları sonucunda izolatların a.a. benzerlik oranlarının % 95 ile % 99 arasında benzerlik oranına sahip ve potyvirüslerin afitler ile taşınımı için gerekli olan DAG a.a. motifini de içerdiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da elde ettiğimiz sonuçlar Zerbini ve ark. (1995)'nın elde ettiği sonuçlara oldukça yakındır. Böylelikle a.a. dizilimleri bakımından aynı bölge izolatlarının a.a. yapılarının oldukça benzer olduğu söylenebilir. A.a. dizilerinin çoklu karşılaştırmaları sonucu elde edilen bilgiler doğrultusunda tüm Çanakkale izolatlarının yaprak bitleri ile taşınmada rol oynayan DAG a.a. motifini içerdikleri de görülmektedir.

Çizelge 4.8. Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen *Marul mozaik virüsü* izolatlarının kılıf protein genine göre çıkarılmış amino asit dizilerinin kendi aralarında gösterdikleri benzerlik oranları

İZOLATLAR	LMV 15	LMV 345-1	LMV 349	LMV 380	LMV 5	LMV 60	LMV 61	LMV 65
LMV 13	99	100	100	100	100	98	96	97
LMV 15		99	99	99	99	97	95	96
LMV 345-1			100	100	100	98	96	97
LMV 349				99	100	98	96	98
LMV 380					100	97	96	97
LMV 5						98	96	97
LMV 60							97	99
LMV 61								97

Çanakkale ili ve ilçelerinin farklı üretim bölgelerinden alınan izolatların CP genlerinin a.a. dizilerinin, dünyanın farklı bölgelerinden elde edilen ve gen bankasında bulunan LMV izolatları ile karşılaştırılması yapıldığında % 91-100 arasında değişen oranlar da benzerlik gösterdiği görülmektedir. Çalışılan tüm Çanakkale LMV izolatları ve gen bankasında bulunan dünyanın diğer bögelerinden elde edilen LMV izolatlarının karşılaştırılmaları çizelge 4.11'de verilmiştir. Çanakkale Ayvacık'tan elde edilen LMV 61 numaralı izolat Z78229.1 numaralı Yunan izolatı ile % 91 oranında benzerlik göstererek Çanakkale LMV izolatları arasında dünya izolatları ile en az benzerlik gösteren izolat olmuştur. Merkez'den elde edilen LMV 13 ve Ayvacık'tan elde edilen LMV 5 numaralı izolatlar X65652.1, X97704.2 Fransa izolatları ile % 100 benzerlik göstermişlerdir. Bayramiç'ten elde edilen LMV 345-1 ile Ayvacık'tan izole edilen LMV 5 numaralı izolatlar AJ297630.1-AJ306288.1 numaralı Çin izolatları ve JQ794776.1 Hindistan izolatı ile % 100 benzerlik göstermişlerdir. Dünya LMV izolatları ile a.a. dizilimi bakımından en fazla benzerliğe sahip olan izolatlar LMV 5, 13, 345-1 numaralı izolatlar oluşturmuşlardır. Genel olarak Çanakkale LMV izolatları a.a. dizilimleri bakımından dünya izolatları ile kıyaslandığında ise % 96-98 benzerlik oranına sahip olduğu görülmektedir.

Revers ve ark. (1997b) biyolojik özellikleri bakımından farklı 2 LMV izolatının (LMV-0 ve LMV-E) tam sekans dizilerinin tamamını belirleyerek karşılaştırmasını yapmışlardır. İki izolatın a.a. dizilerinin karşılaştırılması sonucunda % 97 oranında benzerlik gösterdiklerini belirtmişlerdir. Çanakkale LMV izolatlarının CP genlerinin a.a. dizilimleri bakımından bu iki izolatın çizelge 4.11'e göre karşılaştırılması sonucu % 96-100 arasında değişen benzerlik gösterdikleri görülmektedir.

Sharma ve Jain (2013) Hindistan'da elde ettikleri LMV izolatlarından bir tanesinin klonlamasını gerçekleştirerek a.a. dizilerinin sekansını çıkarmışlardır. Amino asit dizilerinin çıkarılması sonucunda elde ettikleri LMV izolatının *Potyvirus* grubunu virüslerin büyük bir kısmının içerdiği ve yaprak bitleri ile taşınmada rol oynayan DAG ve WCIEN motifini içerdiğini bildirmişlerdir. Çanakkale LMV izolatlarının da hepsi DAG ve WCIEN a.a. motifini içerdikleri görülmektedir.

Çizelge 4.9. Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen *Marul mozaik virüsü* izolatlarının kılıf protein genine göre çıkarılmış olan amino asit dizilerinin kendi aralarında çoklu dizi karşılaştırmaları

```
                      1                                                          61
   LMV 13 CP     (1)  VDTKLDAGQGSKTDDKQKNSADPKDNIITEKGSGSGQMKKDDDINAGLHGKHTIPRTKAIT
   LMV 15 CP     (1)  VDTKLDAGQGSKTDDKQKNSADPKDNIITEKGSGSGQMKKDDDINAGLHGKHTIPRTKAIT
LMV 345-1 CP     (1)  VDTKLDAGQGSKTDDKQKNSADPKDNIITEKGSGSGQMKKDDDINAGLHGKHTIPRTKAIT
  LMV 349 CP     (1)  VDTKLDAGQGSKTDDKQKNSADPKDNIITEKGSGSGQMKKDDDINAGLHGKHTIPRTKAIT
  LMV 380 CP     (1)  VDTKLDAGQGSKTDDKQKNSADPKDNIITEKGSGSGQMKKDDDINAGLHGKHTIPRTKAIT
    LMV 5 CP     (1)  VDTKLDAGQGSKTDDKQKNSADPKDNIITEKGSGSGQMKKDDDINAGLHGKHTIPRTKAIT
   LMV 60 CP     (1)  VDTKLDAGQGSKTDDKQKNSADPKDNIITEKGSSSGQVKKDEDINAGLHGKHTIPRTKAIT
   LMV 61 CP     (1)  VDTKLDAGQGSKTDDKQKNSADPKDNIITEKGSSSGQVKKDEDINAGLHGKHTIPRTQAIP
   LMV 65 CP     (1)  VDTKLDAGQGSKTDDKQKNSADPKDNIITEKGSSSGQVKKDEDINAGLHGKHTIPRPKAIT
   Consensus     (1)  VDTKLDAGQGSKTDDKQKNSADPKDNIITEKGSGSGQMKKDDDINAGLHGKHTIPRTKAIT
                      62                                                        122
   LMV 13 CP    (62)  QKMKLPMIRGKVALNLDHLLEYEPNQRDISNTRATQKQYESWYDGVKNDYDVDDSGMQLIL
   LMV 15 CP    (62)  QKMKLPMIRGKVALNLDHLLEYEPNQRDISNTRATQKQYESWYDGVKNDYDVDDSGMQLIL
LMV 345-1 CP    (62)  QKMKLPMIRGKVALNLDHLLEYEPNQRDISNTRATQKQYESWYDGVKNDYDVDDSGMQLIL
  LMV 349 CP    (62)  QKMKLPMIRGKVALNLDHLLEYEPNQRDISNTRATQKQYESWYDGVKNDYDVDDSGMQLIL
  LMV 380 CP    (62)  QKMKLPMIRGKVALNLDHLLEYEPNQRDISNTRATQKQYESWYDGVKNDYDVDDSGMQLIL
    LMV 5 CP    (62)  QKMKLPMIRGKVALNLDHLLEYEPNQRDISNTRATQKQYESWYDGVKNDYDVDDSGMQLIL
   LMV 60 CP    (62)  QKMKLPMIRGKVALNLDHLLEYEPNQRDISNTRATQKQYESWYDGVKNDYDVDDNGMQLVL
   LMV 61 CP    (62)  QKMQLPMIRGKVALNLDHLLEYEQTQRDISNTRATQKQYESWYDGVKNDYDVDDNGMQLIL
   LMV 65 CP    (62)  QKMKLPMIRGKVALILDHLLEYEPNQRDISNTRATQKQYESWYDGVKNDYDVDDNGMQLIL
   Consensus    (62)  QKMKLPMIRGKVALNLDHLLEYEPNQRDISNTRATQKQYESWYDGVKNDYDVDDSGMQLIL
                      123                                                       183
   LMV 13 CP   (123)  NGLMVWCIENGTSPNINGTWVMMDGEEQVEYALKPIIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEM
   LMV 15 CP   (123)  NGLMVWCIENGTSPNINGTWVMMDGEEQVEYALKPIIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEM
LMV 345-1 CP   (123)  NGLMVWCIENGTSPNINGTWVMMDGEEQVEYALKPIIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEM
  LMV 349 CP   (123)  NGLMVWCIENGTSPNINGTWVMMDGEEQVEYALKPIIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEM
  LMV 380 CP   (123)  NGLMVWCIENGTSPNINGTWVMMDGEEQVEYALKPIIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEM
    LMV 5 CP   (123)  NGLMVWCIENGTSPNINGTWVMMDGEEQVEYALKPIIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEM
   LMV 60 CP   (123)  NGLMVWCIENGTSPNINGTWVMMDGEEQVEYALKPIIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEM
```

