



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

GÜNEY MARMARA BÖLGESİ'NDE
***ALLIUM* CİNSİ BİTKİLERDE**
POTYVİRÜSLERİN TANILANMASI VE
KARAKTERİZASYONU

Hasan Tuna TUZLALI

Bitki Koruma Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

GÜNEY MARMARA BÖLGESİ'NDE
***ALLIUM* CİNSİ BİTKİLERDE**
POTYVİRÜSLERİN TANILANMASI VE
KARAKTERİZASYONU

Hasan Tuna TUZLALI

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 30/01/2018

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

ÇANAKKALE

Hasan Tuna TUZLALI tarafından Prof. Dr. Savaş KORKMAZ yönetiminde hazırlanan ve **30/01/2018** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Güney Marmara Bölgesi’nde Allium Cinsi Bitkilerde Potyviruslerin Tanılanması ve Karakterizasyonu**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

Başkan

Prof. Dr. Figen TÜRK

Üye

Prof. Dr. Kenan KAYNAŞ

Üye

Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU

Üye

Yrd. Doç. Dr. Hakan FİDAN

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

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.

Hasan Tuna TUZLALI

TEŞEKKÜR

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi'nde, lisansüstü eğitime başladığım ilk günden bu yana bilimsel anlamda yaptığı katkıların yanı sıra, her konuda destekçim olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen saygı değer danışman hocam Sayın Prof. Dr. Savaş KORKMAZ'a, bu tez çalışmasının yürütülmesinde yapmış olduğu yardım ve katkılardan dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışma süresince tezin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşım, değerli dostum Arş. Gör. Ali KARANFİL'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışması süresince, yönlendirmeleri ile tezin şekillenmesinde önemli katkıları bulunan Tez İzleme Komitesi Üyesi değerli hocalarım, Sayın Prof. Dr. Figen TÜRK, Sayın Prof. Dr. Kenan KAYNAŞ ve Sayın Doç. Dr. Zeliha GÖKBAYRAK'a, değerli jüri üyeleri Sayın Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Hakan FİDAN'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmasının bir kısmının yürütüldüğü Mersin Zirai Karantina Müdürlüğü'nün değerli yöneticileri ve laboratuvar birimi personellerine vermiş oldukları desteklerden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Bölüm başkanlığı döneminde Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nde çalışma imkanı sunan Sayın Prof. Dr. Yeşim AYSAN'a ve Sayın Doç. Dr. Behçet Kemal ÇAĞLAR'a teşekkür ederim.

Bursa İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü teknik personeli Sayın Zir. Yük. Müh. Uğur EKMEKÇİ'ye, Altıeylül İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü teknik personeli Sayın Oktay MÜMİNOĞLU'na ve Adana Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü teknik personeli Sayın Dr. Pelin ÖZTÜRK KELEŞ'e bu tez çalışmasına vermiş oldukları değerli katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma sürecinde, maneviyatını daima hissettiren, sevgili Çiğdem ALP'e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca hayatımın her döneminde yanımda olan değerli aileme bu süreçte göstermiş olduğu desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hasan Tuna TUZLALI

Çanakkale, Ocak 2018

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde oranı
µl	Mikrolitre
∞	Sonsuz
aa	Amino asit
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ark.	Arkadaşları
BAL	Balıkesir
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
BUR	Bursa
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
cm	Santimetre
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CP	Coat protein
CTV	<i>Citrus tristeza virus</i>
CVB	<i>Chrysanthemum virus B</i>
ÇAN	Çanakkale
da	Dekar
DAC-ELISA	Direct antigen-coated enzyme-linked immunosorbent assay
DAS-ELISA	Double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
DBIA	Dot-blotting immunobinding assay
dCTP	Deoxycytidine triphosphate
DDT	DL-Dithiothreitol
dGTP	Deoxyguanosine triphosphate
dk.	Dakika
DNA	Deoxyribonucleic acid
dTTP	Thymidine triphosphate

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylene diaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FAO	Food and Agricultural Organization of the United Nations
GarMbFV	<i>Garlic mite-borne filamentous virus</i>
GarV-A	<i>Garlic Allexivirus A</i>
GarV-B	<i>Garlic Allexivirus B</i>
GarV-C	<i>Garlic Allexivirus C</i>
GarV-D	<i>Garlic Allexivirus D</i>
GarV-E	<i>Garlic Allexivirus E</i>
GCLV	<i>Garlic common latent Carlavirus</i>
GEB	General extract buffer
ha	Hektar
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside solution
IYSV	<i>Iris yellow spot Tospovirus</i>
JYMV	<i>Japanese yam mosaic virus</i>
kb	Kilo base
KCl	Potasyum klorür
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Mono potasyum fosfat
LB	Leuria Bertani
LMV	<i>Lettuce mosaic virus</i>
LYSV	<i>Leek yellow stripe Potyvirus</i>
M	Molar
M	Markör
MBO	Mikoplazma benzeri organizma
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
M-MMLV	Moloney murine leukemia virus
MW	Molecular weight
Na ₂ HPO ₄	Disodyum fosfat

Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
NaCl	Sodyum klorür
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
NaN ₃	Sodyum azit
ng	Nanogram
NIa	Nuclear inclusion a
NIb	Nuclear inclusion b
NK	Negatif kontrol
nm	Nanometre
No.	Numara
nt	Nükleotit
NTR	Nontranslated region
°C	Santigrat derece
ORF	Open reading frame
OYDV	<i>Onion yellow dwarf Potyvirus</i>
PBST	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Power of hydrogen
pNPP	Para-nitrophenyl-phosphate
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Revolutions per minute
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
sa.	Saat
ScaMV	<i>Scallion mosaic virus</i>
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
SDT	Simple direct tube
SEM	Scanning electron microscope
ShV-X	<i>Shallot Allexivirus X</i>
SLV	<i>Shallot latent Carlavirus</i>
Sn.	Saniye
SSR	Simple sequence repeat
ssRNA	Single-stranded RNA

SYSV	<i>Shallot yellow stripe virus</i>
TAE	Tris-acetate-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TICV	Tomato infectious chlorosis virus
TMV	Tobacco mosaic virus
TNA	Total nucleic acid
ToCV	<i>Tomato chlorosis virus</i>
TÜİK	Türkiye istatistik kurumu
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolet
V	Volt
VAM	Vesicular arbuscular mycorrhizal
vd.	Ve devamı, ve diğerleri
w/v	Weight/volume
WoYSV	<i>Welsh onion yellow stripe virus</i>
WYDYV	<i>Wakegi yellow dwarf virus</i>
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranoside
YMMV	<i>Yam mild mosaic virus</i>
μ M	Mikrometre

ÖZET

GÜNEY MARMARA BÖLGESİ'NDE *ALLIUM* CİNSİ BİTKİLERDE POTYVİRÜSLERİN TANILANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Hasan Tuna TUZLALI

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

30/01/2018, 106

Çalışmada, Çanakkale, Bursa ve Balıkesir ili ve ilçelerinde 2014-2017 üretim yılları içerisinde survey çalışmaları yürütülerek *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), *Leek yellow stripe virus* (LYSV) ve *Turnip mosaic virus* (TuMV) etmenlerine benzer simptom gösteren pırasa, soğan ve sarımsak bitkilerinden 494 örnek toplanmış ve DAS-ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Analizler sonucunda 494 örnekten 100 tanesinde OYDV, 52 tanesinde LYSV ve 35 tanesinde ise karışık enfeksiyon bulunmuş, TuMV enfeksiyonları ise tespit edilememiştir. Enfekteli bulunan örnekler içerisinde elde edilen bazı izolatların moleküler özelliklerini belirlemek amacıyla RT-PCR ürünleri klonlanarak nükleik asit ve amino asit dizilimleri belirlenmiştir. Bu izolatlara özgü nükleotit (nt) ve amino asit (aa) dizilimleri, gen bankasında bulunan ve dünyanın farklı üretim bölgelerinden izolatlar ile karşılaştırılmış ve Güney Marmara Bölgesi LYSV izolatlarının kendi aralarında nt ve aa düzeyinde sırası ile % 79,55-99,81 ve % 80,69-100, OYDV izolatlarının ise % 76,25-99,67 ve % 83,50-100 benzerlik taşıdığı belirlenmiştir. Bu izolatların dünya izolatları ile nt ve aa düzeyinde oluşturduğu benzerlik oranları ise sırası ile LYSV için % 77,90-99,27 ve % 78,19-99,69, OYDV için ise % 74,09-84,72 ve % 79,00-92,50 olarak belirlenmiştir. Yapılan filogenetik analizler sonucunda Güney Marmara Bölgesi izolatlarının dünyanın farklı bölgelerindeki izolatlarla farklı düzeylerde ilişki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca klonlama çalışmalarında kullanılan izolatlardan bazıları indikatör bitkilere mekanik taşınma denemeleri kapsamında inokule edilmiş ve inokule edilen bitkilerin bazılarında LYSV ve OYDV'ye özgü simptomlar gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Güney Marmara Bölgesi, OYDV, LYSV, TuMV, Klonlama

ABSTRACT

DETECTION AND CHARACTERIZATION OF POTYVIRUS IN PLANTS OF *ALLIUM* GENUS IN SOUTH MARMARA REGION

Hasan Tuna TUZLALI

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Doctoral Dissertation in Plant Protection

Advisor: Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

30/01/2018, 106

In this study, 494 samples were collected from leek, onion and garlic plants which show similar symptoms with *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), *Leek yellow stripe virus* (LYSV) and *Turnip mosaic virus* (TuMV) by conducting surveys in Çanakkale, Bursa and Balıkesir provinces and sub provinces in 2014-2017 and they were tested by DAS-ELISA method. As a result of analysis, while 100 OYDV, 52 LYSV and 35 mixed infections out of 494 samples were determined, TuMV infections were not found. To identify the molecular properties of some isolates that were found in infected samples, nucleic acid and amino acid sequences were determined by cloning RT-PCR products. When the nucleotide (nt) and amino acid (aa) sequences which are specific to these isolates compared to isolates from the different production regions all over the world, it has been revealed that there are similarities both among the LYSV isolates of the Southern Marmara Region of 79,55-99,81 % and 80,69-100 %, and the OYDV isolates of 76,25-99,67 % and 83,50-100 %, respectively. While the similarity rates of these isolates with the world isolates at the level of nt and aa within the context of LYSV are 77,90-99,27 % and 78,19-99,69 %, the rates are 74,09-84,72 % and 79,00-92,50 % for OYDV, as a consequence. As a result of conducted phylogenetic analyzes, it has been found that the isolates of the South Marmara Region are associated with different levels of isolates in different parts of the world. Furthermore, some of the isolates used in cloning studies were inoculated with indicator plants through mechanical transmission assays and in some of the inoculated plants, symptoms particular to LYSV and OYDV were observed.

Keywords: South Marmara Region, OYDV, LYSV, TuMV, Cloning

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
2.1. Hastalık Etmeni Virüslere Ait Genel Bilgiler	7
2.2. Ülkemiz Dışında Gerçekleştirilmiş Bazı Çalışmalar	9
2.3. Ülkemizde Gerçekleştirilmiş Bazı Çalışmalar	17
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal	20
3.2. Yöntem.....	22
3.2.1. Arazi Çalışmaları.....	22
3.2.2. DAS-ELISA Testi Çalışmaları	25
3.2.3. RT-PCR Testi Çalışmaları	27
3.2.4. Klonlama Analizi Çalışmaları	32
3.2.4.1. RT-PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	32
3.2.4.2. Ligasyon.....	33
3.2.4.3. Transformasyon	33
3.2.4.4. Bakteri Kolonilerinin Seçimi ve Koloni PCR.....	34
3.2.4.5. Plazmit İzolasyonu	34
3.2.4.6. <i>EcoRI</i> Restriksiyon Enzimi ile Kesme İşlemi (Digestion).....	35
3.2.5. Sekans ve Filogenetik Analiz Çalışmaları	36
3.2.6. Mekanik Taşınma Denemeleri.....	37

BÖLÜM 4	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	40
4.1. Arazi Çalışmaları Bulguları	40
4.2. DAS-ELISA Testi Bulguları	49
4.3. RT-PCR Testi Bulguları.....	55
4.4. Klonlama Analizi Bulguları	59
4.5. Sekans ve Filogenetik Analiz Çalışmaları Bulguları	63
4.5.1. Sekans Analizi Bulguları	64
4.5.1.1. Nükleotit Düzeyinde Çoklu Dizi Karşılaştırmaları	64
4.5.1.2. Amino Asit Düzeyinde Çoklu Dizi Karşılaştırmaları.....	71
4.5.2. Filogenetik Analiz Bulguları.....	77
4.5.2.1. Nükleotit Dizilimlerine Göre Filogenetik Analizler.....	78
4.5.2.2. Aminoasit Dizilimlerine Göre Filogenetik Analizler	82
4.6. Mekanik Taşınma Denemeleri Bulguları	87
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	91
KAYNAKLAR	96
EKLERİ	I
EK 1. DAS-ELISA Analizlerinde Kullanılan Tampon Çözeltiler	II
EK 2. RT-PCR Analizleri Kapsamında Kullanılan Tampon Çözeltiler	IV
EK 3. Klonlama Analizleri Kapsamında Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	V
EK 4. Mekanik Taşınma Denemelerinde Kullanılan Tampon Çözeltiler	VI
ÖZGEÇMİŞ	VII

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3.1. Arazi çalışmalarının yapıldığı Güney Marmara Bölgesi illeri	22
Şekil 3.2. Örneklemeler için belirli bir büyüklüğe gelmiş bitkiler; a: soğan, b: pırasa c: sarımsak	24
Şekil 3.3. İzolatların etiketlenme ve taşınma işlemleri	25
Şekil 3.4. İndikatör bitkilerin yetiştirilme aşamalarından bir görünüm.....	38
Şekil 3.5. Mekanik taşınma denemelerinden bir görünüm	39
Şekil 4.1. Bursa ili, Karacabey ilçesi, soğan alanlarından genel bir görünüm.	41
Şekil 4.2. Örnekleme yapılan soğan bitkilerinin gösterdiği simptomlar; a, b, c, d: parlak sarı-yeşil çizgi oluşumu, e: boğum aralarında daralma, f: kıvrılma, g, h: bodurlaşma, boğum aralarında daralma ve renk açılmaları belirtileri	46
Şekil 4.3. Örnekleme yapılan pırasa bitkilerinin gösterdiği simptomlar; a, b: orta damara paralel renk açılmaları, çizgi oluşumları ve mozaik, c: yapraklarda matlaşma, d: bodurlaşma belirtileri	47
Şekil 4.4. Örnekleme yapılan sarımsak bitkilerinin gösterdiği simptomlar; a, b: yapraklarda kıvrılma ve gelişme geriliği, c, d: çizgi şeklinde renk açılmaları, sararma ve mozaik belirtileri	48
Şekil 4.5. DAS-ELISA testi sonucu enfekteli olduğu belirlenen ve orta damara paralel renk açılmaları ile çizgi oluşumuna neden olan pırasa bitkileri a: LYSV ile enfekteli pırasa izolatu, b: OYDV ile enfekteli pırasa izolatu	52
Şekil 4.6. DAS-ELISA testi sonucu enfekteli olduğu belirlenen ve yapraklarında sararma, renk açılmaları ile mozaik oluşumuna neden olan sarımsak bitkileri a: LYSV ile enfekteli sarımsak izolatu, b: OYDV ile enfekteli sarımsak izolatu	53
Şekil 4.7. LYSV izolatlarına ait RT-PCR sonuçları: M: Markör (100-5000 bp), ÇAN 244 (Pırasa), ÇAN 248 (Pırasa), ÇAN 253 (Pırasa), BUR 288 (Pırasa), BUR 289 (Pırasa), BUR 290 (Pırasa), BUR 293 (Sarımsak), BAL 378 (Sarımsak), BAL 387 (Sarımsak) BAL 398 (Pırasa) enfekteli izolatlar	56
Şekil 4.8. OYDV izolatlarına ait RT-PCR analizleri sonucu: M: Markör (100-5000 bp), NK: Negatif Kontrol, BUR 301 (Sarımsak), BUR 318 (Sarımsak), ÇAN 411 (Sarımsak), ÇAN 419 (Sarımsak), ÇAN 429 (sarımsak), BAL 435 (Sarımsak), BAL 436 (Sarımsak), BAL 449 (Sarımsak), BUR 487 (Pırasa) BUR 488 (Pırasa)enfekteli izolatlar	56
Şekil 4.9. <i>E. coli</i> bakterilerinin LB (ampisilin, X-Gal, IPTG) besi ortamında oluşturdukları mavi-beyaz koloniler	59
Şekil 4.10. Seçilen beyaz kolonilerin LB (ampisilin) besi ortamına çizimi	59
Şekil 4.11. LYSV izolatlarına ait koloni PCR sonuçları (M: Markör; ÇAN 244-1, ÇAN 244-2, ÇAN 244-3, ÇAN 248-1, ÇAN 248-2, ÇAN 248-3, ÇAN 253-1, ÇAN 253-2, ÇAN 253-3, BUR 290-1, BUR 290-2, BUR 290-3, BUR 293-1, BUR 293-2, BUR 293-3 izolat numaraları)	60
Şekil 4.12. OYDV izolatlarına ait koloni PCR sonuçları (M: Markör; BUR 301-1, BUR 301-2, BUR 301-3, BUR 318-1, BUR 318-2, BUR 318-3, ÇAN 411-2, ÇAN 411-3, ÇAN 419-1, ÇAN 419-2, ÇAN 419-3, ÇAN 429-1, ÇAN 429-2, ÇAN 429-3 izolat numaraları).....	60
Şekil 4.13. LYSV geni içeren plazmitlerin <i>EcoRI</i> enzimi ile kesimine ait jel görüntüsü (M: Markör; ÇAN 244-3, ÇAN 248-2, ÇAN 253-3, BUR 288-1, BUR 289-2, BUR 290-3, BUR 293-1, BAL 378-1, BAL 387-2, BAL 398-3 plazmitlere ait örnek numaraları).....	61