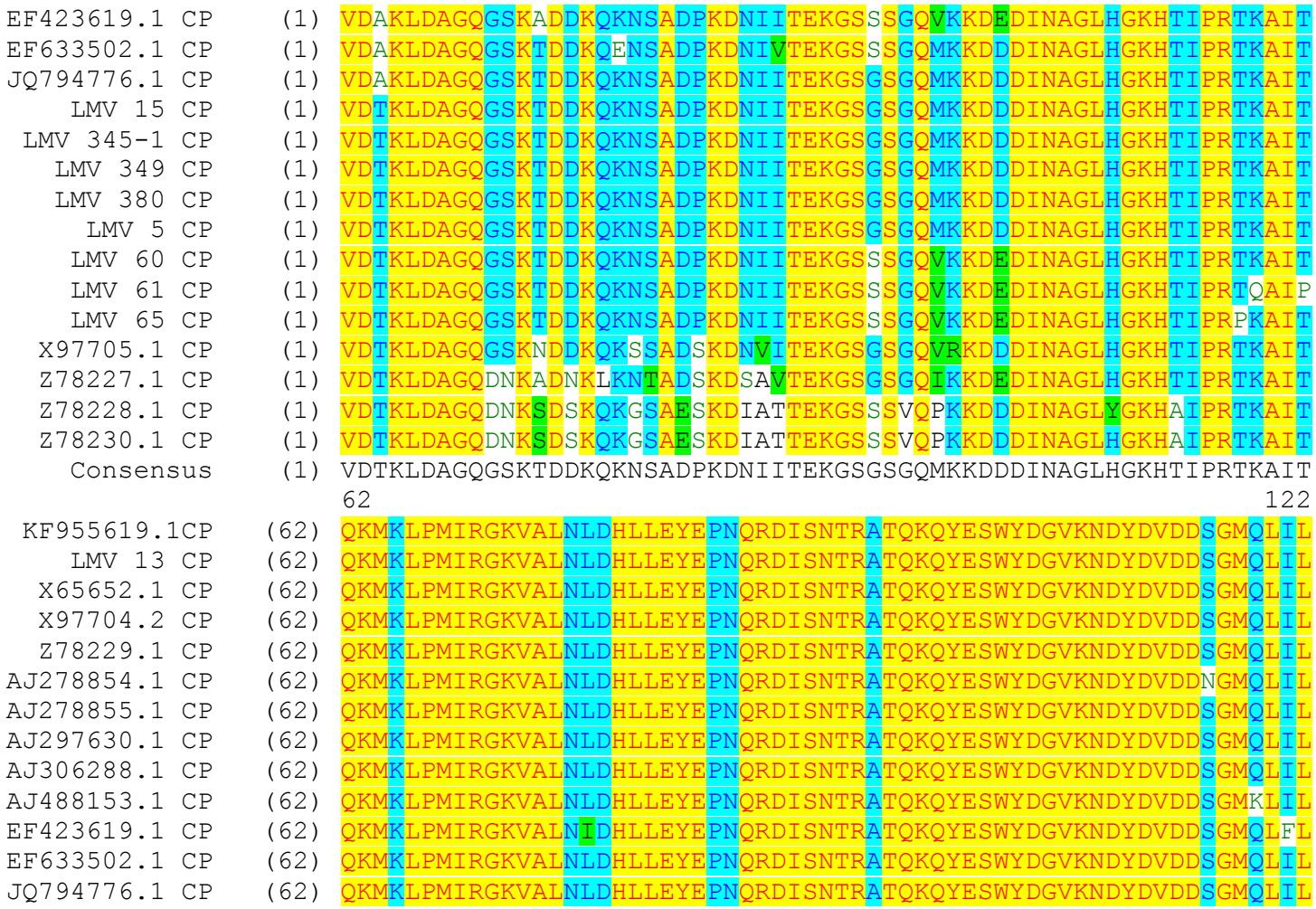
Çizelge 4.9'un devamı. Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen *Marul mozaik virüsü* izolatlarının kılıf protein genine göre çıkarılmış olan amino asit dizilerinin kendi aralarında çoklu dizi karşılaştırmaları

```
   LMV 61 CP   (123) NGLMVWCIENGTSPNINGTWVMMDGEEQVEYALKPIIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEM
   LMV 65 CP   (123) NGLMVWCIENGTSPNINGTWVMMDGEEQVEYALKPIIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEM
   Consensus   (123) NGLMVWCIENGTSPNINGTWVMMDGEEQVEYALKPIIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEM
                     184                                                       242
   LMV 13 CP   (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
   LMV 15 CP   (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMMAAALVGPQNRL
LMV 345-1 CP   (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
  LMV 349 CP   (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRARGAHNQMKAAALVGTQNRL
  LMV 380 CP   (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYPFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
    LMV 5 CP   (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
   LMV 60 CP   (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRARGAHNQMKAAALVGTQNRL
   LMV 61 CP   (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
   LMV 65 CP   (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRARGAHNQMKAAALVGTQNRL
   Consensus   (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
```

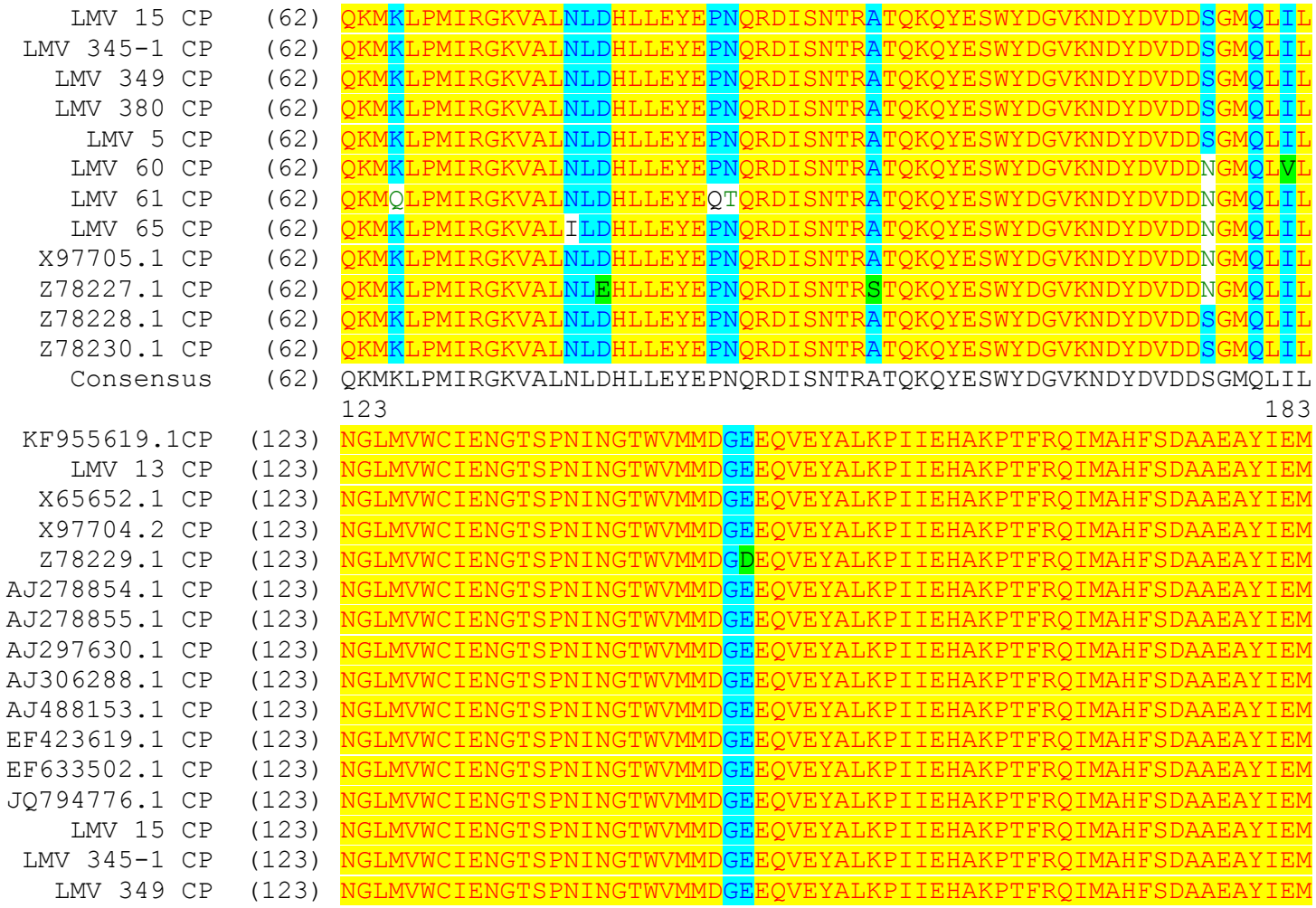
Çizelge 4.10. Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen *Marul mozaik virüsü* (LMV) izolatları ile dünyadaki LMV izolatlarının kılıf protein genine göre çıkarılmış amino asit dizilimlerine ait çoklu dizi karşılaştırmaları

```
                     1                                                         61
 KF955619.1CP    (1) VDAKLDAGQGSKSDDKQKNSADPKDNIITEKGSGSGQMKKDDDINAGLHGKHTIPRTKAIT
    LMV 13 CP    (1) VDTKLDAGQGSKTDDKQKNSADPKDNIITEKGSGSGQMKKDDDINAGLHGKHTIPRTKAIT
  X65652.1 CP    (1) VDAKLDAGQGSKTDDKQKNSADPKDNIITEKGSGSGQMKKDDDINAGLHGKHTIPRTKAIT
  X97704.2 CP    (1) VDAKLDAGQGSKTDDKQKNSADPKDNIITEKGSGSGQMKKDDDINAGLHGKHTIPRTKAIT
  Z78229.1 CP    (1) VDTKLDAGQDNKGDSKQKGSAESKDITTTEKGSSSVQPKKDDDINAGLHGKHAIPRTRAIT
AJ278854.1 CP    (1) VDAKLDAGQGSKTDDKQKNSADPKDNIITEKGSGSGQVKKDDDINAGLHGKHTIPRTKAIT
AJ278855.1 CP    (1) VDAKLDAGQGSKTDDKQKSSADPKDNIITEKGSGSGQMKKDDDINAGLHGKHTMPRTKAIT
AJ297630.1 CP    (1) VDAKLDAGQGSKTDDKQKNSADPKDNIITEKGSGSGQMKKDDDINAGLHGKHTIPRTKAIT
AJ306288.1 CP    (1) VDAKLDAGQGSKTDDKQKNSADPKDNIITEKGSGSGQMKKDDDINAGLHGKHTIPRTKAIT
AJ488153.1 CP    (1) VDAKLDAGQGSKTDNKQKNSADPKDNIITEKGSSSGQVKKDDDINAGLHGKHTIPRTKAIT
```

Çizelge 4.10'un devamı. Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen *Marul mozaik virüsü* (LMV) izolatları ile dünyadaki LMV izolatlarının kılıf protein genine göre çıkarılmış amino asit dizilimlerine ait çoklu dizi karşılaştırmaları