Şekil 4.14. OYDV geni içeren plazmitlerin <i>EcoRI</i> enzimi ile kesimine ait jel görüntüsü (M: Markör; BUR 301-3, BUR 318-3, ÇAN 411-1, ÇAN 419-2, ÇAN 429-2, BAL 435-1, BAL 436-3, BAL 449-2, BUR 487-1, BUR 488-3) plazmitlere ait örnek numaraları).....	61
Şekil 4.15. Güney Marmara Bölgesi <i>Leek yellow stripe virus</i> izolatlarının nükleotit dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı	78
Şekil 4.16. Güney Marmara Bölgesi <i>Onion yellow dwarf virus</i> izolatlarının nükleotit dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı	79
Şekil 4.17. Güney Marmara Bölgesi <i>Leek yellow stripe virus</i> izolatları ile dünya izolatlarının nükleotit dizilimleri kullanılarak görüntülenen filogenetik soyağacı.....	80
Şekil 4.18. Güney Marmara Bölgesi <i>Onion yellow dwarf virus</i> izolatları ile dünya izolatlarının nükleotit dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı.....	81
Şekil 4.19. Güney Marmara Bölgesi <i>Leek yellow stripe virus</i> izolatlarının, amino asit dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı	83
Şekil 4.20. Güney Marmara Bölgesi <i>Onion yellow dwarf virus</i> izolatlarının, amino asit dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı	84
Şekil 4.21. Güney Marmara Bölgesi <i>Leek yellow stripe virus</i> izolatları ile dünya izolatlarının amino asit dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı.....	85
Şekil 4.22. Güney Marmara Bölgesi <i>Onion yellow dwarf virus</i> izolatları ile dünya izolatlarının amino asit dizilimleri kullanılarak görüntülenen filogenetik soyağacı.....	86
Şekil 4.23. BUR 293 sarımsak izolatının mekanik taşınma denemeleri sonucunda indikatör bitkilerinde oluşturduğu belirtiler 293a, 293b: kesikli çizgi ve renk açılması belirtileri.....	88
Şekil 4.24. BUR 301 ve BAL 449 numaralı OYDV izolatlarının mekanik taşınma denemeleri sonucunda indikatör bitkilerinde meydana getirdiği yapraklarda kıvrılma ve renk açılma belirtileri.....	89

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Pırasa, soğan ve sarımsak bitkilerinin taksonomideki yeri.....	1
Çizelge 1.2. 2016 yılı dünya soğan üretimi ve ülkemizin sıralamadaki yeri (ton).....	3
Çizelge 1.3. 2016 yılı dünya pırasa, sarımsak üretimi ve ülkemizin sıralamadaki yeri (ton)	3
Çizelge 1.4. 2016 yılı Bursa, Balıkesir, Çanakkale illeri üretim miktarları (ton) ve sıralaması	4
Çizelge 3.1 Arazi çalışmaları sonucu iller ve türler düzeyinde toplam bitki sayıları	23
Çizelge 3.2. İki aşamalı RT-PCR içeriği	30
Çizelge 3.3 Tek aşamalı RT-PCR içeriği.....	30
Çizelge 3.4. İki aşamalı RT-PCR programı	31
Çizelge 3.5. Tek aşamalı RT-PCR programı	31
Çizelge 3.6. Ligasyon karışımı içerik ve miktarı	33
Çizelge 3.7. Digestion karışımı ve içeriği.....	35
Çizelge 3.8. Mekanik taşınma denemeleri için kullanılan LYSV ve OYDV izolatları.....	37
Çizelge 4.1. Toplam örnek sayısı, üretim miktarı (ton) ve üretim alanı (da) verileri.....	40
Çizelge 4.2. Örneklerin iller, ilçeler, türler bazında dağılımı ve toplam bitki sayıları	43
Çizelge 4.3. İller ve türler düzeyinde hastalıklı bitki sayıları ve toplam bitki sayıları	50
Çizelge 4.4. RT-PCR çalışmaları için kullanılan LYSV ve OYDV izolatları.....	55
Çizelge 4.5. Sekans ve filogenetik analizlerinde kullanılan dünya izolatları	63
Çizelge 4.6. Güney Marmara Bölgesi <i>Leek yellow stripe virus</i> izolatlarının nükleotit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları (%).....	64
Çizelge 4.7. Güney Marmara Bölgesi <i>Onion yellow dwarf virus</i> izolatlarının nükleotit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları (%).....	65
Çizelge 4.8. Güney Marmara Bölgesi <i>Leek yellow stripe virus</i> izolatları ile dünya izolatlarının nükleotit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları (%) ..	67
Çizelge 4.9. Güney Marmara Bölgesi <i>Onion yellow dwarf virus</i> izolatları ile dünya izolatlarının nükleotit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları (%) ..	69
Çizelge 4.10. Güney Marmara Bölgesi <i>Leek yellow stripe virus</i> izolatlarının amino asit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları (%).....	71
Çizelge 4.11. Güney Marmara Bölgesi <i>Onion yellow dwarf virus</i> izolatlarının amino asit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları (%).....	72
Çizelge 4.12. Güney Marmara Bölgesi <i>Leek yellow stripe virus</i> izolatları ile dünya izolatlarının amino asit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları (%)	74
Çizelge 4.13. Güney Marmara Bölgesi <i>Onion yellow dwarf virus</i> izolatları ile dünya izolatlarının amino asit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları (%)	76
Çizelge 4.14. Mekanik taşınma denemeleri sonuçları	88

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Farklı ekolojilerde tarımı yapılabilen ve insanların beslenme gereksinimlerine katkıda bulunan sebzeler, tüketildikleri coğrafyanın kültürü ve ihtiyaçları doğrultusunda pişirilerek, çiğ, taze veya konserve olarak tüketilirler ve bu özellikleri ile süs bitkileri, çayır mera ve yem bitkileri ile tıbbi aromatik bitkilerden farklılık gösterirler. Tüketilen kısımlarına göre kökleri ve yumruları, soğanları, sürgünleri ve gövdeleri, yaprak ve yaprak sapları, çiçek ve çiçek tablası, tohumları ile olgunlaşmış veya olgunlaşmamış meyveleri tüketilebilen sebzeler, insan beslenmesi ve sağlığına faydalı olmakla beraber birim alandan yüksek gelir sağlayabilmeleri ile de tarımın vazgeçilmez ürünleri arasında yer alırlar.

Bu sebze türleri arasında soğanları yenen sebzeler içerisinde bulunan ve iklim istekleri göz önüne alındığında kışlık sebzeler içerisinde sınıflandırılan soğan, sarımsak ve pırasa, *Allium* cinsi bitkiler içerisinde yer alan ve ticari önemi bulunan türleridir. Bu türlerin taksonomideki yeri Çizelge 1.1’de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Pırasa, soğan ve sarımsak bitkilerinin taksonomideki yeri

Alem	<i>Plantae</i>
Şube	<i>Magnoliophyta</i>
Sınıf	<i>Liliopsida</i>
Takım	<i>Asparagales</i>
Familya	<i>Alliaceae</i>
Cins	<i>Allium</i>
Tür	<i>Allium ampeloprasum</i> L. (Pırasa)
	<i>Allium cepa</i> L. (Soğan)
	<i>Allium sativum</i> L. (Sarımsak)

Bu bitkiler arasından soğan (*Allium cepa* L.), keskin kokusu ile kolayca seçilebilen, yumrusunun yanı sıra yeşil yaprakları da tüketilebilen bir bitki olup, hem pişmiş, hem de taze olarak tüketilen bir türdür ve içerisinde 700’den fazla tür bulunduran *Allium* cinsi bitkiler arasında yer almaktadır (Burnie ve ark., 1999).

Allium cinsi bitkilerin soğan ile birlikte en önemli üyesi olan sarımsak (*Allium sativum* L.), taze olarak tüketildiğinde yaprakları ve yalancı gövdesi, kuru olarak tüketildiğinde ise baş kısmında bulunan dişleri ile tüketilebilmektedir. Sarımsak 6000 yıldan fazla bir süre ile dünya çapında yetiştirilen en eski sebzelerden biridir. Yeraltındaki dişleri ve genç yapraklarında bulunan biyoaktif bileşenleri tarafından sağlanan kullanılabilirliği ve tıbbi özellikleri nedeni ile önemli bir bitkidir. En yaygın olanı, bir diploid karyotip ile karakterize edilen, Asya *A. sativum* ekotipidir (Simon ve Jenderek, 2003).

Vejetatif olarak dişlerle üretimi yapılabilen sarımsağın ayrıca tohumlarından da üretim yapılabilir. Sarımsağın içinde bulunduğu *Allium sativum* türünün iki alt türü bulunmaktadır. Bunlardan ilki (*A. sativum* sub var. *sativum*) dünyada yaygın olarak ticareti yapılan ve bitkilerin sapa kalkma özelliklerine göre yumuşak boyunlu (softneck) olarak isimlendirilen sarımsaklardır. Diğeri ise *A. sativum* sub. var. *ophioscorodon*'dur ve sert boyunlu (hardneck) sarımsak olarak bilinmektedir (Heinrich ve Larry, 1996).

Gen merkezi Yakınoğu ya da ölkemizin dahil olduğu Doğu Akdeniz havzası olduğu bilinen pırasanın (*A. ampeloprasum* L.), kökeninin ayrıca İtalya, Yunanistan, Anadolu, İnan, Suriye, Filistin, Azerbaycan ve Afganistan'ı içerisine alan bölgede olduğu ileri sürölmektedir. Geçmişı, Mısır Medeniyeti ve Romalılara kadar dayanan pırasa, ölkemizde genel olarak kışlık sebze olarak kullanılan ve hemen hemen bütün bölgelerimizde üretilip tüketilen bir sebzedir. Özellikle kara ikliminin hüküm sürdüğu bölgelerimizde kışlık sebze tüketiminin çok önemli bir bölümünü oluştururlar (Anonim, 2013).

Allium cinsi bitkiler, dünya genelinde yetiştiriciliklerinin yapılabilidiği her yerde üretilmekte ve ticareti yapılmaktır. Gelir düzeyi fark etmeksizin çoğu insanın severek tüketebildiği bu ürünlerin FAO 2016 yılı verilerine göre dünya genelinde toplam üretim miktarları (ton) ve ölkemizin dünya üretimindeki sıralaması Çizelge 1.2 ve Çizelge 1.3'te verilmiştir (Anonim, 2017a)

Çizelge 1.2. 2016 yılı dünya soğan üretimi ve ülkemizin sıralamadaki yeri (ton)

Soğan (kuru)		Soğan (taze)	
1. Çin	23.849.053	1. Çin	934.707
2. Hindistan	19.415.425	2. Nijer	679.698
3. Mısır	3.115.482	3. Japonya	549.749
4. ABD	3.025.700	4. Mali	529.413
5. İran	2.345.768	5. Yunanistan	415.969
6. Türkiye	2.120.581	6. Güney Kore	412.202
7. Rusya	2.023.271	7. Tunus	282.377
8. Pakistan	1.739.054	8. Nijerya	247.475
9. Bangladeş	1.735.334	9. Yeni Zelanda	203.449
10. Brezilya	1.657.441	11. Türkiye	134.479
Toplam	93.168.548	Toplam	5.725.132

Çizelge 1.3. 2016 yılı dünya pırasa, sarımsak üretimi ve ülkemizin sıralamadaki yeri (ton)

Pırasa		Sarımsak	
1. Endonezya	537.931	1. Çin	21.197.131
2. Türkiye	227.172	2. Hindistan	1.400.000
3. Fransa	150.942	3. Bangladeş	381.851
4. Güney Kore	148.353	4. Mısır	280.216
5. Belçika	130.650	5. Güney Kore	275.549
6. Çin	124.283	6. Rusya	262.211
7. Polonya	118.647	7. Myanmar	212.909
8. Kazakistan	95.951	8. Ukrayna	187.960
9. İspanya	94.809	9. Özbekistan	174.170
10. Almanya	85.861	14. Türkiye	135.148
Toplam	2.096.067	Toplam	26.573.001

Türkiye, kuru soğan üretiminde 2.120.581 ton ile dünya üretiminde 6. sırada yer alırken, taze soğan üretiminde ise 134.479 ton ile 11. sırada yer almaktadır (Çizelge 1.2). Pırasa üretiminde ülkemiz, 227.172 ton ile Endonezya'dan sonra üretimde 2. sırada yer alarak dünya üretiminde söz sahibi olurken, sarımsak üretiminde ise 135.148 ton ile 14. sırada yer almaktadır. (Çizelge 1.3).

Bu çalışmanın araştırma alanı içerisinde yer alan ve Güney Marmara Bölgesi'nde bulunan Bursa, Balıkesir ve Çanakkale illeri polikültür tarımın yapıldığı ve sebzeçiliğin önem taşıdığı illerdir. Çalışmanın ana materyalini oluşturan *Allium* cinsi bitkilerin, Bursa, Balıkesir ve Çanakkale illerinde 2016 yılı TÜİK verilerine göre üretim miktarları ve ülke üretimindeki sıralamalarına ait veriler Çizelge 1.4'te verilmiştir.

Çizelge 1.4. 2016 yılı Bursa, Balıkesir, Çanakkale illeri üretim miktarları (ton) ve sıralaması

Pırasa		Soğan		Sarımsak	
Sıra No	Üretim	Sıra No	Üretim	Sıra No	Üretim
1. Bursa	36.407	1. Ankara	478.331	1. Kastamonu	24.024
2. Mersin	36.279	2. Amasya	294.698	2. Gaziantep	18.847
3. Samsun	27.138	3. Hatay	237.616	3. Kahramanmaraş	16.185
4. İzmir	25.734	8. Bursa	86.944	5. Balıkesir	7.391
5. Balıkesir	10.067	14. Balıkesir	21.583	20. Çanakkale	1.174
19. Çanakkale	2.847	37. Çanakkale	5.208	33. Bursa	594

2016 yılında ülkemizde toplam 227.172 ton pırasa, 2.255.060 ton soğan ve 135.148 ton sarımsak üretimi gerçekleştirilmiştir. Araştırma bölgesi kapsamında yer alan bu illerde soğan, sarımsak ve pırasa üretimlerinin toplam üretimdeki paylarına bakıldığında; Bursa ilinin pırasada % 16,02, soğanda % 3,85 ve sarımsakta % 0,43, Balıkesir ilinin, pırasada % 4,43, soğanda % 0,95 ve sarımsakta ise % 5,46, Çanakkale ilinin pırasada % 1,25, soğanda % 0,23 ve sarımsakta % 0,86 pay sahibi oldukları görülmektedir (Anonim, 2017b).

Allium cinsi bitkilerde ticari öneme sahip bitki türlerinin üretimini sınırlayan biyotik ve abiyotik etkenler bulunmaktadır. Kuşkusuz tüm bu etkenler, insan beslenmesindeki eksikliklerin yanı sıra geçimini tarımdan kazanan üreticiler için de önemli sorunlar teşkil etmektedirler. Biyotik faktörlere neden olan virüs, bakteri, fungus, vd. mikroorganizmalar ile böcek zararları yalnız başlarına ya da birlikte kayıplara neden olabilmektedirler. Bu zararlar, abiyotik etmenler ile birlikte daha yıkıcı sonuçlara da ulaşabilmektedir.