Çizelge 4.10'un devamı. Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen *Marul mozaik virüsü* (LMV) izolatları ile dünyadaki LMV izolatlarının kılıf protein genine göre çıkarılmış amino asit dizilimlerine ait çoklu dizi karşılaştırmaları



Çizelge 4.10.'un devamı. Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen *Marul mozaik virüsü* (LMV) izolatları ile dünyadaki LMV izolatlarının kılıf protein geni dizilimlerine ait çoklu dizi karşılaştırmaları

```
   LMV 380 CP  (123) NGLMVWCIENGTSPNINGTWVMMDGEEQVEYALKPIIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEM
     LMV 5 CP  (123) NGLMVWCIENGTSPNINGTWVMMDGEEQVEYALKPIIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEM
    LMV 60 CP  (123) NGLMVWCIENGTSPNINGTWVMMDGEEQVEYALKPIIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEM
    LMV 61 CP  (123) NGLMVWCIENGTSPNINGTWVMMDGEEQVEYALKPIIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEM
    LMV 65 CP  (123) NGLMVWCIENGTSPNINGTWVMMDGEEQVEYALKPIIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEM
  X97705.1 CP  (123) NGLMVWCIENGTSPNINGTWVMMDSEEQVEYALKPIIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEM
  Z78227.1 CP  (123) NGLMVWCIENGTSPNINGTWVMMDGEEQVEYALKPIIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEM
  Z78228.1 CP  (123) NGLMVWCIENGTSPNINGTWVMMDGDEQVEYALKPIIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEM
  Z78230.1 CP  (123) NGLMVWCIENGTSPNINGTWVMMDGDEQVEYALKPIIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEM
    Consensus  (123) NGLMVWCIENGTSPNINGTWVMMDGEEQVEYALKPIIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEM
                     184                                                      242
 KF955619.1CP  (184) RNRKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
    LMV 13 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
  X65652.1 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
  X97704.2 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
  Z78229.1 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
AJ278854.1 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
AJ278855.1 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
AJ297630.1 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
AJ306288.1 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
AJ488153.1 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
EF423619.1 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
EF633502.1 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
JQ794776.1 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
    LMV 15 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMMAAALVGPQNRL
 LMV 345-1 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
   LMV 349 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRARGAHNQMKAAALVGTQNRL
   LMV 380 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYPFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
     LMV 5 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
    LMV 60 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRARGAHNQMKAAALVGTQNRL
```

Çizelge 4.10.'un devamı. Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen *Marul mozaik virüsü* (LMV) izolatları ile dünyadaki LMV izolatlarının kılıf protein genine göre çıkarılmış amino asit dizilimlerine ait çoklu dizi karşılaştırmaları

```
   LMV 61 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
   LMV 65 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRARGAHNQMKAAALVGTQNRL
X97705.1 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
Z78227.1 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
Z78228.1 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
Z78230.1 CP  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
  Consensus  (184) RNKKKPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAHNQMKAAALVGTQNRL
```

Çizelge 4.11. Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen *Marul mozaik virüsü* (LMV) izolatları ile dünyadaki diğer LMV izolatlarının kılıf protein genine göre çıkarılmış amino asit dizilimlerine göre benzerlik oranları

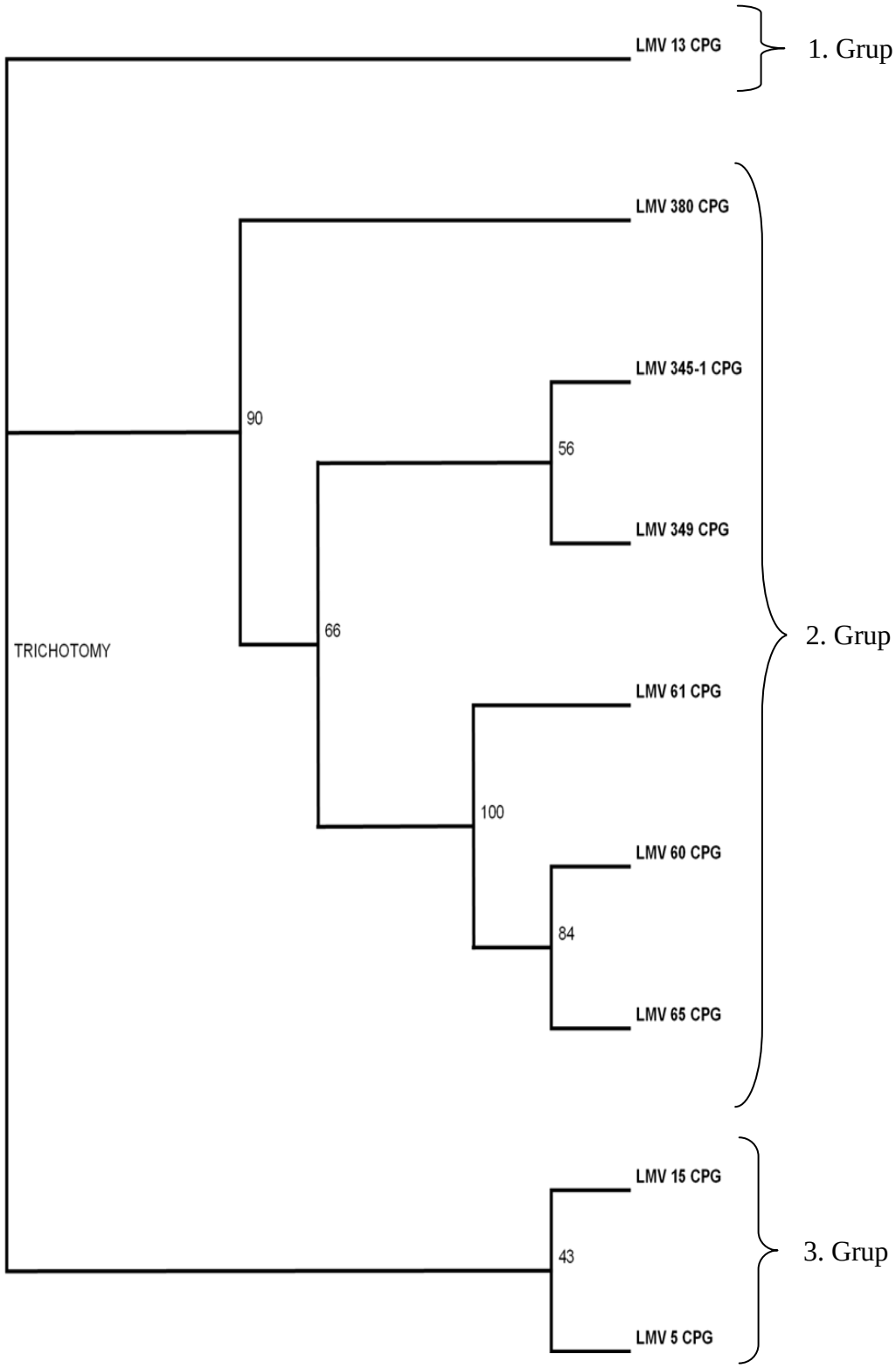
İZOLATLAR	LMV 13	X65652.1	X97704.2	Z78229.1	AJ278854.1	AJ278855.1	AJ297630.1	AJ306288.1	AJ488153.1	EF423619.1	EF633502.1	JQ794776.1	LMV 15	LMV 345-1	LMV 349	LMV 380	LMV 5	LMV 60	LMV 61	LMV 65	X97705.1	Z78227.1	Z78228.1	Z78230.1
KF955619.1	99	99	99	92	98	98	99	99	98	97	98	99	98	99	98	98	99	96	95	96	96	93	93	93
LMV 13		100	100	93	99	99	100	100	98	97	98	100	99	100	100	100	100	98	96	97	97	94	93	94
X65652.1			100	93	99	99	100	100	98	98	99	100	99	100	99	99	100	97	96	97	96	93	93	93
X97704.2				93	99	99	100	100	98	98	99	100	99	100	99	99	100	97	96	97	96	93	93	93
Z78229.1					92	92	93	93	93	92	93	93	92	93	93	93	93	92	91	92	92	92	98	99
AJ278854.1						98	99	99	98	98	98	99	98	99	98	98	99	98	97	98	97	94	92	93
AJ278855.1							99	99	98	97	98	99	98	99	98	98	99	96	95	96	96	92	92	93
AJ297630.1								100	98	98	99	100	99	100	99	99	100	97	96	97	96	93	93	93
AJ306288.1									98	98	99	100	99	100	99	99	100	97	96	97	96	93	93	93
AJ488153.1										98	98	98	97	98	98	98	98	97	96	97	95	93	93	93
EF423619.1											97	98	96	97	97	97	97	98	96	97	95	93	92	92
EF633502.1												99	98	98	98	98	98	97	95	96	95	93	93	93
JQ794776.1													99	100	99	99	100	97	96	97	96	93	93	93
LMV 15														99	99	99	99	97	95	96	96	93	92	93
LMV 345-1															100	100	100	98	96	97	97	94	93	94
LMV 349																99	100	98	96	98	96	93	93	93
LMV 380																	100	97	96	97	96	93	93	93
LMV 5																		98	96	97	97	94	93	94
LMV 60																			97	99	96	93	92	92
LMV 61																				97	95	92	91	91
LMV 65																					95	93	92	92
X97705.1																						93	92	93
Z78227.1																							92	93
Z78228.1																								100

4.7. Filogenetik Analizler

Çanakkale'nin farklı üretim alanlarından elde edilen LMV izolatlarının birbirleri ve dünyadaki bazı izolatlar ile genetik ilişkisini belirlemek amacı ile 9 farklı izolatın CP genlerine ait nt ve a.a. dizileri kullanılarak filogenetik analizler yapılmıştır.