Hastalık ve zararlı organizmaların varlığı ve bu organizmalara ait türler, ülkeler arasında değişkenlik göstermekle birlikte ülkemizde bu etmenlerin büyük çoğunluğunun varlığı bilinmektedir. Bu kapsamda *Allium* cinsi bitkiler, ülkemizde, Bitki Karantinası Yönetmeliği EK-2/A (Türkiye'de Varlığı Bilinmeyen Karantinaya Tabi Zararlı Organizmalar)'da bulunan *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* bakteriyel hastalık etmeni ile

EK-2/B (Türkiye’de Sınırlı Olarak Bulunan Karantinaya Tabi Zararlı Organizmalar)’de yer alan *Ditylenchus dipsaci* nematodu ve *Sclerotium cepivorum* fungal hastalık etmeni, *Allium* cinsi bitkilerde laboratuvar analizlerine tabi tutulmaktadır.

Allium cinsi bitkilerde kayıplara neden olan tüm bu hastalık etmenleri içerisinde viral etmenler, bir bitkiden diğerine mekanik yollardan bulaşabilmeleri, tohum veya vejetatif üretim materyalleri ile veya vektör böcekler tarafından kısa sürede geniş ve uzak alanlara yayılabilmeleri ve özellikle fungal ve bakteriyel etmenlerde olduğu gibi etkin kimyasal mücadele yöntemlerinin olmaması nedenleri ile farklı bir öneme sahiptirler. *Allium* cinsi bitkilerde de oldukça önemli kayıplara neden olan viral etmenler ile ilgili varlıklarının ve mevcut durumlarının belirlenmesi, teşhis ve tanılama yöntemlerinin optimizasyonu, biyolojik özelliklerinin belirlenmesi ve genetik yapılarının incelenmesi, verim ve kaliteye etkileri ile virüsten ari üretim materyali olarak üretilmeleri gibi araştırma konuları uzun yıllardan bu yana incelenen ve günümüzde de çalışılmaya devam edilen konular arasında yer almıştır. Bu çalışmalar yalnızca kültür bitkilerinde değil, ayrıca *Allium* cinsine ait süs bitkileri ve yabancı otlar üzerinde de gerçekleştirilmiştir.

Allium cinsi bitkilerin, viral hastalıkları tüm dünyada yaygındır ve viral enfeksiyona bağlı olarak ürün verimlerindeki kayıplar ve kalitenin bozulması, özellikle sarımsak ve shallot gibi vejetatif olarak çoğaltılmış bitkiler için ciddi sorunlar ortaya çıkarmaktadır (Koch ve Salomon 1994). Virüs enfeksiyonları, ağır viral enfeksiyonu oluşturan enfeksiyonlu dişler yolu ile bir ürün döngüsünden diğerine geçer ve bitkilerin çoğu beş farklı virüse kadar enfekteli olabilmektedirler (Dovas ve ark., 2001).

Dünyada sarımsağı enfekte eden 12’den fazla virüs türü vardır (Sumi ve ark., 1993; Yamashita ve ark., 1996). "Sarımsak virüs kompleksi" olarak bilinen bir hastalık genellikle farklı taksonomik gruplara ait çeşitli virüslerin eş zamanlı enfeksiyonları ile meydana gelir (Van Dijk, 1993a; 1993b). Tek bir virüs türünün sarımsaktaki viral kompleksten ayırt edilmesi zordur, zira kendi aralarında benzer özellikleri var olduğu için, doğal olarak enfekte olmuş sınırlı konukçuları üzerinde örtüşen benzer belirtiler gösterirler (Fajardo, 2001).

Soğan bitkisi, fungus, bakteri ve virüslerin yol açtığı bir takım hastalıklara duyarlıdır. Çoğu soğan hastalığı belirtisi, yetiştirme sürecinde başlar, saklama ve taşıma sürecinde gelişir ve belirginleşir. Birçok virüsün, dünya genelinde soğanları enfekte ettiği bilinmektedir ve ürün verimleri ve kalitesini ciddi şekilde azaltabilirler. Bu virüsler, soğan ve sarımsak üzerindeki verimi % 25-54 oranında düşürebilirler (Lot ve ark., 1998). Birincil bulaşma şekilleri her ne olursa olsun, bitkinin vejetatif yayılımı, soğan baş kısmında

yayıma ve virüs birikimini destekler (Shahraeen ve ark., 2008). Soğanın vejetatif olarak çoğaltılması nedeni ile virüs gibi sistemik patojenler, ardışık ürün döngüleri boyunca devam eder ve virüsün farklı üretim bölgelerine yayılmasına neden olurlar (Lunello ve ark., 2007). Soğanlarda klonal yayılım, her kuşakta virüslerin oluşmasına ve virüsten ari stokların yakınlarda büyüyen hastalıklı bitkilerden sürekli virüsün bulaşması nedeni ile üç ila dört yetiştirme döneminde yeniden enfeksiyonlar gerçekleşir (Lot ve ark., 1998). Virüsler, bitkileri öldürmeyebilir, fakat verimi zamanla % 50'ye kadar düşürebilirler (Conci ve ark., 2003).

Allium cinsi bitkilerde görülen viral hastalık etmenleri ile ilgili olarak, gerek ülkemizde gerekse ülkemiz dışında ilk tespitleri, konukçu dizini ve semptomlarının belirlenmesi, taşınmaları, ekonomik önemleri ile biyolojik ve moleküler özelliklerinin belirlenmesi ile ilgili birçok çalışma yer almaktadır.

“Güney Marmara Bölgesi’nde *Allium* Cinsi Bitkilerde Potyviruslerin Tanınması ve Karakterizasyonu” isimli doktora tez çalışmasında, besleyici değerlerinin yanı sıra tüm sofralarda zevkle tüketilmesi ile bilinen *Allium* cinsi bitkilerin en tahripkar hastalıkları olan Potyvirus grubu üyesi üç etmenin varlığı, üretimde oldukça önemli bir pazar payı bulunan Güney Marmara Bölgesi’nde araştırılmıştır.

Çalışma kapsamında Bursa, Balıkesir ve Çanakkale illerinde, *Allium* cinsi bitkiler içerisinde viral hastalık etmenleri içerisinde en tehlikeli iki etmeni olan Soğan sarı cücelik virüsü (*Onion yellow dwarf virus*; OYDV) ve Pırasa sarı çizgi virüsü (*Leek yellow stripe virus*; LYSV) ile dünya literatüründe oldukça ender rastlanan Şalgam mozaik virüsü (*Turnip mosaic virus*; TuMV) hastalıklarının bölgedeki varlığının araştırılması ve mevcut durumlarının saptanması, hastalık etmenlerinin bu bitkilerde oluşturduğu semptomların belirlenmesi, teşhis ve tanılama protokollerinin oluşturulması, elde edilecek izolatların karakterizasyonlarının gerçekleştirilerek gerek birbirleri ile gerekse dünya izolatları ile benzerlik oranlarının saptanması ve bu izolatların bir kısmının indikatör bitkilere taşınabilmesi ile ilgili tüm bu verilerin bir araya getirilmesi neticesinde ortaya ümitvar sonuçların çıkarılması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Hastalık Etmeni Virüslere Ait Genel Bilgiler

Soğan, sarımsak ve pırasa bitkilerini enfekteleyen viral etmenler, tüm dünya genelinde araştırmacıların ilgi odağı olmuştur. *Allium* cinsi bitkilerde çok sayıda gerçekleştirilen survey ve epidemiyoloji çalışmalarında sıklıkla Potyvirus enfeksiyonlarının yanı sıra, Carlavirüs ve Alexivirüs enfeksiyonlarının da varlığı bildirilmiştir. Bu nedenle bu bölüm kapsamında literatür özetlerinde Potyvirus grubu üyesi etmenlerin yanı sıra diğer *Allium* virüsleri de yer almaktadır.

Potyvirusler, 143 türü ile Potyviridae ailesinde ve tüm bitki virüsleri arasında en fazla bulunan cinstir. Potyviruslerin genetik materyali yaklaşık olarak 9,7 kb uzunluğunda ssRNA molekülleri içerir ve bu moleküller, 680-900 nm arasında değişen bir uzunluğa ve 11-13 nm çapa sahiptir. Kılıf proteinlerinin (CP) boyutu bireysel türler arasında 30 kDa-47 kDa arasında değişir. Bu cins virüsler, sınırlı bir konukçu aralığı ile karakterize edilir ve sıklıkla yaprak bitleri tarafından taşınırlar. Tohum yolu ile sadece birkaç tür taşınabilmektedir (King ve ark., 2011). Şu ana kadar *Allium* virüsleri arasında Potyvirusler, en iyi çalışılan grup olmuştur (Takaichi ve ark.,1998).

Potyvirus cinsi üyeleri, *Allium* cinsi bitkilerde belirgin kayıplara neden olur (Lot ve ark., 1998) ve bu virüsler arasında karakterize edilen ilk iki virüs olan OYDV ve LYSV bu bitkilerin yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlarda sıklıkla gözlemlenirken, *Shallot yellow stripevirus* (SYSV) ve TuMV hastalıkları *Allium* cinslerinde daha az görülmektedir (Gera ve ark., 1997; Van der Vlugt ve ark., 1999).

Bu etmenlerden LYSV, ilk olarak Almanya'da pırasa bitkisinde Bos ve ark. (1978) tarafından rapor edilmiştir. Etmen, dünya genelinde yaygın olup, 1950'lerde Almanya'da pırasalarda oluşturduğu sarı çizgiler ile epidemi haline gelmiş ve daha sonra Hollanda'da hastalığın viral etkileri üzerine yoğun araştırmalar gerçekleştirilmiştir (Bos, 1983). Hastalık belirtileri, yaz aylarında arazi koşullarında nadir ve gelişigüzel olurken, sonbahar aylarında giderek daha belirgin hale gelir ve sonbahar-kış döneminde bitkiler tamamen enfekteli olabilir (Bos ve ark., 1978).

LYSV, pırasa bitkilerinde özellikle kök kısmına yakın yerlerde düzensiz sarı çizgilere neden olur, ancak bu belirtiler bazı durumlarda, yaprakların tamamının sararması şeklinde gelişebilir (Bos ve ark., 1978). Hastalıklı bitkiler, yumuşak, gevşek ve/veya deforme olmuş yapraklarla daha kurudurlar (Barg ve ark., 1997). Sarımsak bitkilerinde

LYSV, yaprakların uç kısmında açık sarı çizgilere neden olur ve bu da tüm bitkinin cüceleşmesine neden olabilir. Virüs aynı zamanda baş oluşumunun daha küçük ve hatalı biçimlendirilmesine neden olur ve verim kaybına yol açar.

LYSV ile enfekte edilmiş *Allium* cinsi bitkiler, don gibi hava şartlarına karşı daha duyarlıdır ve hasat sonrası iyi durumda kalmazlar (Bos ve ark., 1978). Arazi koşullarında meydana gelen LYSV enfeksiyonları oldukça yıkıcı olabilir, bazen bu oran % 100'e yaklaşır (Bos, 1983). Sarımsak dişlerindeki verim kaybı, % 60'a yaklaşabilir ve başka bir Potyvirus ile eş zamanlı enfekte olduğunda % 84'e tırmanabilir (Lot ve ark., 1998).

Pırasa ve sarımsak, LYSV'nin majör konukçusu olup, soğan ve shallot minör, *Chenopodium amaranticolor* ve *C. quinoa* ise deneysel konukçularıdır (Bos, 1981; Van Dijk, 1993a). LYSV'nin yayılımında vejetatif materyal oldukça önem taşımaktadır. *Myzus persicae* ve *Aphis fabae* etmenin yaygın vektörleridir ve beslenme sırasında LYSV'yi non-persistent olarak yayarlar (Blackman ve Eastop, 2000).

LYSV, bir başka Potyvirus grubu üyesi OYDV ile serolojik olarak yakından ilişkilidir ve moleküler yöntemler ile LYSV ve OYDV'nin karışık enfeksiyonlar içerisinden ayrılabilmesi mümkündür (Dovas ve ark., 2001; Lunello ve ark., 2005).

OYDV, ilk olarak ABD'de soğan bitkisinde Melhus ve ark. (1929) tarafından tespit edilmiştir. Etmen, soğan bitkilerinde bodurlaşma ve yapraklarda düzensiz sarı çizgilere neden olur ve neredeyse bitkinin tamamını sarartır. Yapraklar aşağı doğru kıvrılır ve yassılaştır (Melhus ve ark., 1929; Henderson, 1935). Ayrıca soğan başlarının depolanma sürecinde bozulmalarına ve erken filizlenmelerine neden olmaktadır (Bremer, 1937). Tohumluk soğan bitkilerinde çiçek saplarının yapısının bozulmasına ve kıvrılmalara, çiçek ve tohum sayısındaki azalma ve tohum kalitesinin bozulmasına sebep olmaktadır (Hardtl, 1965). Soğanlarda görülen semptomlara benzer belirtiler sarımsak bitkilerinde de görülür (Brierley ve Smith, 1944).

OYDV, bazı süs bitkilerinde de tespit edilmiştir (Brierley ve Smith, 1946). Yabani nergis, hastalık ile doğal olarak enfekteli bulunurken, Çin nergisi ise inokulasyon sonucunda hastalık belirtisi göstermiştir (Henderson, 1935).

Dünya genelinde yaygın olan etmen, önemli kayıplara neden olabilmektedir. Canavelli ve ark. (1998), OYDV'nin sarımsak dişlerinde % 24-60 arasında kayıplara neden olabileceğini ve LYSV ile karışık enfeksiyonlarının ise bu kayıpları arttırarak baş ağırlığında % 88'e kadar azalmalara sebep olabileceğini bildirmişlerdir.

OYDV, birçok yaprak biti türü ile non-persistent olarak taşınabilmektedir (Tate, 1940; Heinze, 1952). Bunlar arasında en yaygın olanı ise *Mysuz persicae*'dir (Drake ve ark., 1933). OYDV ve LYSV birbirleri ile serolojik olarak yakın ilişki içerirler. Her iki etmenin teşhisinde serolojik bir yöntem olan ELISA yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. Shukla ve Ward (1988) serolojinin, Potyviruslerin tespiti için kullanılabilir olduğunu ancak yöntemin taksanomi için uygun olmadığını bildirmişlerdir.

Şalgam mozaik virüsü (TuMV), ilk kez 1921 yılında ABD'de *Brassicaceae* familyasına ait türlerde (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*, *B. japonica*, *B. campestris* ssp. *rapa*) tanılanmıştır (Gardner ve Kendrick, 1921; Schultz, 1921). *Allium* cinsi bitkilerin minör konukçusu olan TuMV, bu cins içerisinde yer alan, pırasa, süs bitkileri ve bazı yabancı türlerde tespit edilmiştir. Etmen, çok geniş bir konukçu dizisine sahip olup, 156 cinsle bağlı 318 bitki türünü enfekte edebilmektedir. En önemli konukçuları karnabahar, lahana, brokoli, Brüksel lahanası, Çin lahanası, enginar, yer fıstığı, marul, turp, kolza, hardal, su teresi, tütün ve birçok yabancı ot olup dünyada bu bitkilerin yetiştirildiği bölgelerde ekonomik düzeyde zarara neden olmaktadır (Edwardson ve Christie, 1991; Ohshima ve ark., 2002).

TuMV, 40'ın üzerinde yaprak biti türü ile non-persistent olarak taşınmakta ve başta Afrika, Asya, Avustralya, Avrupa, Hindistan, Kuzey ve Güney Amerika olmak üzere tropik ve ılıman iklim bölgelerinde yaygın olarak bulunmaktadır (Provvidenti ve ark., 1996; Walsh ve Jenner, 2002). Gera ve ark. (1997) TuMV'nin *Allium* cinsine ait bitkilerde genel olarak, sistemik kloroz ve sarı çizgiler oluşmasına, yaprak yapısının bozulmasına ve nekrotik lekelenmeler oluşmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. TuMV, serolojik ve moleküler yöntemler ile teşhis edilebilmektedir.

Günümüz teknolojisinde gerek ülkemizde gerekse de ülkemiz dışında yapılan çalışmalara erişimin kolay olması nedeni ile bu hastalık etmenleri ile bilgilere ulaşabilmek mümkündür. Tüm dünya üzerinde birçok araştırmacı tarafından çalışılmış *Allium* cinsi bitkilerde virüs hastalık etmenleri sorununa ilişkin dünyada ve ülkemizde gerçekleştirilen çalışmalardan birçoğu bu bölümde literatür özetleri olarak bildirilmiştir.