4.7.1. Nükleotid dizilimlerine göre filogenetik soy ağaçlarının oluşturulması

Çanakkale LMV izolatlarının nt dizileri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı Şekil 4.12'de verilmiştir. Nt dizileri kullanılarak yapılan filogenetik analizler sonucunda izolatların genetik ilişkisi belirlenmiştir. CP genlerinin nt dizilimlerine göre yapılan filogenetik analizde üçü aynı anlamına gelen "trichotomy" tipi dallanma meydana gelmiş olup izolatlar arasında yüksek benzerlik ortaya çıkmıştır. Ancak bu analizlere göre Çanakkale LMV izolatlarını nt dizilimlerine göre kendi içerisinde gruplandırmak istenildiğinde, birbirine yakın ilişki gösteren üç ana grup belirlenmiştir. Bu gruplardan birincisi 1 izolat, ikincisi 6 izolat ve üçüncüsü 2 izolat içermektedir. Çanakkale Merkez'den elde edilen LMV 13 ile Ayvacık'tan elde edilen LMV 5 numaralı izolatlar birbirine filogenetik açıdan en uzak yani birbirine en az benzeyen izolatları oluşturmuşlardır. Ayrıca soyağacına bakıldığında LMV 60, LMV 61 ve LMV 65 Ayvacık izolatlarının birbirleri ile çok yakın ilişkili olduğu görülmektedir. Fakat LMV 5 numaralı örnek de Ayvacık'tan izole edilmesine rağmen izolatları kendi içlerinde gruplandığımızda 3. grupta yer almaktadır. Bayramiç'ten elde edilen LMV 345-1 ile Ezine'den elde edilen LMV 349 numaralı izolatlar da birbirleri ile yakın ilişkili olarak bulunmuştur. Bu sonuç, iki ilçenin birbirleri ile komşu olmasından dolayı normal olarak kabul edilmiştir. Oluşturulan soyağaçlarının dalları 34-100 arasında değişen boostrap değerleri ile desteklenmekte olup tesadüfi olmadığı ve soy ağacındaki dallardan çoğunun istatistiksel açıdan desteklendiğini göstermiştir.

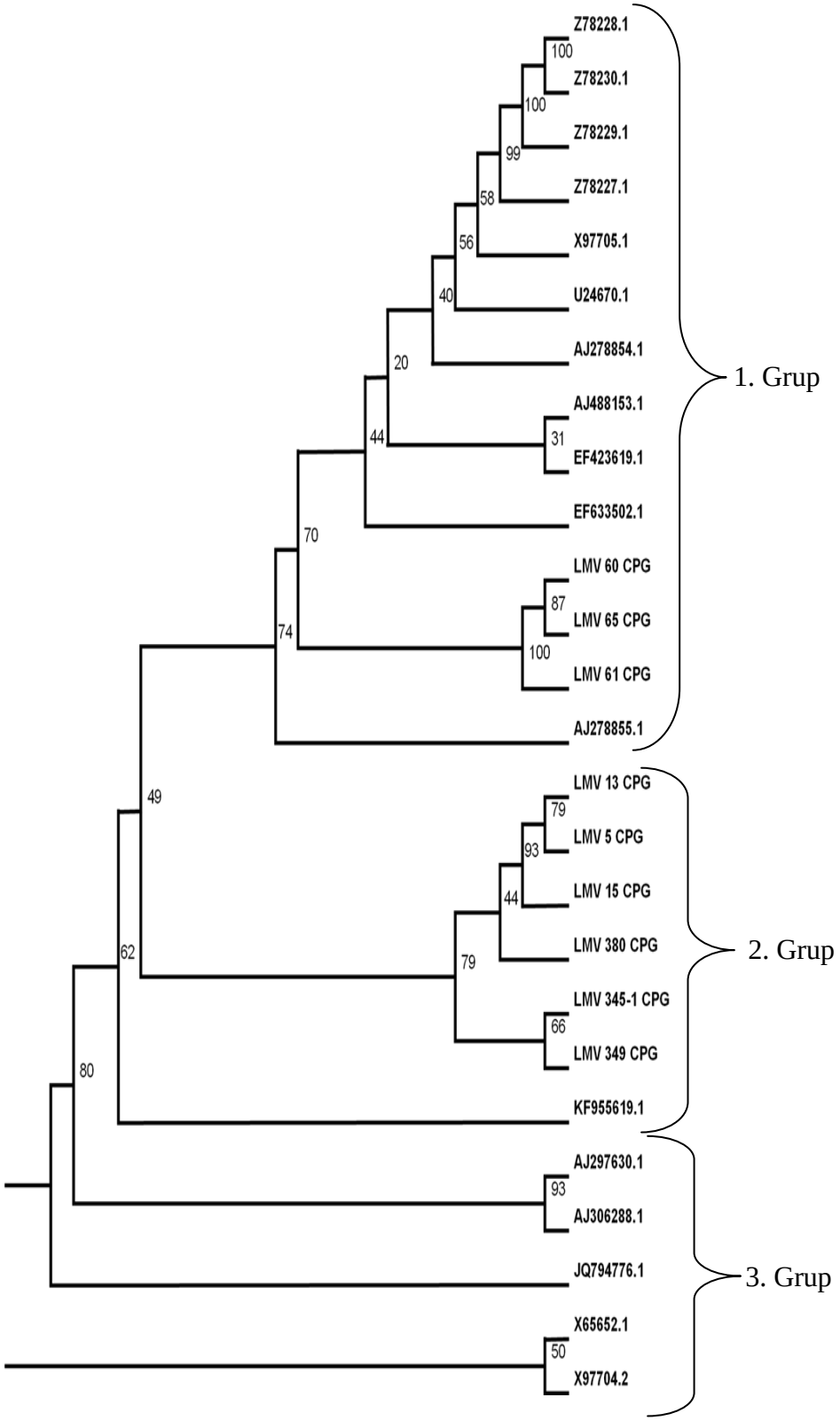


Şekil 4.12. Çanakkale *Marul mozaik virüsü* izolatlarının kılıf protein geninin nükleotid dizimleri kullanılarak Neighbor Joining yöntemi ile oluşturulan ve TreeView programı ile görüntülenen filogenetik soy ağacı

Çanakkale LMV izolatlarının dünyadaki bazı izolatlar ile nt dizilimine göre oluşturulan filogenetik soy ağacı Şekil 4.13'te verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi LMV izolatları 3 ana gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan birincisi 14 izolat, ikincisi 7 izolat ve üçüncüsü ise 5 izolat içermektedir. Genel olarak LMV Çanakkale izolatları, Ayvacık LMV 60 LMV 61 ve LMV 65 numaralı izolatlar hariç 2. grupta yer almaktadır. Bu grubun neredeyse hepsini Çanakkale LMV izolatları oluşturmaktadır. Sadece KF955619.1 numaralı Kore izolatı bu grupta yer almıştır. Ayvacık LMV 60-61-65 numaralı izolatlar ise birinci grupta üç Yunanistan, bir Yemen, iki İspanya ve iki Brezilya izolatı ile yer almaktadır. Genel olarak Çanakkale izolatları Z78228.1 (Yunanistan) ve X97704.2 (Fransa) numaralı izolatlar ile birbirine en uzak olanlar olarak bulunmuştur. İkinci grupta yer alan Çanakkale LMV izolatlarına filogenetik açıdan en yakın olarak KF955619.1 (Kore) numaralı izolat bulunmuştur. Birinci grupta yer alan Çanakkale LMV izolatlarına ise AJ278855.1 (Brezilya) ve EF633502.1 (Çin) numaralı izolatlar filogetik açıdan en yakın olarak bulunmuştur. Birinci grup izolatları çoğunlukla Avupa izolatlarından oluşmuştur. Ancak Avrupa izolatı olmasına rağmen X97704.2 (Fransa) ve X65662.1 (Fransa) numaralı izolatlar bu gruba en uzak olan üçüncü grup içerisinde yer almıştır. Filogetik soyağacına bakıldığında diğer dikkat çekici olan durumu ise Çin izolatları oluşturmaktadır. AJ297630.1 ve AJ306288.1 numaralı Çin izolatları üçüncü grupta yer alırken, AJ48813.1, EF423619.1 ve EF633502.1 numaralı Çin izolatları ise birinci grupta yer almaktadır. Ayrıca 3. grupta yer alan izolatların her birisi ayrı bir grup olarak değerlendirilebilir. Oluşturulan soyağaçlarının dalları 31-100 arasında değişen boostrap değerleri ile desteklenmekte olup tesadüfi olmadığı ve soy ağacındaki dallardan çoğunun istatistiksel açıdan desteklendiğini göstermiştir.

Çanakkale LMV izolatlarının farklı 2 grupta yer alması Çanakkale LMV izolatlarının orijini hakkında kesin bir yargıya varılmaması ile birlikte genel olarak Çin ve Kore izolatları arasında filogenetik ağaçta yer almıştır. Türk LMV izolatlarının kesin olarak orijininin bulunması için ülkemizin farklı üretim bölgelerinden daha fazla sayıda izolat ile çalışılması gerekmektedir.

Krause-Sakate ve ark. (2002) farklı ülkelerden elde ettikleri 73 LMV izolatı ile gerçekleştirmiş oldukları filogenetik analizler sonucunda elde edilen filogenetik ağacın 3 temel gruba ayrıldığını bildirmişlerdir. Bizim oluşturmuş olduğumuz filogenetik ağaç da benzer şekilde temel olarak 3 gruba ayrılmıştır.



Şekil 4.13. Çanakkale *Marul mozaik virüsü* (LMV) izolatları ile dünyadaki LMV izolatlarının kılıf protein geninin nükleotid dizilimi kullanılarak Neighbor Joining yöntemi ile oluşturulan ve TreeView programı ile görüntülenen filogenetik soy ağacı

Fakhfakh ve ark. (2001) gerçekleştirmiş oldukları filogenetik analizler sonucunda Tunus LMV izolatlarının Avrupa LMV izolatları ile filogenetik açıdan ilişkili olduğunu ve bu durumun tohum ticaretinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Çanakkale LMV izolatlarının bir kısmının Avrupa bir kısmının Asya LMV izolatlarına yakın çıkması ise tohum ticareti ile ilişkili olabileceği gibi, Revers ve ark. (1997a)'nın belirttiği gibi LMV izolatlarının filogenetik ilişkileri elde edildikleri coğrafik bölgelere bağlılık göstermesi ile açıklanabilir.

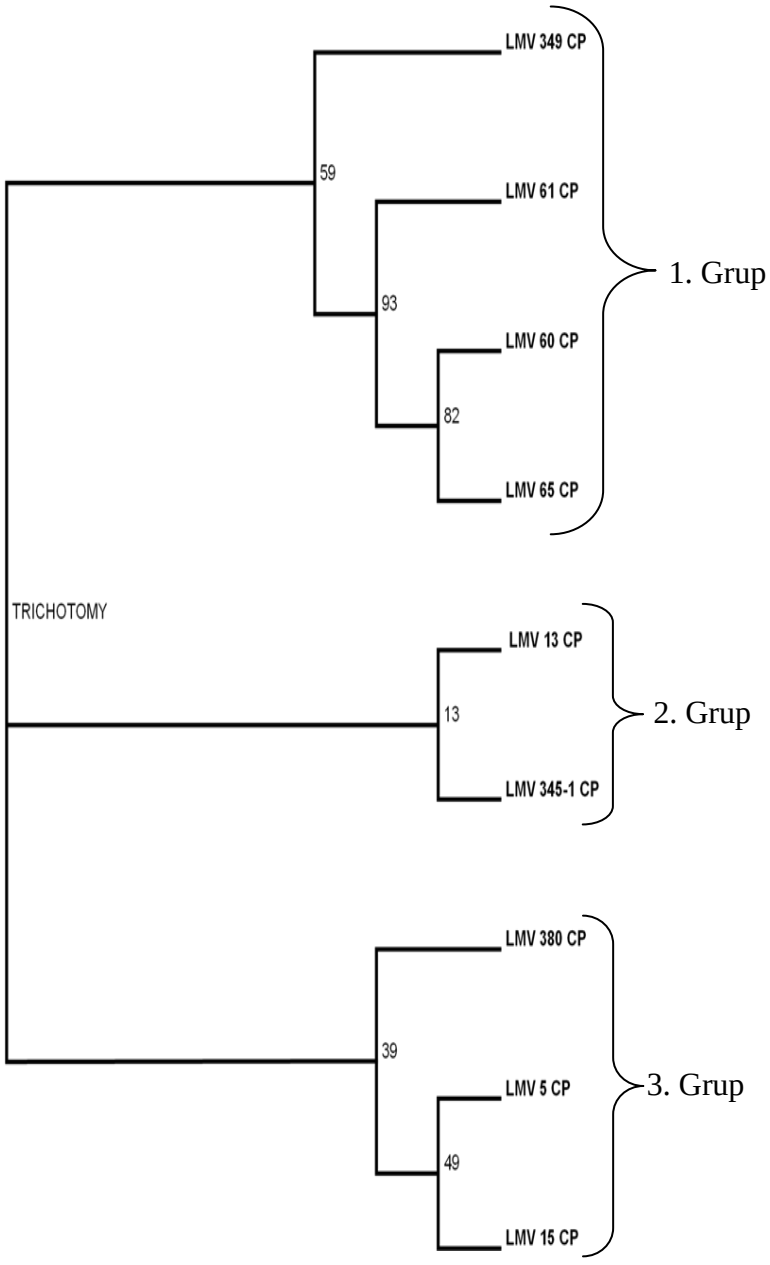
4.7.2. Amino asit dizilimlerine göre filogenetik soy ağaçlarının oluşturulması

Çanakkale ili ve ilçelerinin farklı üretim bölgelerinden alınan LMV izolatlarının birbirleri ile ve dünyadaki bazı izolatlar ile CP geninin tamamının kodladığı a.a. dizilimleri kullanılarak filogenetik analizler sonucunda, LMV izolatlarının nt dizilimlerinin kullanılarak oluşturulan filogenetik soy ağacından bazı farklılıklar içerdiği görülmektedir. Ancak Çanakkale LMV izolatlarının dünya LMV izolatları ile karşılaştırılmasının yapıldığı filogenetik ağaç bazı farklılıklar haricinde birbirine oldukça benzerdir.

Çanakkale LMV izolatlarının birbirleri ile oluşturduğu soy ağacının (Şekil 4.14) dalları 13-93 arasında değişen boostrap değerleri ile desteklenmekte olup tesadüfi olmadığı ve soy ağacındaki dallardan birçoğunun istatistiksel açıdan desteklendiğini göstermiştir. Oluşturulan soy ağacında üçü aynı anlamına gelen trichotomy tipi dallanma meydana gelmiştir. Ancak izolatların kendi içlerinde gruplandırmak istediğimizde 3 gruba ayrıldığı görülmektedir. Birinci grupta 4 izolat, ikinci grupta 2 ve üçüncü grupta ise 3 izolat yer almaktadır. Filogenetik açıdan Çanakkale Merkez'den elde edilen LMV 15 numaralı izolat ile Ezine'den izole edilen LMV 349 nolu izolat birbirine en uzak olan izolatlar olarak görülmektedir. Çanakkale Merkez'den elde edilen LMV 13 numaralı izolat ile Bayramiç'ten elde edilen LMV 345-1 numaralı izolatlar, nt dizilimlerine göre oluşturulan filogenetik soy ağacında farklı gruplar bulunmasına rağmen, a.a. dizilimlerine göre aynı grupta yer almıştır. A.a. dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soy ağacında olduğu gibi LMV 60, LMV 61 ve LMV 65 numaralı Ayvacık izolatları aynı grupta yer alırken, benzer şekilde Ayvacık'tan elde edilen LMV 5 izolatı farklı bir grupta yer almıştır.

Krause-Sakate ve ark. (2002) gerçekleştirmiş oldukları filogenetik analizler sonucunda LMV izolatlarının a.a. dizilimlerine göre oluşturulan filogenetik ağacın, nt

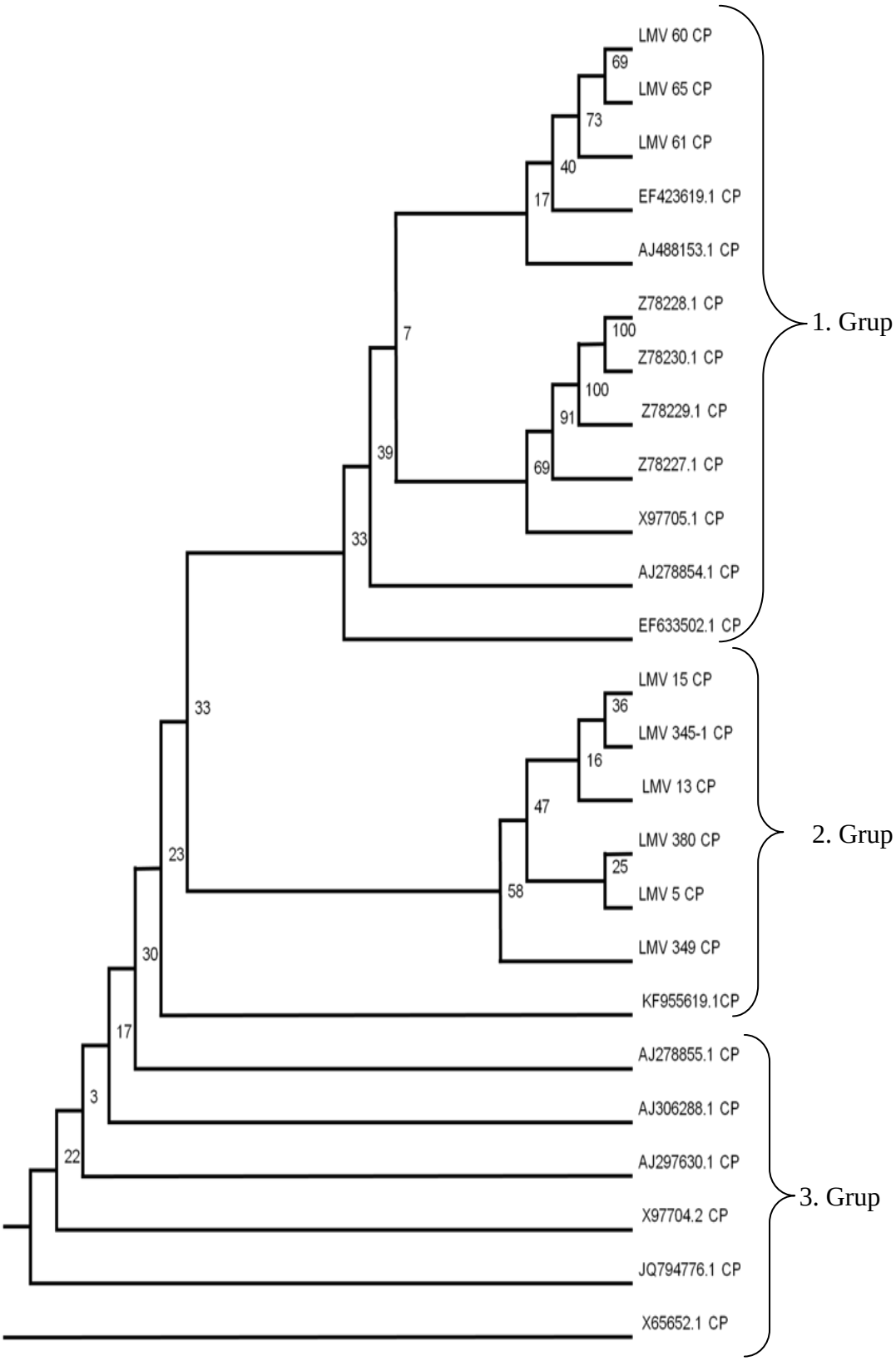
dizilimlerine göre oluşturulan filogenetik ağaca birkaç istisna dışında oldukça benzer olduğunu belirtmişlerdir. Bizim nt ve a.a. dizilimlerine göre oluşturduğumuz filogenetik ağaçlar da birbirine oldukça yakın olarak gözükmektedir.