2.2. Ülkemiz Dışında Gerçekleştirilmiş Bazı Çalışmalar

Novak (1959), Çekya'da soğan, sarımsak ve pırasa yetiştiriciliği yapılan alanlarda OYDV, asteryellow (MBO) ve tanımlanamayan sarı çizgilerin, bu ürünlerin en tehlikeli hastalıkları olduğunu ileri sürmüşlerdir. OYDV'nin mekanik olarak soğan bitkilerine bulaşmasının çok zor olduğunu, nergis bitkisinin büyüme noktalarına uygulanan

inokulasyonların ise başarılı olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca inokulasyon çalışmaları sonucunda yaşlı pırasa bitkilerinde ve sarımsaklarda inokulasyonların başarısız olduğunu ve ilkbahar erken dönemlerinde yapılan soğan ekimlerinin Nisan ayı sonuna doğru yapılan ekimlere oranla ürün kayıplarını azalttığını bildirmişlerdir.

Huttinga (1975), OYDV'nin saflaştırılması zor bir viral etmen olduğu için, Potyvirusler arasında en az bilinen etmen olduğunu ve geçmiş yıllarda farklı araştırmacıların OYDV'yi saflaştırma çabalarının başarısızlıkla sonuçlandığını ve bunun nedeninin, pırasa bitkisinin yapısında bulunan ve müsilaj adı verilen zamklar gibi suda şişerek viskoz, koloidal çözelti meydana getiren maddelerden kaynaklandığını ileri sürmüştür. Araştırmacı, müsilajı, enzim ile parçalama, bitki özsuvarını dondurma, çeşitli tuzlar ve farklı pH değerleri kullanarak parçalama girişimlerinin sonuçsuz kaldığını, yüksek hızda santrifüjün ise müsilajın parçalanmasında istenilen sonuçların elde edilmesinde etkin olduğunu rapor etmiştir.

Hollanda'da, pırasa yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlarda sarı çizgi hastalığının epidemilerinin arttığını tespit eden Bos ve ark. (1978), OYDV ile yakın ilişkili olduğunu ileri sürdükleri ve Pırasa sarı çizgi virüsü (LYSV) olarak tanıladıkları etmenin, soğan ve shallot bitkilerinde neredeyse enfeksiyon oluşturmadığını, pırasa bitkilerinde oluşturduğu belirtilerin ise LYSV ile benzerlik taşıdığını tespit etmişlerdir. Her iki etmenin farklı konukçularda benzer belirtileri gösterdiğini ancak partiküllerinin farklı uzunlukta olduğunu (LYSV 820 nm, OYDV 833 nm) ve CP genleri ağırlıklarının da (LYSV 34 kDa, OYDV 30 kDa) farklı olması sebebi ile Potyvirus grubu üyesi iki farklı virüs olduklarını ileri sürmüşlerdir. Yaprak bitleri ile non-persistent olarak taşınan LYSV'nin, tohum ile taşınmadığını ve yaz sonu-sonbahar dönemlerinde epidemiler oluşturduğunu rapor etmişlerdir.

Japonya'da yürüttükleri çalışmada Noda ve Inouye (1989), *Allium* cinsi içerisinde bulunan ve yapraklarında mozaik ve nekroz belirtileri gösteren, süs bitkisi olarak yetiştirilen (*Allium ampeloprasum* cv. *murasame*) bir bitkide LYSV'yi teşhis etmişlerdir. Çalışmaları kapsamında etmenin bitki özsuvarınınun 10 dk. 50 °C'de bekletildikten sonra *C. quinoa* bitkisinde enfeksiyon oluşturabildiğini, sıcaklık 55 °C'ye çıkarıldığında ise enfeksiyon oluşturamadığını bildirmişlerdir.

Gera ve ark. (1997) yürüttükleri çalışmada hastalıkla bulaşık olduğunu düşündükleri pırasa bitkilerinde sistemik kloroz ve sarı çizgileri takiben büyümede azalma belirtileri gözlemlediklerini ve nekrotik lekelenmeler meydana gelen yaprakların yapısının bozulduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında *Allium* spp., *Chenopodium* spp., *Gomphrena*

spp. ve *Nicotiana* spp. türlerine hastalığı başarı ile inokule etmişler, benzer sonuçları *Datura stramonium*, *Cucumis sativis* L., *Lycopersicon esculentum*, *Capsicum annuum* ve *Petunia hybrida*'da elde edememişlerdir. Yaprak bitleri ile taşıma denemelerinde hastalığı başarılı bir şekilde taşıyabilen araştırmacılar, elektron mikroskobu gözlemlerinde etmenin morfolojisinin Potyviruslere benzediğini gözlemlemişlerdir. İzolatları, *Allium* cinsi bitkilerde yaygın olan Potyviruslere karşı antibadiler varlığında test etmişler ve sadece TuMV'nin reaksiyon göstermesi üzerine çalışmalarını SDS-PAGE ile destekleyerek CP geni moleküler ağırlığını 35 kDa olarak belirlemişlerdir.

Fransa'da LYSV ve OYDV'nin 3 farklı sarımsak çeşidinde meydana getirdiği belirtiler ve bu çeşitlerdeki verim kayıpları üzerine bir araştırma yürüten Lot ve ark. (1998), Messidrome, Germidour ve Printanor sarımsak çeşitlerinde inokulasyonu takiben yaprak uzunluğu, baş ağırlığı parametrelerini incelemişlerdir. OYDV ile enfekteli Germidor çeşidinde baş ağırlığındaki kaybın % 39, diğer iki çeşitte ise % 60'a kadar ulaştığını LYSV ile enfekteli sarımsaklarda ise Messidrome'da % 17 Germidour'da % 26 ve Printanor'da % 54 oranında kayıpların oluştuğunu bildirmişlerdir.

Dovas ve ark. (2001) Yunanistan'da *Allium* cinsi bitkilerde LYSV ve OYDV'nin varlığı üzerine bir çalışma gerçekleştirmişler ve 39 farklı tarla ve 112 farklı lokasyondan örneklemeler gerçekleştirmişlerdir. Çalışmaları neticesinde enfeksiyon oranlarını tüm bölgelerde OYDV için % 98.5 ve LYSV için ise % 98.7 olarak belirlemişlerdir. Yabani bitkiler arasından sadece *Allium ampeloprasum* spp. *ampeloprasum* ve *Allium flavum*'un LYSV ile bulaşık türler olduğunu bildiren araştırmacılar, *A. sphaerocephalon*, *A. guttatum*, *A. subhirsutum* ve *A. neapolitanum* yabancı türlerinin ise TuMV ile bulaşık olduğunu bildirmişlerdir.

Brezilya'da, sarımsaklarda karışık enfeksiyon şeklinde bulunan Potyvirus ve Carlavirüslerin tanılanması ve moleküler karakterizasyonları üzerine bir çalışma yürüten Fajardo ve ark. (2001), hazırladıkları raporda OYDV (G-strain), LYSV ve GCLV varlığını doğrulamışlar ve gerçekleştirdikleri sekans analizleri sonucunda CP genleri amino asit dizilimine göre Brezilya izolatlarının, dünyanın farklı coğrafi bölgelerinde bulunan izolatlar ile sırası ile OYDV-G, LYSV ve GCLV için % 95-99,2, % 85,9-88,6 ve % 94-94,5 benzer olduğunu ve bu izolatlara ait nükleotit dizilimlerinin ise aynı sıra ile % 95,1, % 81,6 ve % 83,3 oranlarında benzer olduğunu bildirmişlerdir.

Dovas ve ark. (2002) Yunanistan'da Potyvirus grubu üyesi olan OYDV ve LYSV hastalık etmenleri ile enfekteli sarımsakların üretim sezonu boyunca ve örnekleme süresince mevcut konsantrasyonlarının DAS-ELISA ile belirlenmesi üzerine bir araştırma gerçekleştirmişlerdir. Çalışmaları neticesinde sarımsaklarda her iki virüsün de düzensiz dağılım gösterdiğini, virüs konsantrasyonunun yaprak uçlarında en yüksek düzeyde bulunduğunu ve yaşlı yapraklarda ise en az konsantrasyonu saptadıklarını bildirmişlerdir.

İtalya'nın güneyinde yürüttükleri çalışma kapsamında Dovas ve Vovlas (2003), sarımsak ve soğan ekim alanlarında büyüme geriliği, klorotik çizgiler ile yapraklarında kıvrılma ve sararma belirtileri gösteren 120 sarımsak ve 25 soğan örneğinde ELISA testleri ile OYDV, LYSV, GarCLV, SLV, GVC ve GVD virüslerinin varlığını araştırmışlardır. Çalışmaları sonucunda, Potyviruslerde (OYDV ve LYSV) enfeksiyon oranını en yüksek oranda saptamışlar ve bu oranların sarımsaklarda % 98, soğanlarda ise % 92 olduğunu bildirmişlerdir. Tüm bölgelerde Allexivirüslerin (GVC ve GVD) varlığına işaret eden araştırmacılar, enfeksiyon oranlarının % 10-20 arasında olduğunu rapor etmişlerdir.

Allium cinsi bitkilerde görülen Potyviruslerin saptanabilmesi için bir PCR protokolü gerçekleştiren Lunello ve ark. (2005), LYSV ve OYDV arasındaki tekli ya da karışık enfeksiyon farklılıklarını da belirlemeyi amaçlamışlardır. Tekli enfeksiyonlarda LYSV için 566 bp, OYDV için ise 489 bp büyüklüğünde bantlar gözlemlemişler, aynı primerler ile yaptıkları çalışmalarda ise SYSV için 508 bp ve TuMV için de 594 bp büyüklüğünde bantlar tespit etmişlerdir. Negatif çıkan sonuçlar için RT-nested-PCR analizi yapan araştırmacılar bu yöntemin DAS-ELISA yöntemine göre göre 10^2 kat daha duyarlı olduğunu ayrıca IC-RT-nested-PCR yönteminin ise 10^4 kat daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Takaki ve ark. (2005) Japonya'da, LYSV ile enfekteli ikisi şiddetli biri ılımlı olmak üzere 3 izolatin tüm genom sekanslarını elde etmişler ve bu izolatlarda sekans varyanslarının hem amino asit hem de nükleotit düzeyinde % 1,5 olduğunu ve şaşırtıcı bir şekilde tüm izolatlarda yakın zamanda tanıladıkları bir Çin izolatu ile oldukça farklılık gösterdiğini ve bu izolatlarda farklı virüs türleri olabileceği ihtimalini ileri sürmüşlerdir. Gerçekleştirdikleri filogenetik analizler sonucunda tüm LYSV izolatlardının üç gruba ayrıldığını ve Japonya'nın kuzeyinden elde ettikleri sarımsak izolatlardının, pırasadan elde ettikleri izolat ile birlikte, Japonya ve Çin'deki sarımsak izolatlardına kıyasla daha yakın olduğunu, ayrıca Kuzey Japonya'da yeni yetiştirilen sarımsak çeşitlerinin farklı orijin oluşturduğunu ileri sürmüşlerdir.

Japonya’da OYDV’nin zayıf streynleri ile sarımsaklarda yaygın görülen virüs hastalıklarının kontrol altına alınmasına yönelik bir araştırma gerçekleştiren Takaki ve ark. (2006), ılımlı (G79) OYDV izolatının, şiddetli (G5h) izolatından farklılık gösterdiğini, şiddetli izolatta 10.459 nükleotit ve 3403 amino asit bulunduğunu ve ılımlı izolatın ise 10.183 nükleotit ve 3.311 amino asit içerdiğini belirlemişlerdir. G79 izolatında HC-Pro genomunun N terminal bölgesinde 92 amino asitin doğal olarak bir mutasyon sonucunda silindiğini ve beklenmedik bir şekilde ticari sarımsak alanlarında her ikisinin de bir arada bulunduğunu saptamışlar ve Potyviruslerde N terminal bölgesinde doğal mutasyon sonucu meydana gelen silinmenin, ilk kez kayıt altına alındığını bildirmişlerdir.

Klukackova ve ark. (2007) Çekya’da sarımsaklarda oluşan virüs enfeksiyonlarının varlığının belirlenmesi üzerine gerçekleştirdikleri çalışmaları kapsamında, ticari olarak 5 farklı çeşide ait 463 örneğin yanı sıra marketlerden satın aldıkları Çin ve İspanya menşeli sarımsak başlarında OYDV, LYSV, GarCLV, SLV ve Allexiviruslerin varlığını DAS-ELISA ve RT-PCR ile belirlemişlerdir. Çalışmaları sonucunda enfeksiyon oranlarını OYDV’de % 75,4, LYSV’de % 31,2, GarCLV’de % 99,6 ve SLV’de ise % 81,1 olarak bildirmişlerdir. Ayrıca Çin’den ithal edilen sarımsaklarda GarCLV enfeksiyonlarının ve İspanya’dan ithal edilen sarımsaklarda ise OYDV ve SLV enfeksiyonlarının bulunmadığını rapor etmişlerdir.

Allium cinsi bitkilerde OYDV’nin varlığını DAS-ELISA, Tissue blotting immune binding assay (TBIA) ve Dot-blotting immune binding assay (DBIA) analizleri ile araştıran Wahab ve ark. (2009), çalışmalarında hastalığın en az oranla (% 3,3) soğandan pırasaya taşındığını, *N. tazetta* ve *D. stramonium*’da virüs belirtisi gözlenmediğini ayrıca yaprak bitleri ile taşıma denemelerinde en etkin türün *M. persicae* olduğunu bildirmişlerdir. DAS-ELISA çalışmaları sonucunda en yüksek enfeksiyon oranlarını soğan (% 80) ve sarımsakta (% 70,6) en az enfeksiyonun ise (% 7,5) virüs belirtisi göstermeyen Çin nergisi (*N. tazetta*) bitkisinde olduğunu bildirmişlerdir.

Ward ve ark. (2009) Yeni Zelanda’da *Allium* cinsine ait ticari bitkilerde ve süs bitkilerinde Tospovirus, Potyvirus, Carlavirus ve Allexivirus gruplarına ait 22 virüse karşı yaptıkları analizler sonucunda OYDV ve LYSV varlığının yanı sıra *Garlic virus A*, *Iris yellow spot virus* ve *Shallot mite-borne latent virus* hastalıklarının, Yeni Zelanda için ilk tespitlerini kaydetmişlerdir.

Brezilya’da yürüttükleri çalışmada 5 farklı tarım üretim sistemi içerisinde kültürü yapılan sarımsaklarda virüs hastalıklarının yayılımı üzerine bir proje gerçekleştiren Fayad-Andre ve ark. (2011), 4 farklı bölgeden 352 örnek toplamışlardır. Bu örneklerde OYDV, LYSV, GCLV, GarV-C, GarV-D ve GarMbfV hastalık etmenlerinin varlığını RT-PCR ile belirlemişler ve örneklerin % 22’sinde karışık enfeksiyon saptamışlardır. Ayrıca, tüm bölgelerde Potyviruslerin varlığına işaret eden araştırmacılar, LYSV’nin OYDV’ye göre baskın olduğunu ve GCLV’nin ise nadiren görüldüğünü bildirmişlerdir.

Celli ve ark. (2013) OYDV’nin soğan ve sarımsak izolatlarının biyolojik ve moleküler olarak belirgin farklılıklarını saptadıkları çalışmada, orta derecede mozaik belirtileri ile neredeyse hiç ya da çok az sarı çizgi belirtileri gösteren Alman izolatına “OYDV-Mi”, baskın OYDV belirtileri gösteren Arjantin izolatına is “OYDV-Se” adını vermişler ve bu izolatları farklı indikatör bitkilere inokule etmişlerdir. Çalışmaları neticesinde her iki izolatın da 9 soğan çeşidini inokule edebildiğini, OYDV-Se izolatının 135 bitkiden 128’ini (% 95) enfekte ederek, bu bitkilerde şiddetli belirtiler oluşturduğunu ve OYDV-Mi izolatının ise 15 bitkiyi (% 11) enfekte ederek orta şiddete ve/veya zayıf belirtiler oluşturduğunu rapor etmişlerdir.

Saffar ve ark. (2013) İran’da, OYDV’nin mevcut durumunun belirlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada, sarımsak, pırasa, soğan, shallot ve Gal soğanı (*Allium fistulosum*) bitkilerinde etmenin varlığını belirlemişler ve OYDV’nin daha önceleri İran’da sarımsaklarda tespit edildiğini fakat yukarıda sözü edilen diğer türlerde ilk tespit olduğunu rapor etmişlerdir.