Şekil 4.14. Çanakkale *Marul mozaik virüsü* (LMV) izolatlarının kılıf protein geninine göre çıkarılmış amino asit dizilimi kullanılarak Neighbor Joining yöntemi ile oluşturulan ve TreeView programı ile görüntülenen filogenetik soy ağacı

Çanakkale LMV izolatları ile dünyadaki diğer LMV izolatlarının CP genlerinin a.a. dizilimleri kullanılarak oluşturduğu soy ağacının (Şekil 4.15) dalları 7-100 arasında değişen boostrap değerleri ile desteklenmekte olup tesadüfi olmadığı ve soy ağacındaki dallardan birçoğunun istatistiksel açıdan desteklendiğini göstermiştir. Oluşturulan soy ağacında 3 ana grup oluşmuştur. Genel olarak Çanakkale LMV izolatları Ayvacık'tan elde edilen LMV 60, LMV 61 ve LMV 65 numaralı izolatlar hariç ikinci grupta yer almıştır. Filogenetik soy ağacına bakıldığında ikinci grubun tamamına yakınını Çanakkale LMV izolatlarının oluşturduğu görülmektedir. Genel olarak Ayvacık LMV 60, 61 ve 65 numaralı LMV izolatlarının EF423619.1 ve AJ48813.1 numaralı Çin izolatlarına, diğer Çanakkale LMV izolatlarının ise KF955619.1 numaralı Kore izolatına en yakın olduğu görülmektedir. Fakat EF423619.1 ve AJ48813.1 numaralı Çin izolatları Ayvacık LMV 60, 61 ve 65 numaralı LMV izolatlarınına en yakın bulunmasına rağmen, diğer Çanakkale LMV izolatlarına X65652.1 Fransa izolatı ile birlikte en uzak bulunan LMV izolatlarını oluşturmaktadır. Nt dizilimlerine göre oluşturulan filogenetik soy ağacında da belirtilen Çanakkale LMV izolatları farklı 2 grupta bulunmasına rağmen, birbirlerine yakın dallarda bulundukları görülmektedir. A.a. dizilimlerine göre oluşturulan soy ağacında ise yukarıda belirtilen 3 Ayvacık LMV izolatı, ikinci grubu oluşturan Çanakkale LMV izolatlarına en uzak dallardan biri olarak görülmektedir. Ayvacık LMV 60 izolatı ile Fransa X65652.1 izolatları filogenetik açıdan birbirlerine en uzak olan izolatları oluşturmaktadır.

Krause-Sakate ve ark. (2002) farklı ülkelerden elde ettikleri 73 LMV izolatının CP genine göre a.a. dizilimlerinden yararlanarak oluşturdukları filogenetik ağacın nt dizilimlerine göre oluşturulanda olduğu gibi Yunan LMV izolatlarının ayrı bir alt grup oluşturduklarını belirtmişlerdir. Bizim LMV CP genine göre çıkarılmış olan a.a. dizilimlerini kullanarak oluşturmuş olduğumuz filogenetik ağaçta ise Ayvacık LMV izolatları ile Yunan LMV izolatları aynı grupta yer alarak Krause-Sakate ve ark. (2002)'nın yapmış olduğu çalışma ile benzerlik göstermiştir.



Şekil 4.15. Ülkemiz *Marul mozaik virüsü* (LMV) izolatları ile dünyadaki LMV izolatlarının kılıf protein geni amino asit dizilimi kullanılarak Neighbor Joining yöntemi ile oluşturulan ve TreeView programı ile görüntülenen filogenetik soy ağacı

BÖLÜM 5
SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında Çanakkale ili ve ilçelerinde marul üretim alanlarından LMV ile enfekteli olduğundan şüphelenilen, tipik virüs ve virüs benzeri hastalık simptomu gösteren 71 örnek ve daha önceden 1060675 nolu TÜBİTAK-TOVAG projesi kapsamında alınan 6 örnek ile toplam 77 örnek üzerinde çalışılmıştır. Hastalık simptomu gösteren bitki sayısına bağlı olarak en çok örnekleme 19 bitki ile Bayramiç'ten yapılırken, en az örnekleme ise 1 bitki ile Ezine'den yapılmıştır.

Sörveyler süresince marul üretim alanlarında genellikle çok tipik virüs ve virüs benzeri hastalık simptomu gösteren bitkiye rastlanılmamıştır. Arazi çıkışlarında yapılan gözlemler sonucu marul bitkileri tipik LMV simptomlarını tohum bağlamaya yakın olduğu fenolojik dönem ve yaprak biti vektörlerinin kışlaklardan çıktığı zaman tipik olarak gözlenebilmektedir. Özellikle tipik simptomların tohum bağlama döneminde görülmesi etmenin tohum ile de taşınmasından dolayı bu dönemde bitki içindeki konsantrasyonunun artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bitkinin bu döneminde görülen tipik simptom tipi ise yapraklarda açık yeşil mozaik belirtilerin oluşmasıdır. Örneklemelerde marul çeşidi dikkate alınmamıştır.

Toplanan 77 bitki örneğine DAS-ELISA testi uygulanmıştır. DAS-ELISA testleri sonucunda 77 örneğin 13 tanesi LMV ile enfekteli bulunmuştur. DAS-ELISA testleri sonucunda en yüksek enfeksiyon oranı Ezine'ye aittir, fakat Ezine'den tek bir örnek alınması ve bu örneğin de pozitif çıkması sonucu % 100'lük bir enfeksiyon oranı ortaya çıkmıştır. Ancak enfekteli bitki sayısı olarak bakıldığında ise 6 enfekteli örnek ile Ayvacık gelmektedir. Lapseki, Çan ve Gelibolu'dan alınan örneklerde ise LMV enfeksiyonu tespit edilmemiştir. Toplam LMV enfeksiyon oranı ise % 16.80 olarak bulunmuştur. Ayrıca daha önceden belirtildiği gibi marul alanlarında CMV ve TSWV enfeksiyonu da simptomatolojik olarak yapılan gözlemler sonucunda araştırılması gereken konular olarak düşünülmektedir.

Çalışma kapsamında DAS-ELISA sonuçlarını doğrulamak ve klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere DAS-ELISA sonuçlarına göre pozitif olarak bulunan örnekler içinden izole edildikleri bölgeler göz önüne alınarak seçilen izolatlar RT-PCR ile test edilmiştir. RT-PCR testleri sonucunda LMV CP geninin tamamını içeren 834

bç'lik bölgesine karşılık gelen bantlar elde edilmiştir. RT-PCR çalışmalarında da herhangi bir sorun ile karşılaşılmamıştır. Ayrıca total RNA ekstraksiyonunda taze örnek veya +4 ^{o}C'de silika jel içinde dehidre edilmiş olması total RNA verimini etkilememektedir. LMV için total RNA ekstraksiyonunda ise SDT yöntemi etkin bir şekilde kullanılmıştır.

Klonlama çalışmalarında DAS-ELISA ve RT-PCR sonuçları pozitif olduğu bulunan LMV 5, 13, 15, 60, 61, 65, 345-1, 346, 349, 380 ve 382 numaralı 11 izolat kullanılmıştır. LMV 346 ve 382 numaralı 2 izolat hariç, klonlama işlemi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. LMV 346 numaralı örneğin klonlanmasında beyaz kolonilerin elde edilememesi sonucu transformasyon veya ligasyon aşamasında kaynaklanan bir sorun olduğu ya da RT-PCR ürünlerinin saflaştırılması esnasında RT-PCR ürünlerinin kaybedilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle en azından RT-PCR ürünlerinin saflaştırılmasını takiben elde edilen ürünlerin tekrardan agoraz jel elektroforezinde ayrıştırılması ile ortaya çıkabilecek sorunlardan bir tanesinin elemine edebileceği düşünülmektedir.

LMV CP genlerini kesin olarak taşıdığı belirlenen 9 Çanakkale LMV izolatının saflaştırılmış plazmidleri seçilerek LMV CP genlerinin nt dizilimleri ortaya çıkarılmıştır. Dizilimi yapılan bu izolatlar kendi aralarında ve gen bankası veri tabanında bulunan diğer LMV izolatları ile karşılaştırarak sonuçlar tartışılmıştır. Ülkemiz LMV izolatları arasında yapılan benzerlik ve farklılık kıyaslamaları sonucunda % 97-100 arasında benzerlik tespit edilmiştir. Dünya izolatları ile yapılan karşılaştırmalar sonucunda ise % 88-100 arasında değişen benzerlik oranı tespit edilmiştir. LMV CP genlerine göre çıkarılan a.a. dizilimleri sonucu ise ülkemiz LMV izolatları arasında yapılan benzerlik ve farklılık kıyaslamaları sonucu % 95-100 arasında benzerlik tespit edilmiştir. Bayramiç'ten elde edilen LMV 345-1 izolatı, Fransız izolatları olan X65652.1 ile X97704.2 ve Hindistan izolatı olan JQ794776.1 ile % 100'lük benzerlik göstererek dünya LMV izolatları arasında CP genleri nt dizilimleri açısından en fazla benzerlik gösteren izolat olarak bulunmuştur. Ayvacık'tan elde edilen LMV 61 izolatı ise Yemen Z78227.1 izolatı ile % 88'lik benzerlik oranı göstererek en düşük benzerlik oranına sahip izolat olarak bulunmuştur. Dünya izolatları ile Çanakkale LMV izolatlarının a.a. dizilerinin benzerlik karşılaştırmaları sonucunda ise % 91-100 arasında değişen benzerlikler tespit edilmiştir. Çanakkale Ayvacık'tan elde edilen LMV 61 numaralı izolat Z78229.1 numaralı Yunan izolatı ile % 91 oranında benzerlik

göstererek Çanakkale LMV izolatları arasında dünya izolatları ile en az benzerlik gösteren izolat olmuştur. Merkez'den elde edilen LMV 13 ve Ayvacık'tan elde edilen LMV 5 numaralı izolatlar X65652.1, X97704.2 Fransa izolatları ile % 100 benzerlik göstermişlerdir. Bayramiç'ten elde edilen LMV 345-1 ile Ayvacık'tan izole edilen LMV 5 numaralı izolatlar AJ297630.1-AJ306288.1 numaralı Çin izolatları ve JQ794776.1 Hindistan izolatı ile % 100 benzerlik göstermişlerdir. Dünya LMV izolatları ile a.a. dizilimleri bakımından en fazla benzerliğe sahip olan izolatları LMV 5, 13, 345-1 numaralı izolatlar oluşturmuşlardır. Genel olarak Çanakkale LMV izolatları a.a. dizilimleri bakımından dünya izolatları ile kıyaslandığında ise % 91-100 benzerlik oranına sahip olduğu görülmektedir. Gerek nt gerekse a.a. dizilimleri benzerlik oranlarına göre Ayvacık'tan elde edilen LMV 61 izolatı diğer Çanakkale izolatlarından farklılık göstermektedir.

Çanakkale'nin farklı üretim alanlarından elde edilen LMV izolatlarının birbirleri ve dünyadaki bazı izolatlar ile genetik ilişkisini belirlemek amacı ile 9 farklı izolatın CP genlerine ait nt ve a.a. dizileri kullanılarak filogenetik analizler yapılmıştır. Çanakkale LMV izolatlarının kendi aralarında değerlendirilmesi amacı ile nt ve a.a. dizileri kullanılarak gerçekleştirilen filogenetik soy ağaçlarında benzer dallanmalar gözlenmiştir. Hem nt dizileri hem de a.a. dizilimleri kullanılarak oluşturulan soy ağaçlarının ikisinde de üçü aynı anlamına gelen trichtomy tipi dallanma meydana gelmiştir. Çanakkale LMV izolatları ile dünyadaki diğer LMV izolatlarının CP genlerine ait nt ve a.a. dizilimleri kullanılarak oluşturulan soy ağaçlarının ikisinde de tüm LMV izolatlarının genel olarak 3 gruba ayrıldığı görülmektedir. Nt dizilimleri kullanılarak gerçekleştirilen filogenetik soy ağacında Çanakkale LMV izolatları filogetik açıdan birbirlerine yakın dallanmalar göstermiştir. Ancak a.a. dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soy ağacında üç Ayvacık izolatının diğer Çanakkale LMV izolatlarına filogenetik açıdan oldukça uzak olduğu bulunmuştur.

Üretici açısından bakıldığında genel olarak LMV hakkında bilgi sahibi olmadıkları görülmüştür. Üreticilerin yetiştiriciliğini yaptığı çeşitlerin hangi hastalıklara dayanıklı veya tolerant olduğunu dikkate almamaktadır. Bunun sebebi olarak ise ülkemizde şiddetli LMV epidemilerinin gerçekleşmemiş olması verilebilir. Bu bağlamda üreticilerimiz LMV hakkında bilgilendirilmelidir. Virüs hastalıkları ile mücadele temel prensip olan viral hastalıklarından ari, temiz ve sertifikalı üretim materyali kullanmaya teşvik edilmelidir. Virüs hastalıklarının hangi yollar ile

yayıldıkları ve bu yolların nasıl önlenebileceğine dair bilgiler verilmelidir. Genel olarak üreticilerimizin virüs hastalıkları hakkındaki farkındalık seviyesi arttırılmalıdır.

Bu çalışma kapsamında Çanakkale ili ve ilçelerinde marul üretimi yapılan alanlardan elde edilen LMV izolatlarının tanılanması ve karakterizasyonu yapılmıştır. Yapılan bu çalışma LMV'nin moleküler yapılarının belirlenmesi açısından ülkemizde yapılan en kapsamlı çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda bu izolatların biyolojik özelliklerinin belirlenerek izolatların patojenisiteleri üzerinde fikir sahibi olunmalı ve konukçu dayanıklılığı üzerine yapılacak olan çalışmalara ağırlık verilmelidir. Ayrıca en az bir Türk LMV izolatının tam sekansı çıkarılarak gen bankasında yer alması, dünyanın farklı bölgesindeki araştırmacıların yararlanması sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR

Alan B., 2012. Doğu Akdeniz Bölgesinde Yetiştirilen Bazı Kışlık Sebzelerde Hastalık Yapan Virüslerin Tanılanması ve Karakterizasyonu. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.

Anonim, 2012. http://www.fao.org. Erişim tarihi: 22.05.2014.

Anonim, 2013. http://www.tuik.gov.tr. Erişim tarihi: 27.05.2014.

Aybak H.Ç., 2002. Salata/Marul Yetiştiriciliği. *Hasad yayıncılık,* 96 s.

Candresse T., Lot H., German-Retana S., Krause-Sakate R., Thomas J., Souche S., Delaunay T., Lanneau M., Le Gall O., 2007. Analysis of The Serological Variability of *Lettuce mosaic virus* Using Monoclonal Antibodies and Surface Plasmon Resonance Technology. *Journal of General Virology*, 88: 2605–2610.

Clark M.F., Adams A.N., 1977. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *J. Genet. Virol*., 34: 475-483.

Çevik B., Pappu S.S., Pappu H.R., Benscher D., Lee R.F., Futch S.H., Rucks, P., Niblett C.L. 1995. Molecular Cloning and Sequencing of Coat Protein Genes of *Citrus tristeza virus* Isolated from Meyer Lemon and Homely Tangor Trees in Florida. *In: 53 Proc. Intern, Org. Citrus Virologist*, 47-53.

Dinant S., Lot H., 1992. Lettuce mosaic virus: a review. *Plant Pathology*, 41: 528-542.

Erkan S., Gümüş M., Paylan İ.C., Duman İ., Ergün M., 2013. İzmir İli ve Çevresindeki Bazı Kışlık Sebzelerde Görülen Viral Etmenlerin Saptanması. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg*., 50 (3): 311-322.

Fakhfakh H., Le Gall O., Candresse T., Marrakchi M., 2001. Analysis of The Variability of Tunisian Isolates of Lettuce Mosaic Virus Using Biological and Molecular Properties. *Journal of Plant Pathology*, 83 (1): 3-11.

Fidan Ü., Türkoğlu T., 1988. Ege Bölgesi Marul Bitkilerinde Görülen Virus Hastalıkları Üzerine Çalışmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 28 (1-2): 43-56.

Firmino A.C., Krause-Sakate R., Pavan M.A., Silva N., Hanai S.M., Anbo R.H., Nietzsche T., Le Gall O., 2008. Prevalence of Lettuce Mosaic Virus-Common Strain on Three Lettuce Producing Areas from Sao Paulo State. *Summa Phytopathol. Botucatu*, 34 (2): 161-163.

German-Retana S., Candresse T., Alies E., Delbos R.P., Le Gall O., 2000. Effect of Green Fluorescent Protein or B-glucuronidase Tagging on The Accumulation and Pathogenicity of a Resistant-Breaking Lettuce Mosaic Virus İsolate in Susceptible and Resistant Lettuce Cultivars. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13 (3): 316-324.

Horvath J., 1980. Viruses of Lettuce. II Host Ranges of Lettuce Mosaic Virus and Cucumber Mosaic Virus. *Acta Agron. Scient. Hungaricae*, 29: 333-352.

Jafarpour B., Shepherd R.J., Grogan R.G., 1979. Serologic Detection of Bean Common Mosaic and Lettuce Mosaic Viruses in Seed. *Phytopathology*, 69 (10): 1125-1129.

Jagger I.C., 1921. A Transmissible Mosaic Disease of Lettuce. *J. Agric. Res.* (*U.S.*), 20: 737-741.

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.

Jordan R., Guaragna M.A., Putnam M., 2008. Detection and Molecular Characterizaiton of New and Emerging Potyviruses of Ornamental Plants. XII *International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants*.

Krause-Sakate R., Le Gall O., Fakhfakh H., Peypelut M., Marrakchi M., Varveri C., Sylvie S.M.A., Lot H., Zerbini F.M., Candresse T., 2002. Molecular and Biological Characterization of Lettuce Mosaic Virus (LMV) isolates reveals a Distinct and Widespread Type of Resistance-Breaking Isolate: LMV-Most. *Virology*, 92 (5): 563-572.

Krause-Sakate R., Redondo E., Richard-Forget F., Jadao A.S., Houvenaghel M.C., German-Retana S., Pavan M.A., Candresse T., Zerbini F.M., Le Gall O., 2005.

Molecular Mapping of The Viral Determinants of Systemic Wilting İnduced by a *Lettuce mosaic virus* (LMV) Isolate in Some Lettuce Cultivars. *Virus Research*, 109: 175-180.

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.

Mazier M., German-Retana S., Flamain F., Dubois V., Botton E., Sarnette V., Le Gall O., Candresse T., Maisonneuve B., 2004. A Simple and Efficient Method for Testing Lettuce Mosaic Virus Resistance In Vitro Cultivated Lettuce. *Journal of Virological Methods*, 116: 123-131.

Messiaen M.C., Lafor R., 1965. Les Maladies Des Plantes Maraicheres. *INRA*, 2: 272-276.

Moreno A., Fereres A., 2012. Virus Diseases in Lettuce in The Mediterranean Basin. *Advances in Virus Research*, 84: 247-288.

Naidu R.A., Karthikeyan G., Jarugula S., Nelson M., 2008. First Report of The Natural Infection of Coreopsis Auriculata 'Nana' with Lettuce Mosaic Virus in The United States. *Plant Disease*, 92 (3): 486 s.

Nebreda M., Moreno A., Perez, N., Palacios I., Seco-Fernandez V., Fereres A., 2004. Activity of Aphids Associated with Lettuce and Broccoli in Spain and Their Efficiency as Vectors of Lettuce Mosaic Virus. *Virus Research*, 83–88.

Ormaz B., Winter S., Koohi-Habibi M., Mosahebi G., Izadpanah K., 2006. Comparison of Biological and Molecular Characterization of Iranian Lettuce Mosaic Virus Isolates. *Commun Agric Appl Biol Sci*, 71 (3): 1289-1294.

Özalp M.O., 1964. İzmir'de Sebzelerde Görülen Virus Hastalıkları. *Bitki Koruma Bülteni*, 4 (1): 18-25.