Manglli ve ark. (2014) OYDV ile enfekteli soğan izolatlarını dünyanın farklı bölgelerinden *Allium* cinsine ait konukçular ile kıyaslamışlardır. Çalışmalarında, İtalyan izolatlarını nükleotit dizilimleri açısından oldukça yakın (% 99,3’ten fazla) olarak belirleyen araştırmacılar, bu izolatların Alman izolatları ile % 94, Arjantin ve Sudan izolatları ile % 92 benzer olduğunu saptamışlardır. 3’UTR ve Nİb proteinlerinin tamamına göre gerçekleştirdikleri filogenetik analizlerin, yüksek bootstrap değerlerine (% 100) sahip sonuçlarının, OYDV soğan ve sarımsak izolatları için ayırt edici iki ayrı genetik grup oluşturduğunu saptamışlardır.

OYDV’nin CP geninde genetik çeşitlilik ve rekombinasyonu kanıtlamak amacı ile bir çalışma gerçekleştiren Berada ve ark. (2015), Polonya’dan elde ettikleri 7 soğan izolatının, karşılaştırmalı nükleotit analizleri sonucunda birbirleri ile % 3, dünya üzerindeki sarımsak izolatları ile de % 20 oranında farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Gen bankasından aldıkları soğan izolatlarının, Polonya izolatlarının CP dizileri ile

karşılaştırılmaları sonucunda, sırası ile nükleotit ve amino asit düzeyinde % 88-100 ve % 94-100 arasında benzer olduğunu ve yapılan filogenetik analizler sonucunda Polonya izolatlarının 1. alt grup olan İtalya, Almanya ve Japonya izolatları ile birlikte bulunduğunu bildirmişlerdir.

Kumar ve ark. (2015) tarafından Hindistan'da gerçekleştirilen çalışmada araştırmacılar, OYDV izolatlarının, dizi değişkenliği, basit dizi tekrarlarının dağılımı (SSR) ve rekombinasyon kırılma noktalarını incelemişler ve bu izolatların P1 ve P3 bölgelerinin, amino asit ve nükleotit sekanslarında diğer genomik bölgelere kıyasla daha yüksek bir dizi değişkenliği gösterdiğini, elde ettikleri amino asit sekanslarının entropi zirvelerinin, farklı OYDV izolatlarının her iki bölgesinde (P1 ve P3) daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Hint izolatu RR1'in, diğer OYDV izolatları ile nükleotit ve amino asit dizilerinde % 75-98 benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Pramesh ve Baranwal (2015), virüsten ari G-1 dişleri elde edebilmek için uyguladıkları güneş ısısı ve sıcak hava uygulamalarında sarımsak dişlerini 5-10 veya 15 gün boyunca güneş ısısında veya 37 °C, 40 °C veya 42 °C'lerde (7, 14 veya 21 gün) bekletmişler ve ardından tüm dişleri DAC-ELISA ve RT-PCR ile test etmişlerdir. Güneş ısısı ile işlemde geçirilmiş veya sıcak hava uygulanmış dişlerden gelen meristemleri sırası ile 90 gün ve 45 gün rejenere etmişler ve 15 günlük güneş ısısı uygulamasının % 17-18 rejenerasyona neden olduğunu ve bu uygulama sonucunda dişlerin tamamının GarCLV, SLV ve OYDV'den arındırıldığını rapor etmişlerdir. Bununla birlikte, 10 gün süre ile güneş ısısı uyguladıklarında ise, bitkilerin sadece % 66'sında % 17-18 rejenerasyon elde etmişler ve GarV-X de dahil olmak üzere tüm virüslerden arındırıldığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, 37 °C veya 40 °C'de sıcak hava uygulamasının, GarCLV, SLV ve OYDV enfeksiyonlarını sırası ile % 20, % 38 ve % 42 oranlarında azalttığını, bu uygulamanın maruz kalındığı farklı süreler içinde bitkilerin % 62 rejenere edildiğini belirlemişler, 7-14 gün boyunca 42 °C'de sıcak hava uygulamasına maruz bıraktıkları dişlerden gelen meristemlerin rejenerasyonunun ise % 50-66 arasında olduğunu ve bu dişlerin GarCLV, SLV ve OYDV'den % 53-57 oranları arasında ari olduğunu saptamışlardır. Sıcak hava uygulamasının 21 güne çıkartıldığında, sarımsakların tüm virüslerden arındırıldığını bildiren araştırmacılar, uygulamalar için, ısıya maruz kalma süresindeki artışın, rejenerasyonun azalmasına neden olduğunu, fakat bu durumun virüssüz bitkilerin elde edilme oranını arttırdığını belirlemişlerdir.

Allium cinsi bitkiler içerisinde yer alan süs bitkilerinde, Potyvirus ve Tobravirus enfeksiyonlarını belirlemek için bir çalışma gerçekleştiren Scrace ve ark. (2015), Birleşik Krallık ve Hollanda'dan elde ettikleri bitki materyallerinde RT-PCR analizleri gerçekleştirmişlerdir. Analizler sonucunda araştırmacılar, KT223098, KT223099, KT223100, KT223101, KT223102 ve KT223103 izolatlarına ait nükleik asit dizilimlerinin sırası ile LYSV, OYDV, *Ornamental onion stripe mosaic virus* (OrOSMV) *Pea early browning virus* (PEBV) *Tobacco rattlevirus* ve TuMV hastalık etmenlerine karşı; % 98, % 98, % 99, % 92, % 99 ve % 85 oranlarında benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Kriyoterapinin sarımsak bitkilerindeki virüs kompleksini yok etme kabiliyetini değerlendirmeyi amaçlayan Vieira ve ark. (2015), OYDV, LYSV ve GCLV hastalıkları ile doğal olarak enfekteli sarımsak izolatlarını çalışma materyali olarak kullanmışlardır. Kriyoterapiden beş gün sonra gerçekleştirilen yapısal analizlerin, soğutmanın hücre hasarına neden olduğunu ve bu durumun hücreler arasındaki boşluk artışı ile termoterapi sonrası oluşan plazmoliz benzeri bir durumu meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Çalışmaları neticesinde kriyoterapinin, virüs kompleksini başarıyla kaldırarak, geleneksel meristem kültürü tabanlı tekniklerle karşılaştırıldığında, virüsten arı bitki elde edilmesinde daha etkin olduğunu buna ek olarak, kriyoterapi ve termoterapinin sinerjik etkilerinin, sürgün uçlarının % 40 yaşama oranına ve rejenrasyonun, OYDV (% 90) LYSV (% 100) ve GCLV (% 80) içermeyen bitkilerin oluşmasına yol açtığını rapor etmişlerdir.

Gilani ve ark. (2016) sarımsaklarda OYDV, LYSV hastalık etmenlerinin yaygınlık ve dağılımını incelemek amacı ile Pakistan'da bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Topladıkları örneklerle uyguladıkları DAS-ELISA testleri sonucunda Khyber Pakhtunkhwa'da her ilde ve lokasyonda OYDV ve LYSV enfeksiyonlarını değişen oranlarda tespit eden araştırmacılar, Punjab'ta ise 4 ilde % 8,75-87,1 aralığında OYDV enfeksiyonlarını belirlemişlerdir. LYSV bulgularını ise OYDV'nin aksine yalnızca 2 şehirde (Sialkot; % 91,44 ve Kasur; % 5) 19 lokasyonda tespit edebilmişlerdir.

Ekvador'da, OYDV'nin ilk kayıt niteliği taşıdığı bir çalışmayı yürüten Sivaprasad ve ark. (2017), enfekteli soğan izolatı ile yaptıkları BLAST analizi sonucunda ülke izolatının, dünyanın farklı ülkelerinden elde edilen izolatlar ile farklılık gösterdiğini ve Ekvador-OYDV izolatının kısmi NIB gen bölgesi sonuçlarına göre Almanya ve İtalya izolatları ile nükleotit ve amino asit seviyelerinde sırası ile maksimum % 91,1 ve % 98,1 benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Filogenetik analizler sonucunda Ekvador-OYDV izolatının, Almanya, İtalya, Arjantin ve ABD izolatları ile bir küme oluşturduğunu ve bu izolatların yakın ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Tabanera ve ark. (2017) İspanya'da pırasalarda OYDV etmeninin varlığını belirlemek için yürüttükleri çalışmada, semptom gösteren ya da göstermeyen tüm izolatların enfekteli olduğunu bildirmişler ve BLAST analizi sonuçlarına göre en çok benzerliğin İtalyan izolatları ile olduğunu rapor etmişlerdir.

2.3. Ülkemizde Gerçekleştirilmiş Bazı Çalışmalar

Fidan ve ark. (2009) Doğu Akdeniz Bölgesi ile Kastamonu'nun Taşköprü ilçesinde yürüttükleri arazi çalışmalarında topladıkları sarımsak örneklerinde OYDV enfeksiyonlarını tespit etmişlerdir. Enfekteli olarak belirledikleri izolatlardan biri ile gerçekleştirdikleri filogenetik analizler sonucunda OYDV Doğu Akdeniz izolatının, dünyadaki diğer izolatlar ile % 94 oranında benzerlik gösterdiğini saptamışlardır. Çalışmada aynı zamanda *Shallot latent virus* (SLV) enfeksiyonlarını belirleyen araştırmacılar, SLV ve OYDV enfeksiyonlarının Türkiye'de ilk defa bu araştırma ile tespit edildiğini ve çalışmanın, ülkemiz soğan ve sarımsak yetiştirilen diğer bölgelerinde hastalıkların yaygınlığının araştırılması bakımından önemli bir başlangıç noktası olma özelliği taşıdığını ileri sürmüşlerdir.

Marmara Bölgesi'nde 2007 yılı üretim sezonu içerisinde pırasa bitkilerinde LYSV'nin neden olduğu semptomlara benzer belirtileri gözlemleyen Korkmaz ve Çevik (2009), pırasa tarlalarından 42 örnek toplamışlar ve gerçekleştirdikleri DAS-ELISA testleri sonucunda bu örneklerden 39'unu LYSV ile enfekteli bulmuşlardır. Western blot analizi çalışmaları sonucunda virüse özgü 34 kDa ağırlığında CP genleri elde eden araştırmacılar, virüsün kesin teşhisini onaylamak amacı ile RT-PCR ürünlerinin sekans analizlerini gerçekleştirmişler ve en çok benzerliği % 93 oranında Arjantin'den bir LYSV izolatının CP geni ile gösterdiğini bildirmişlerdir.

Fidan (2010), Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yetiştirilen sarımsak, soğan ve pırasalarda mevcut virüs hastalıklarının saptanması, bu izolatların karakterizasyonlarının gerçekleştirilmesi ve Taşköprü 56 sarımsak çeşidinin en yaygın viral hastalık etmenine karşı reaksiyonlarının belirlenmesi üzerine araştırmalarını gerçekleştirmiştir. Çalışma sonucunda sarımsak, soğan ve pırasa örneklerinin % 32 oranında LYSV, % 31 oranında SLV, % 10 oranında OYDV ve GCLV, % 1 oranında *Tobacco mosaic virus* (TMV) ve *Cucumber mosaic virus* (CMV) ile bulaşık olduğunu belirlemiş, ayrıca örneklerin, GarV-B, GarV-D, GarV-X ve GMbFV ile tek yada karışık enfeksiyon şeklinde % 15 oranında bulaşık olduğunu ve LYSV'nin Taşköprü 56 çeşidinin dışlarında çapta % 55'lik bir daralmaya ve boyunda da % 41 oranında küçülmeye neden olduğunu bildirmiştir.

Korkmaz ve ark. (2011) Marmara Bölgesi'nde 2007-2008 üretim sezonu içerisinde soğan bitkilerinde OYDV'nin neden olduğu semptomlara benzer, kloroz, bodurluk, yapraklarda kıvrılma ve bükülme semptomları gözlemlemişler ve topladıkları 16 örneği, DAS-ELISA ile test etmişlerdir. Araştırmacılar, ELISA testi sonucunda 16 örneğin 3'ünü OYDV ile enfekteli bulmuşlar ve aynı antibadileri kullanılarak yaptıkları Western blot analizi çalışmalarında ise virüse özgü 30 kDa ağırlığında CP genleri elde etmişlerdir. Tüm bu sonuçları doğrulamak için enfekteli örneklerle ait viral RNA'ları direkt tüpe bağlanma olarak bilinen yöntem ile elde ederek RT-PCR ile test etmişler ve virüsün kılıf proteini ile ilişkili 335 bp uzunluğunda DNA elde etmişlerdir. Araştırmacılar, bu çalışma ile OYDV'yi Marmara Bölgesi'nde ilk defa tespit etmişlerdir.

DAS-ELISA yöntemini kullanarak OYDV ile enfekteli soğan bitkilerinde yapraklar ve baş kısmındaki virüs konsantrasyonu farklılıklarını belirlemeyi amaçlayan Şevik ve Temiz (2011), enfekteli izolatların baş ve yaprak uç kısımlarından parçalar almışlar ve DAS-ELISA sonuçlarını oda sıcaklığında 30 dk. 60 dk. ve 120 dk.'lık okumalar sonucunda değerlendirmişlerdir. Yaptıkları analiz sonuçlarına göre yaprak uç kısımlarının soğanlara göre daha fazla absorbans değeri verdiğini rapor etmişlerdir.

Kurtuluş (2012), Çanakkale'den topladığı pırasa örneklerinde LYSV'nin varlığını belirlemek amacı ile DAS-ELISA ve/veya RT-PCR analizleri gerçekleştirmiş ve analizler sonucunda 77 örnekten 51'ni LYSV ile enfekteli bulmuştur. Belirli sayıda izolatu biyolojik özelliklerini belirlemek amacı ile değişik gösterge bitkilere mekanik inokulasyon yöntemi ile inokule etmiş ve moleküler özelliklerini belirlemek amacı ile CP genlerini klonlayarak nükleik asit dizilimlerini belirlemiştir. İzolatlarını, dünyanın farklı üretim bölgelerinden elde edilen LYSV izolatlarının CP genleri ile karşılaştırmış ve Çanakkale LYSV izolatlarının CP genlerinin nükleotit düzeyinde kendi aralarında % 97-98, dünya izolatları ile % 77-95 oranında benzerlik içerdiğini bildirmiştir.

İzmir ili ve çevresindeki bazı kışlık sebzelerde görülen viral etmenlerin saptanması amacı ile 2010 ve 2011 yıllarında bir çalışma yürüten Erkan ve ark. (2013), soğan ve pırasalarda OYDV ve/veya LYSV varlığını tespit etmişlerdir. DAS-ELISA bulguları sonucunda 38 pırasa örneğinin 4 tanesinin, 20 soğan örneğinin ise 6 tanesinin LYSV ile enfekteli olduğunu bildiren araştırmacılar, soğan örnekleri içerisinde ayrıca 3 tanesinin yalnız başına OYDV ile enfekteli olduğunu, 3 örneğin ise karışık enfeksiyon içerdiğini rapor etmişlerdir.

Şevik ve Akcura (2013), Amasya'da soğan üretim alanlarından topladıkları örneklerde OYDV, IYSV, LYSV, SLV ve GCLV hastalıklarının varlığını araştırmışlardır. Topladıkları 332 örneğin 57'sinde (% 17,16) virüslerin varlığını DAS-ELISA yöntemi ile belirleyen araştırmacılar, en fazla enfeksiyonun % 12,33 ile OYDV'de olduğunu bildirmişlerdir. OYDV enfeksiyonlarını takiben sırası ile LYSV ve SLV'de % 3,60 ve % 1,19 oranlarında enfeksiyon saptadıklarını ayrıca örneklerin hiçbirinde GCLV ve IYSV bulunmadığını rapor etmişlerdir.