Özdemir S., Erilmez S., 2007. Denizli İlinde Yetiştirilen Biber, Patlıcan ve Marul Alanlarında Bazı Viral Etmenlerin Saptanması, *Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi*, Isparta, 144.

Peypelut M., Krause-Sakate R., Guiraud T., Pavan M.A., Candresse T., Zerbini F.M., Le Gall O., 2004. Specific Detection of Lettuce Mosaic Virus Isolates Belonging to The 'Most' Type. *Journel of Virological Methods*, 121: 119-124.

Revers F., Lot H., Souche S., Le Gall O., Candresse T., Dunez J., 1997a. Biological and Molecular Variability of Lettuce Mosaic Virus Isolates. *Molecular plant pathology*, 87 (4): 397 s.

Revers F., Yang S.J., Walter J., Souche S., Lot H., Le Gall O., Candresse T., Dunez J., 1997b. Comparison of The Complete Nucleotide Sequences of Two Isolates of Lettuce Mosaic Virus Differing in Their Biological Properties. *Virus Research*, 47: 167-177.

Sharma P., Jain R.K., 2013. First Report of *Lettuce mosaic virus* Infecting *Lactuca sativa* in India. *Plant Disease*, 97 (6): 849 s.

Soleimani P., Mosahebi G., Habibi G. M., 2011. Identification of Some Viruses Causing Mosaic on Lettuce and Characterization of Lettuce Mosaic Virus from Tehran Province in Iran. *African Journal of Agriculture Research*, 6 (13): 3029-3035.

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.

Sutic D.D., Ford R.E., Tosic, M.T. 1999. Handbook of Plant Virus Diseases. *CRC Press*, Boca Raton, Florida, USA.

Takaki F., Sano T., Yamashita T., 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.

Tekinel N., Dolar M. S., Sağgöz S., Salcan Y., 1969. Mersin Bölgesinde Ekonomik Bakımdan Önemli Bazı Sebze Virüsleri Üzerinde Araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 9 (1): 37-49.

Tomlinson J.A., 1970. Lettuce mosaic virus. *CMI/AAB* Descriptions of Plant Viruses 9.

Uzunoğulları N., Beşirli G., 2011. Yedikule Marul (*Lactuca sativa* L. var. Longifolia) Çeşidinde Zarar Yapan Bazı Viral Etmenlerin Tanılanması. *Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri*, Kahramanmaraş, 416.

Zanganeh M., Dizadji A., Mossahebi G.H., 2014. The responsse of lettuce cultivars Against Two *Lettuce mosaic virus* Isolates, One Able to Systemically İnfect The Resistant Cultivar Salinas 88. *Journal of Phytopathology*, 1-8.

Zerbini F.M., Koike S.T., Gilbertson R.L., 1995. Biological and Molecular Characterization of Lettuce Mosaic Potyvirus Isolates from The Salinas Valley of California. *Phytopathology*, 85: 746-752.

Ek Çizelge 1. Toplanan örneklere ait bilgiler

Örnek No	Alındığı Yer	Alındığı Tarih	*DAS-ELISA Sonucu (LMV)
1	Ayvacık	08.11.2013	-
2	Ayvacık	08.11.2013	-
3	Ayvacık	08.11.2013	-
4	Ayvacık	08.11.2013	-
5	Ayvacık	08.11.2013	+
6	Ayvacık	08.11.2013	-
7	Ayvacık	08.11.2013	-
8	Ayvacık	08.11.2013	-
9	Ayvacık	08.11.2013	-
10	Merkez	12.11.2013	-
11	Merkez	12.11.2013	-
12	Merkez	12.11.2013	-
13	Merkez	12.11.2013	+
14	Merkez	12.11.2013	-
15	Merkez	12.11.2013	+
16	Merkez	12.11.2013	-
17	Merkez	12.11.2013	-
18	Lapseki	12.11.2013	-
19	Lapseki	12.11.2013	-
20	Lapseki	12.11.2013	-
21	Lapseki	12.11.2013	-
22	Lapseki	21.12.2013	-
23	Lapseki	21.12.2013	-

*****Negatif sonuç: -, pozitif sonuç: +

Ek Çizelge 1'in devamı Toplanan örneklere ait bilgiler

Örnek No	Alındığı Yer	Alındığı Tarih	*DAS-ELISA Sonucu (LMV)
24	Lapseki	21.12.2013	-
25	Lapseki	21.12.2013	-
26	Lapseki	21.12.2013	-
27	Lapseki	21.12.2013	-
28	Merkez	21.12.2013	-
29	Merkez	21.12.2013	-
30	Merkez	21.12.2013	-
31	Merkez	21.12.2013	-
32	Bayramiç	21.12.2013	-
33	Bayramiç	21.12.2013	-
34	Bayramiç	21.12.2013	-
35	Bayramiç	21.12.2013	-
36	Bayramiç	21.12.2013	-
37	Bayramiç	21.12.2013	-
38	Bayramiç	21.12.2013	-
39	Bayramiç	21.12.2013	-
40	Bayramiç	21.12.2013	-
41	Bayramiç	21.12.2013	-
42	Bayramiç	21.12.2013	-
43	Bayramiç	21.12.2013	-
44	Bayramiç	21.12.2013	-
45	Bayramiç	21.12.2013	-
46	Bayramiç	21.12.2013	-

*****Negatif sonuç: -, pozitif sonuç: +

Ek Çizelge 1'in devamı. Toplanan örneklere ait bilgiler

Örnek No	Alındığı Yer	Alındığı Tarih	*DAS-ELISA Sonucu (LMV)
47	Bayramiç	21.12.2013	-
48	Gelibolu	24.12.2013	-
49	Gelibolu	24.12.2013	-
50	Çan	25.12.2013	-
51	Çan	25.12.2013	-
52	Çan	25.12.2013	-
53	Çan	25.12.2013	-
54	Çan	25.12.2013	-
55	Çan	25.12.2013	-
56	Çan	25.12.2013	-
57	Çan	25.12.2013	-
58	Biga	25.12.2013	-
59	Biga	25.12.2013	-
60	Ayvacık	27.02.2014	+
61	Ayvacık	27.02.2014	+
62	Ayvacık	27.02.2014	+
63	Ayvacık	27.02.2014	+
64	Ayvacık	27.02.2014	-
65	Ayvacık	27.02.2014	+
66	Gelibolu	13.03.2014	-
67	Gelibolu	13.03.2014	-
68	Gelibolu	13.03.2014	-
69	Gelibolu	13.03.2014	-

*****Negatif sonuç: -, pozitif sonuç: +

Ek Çizelge 1'in devamı. Toplanan örneklere ait bilgiler

Örnek No	Alındığı Yer	Alındığı Tarih	*DAS-ELISA Sonucu (LMV)
70	Gelibolu	13.03.2014	-
71	Gelibolu	13.03.2014	-

*Negatif sonuç: -, pozitif sonuç: +

Ek Çizelge 2. Tübitak-TOVAG projesi kapsamında toplanan örneklere ait bilgiler

Örnek No	Alındığı Yer	Alındığı Tarih	*DAS-ELISA Sonucu (LMV)
257	Bayramiç	23.12.2007	-
345	Bayramiç	21.05.2008	+
346	Bayramiç	21.05.2008	+
349	Ezine	21.05.2008	+
380	Biga	21.05.2008	+
382	Biga	21.05.2008	+

*Negatif sonuç: -, pozitif sonuç: +

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Ali KARANFİL

Doğum Yeri: İZMİR

Doğum Tarihi: 02/04/1987

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

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

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Uluslararası kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda sunularak, programda yer alan <u>özet metin</u> olarak yayınlanan bildiri ya da poster veya gösteri

- Karanfil A, Korkmaz S, Tuzlalı H.T., 2014. Current Situation of Citrus tristeza virus in Turkey. Second Student Scientific Conference "Ecology and Environment" 16-17 May, 2014, Shumen, Bulgaria.
- Karanfil A., Tuzlalı H.T., Korkmaz S., 2014. Plant Viruses Relation with Aphids and Manners of Transmission. Second Student Scientific Conference "Ecology and Environment" 16-17 May, 2014, Shumen, Bulgaria.

Ulusal kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda sunularak, programda yer alan <u>özet metin</u> olarak yayımlanan bildiri ya da poster veya gösteri

- Korkmaz S., Çevik B., Akdura N., Bakır T., Satar S., Koç N.K., Karanfil A., 2014.Yaprakbiti ile Taşınmanın Turunçgil Tristeza Virüsü (CTV)'nün Genetik

Çeşitliliğine ve Popülasyon Yapısına Etkisinin Kılıf Protein Geni Dizilimine Göre Belirlenmesi. V. Bitki Koruma Kongresi, 3-5 Şubat Antalya, 2014, 264.

Ulusal kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda sunularak, programda yer alan <u>tam metin</u> olarak yayımlanan bildiri ya da poster veya gösteri

- Mert-Türk F., Karanfil A., 2013. Zearalenone'nun Çiftlik Hayvanlarının Sağlığı Üzerine Etkisi. 8. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, 5-7 Eylül Çanakkale, 2013, 532-535.
- Karanfil A., Mert-Türk F., 2013.Hayvan Yemlerinde Küfler ve Önleme Yolları. 8. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, 5-7 Eylül Çanakkale, 2013, 536-539.

Alanındaki uluslararası ödülleri

- Best Poster Award. Second Student Scientific Conference "Ecology and Environment" 16-17 May, 2014, Shumen, Bulgaria.

Alanındaki Ulusal Ödülleri

- Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Birinciliği
- Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Birinciliği

<u>Ulusal</u> sempozyum, kongre, çalıştay (workshop), yaz okulu düzenlemesi gibi etkinliklerde alınan görevler

Düzenleme Kurulu Üyeliği:
"Güney Marmara Bölgesi'nde Dünden Yarına Entegre Mücadele" 27-28 Ağustos Çanakkale, 2014.

Katıldığı Kurslar

- Emerging and Quarantine Diseases of Mediterranean Fruit and Vegatable Crops. 31 March-5 April 2014, Zaragoza, Spain.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi 2011- &

İLETİŞİM

E-posta Adresi: ali.karanfil@hotmail.com