Taşkın ve ark. (2013) virüsten arı bitki elde edilmesinde meristem kültür tekniğinin, sürgün ucu kültür tekniği ile karşılaştırılması ve iki farklı besin ortamında mikro çoğaltım başarılarının kıyaslanması ile virüslerin tespiti için Real-Time PCR testinin etkililiğinin belirlenmesi üzerine bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Denemelerde iki farklı sarımsak türü (*Allium sativum* ve *Allium tuncelianum*) ve iki farklı besin ortamı (Medium 1 ve Medium 2) kullanan araştırmacılar, her iki sarımsak türünde de Medium 2'nin Medium 1'e göre daha başarılı olduğunu ve bu karşılaştırmanın istatistikî açıdan önemli farklılıklar içerdiğini bildirmişlerdir. Meristem ve sürgün ucu kültürü ile elde ettikleri bitkileri, OYDV ve LYSV hastalık etmenlerine karşı Real-Time PCR ile test etmişler ve meristem kültürü ile elde ettikleri bitkilerde herhangi bir virüs etmeni ile karşılaşmamışlardır. Sürgün ucu tekniğinde ise OYDV ve LYSV ile enfekteli bitkileri tespit etmişler ve *Allium sativum* ve *Allium tuncelianum* türlerinde yaptıkları testler sonucunda OYDV enfeksiyonlarını sırası ile % 80 ve % 73, LYSV enfeksiyonlarını ise % 87 ve % 67 olarak belirlemişlerdir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

Tez çalışması çalışma kapsamında gerçekleştirilen arazi çalışmaları, Güney Marmara Bölgesi'nde bulunan Bursa, Balıkesir ve Çanakkale illeri ve ilçelerinde, laboratuvar çalışmaları ise, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü ve Mersin Zirai Karantina Müdürlüğü, viroloji laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bazı enfekteli örneklerin indikatör bitkilere taşınması amacı ile gerçekleştirilen mekanik taşınma denemeleri ise Mersin Zirai Karantina Müdürlüğü iklim odalarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

Çalışmanın ana materyalini, Bursa, Balıkesir ve Çanakkale illeri ve ilçelerinden toplanan soğan, sarımsak ve pırasa bitkileri oluşturmaktadır. Bu amaçla toplanan örnekler, üretimin ticari olarak yoğun yapıldığı tarlaların yanı sıra, hobi amaçlı olarak üretilen ve ticari üretim amacı gütmeyen küçük parsellerden ve ev bahçelerinden elde edilmiştir. Yapraklarında kloroz, bodurluk, kıvrılma ve bükülme ile çizgi belirtileri gibi virüs ve virüs benzeri belirtiler gösteren bu bitkiler için yapılan arazi çıkışları, il ve ilçe bazında üretim miktarına bağlı olarak yapılmamış ve tesadüfi olarak gerçekleştirilmiştir.

Tarlaların boyutlarına bağlı olarak her bir tarladan en az bir en fazla üç örnek toplanmıştır. Toplanan örnekler, dijital fotoğraf makinesi veya cep telefonu kamerası ile kayıt altına alınmıştır. Her bir örnek için numara verilmiş ve örnek numaraları, örneklerin toplandığı tarih, toplandıkları yer (il, ilçe ve köy), bitki türü, hastalık belirtileri ve fotoğraf numarası bilgilerinin yer aldığı etiketler ile birlikte naylon kilitli poşetlerde silika jel içerisinde muhafaza edilmiştir. Daha sonra örnekler, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü ve Mersin Zirai Karantina Müdürlüğü, viroloji laboratuvarlarına getirilerek +4 °C'de saklanmıştır.

Toplanan örneklerde, viral hastalık etmenlerinin tanımlanabilmesi için serolojik bir yöntem olan Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) yöntemi kullanılmıştır. Yöntemde, OYDV, LYSV ve TuMV hastalıklarına özgü ticari poliklonal antiserumlar kullanılmıştır.

DAS-ELISA analizlerinde, Bioreba (İsviçre) ve Agdia (ABD) firmalarından temin edilen ELISA kitleri ve 96 çukur içeren Microtiter plakalar kullanılmış ve yöntem, kitlerin temin edildiği firmaların önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Test edilen örneklere

ait bitki öz sularının elde edilmesinde porselen havan ve havanelerinin yanı sıra, Bioreba (İsviçre) firmasından temin edilen ekstraksiyon poşetleri (Extraction bags, Universal, 12x15 cm) ile birlikte bilyalı ekstraksiyon aparatı (Homogenizer Hand Model) kullanılmıştır. Analizlerde kullanılan tampon çözeltiler, üretici firmanın gönderdiği kit içerisinde temin edilmiştir. DAS-ELISA testleri sonuçlarının değerlendirilmesinde, MEDISPEC ESR 200 (ABD) ve Sunrise, TECAN (İsviçre) ELISA okuyucuları kullanılmış ve ayrıca görsel değerlendirmeler de gerçekleştirilmiştir.

Moleküler çalışmalar kapsamında enfekteli örneklere ait RNA'lar, QIAGEN (Almanya) firmasından temin edilen "RNeasy Mini Kit" RNA izolasyon kiti ile ve Suehiro ve ark. (2005) tarafından geliştirilen ve basit doğrudan tüpe bağlanma (simple direct tube; SDT) olarak bilinen yöntem kullanılarak elde edilmiştir. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction; RT-PCR) çalışmalarında ise TaKaRa (Japonya) firmalarından temin edilen iki aşamalı "Prime Script RT-PCR Kit" ve tek aşamalı Thermo Fisher Scientific (ABD) firmasından temin edilen "Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR Hot-Start Kit" RT-PCR kitleri kullanılmıştır. RT-PCR analizlerinde kullanılan oligonükleotit primerler, İontek (Türkiye) firmasında sentezletilmiştir. RT-PCR analizlerinde Bio-Rad (ABD) marka Thermal Cycler, güç tankı ve yatay elektroforez cihazı kullanılmış ve elde edilen DNA'ların yürütülmesi için hazırlanan agaroz jel, TAE (Tris-acetate-EDTA) tamponu ve agaroz (Sigma Aldrich; ABD) ile hazırlanmıştır. Jel, etidyum bromide (Sigma Aldrich; ABD), 6X DNA Gel Loading Dye (Thermo Fisher Scientific; ABD) ve GM 343 100-1000 bp ve SGM03 100-5000 bp DNA büyüklük markörleri (Biobasic, Kanada) varlığında yürütülmüştür. Sonuçların değerlendirilmesinde, PCR ürünlerinin görüntülenmesi UVDI jel görüntüleme cihazında (Major Science, ABD) gerçekleştirilmiştir.

Klonlama çalışmalarında, RT-PCR ürünleri, "EZ-10 Spin Column PCR Purification" saflaştırma kiti (BioBasic, Kanada) kullanılarak kitlerin temin edildiği firma önerileri doğrultusunda saflaştırılmış ve "pGEM-T Vector" (Promega, ABD) kiti ile pGEM-T Easy plazmit vektörüne klonlanıp, *Escherichia coli* bakterisine aktararak koloniler elde edilmiştir. Çalışma kapsamında *E. coli* bakterilerinin üretilmesinde LB (Leuria Bertani) besi yeri, katı besi yeri olarak ise LB-agar kullanılmıştır. Klonlama çalışmaları boyunca RT-PCR çalışmalarında kullanılan ekipmanların yanı sıra Biosan CH-100 (Türkiye) blok ısıtıcı ve IKA KS 4000i (Almanya) çalkalamalı inkübatör kullanılmıştır.

Tüm bunlara ek olarak laboratuvar çalışmaları kapsamında, Acculab Vicon (ABD) hassas terazi, Eutech Cyber Scan pH 510 (ABD) pH metre, Velp ZX3 (İtalya) vortex cihazı, Hirayama HV-50L (Japonya) otoklav cihazı, Memmert (Almanya) ICP 500 inkübatör ve Um 400 etüv, beher, erlen, mezür, cam ve plastik pipetler, cam şişe, plastik ve cam petri kabı, parafilm, alimünyum folyo, tülbent, otoklav bandı, etüv, steril cam malzeme, saf su, puar, piset, santrifüj tüpü, cam spatül ile Brand ve Eppendorf (Almanya) marka mikropipet setleri kullanılmıştır.

Mekanik taşınma denemeleri, Mersin Zirai Karantina Müdürlüğü'nde bulunan 10.000 lüks aydınlatmalı iklim odasında 24°C'de gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, indikatör bitkiler, steril toprak ve torf karışımına ekilmiş, inokulasyon için 0,05 M fosfat tamponu (pH; 7,4), mercaptoethanol, karborandum tozu, porselen havan ve havaneli ve kulak çöpü kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Arazi Çalışmaları

Arazi çalışmaları, Güney Marmara Bölgesi'nde bulunan Bursa, Balıkesir ve Çanakkale illerinde *Allium* cinsi bitkilerin yetiştirildiği alanlarda yürütülmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Arazi çalışmalarının yapıldığı Güney Marmara Bölgesi illeri

Çalışmaların yapıldığı alanlar; üretim deseni, yüz ölçümü, iklim, rakım, toprak özelliği, çeşit özelliği vb. faktörleri gözlemeksizin tesadüfi olarak seçilmiş olup, ayrıca Tarım İlçe Müdürlükleri'nden alınan çiftçi kayıt sistemine bağlı veriler, üreticilerin

yönlendirmeleri ve bölgelerde çalışan teknik elemanların görüşleri ile belirlenmiştir. Arazi çalışmaları kapsamında 2014-2017 üretim sezonu içerisinde gerçekleştirilen surveyler sonucunda 494 örnek toplanmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Arazi çalışmaları sonucu iller ve türler düzeyinde toplam bitki sayıları

	Çanakkale	Balıkesir	Bursa	Toplam
Pırasa	62	32	48	142
Soğan	48	33	116	197
Sarımsak	40	98	17	155
Toplam	150	163	181	494

Çizelge 3.1.'de görüldüğü üzere her ili temsil etmek üzere pırasa, soğan ve sarımsak bitkilerinden örneklemeler yapılmıştır. Örneklemeler, virüs ya da virüs benzeri simptomların görsel olarak daha iyi belirlenebilmesi açısından belirli bir büyüklüğe gelmiş bitkilerden yapılmıştır (Şekil 3.2). Örnek sayılarının belirlenmesinde, lokasyonlardaki ağırlıklı bitki deseni, ekim alanlarının büyüklüğü ve üretim miktarları gibi parametreler göz ardı edilmiş ve örneklerin mümkün olduğunca birbirlerine uzak alanlardan ve farklı lokasyonlardaki farklı parsellerden gerçekleştirilmesine özen gösterilmiştir. Bu amaçla Çanakkale ili; Merkez, Ezine, Çan, Biga, Lapseki ve Gelibolu, Bursa ili; Mustafakemalpaşa, Gürsu ve Karacabey ile Balıkesir ili; Merkez, Burhaniye ve Edremit ilçelerinden örnekler toplanmıştır.



Şekil 3.2. Örnekleme için belirli bir büyüklüğe gelmiş bitkiler; a: soğan, b: pırasa c: sarımsak

Arazi çalışmaları sürecinde, OYDV, LYSV ve TuMV ile bulaşık olduğu düşünülen bitkilerin yanı sıra, semptom göstermeyen ve normal seyrinin dışında belirti gösteren bazı bitkilerden de örnekler toplanmıştır. Her bir tarlayı temsil edecek örnekleme sayısı, tarlaların boyutlarına bağlı olarak en az bir en fazla üç olarak belirlenmiş ve toplanan örneklerin fotoğrafı çekilerek oluşturduğu semptomlar ya da bitkilerde gözlenen anormallikler kayıt altına alınmıştır.

Tüm örnekler, izolat numarası, toplandığı yer ve tarih bilgilerinin yer aldığı etiketler ile birlikte naylon kilitli poşetlerde silika jel içerisinde laboratuvarlara getirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. İzolatların etiketlenme ve taşınma işlemleri

Arazi çalışmaları sonucu toplanan örneklerde, virüs hastalık etmenlerinin tanımlanabilmesi için serolojik bir yöntem olan DAS-ELISA yöntemi kullanılmıştır.

3.2.2. DAS-ELISA Testi Çalışmaları

Arazi çalışmaları sonucunda toplanan pırasa, sarımsak ve soğan örneklerinin tamamı DAS-ELISA testleri ile test edilmiştir.

OYDV, LYSV ve TuMV hastalık etmenlerine karşı tanılama amacı ile ticari olarak ve virüslere özgü poliklonal antibadilerle gerçekleştirilen testler, kitlerin temin edildiği Bioreba (İsviçre) ve Agdia (ABD) kitlerinin temin edildiği firmaların önerileri doğrultusunda sırası ile 1:1000 ve 1:200 sulandırma oranları ile gerçekleştirilmiştir. DAS-ELISA testleri kapsamında kullanılan tampon çözeltiler EK 1’de verilmiş olup, analizler Clark ve Adams (1977) tarafından bildirilen yöntem esas alınarak kitlerin temin edildiği firmaların önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Analizlerde, bitkilere ait yaprak dokuları kullanılmıştır. Pozitif ve negatif kontroller kitlerden temin edilmiş olup, analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde makroskobik gözlemlerin yanı sıra ELISA okuyucularından faydalanılmış ve 405 nm’de yapılan okumalar neticesinde negatif kontrolün iki katı ve üzerinde absorbans değeri veren izolatlar, enfekteli kabul edilirken, sınır değerleri veren örnekler şüpheli olarak değerlendirilmiştir. Her iki firma önerileri doğrultusunda tamamlanan DAS-ELISA analizlerinin yapım aşamaları aşağıda verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Bioreba (İsviçre) firmasının önerileri doğrultusunda gerçekleştirilen adımlara göre;

- Etmenlere özgü antibadiler (IgG), 1:1000 oranında sulandırılmış ve 96 çukur içeren ELISA plakalarına her bir örnek için birer tekerrür olmak üzere kuyulara 200'er µl yüklenerek 30 °C'de 4 sa. inkübe edilmiştir.
- Daha sonra plakalar, yıkama tamponu ile 3-4 defa olmak üzere 3'er dk. bekletilmiş, yıkama işlemi ardından kurutulmuştur.
- 1/20 oranında ekstraksiyon solüsyonu varlığında, homojenizatör ve/veya havan-havaneli ile ezilen bitki örnekleri, etmenlere özgü pozitif ve negatif kontroller ile birlikte 200'er µl yüklenmiş ve bir gece 4 °C'de inkübe edilmiştir.
- Yıkama aşaması tekrar edilmiştir.
- Alkalın fosfataz enzimi ile işaretli antibadiler (conjugate) 1:1000 oranında 1X konjugat solüsyonu ile sulandırılmış, her bir çukura tekerrürlü olarak 200'er µl konularak 30 °C'de 5 sa. inkübe edilmiştir.
- Yıkama aşaması tekrar edilmiştir.
- 20 ml hazırlanan 1X substrat çözeltisine substrat maddesinden (1mg/ml para-nitrophenyl-phosphate) veya 20 mg pNPP tabletten (Sigma-Aldrich) her bir plaka için bir adet olmak üzere konulmuş ve çukurlara 200 µl olacak şekilde dağıtılmıştır.
- Plaka, 30-60 dk. oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir.
- Plakalarda, meydana gelmesi muhtemel renk değişimlerinin gözlemi, öncelikle makroskobik olarak yapılmış, kesin sonuçların değerlendirilmesi ise ELISA okuyucularında gerçekleştirilmiştir.

Agdia (ABD) firmasının önerileri doğrultusunda gerçekleştirilen adımlara göre;

- Hastalık etmenlerine özgü antibadiler (IgG), bir beher yardımı ile karbonat kaplama solüsyonu ile 1:200 oranında sulandırılmış ve ELISA plakalarında yer alan kuyulara her bir örnek için birer tekerrür olacak şekilde 100'er µl konulmuştur.
- Daha sonra plakalar, 4 sa. oda sıcaklığında veya bir gece 4 °C'de buzdolabında inkübe edilmiş ve yıkama solüsyonu ile (1X PBST) 2 defa olmak üzere yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Genel ekstraksiyon tamponu (GEB) kullanılarak 1:10 oranında homojenizatör ve/veya havan-havaneli ile ezilen bitki örnekleri, her bir kuyuya 100 µl olacak şekilde pozitif kontroller ve negatif kontroller ile birlikte yüklenmiştir.
- Plakalar, 2 sa. oda sıcaklığında veya bir gece 4 °C'de buzdolabında inkübe edilmiştir.

- Plaka, yıkama solüsyonu ile (1X PBST) bekletilmeden 7 defa yıkanmış ve kurutulmuştur.
- Alkalın fosfataz enzimi ile işaretli antibadiler (conjugate), 1:200 oranında ECI tampon solüsyonu ile sulandırılmış ve karıştırıldıktan sonra her bir çukura tekerrürlü olarak 100'er µl konularak oda sıcaklığında 2 sa. inkübe edilmiştir.
- Plaka, yıkama solüsyonu ile (1X PBST) bekletilmeden 8 defa yıkanmış ve ardından kurutulmuştur.
- 1ml/mg ölçekte, her biri 5 ml su için kullanabilen pNPP (para-nitrophenyl-phosphate) tabletleri, 1X PNP solüsyonu içerisinde çözülerek her bir kuyuya 100 µl olacak şekilde dağıtılmış ve 60 dk. oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Plakalarda, oluşması muhtemel renk değişimlerinin gözlemi, öncelikle makroskopik olarak yapılmış, kesin sonuçların değerlendirilmesi ise ELISA okuyucularında gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. RT-PCR Testi Çalışmaları

RT-PCR analizleri, klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere gerçekleştirilmiş olup, RT-PCR çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen nükleik asit izolasyon yöntemleri ve elektroforez çalışmaları, RT-PCR testi çalışmaları başlığı içerisinde sunulmuştur.

RT-PCR çalışmalarında enfekteli izolatların kalıp (template) RNA'larını elde etmek amacı ile yapılan total nükleik asit izolasyonu çalışmalarında, enfekteli örnekler için total nükleik asitler, Qiagen (Almanya) firmasından temin edilen "RNeasy Mini Kit" RNA izolasyon kiti ve Suehiro ve ark. (2005) tarafından geliştirilen basit doğrudan tüpe bağlanma (SDT) olarak bilinen yöntem kullanılarak elde edilmiştir. RT-PCR analizleri kapsamında kullanılan tampon çözeltiler EK 2'de verilmiş olup, yöntemler ve uygulanan adımlar aşağıda verildiği üzere gerçekleştirilmiştir.

Suehiro ve ark. (2005) tarafından geliştirilen SDT yöntemine göre;

- Hastalıkla bulaşık örnekler için bitki yapraklarından 1:1 (w/v) oranında alınmış ve içerisinde % 0,05 Tween-20 içeren PBST (phosphate-buffered saline) tampon çözeltisi ile ezme işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Elde edilen 50 µl bitki özsu, 0,5 ml'lik PCR tüplerine (polypropylene) konulmuştur.
- 15 dk. oda sıcaklığında inkübe edilen PCR tüpleri, içerindeki bitki özsu boşaltıldıktan sonra PBS-T ile 2 defa yıkanmıştır.

- Tüplerin kurutulmasının ardından her bir tüpe 30 µl distile su ve 15 ünite RNA'se inhibitör eklenerek 95 °C'de 1 dk. inkübe edilmiştir. İnkübe edilen tüpler, doğrudan buza konulmuş ve RT-PCR çalışmaları için hazır hale getirilmiştir.

RNeasy Mini Kit aşamaları;

- 1 ml RLT/RLC lysis tamponu için 10 µl 2-Mercaptoethanol veya 2M 20 µl DL-Dithiothreitol (DDT) eklenerek stok hazırlanmıştır. RPE yıkama tampon çözeltisi, 4 hacim % 96'lık etanol eklenerek hazır hale getirilmiştir.
- Her bir izolat için 100 mg bitki materyali, havan havaneli yardımı ile ezilmiş ve üzerlerine 450'şer µl RLT/RLC tamponu eklenerek vortekslenmiştir.
- Karışım, QIAshredder Mini spin Column'lara aktararak 13.300 rpm'de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
- Sıvı kısım, yeni 1,5 ml'lik tüplere aktarılmış ve üzerlerine her bir örnek için 500 ml % 96'lık etanol eklenmiştir.
- Örnekler, mikropipet yardımı ile karıştırıldıktan sonra 650'şer ml çekilmiş ve RNeasy Mini Spin Column'lara aktarılmıştır.
- Tüpler, 10.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiş ve toplama tüplerindeki sıvı kısım dikkatlice uzaklaştırılarak filtreler tekrar RNeasy Mini Spin Column'lara aktarılmıştır.
- Filtreler üzerine 700'er µl RW 1 yıkama tamponu eklenmiş ve 10.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Daha sonra toplanan sıvı uzaklaştırılmış ve filtreler tekrar RNeasy Mini Spin Column'lara aktarılmıştır.
- Filtreler üzerine 500'er µl RPE yıkama tamponu eklenmiş ve 10.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
- Bir önceki adım tekrarlanarak yıkama aşaması tekrar edilmiştir.
- Filtreler, 2 ml'lik yeni toplama tüpleri üzerine yerleştirilmiş ve membranı kurutmak amacı ile maksimum hızda (13.300 rpm) 1 dk. santrifüj edilmiştir.
- Filtreler, üzerlerinde örnek numaralarının yazılı olduğu 1,5 ml'lik yeni tüplere yerleştirilmiş ve üzerlerine 30-50 µl RNase içermeyen steril su konularak 10.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
- Kurutma işleminin ardından, filtreler uzaklaştırılmış ve elde edilen RNA'lar RT-PCR işlemi gerçekleştirilene kadar -20 °C'de bekletilmiştir.

RT-PCR analizlerinin temeli, çoğaltılmak istenilen bölge ya da bölgelerin her iki tarafına özgü, nükleotit dizilimlerini birleştirecek primerler kullanılarak, hedef alınan genlerin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere

gerçekleştirilen RT-PCR çalışmaları için seçilen izolatlar, DAS-ELISA bulgularında en yüksek absorbans vererek enfekteli olduğu belirlenen ve elde edildiği bölgeler ve çeşitler göz önünde bulundurulmuş izolatlar arasından seçilmiştir.

Çalışmalarda, LYSV için, Fajardo ve ark. (2001) tarafından tasarlanan ve kılıf protein geninin tamamı ile Nib bölgesinin bir bölümünü içeren, 5' TCA CTG CAT ATG CGC ACC AT 3' ve 3' GCA CCA TAC AGT GAA TTG AG 5' (1030 bp) dizisine sahip oligonükleotit primerler, OYDV için ise Lee ve ark. (2005) tarafından tasarlanan ve kılıf protein bölgesinin 602 bp'lik bölümünü içeren 5' CAC CNT AYA TAG CRG ARA CAG CTC T 3' ve 3' ACT GAA ATG CGC CAT TAT YTG YCT A 5' dizisine sahip oligonükleotit primerler kullanılmıştır.

Analizler kapsamında hem tek aşamalı hem de iki aşamalı RT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. OYDV izolatlarının RT-PCR analizleri “Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR Hot-Start Kit” (Thermo Fisher Scientific, ABD) RT-PCR kiti ile tek aşamalı olarak gerçekleştirilirken, LYSV izolatlarının RT-PCR çalışmaları ise “PrimeScript RT-PCR Kit” (TaKaRa, Japonya) RT-PCR kiti ile iki aşamalı olarak kitlerin temin edildiği firmaların önerileri doğrultusunda tamamlanmıştır.

Virüslere özgü oligonükleotit primer çiftleri, DNA polimeraz enzimi (Taq polimeraz), Reverse Transcriptase enzimi (M-MMLV), dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), Random primer gibi RT-PCR'in temel bileşenleri ile yapılan RT-PCR içerikleri Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'te verilmiştir. Bu içerikler ile gerçekleştirilen RT-PCR programları ise Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'te yer almaktadır.

Çizelge 3.2. İki aşamalı RT-PCR içeriği

DENATÜRASYON	
dNTP Mixture (10 mM)	1 µl
Random 6 mers (20 µM)	1 µl
RNase Free dH ₂ O	3 µl
Template RNA	5 µl
RT-KARIŞIMI	
Prime Script RTase	0,5 µl
RNaseInhibitor (40 U/µl)	0,5 µl
5X PrimeScriptBuffer	4 µl
RNase Free dH ₂ O	5 µl
PCR-KARIŞIMI	
10X PCR Buffer II	2,5 µl
dNTP Mixture (10 mM)	1 µl
Forward Primer	0,5 µl
Reverse Primer	0,5 µl
TaKaRa ExTaq HS (5 U/µl)	0,25 µl
RNase Free dH ₂ O	15,25 µl
Complementary DNA (cDNA)	5 µl
Toplam Hacim	25 µl

Çizelge 3.3. Tek aşamalı RT-PCR içeriği

Verso Enzyme Mix	0,5 µl
2X 1-Step PCR Hot-Start Master Mix	12,5 µl
RT Enhancer	1,25 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl
Reverse Primer (10 µM)	1 µl
Template RNA	0,5 µl
Water, Nuclease-free	8,25 µl
Toplam Hacim	25 µl

Çizelge 3.4. İki aşamalı RT-PCR programı

DENATÜRASYON	
65 °C 5 dk.	1 Döngü
RT-PROGRAMI	
30 °C 10 dk.	
42 °C 45 dk.	1 Döngü
70 °C 15 dk.	
PCR-PROGRAMI	
94 °C 5 dk.	1 Döngü
94 °C 30 Sn.	
55 °C 30 Sn.	40 Döngü
72 °C 30 Sn.	
72 °C 5 dk.	1 Döngü
4 °C	∞

Çizelge 3.5. Tek aşamalı RT-PCR programı

	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
cDNA sentezi	50 °C	15 dk.	1
Verso inaktivasyonu	95 °C	15 dk.	1
Denatürasyon	95 °C	20 Sn.	
Annealing	50 °C	30 Sn.	35
Extension	72 °C	1 dk.	
Final Extension	72 °C	5 dk.	1

RT-PCR analizlerinin değerlendirilmesi, agaroz jel varlığında mümkün olabilmektedir. Bu amaçla elde edilmesi muhtemel DNA parçalarının görüntülenebilmesi için agaroz jel elektroforezi çalışmaları, Galitelli ve Minafra (1994) tarafından belirlenen yöntem esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada aşağıdaki aşamalar sırası ile takip edilmiştir.

- % 1,5'lük jel hazırlamak üzere 1,5 gr agaroz (Sigma Aldrich; ABD) hassas terazide tartılmış ve üzerine 100 ml 1X TAE tampon çözeltisi ilave edilerek mikrodalga fırınında homojen olarak karışması sağlanmıştır.
- Karışım, soğuması için ve 60 °C sıcaklıktaki su banyosunda bekletilmiştir.

- Jelin oluşturulacağı hazne üzerine aparatları takılmış ve su banyosunda bekletilen karışım, istenilen sıcaklığa geldikten sonra içerisine 2 µl etidyum bromide (Sigma Aldrich; ABD) eklenmiş, daha sonra jel haznesi üzerine dökülerek 30 dk. katılaşması beklenmiştir.
- Jelin katılaşmasının ardından hazne üzerindeki aparatlar dikkatlice çıkarılmış ve jel tank üzerine yerleştirilmiştir.
- Daha sonra 1X TAE tamponu, jelin üzerini geçecek şekilde jel tankı içerisine dökülmüş ve ardından mikropipet yardımı ile sırası ile 5 µl DNA büyüklük markörü (Biobasic, Kanada) ve 12 µl'ye tamamlanacak şekilde 2 µl 6X DNA Gel Loading Dye (Thermo Fisher Scientific; ABD) yükleme tamponu ve 10 µl RT-PCR ürünü karışımı, jel kuyularına yüklenmiştir.
- Elektroforez cihazı, güç kaynağı çalıştırılmış ve 100 V elektrik ortamında DNA'ların 40 dk. yürütülme işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Daha sonra jel, tanktan çıkarılmış ve jel görüntüleme cihazında UV ışık varlığında görüntülenmiştir.

3.2.4. Klonlama Analizi Çalışmaları

Klonlama analizi çalışmaları kapsamında, RT-PCR analizleri gerçekleştirilen 20 izolata ait PCR ürünleri, saflaştırılmış ve pGEM-T Easy plazmit vektörüne (Promega, ABD), Çevik ve ark. (1995) ve Jiang ve ark. (2008) tarafından rapor edilen yöntem modifiye edilerek kitlerin sağlandığı firmaların önerileri doğrultusunda klonlanmıştır. Klonlama çalışmaları kapsamında kullanılan çözeltiler ve içerikleri EK 3'de verilmiş olup; aşağıda verilen aşamalar sırası ile takip edilmiştir.

3.2.4.1. RT-PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Enfekteli izolatlara ait RT-PCR ürünleri, EZ-10 Column PCR Pürifikasyon Kiti kullanılarak kitlerin temin edildiği Bio Basic (Kanada) firmasının önerileri doğrultusunda saflaştırılmıştır. Analizde, aşağıdaki adımlar izlenmiştir.

- Yıkama solüsyonuna % 96'lık etanol eklenerek karışım 120 ml'ye tamamlanmıştır.
- Her bir izolat için, 20 µl RT-PCR ürününe, 60 µl Binding I solüsyonu eklenmiş ve hazırlanan karışım "EZ-10 column" kolonlarına aktarılmıştır.
- Oda sıcaklığında 2 dk. bekletilen kolonlar, 10.000 rpm'de 2 dk. santrifüj edilmiş ve sıvı kısım uzaklaştırılmıştır.

- Kolonlara 500'er µl yıkama solüsyonu eklenmiş ve 10.000 rpm'de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
- Yıkama aşaması tekrar edilmiştir.
- Kolonlarda kalan etil alkolün tamamen uzaklaştırılması amacı ile tüpler, 10.000 rpm'de 2 dk. boş olarak santrifüj edilmiş ve kolonlar, üzerlerinde örnek numaralarının yazılı olduğu 1,5 ml'lik yeni tüplere yerleştirilmiştir.
- Kolonlara elution solüsyonundan 25 µl eklenerek 2 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Tüpler 10000 rpm'de 2 dk. santrifüj edilmiş ve saflaştırılmış PCR ürünleri kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.4.2. Ligasyon

Ligasyon aşamasında, RT-PCR analizleri ile çoğaltılan genlerin, pGEM-T Easy plazmit vektörü ile birleştirilme işlemi gerçekleştirilmiştir. Yöntem, kitlerin temin edildiği firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiş olup, Çizelge 3.6'da verilen ligasyon karışımı 1 sa. oda sıcaklığında bekletilerek aşama tamamlanmıştır.

Çizelge 3.6. Ligasyon karışımı içerik ve miktarı

pGEM-T Easy Vector (50 ng)	1 µl
2X Rapid Ligation Buffer	5 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
RT-PCR ürünü	3 µl
Toplam hacim	10 µl

3.2.4.3. Transformasyon

Transformasyon, ligasyon karışımının hücre duvarı kimyasal uygulamalarla geçirgen hale getirilmiş (competent) *Escherichia coli* bakterisine aktarılmasıdır. Bu aşamada, Promega (ABD) firmasından temin edilen *E. coli* bakterisinin JM109 ırkı kullanılmıştır. Transformasyon aşamaları aşağıda özetlenmiştir.

- Analizde kullanmak üzere, yalnızca ampisilin içeren ve ampisilin/ IPTG/X-Gal içeren LB (Luria Broth) besi ortamları hazırlanmıştır.
- *E. coli* bakterisinin JM109 ırkının competent hücrelerinden, her bir izolat için 50 µl alınarak üzerinde örnek numaraları yer alan 1,5 ml'lik steril tüplere aktarılmıştır.

- pGEM-T Easy plazmiti ve ligasyon karışımından 5 µl alınarak *E. coli* JM109 competent hücrelere eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra 20 dk. buzda bekletilmiştir.
- Karışım, 42 °C'de 45-50 Sn. süre ile bekletilerek ısı şoku uygulanmış ve tekrar 2-3 dk. buzda bekletilmiştir.
- Steril polypropylene tüpler üzerine örnek numaraları yazılmış ve içlerine her bir örnek için 750'şer µl LB besi (sıvı) ortamı eklenerek 150 rpm'de 1.5 sa. 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir.
- Çalkalamalı inkübatörden çıkarılan tüpler, 5000 rpm'de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
- Sıvı kısım üzerinden 500 ml sıvı uzaklaştırılmış ve geriye kalan 250 m'lik hacim, tüpün dibinde kalan bakteriler ile pipetlenerek karıştırılmış ve LB (ampisilin)/IPTG/X-Gal içeren petri kaplarına steril spatula yardımı ile yayılmıştır.
- Petriler 37 °C'de 1 gece inkübatörde bekletilmiştir.

3.2.4.4. Bakteri Kolonilerinin Seçimi ve Koloni PCR

Transformasyonu gerçekleştiren bakterilerin oluşturduğu mavi-beyaz kolonilerden, her bir izolatu temsil edecek şekilde beyaz koloniler seçilmiştir. Daha sonra petri kaplarında çizimi gerçekleştirilen beyaz kolonilerin viral etmenlere ait genleri taşıyan rekombinant plazmitleri içerip içermedikleri daha hassas bir yöntem olan koloni PCR yöntemi ile taranarak kesin olarak belirlenmiştir. Koloni PCR aşamalarında, PCR aşamalarında kullanılan spesifik primerler kullanılmıştır.

3.2.4.5. Plazmit İzolasyonu

Bu aşamada, pGEM-T Easy plazmitini içerdiği kesin olarak belirlenen koloniler seçilmiş ve bu kolonilerden plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Her bir izolat için koloni PCR'da pozitif sonuç veren en az 2 koloni seçilmiş ve plazmit izolasyonu yapılmıştır. Yöntemde;

- Her bir izolat için seçilen koloniler, 2 µl ampisilin içeren, 5 ml LB sıvı besi ortamına inokule edilmiş ve 37 °C'de 16 sa. boyunca 180 rpm hızda çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir.
- Steril bir mikrofij tüpüne 500 µl gliserol ve 500 µl bakterilerden alınarak gliserol stokları hazırlanmıştır.
- Geriye kalan kısımdan ise BioBasic (Kanada) firmasından sağlanan plazmit saflaştırma kiti kullanılarak, plazmit izolasyonu, kitlerin temin edildiği firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

- Bakteri hücrelerinin parçalanması amacı ile her bir izolata 200 µl solüsyon I eklenip, 1 dk. oda sıcaklığında beklenmiştir.
- Parçalanmayan bakteri hücrelerini tamamen parçalamak amacı ile 400 µl solüsyon II eklenip, 1 dk. oda sıcaklığında beklenmiştir.
- Daha sonra 700 µl solüsyon III eklenmiş ve örnekler, 12.000 rpm 4 °C’de 5 dk. santrifüj edildikten sonra kolonlara aktarılmıştır. Kolonlar, 10.000 rpm ve 4 °C’de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
- Plazmitlerin artık maddelerden temizlenmesi için 500 µl yıkama solüsyonu eklenmiş ve 10.000 rpm 4 °C’de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
- Son olarak kurutma işleminin ardından 50 µl elution tampon solüsyonu eklenerek plazmit izolasyonu tamamlanmıştır.

3.2.4.6. *EcoRI* Restriksiyon Enzimi ile Kesme İşlemi (Digestion)

Bu aşama, plazmit izolasyonu ardından plazmitlerin, *EcoRI* enzimi ile kesilip virüslere ait genleri içerdiklerinin teyit edilmesi amacı ile gerçekleştirilmiştir. *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesme işlemi için kullanılan kit Promega (ABD) firmasından temin edilmiş olup, kitin temin edildiği firmaların önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hazırlanan digestion karışımı Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Digestion karışımı ve içeriği

Plazmit DNA	10 µl
<i>EcoRI</i> enzimi	1 µl
10X <i>EcoRI</i> buffer	2 µl
Bovine serum albumin (BSA)	0,2 µl
dH ₂ O	6,8 µl
Toplam Hacim	20 µl

Elde edilen bu karışım, 37 °C’de 6 sa. bekletilerek plazmitlerin *EcoRI* enzimi ile kesilme işlemi tamamlanmıştır. *EcoRI* enzimi ile kesme işleminin tamamlanmasından sonra elde edilen DNA’lar SGM03 100-5000 bp DNA büyüklük markörü ile birlikte % 1,5’lik agaroz jelinde elektroforez yöntemi ile ayrıştırılmış ve etidyum bromür varlığında UV ışık altında görüntülenmiştir.

3.2.5. Sekans ve Filogenetik Analiz Çalışmaları

RT-PCR ürünlerinin klonlanması sonucunda izolatlara ait genleri kesin olarak taşıdıkları belirlenen saflaştırılmış plazmitlerden 20 tanesi seçilerek sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu izolatlara ait DNA dizilimleri ALTIGENBIO (İzmir) firmasından hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. DNA dizilimi, pGEM-T Easy plazmitinin T-A klonlama bölgesinin yaklaşık 50 bp üst ve alt kısmındaki bölgelere spesifik M13F ve M13R üniversal primerleri kullanılarak döngü dizileme yöntemi ile otomatik DNA dizileme cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Her bir izolat için bir klonun iki yönünden M13F ve M13R primerleri kullanılmış ve sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ham DNA dizilimleri CLC Main Workbench (V.7.7.3) dizi analiz programına aktarılmıştır. Öncelikle pGEM-T Easy plazmit vektörüne ait DNA dizileri temizlenmiş ve elde edilen çift yönlü DNA dizileri birleştirilmiştir. Son aşamada hedef alınan bölgelere ait genlerin nükleotit dizilimi ve amino asit dizilimleri elde edilmiştir.

Bu amaçla, Bursa, Balıkesir ve Çanakkale illerinin farklı bölgelerinde pırasa ve sarımsak yetiştiriciliği yapılan alanlardan elde edilen izolatlara ait nükleotit ve amino asit dizilerinin Clustal W programında çoklu dizi karşılaştırmaları yapılmış ve birbirleri ile benzerlik oranları yüzde olarak saptanmıştır. Daha sonra gen bankasında DNA ve protein veri tabanlarında araştırmalar yapılarak dünyanın farklı bölgelerinden elde edilen izolatlara ait nükleotit ve amino asit dizileri ile Güney Marmara Bölgesi'nden elde edilen izolatlara ait veriler, Clustal W programı kullanılarak karşılaştırılmış ve benzerlik oranları yüzde olarak belirlenmiştir.

Filogenetik analizler için LYSV ve OYDV izolatlarının kendi içlerinde ve dünya izolatları ile göstermiş olduğu ilişkiler belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla Clustal W ile gerçekleştirilen çoklu dizi dosyaları kullanılmıştır. Elde edilen çoklu dizi dosyaları neighbour joining metodu ile 1000 tekrarlı bootstrap analizi kullanılarak LYSV ve OYDV izolatlarının filogenetik ilişkileri ortaya çıkarılmıştır.

Hem LYSV hem de OYDV izolatlarının filogenetik ilişkilerinin belirlenmesinde *Shallot yellow stripe virus* (SYSV), oluşturulan filogenetik ağaçlarının doğruluğunu arttırmak için dış grup olarak kullanılmış ve LYSV ve OYDV izolatlarının filogenetik ilişkileri hem nükleotit hem de amino asit düzeyinde belirlenmiştir.

3.2.6. Mekanik Taşınma Denemeleri

Mekanik taşınma denemeleri kapsamında seçilen OYDV ve LYSV ile enfekteli 9 izolat, klonlama çalışmalarında kullanılan 20 izolat içerisinde, toplandığı yer, enfekteli olduğu etmen ve konukçuları göz önünde bulundurularak seçilmiştir (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. Mekanik taşınma denemeleri için kullanılan LYSV ve OYDV izolatları

İzolat Adı	Konukçu	Toplandığı Yer	Etmen
ÇAN 244	Pırasa	Çanakkale	LYSV
BUR 288	Pırasa	Bursa	LYSV
BUR 293	Sarımsak	Bursa	LYSV
BAL 378	Sarımsak	Balıkesir	LYSV
BAL 398	Pırasa	Balıkesir	LYSV
BUR 301	Sarımsak	Bursa	OYDV
ÇAN 419	Sarımsak	Çanakkale	OYDV
BAL 449	Sarımsak	Balıkesir	OYDV
BUR 487	Pırasa	Bursa	OYDV

Çalışmada indikatör bitki olarak kullanılan soğan kıskaları ve sarımsak dişleri, market ve pazarlardan temin edilmiş olup, LYSV ve OYDV etmenlerini içerip içermedikleri DAS-ELISA testleri ile belirlenmiştir. Bu amaçla, sarımsak başlarını temsil edecek şekilde dişler belirlenmiş ve her bir baş için 2-4 adet dişe uygulanan ELISA testleri sonucunda LYSV ve OYDV ile enfekteli olmadığı belirlenenler arasından ekimler gerçekleştirilmiştir. Soğanlarda ise yaprak uçlarından alınan örneklere uygulanan ELISA testleri sonucunda, enfekteli olmadığı belirlenen soğan örnekleri indikatör bitki olarak kullanılmıştır. Mekanik taşınma denemeleri çalışmalarında kullanılacak indikatör bitkilerin belirlenmesi için gerçekleştirilen DAS-ELISA testleri, kitlerin temin edildiği firmaların önerileri doğrultusunda Bölüm 3.2.2’de belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

LYSV ve OYDV etmenlerini içermedikleri belirlenen indikatör bitkilerinin yetiştirilme işlemleri, Mersin Zirai Karantina Müdürlüğü’nde bulunan bitki yetiştirme odasında gerçekleştirilmiş olup, kontrollü koşullar içerisinde, 10.000 lüks aydınlatmalı, 16 saat ışıklandırma süresine ayarlı ve 24°C’de koşullarında, 1:1 oranında steril toprak ve torf karışımında gerçekleştirilmiştir. Küvetlerde gerçekleştirilen ekimler sonrası indikatör bitkiler, saksılara şaşırtılmış ve deneme süresince indikatör bitkilerin sulama işlemleri ve kontrolleri düzenli periyodlarla gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. İndikatör bitkilerin yetiştirilme aşamalarından bir görünüm

İndikatör bitkilere uygulanacak inokulasyonlar öncesinde her bir izolat için kontrol bitkilerinin de yer aldığı 4 indikatör bitki belirlenmiştir. Bu amaçla, ikisi enfekteli izolatların inokule edileceği tekerrür bitkileri, diğer ikisi kontrol bitkisi olan indikatör bitkileri seçilmiş ve saksılar üzerinde yer alan etiketler üzerine numaralandırılmışlardır. Her bir izolat için belirlenen iki kontrol bitkisinden birine LYSV ve OYDV ile enfekteli olmadığı belirlenen sağlıklı bir bitkinin özsuyu inokule edilirken, diğer kontrol bitkisine ise herhangi bir uygulama yapılmamıştır.

Yöntem, Van Dijk (1993b)'e göre gerçekleştirilmiş olup, öncelikle inokulasyon için belirlenen izolatlardan 0,5 g tartılmış ve havan içerisinde % 0,1 mercaptoethanol içeren 4,5 ml, 0,05 M (pH; 7,4) fosfat tampon çözeltisi (EK 4) ile ezilerek bitki özsuvarı elde edilmiştir. Daha sonra, indikatör bitkilerinin yapraklarında yara oluşumu sağlamak amacı ile karborandum tozu dökülmüş ve kısa bir süre beklenildikten sonra, yapraklarda deformasyon yaratmayacak şekilde pamuk aracılığı ile bitki özsuvarı indikatör bitkilere inokule edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Mekanik taşınma denemelerinden bir görünüm

Taşınma denemelerinin ardından, indikatör bitkiler çeşme suyu ile yıkanmış ve bitkilerin periyodik olarak sulama ve kontrol işlemlerine devam edilmiş, indikatör bitkilerinin hastalık etmenleri ve zararlılardan korunması amacı ile gerekli önlemlerin alınmasına özen gösterilmiştir. İnokulasyonu takiben 4 hafta süre ile bitkilerde oluşan belirtiler gözlenmiş ve tüm bitkilere OYDV ve LYSV etmenlerini içerip içermediklerinin belirlenmesi amacı ile DAS-ELISA testi uygulanmıştır.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu bölümde “Güney Marmara Bölgesi’nde *Allium* Cinsi Bitkilerde Potyvürüslerin Tanılanması ve Karakterizasyonu” isimli tez çalışmasına ait araştırma bulguları ve tartışmaları yer almaktadır.

Bu bağlamda, arazi çalışmalarının gerçekleştirildiği araştırma bölgesine ait bilgiler ve arazi çalışmaları bulguları, toplanan örneklerde tez kapsamına bağlı olarak incelenen viral hastalık etmenlerinin bölgedeki mevcut varlığına ait bulgular ve enfekteli olduğu belirlenen izolatlar arasından seçilenlerin moleküler karakterizasyon çalışmaları ile klonlama çalışmalarında kullanılan izolatlardan bazılarının mekanik olarak indikatör bitkilere taşınmaları ile ilgili denemeler yer almaktadır. Tüm bunlara ek olarak bu bulguların, ülkemiz ve ülkemiz dışında gerçekleştirilmiş benzer çalışmalara ait bulgular ile tartışmaları da bu bölüm içerisinde değerlendirilmiştir.

4.1. Arazi Çalışmaları Bulguları

Arazi çalışmaları Güney Marmara Bölgesi’nde bulunan Bursa, Balıkesir ve Çanakkale illerinde yürütülmüştür. 2014-2017 üretim sezonu içerisinde gerçekleştirilen arazi çalışmalarında bu illerden toplam 494 örnek toplanmıştır. Toplanan örneklerin iller ve türler düzeyinde sayısı ile toplandıkları yerlere ait 2016 yılı üretim miktarları (ton) ve üretim alanları (da) Çizelge 4.1.’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Toplam örnek sayısı, üretim miktarı (ton) ve üretim alanı (da) verileri

	Çanakkale			Balıkesir			Bursa			Toplam
	Üretim Alanı	Üretim Miktarı	Örnek Sayısı	Üretim Alanı	Üretim Miktarı	Örnek Sayısı	Üretim Alanı	Üretim Miktarı	Örnek Sayısı	
Pırasa	1.075	2.847	62	4.277	10.067	32	10.229	36.407	48	142
Soğan	3.775	5.208	48	16.012	21.583	33	35.193	86.944	116	197
Sarımsak	1.376	1.174	40	9.845	7.391	98	861	594	17	155
Toplam			150			163			181	494

Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi arazi çalışmaları sonucunda, iller ve türler düzeyinde toplanan örnek sayılarının, toplandıkları yerlere ait üretim miktarları (ton) ve üretim alanları (da) ile doğrudan bir ilişki içermediği ve örneklemelerin tesadüfi olarak gerçekleştirildiği görülmektedir. Toplanan bu örneklerin dağılımına bakıldığında toplam 494 örneğin 142’sinin (% 28,74) pırasa, 197’sinin soğan (% 39,87) ve 155’inin ise (% 31,37) sarımsak bitkilerinden elde edildiği, iller düzeyinde ise bu örneklerin 150’sinin Çanakkale’den (% 30,36), 163’nün Balıkesir’den (% 32,99) ve 181’nin ise Bursa’dan (% 36,63) toplandığı görülmektedir.

Bu veriler ışığında, üretim miktarı açısından bakıldığında *Allium* cinsi içinde Balıkesir ilinde sarımsağın (% 60,12) ilk sırayı aldığı, bunu sırasıyla pırasa (% 19,63) ve soğanın (% 20,24) izlediği, Bursa ilinde ise soğanın (% 64,00) ilk sırayı aldığı, bunu pırasa (% 26,51) ve sarımsağın (% 9,39) izlediği, Çanakkale ilinde ise pırasanın (% 41,33) ilk sırayı aldığı, bunu soğan (% 32) ve sarımsağın (% 26,66) izlediği yine Çizelge 4.1’deki bilgilerden anlaşılmaktadır. Tüm bu oranlara bakıldığında araştırma bölgesi içerisinde bulunan illerde ürüne endeksli entansif tarım uygulamaları gerçekleştirildiği görülmektedir. Bu durum, en sık Bursa ili soğan üretim alanlarında (Şekil 4.1) olmak üzere ayrıca pırasa üretim alanlarında ve Balıkesir ili sarımsak üretim alanlarında gözlenmiştir. Çanakkale ilinde ise ticari üretim yapılan alanlar, pazar istekleri doğrultusunda şekillenmekte ve entansif tarım üretimi küçük ölçekli arazilerde yapılmaktadır.



Şekil 4.1. Bursa ili, Karacabey ilçesi, soğan alanlarından genel bir görünüm.

Güney Marmara Bölgesi içerisinde Balıkesir ili sarımsak, Bursa ili ise soğan üretiminde söz sahibi illerdir. Ayrıca bu illerimiz pırasa üretiminde de ülke içerisinde oldukça önemli bir yere sahip olup 2016 yılı TÜİK verilerine göre Bursa ili ilk sırada Balıkesir ili ise beşinci sırada yer almaktadır. Çanakkale ili, *Allium* cinsi bitkilerin üretiminde, hem üretim yapılan arazilerin küçük ve az sayıda olması hem de ürünlerin pazar istekleri doğrultusunda yıldan yıla değişerek bir istikrar oluşturmaması nedenleri ile ülke üretiminde üst basamaklarda yer alamamaktadır (Anonim 2017b).

Arazi çalışmaları süresince örnekleme yönteminde ilçelerin seçimi de tesadüfi olarak gerçekleştirilmiş ve örnekleme yapılan ilçelere ait alanlarda, üretim miktarları ve üretim alanlarının büyüklükleri dikkate alınmamıştır. Bursa, Balıkesir ve Çanakkale illeri ve ilçelerinden toplanan örneklerin, türler bazında dağılımı ve toplam bitki sayılarına ait veriler Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Örneklerin iller, ilçeler, türler bazında dağılımı ve toplam bitki sayıları

İller	İlçeler	Türler	Toplam Bitki Sayısı
Çanakkale	Merkez	Pırasa	37
		Soğan	18
		Sarımsak	21
	Biga	Pırasa	13
		Soğan	0
		Sarımsak	4
	Çan	Pırasa	8
		Soğan	0
		Sarımsak	5
	Gelibolu	Pırasa	0
		Soğan	9
		Sarımsak	2
	Eceabat	Pırasa	0
		Soğan	10
		Sarımsak	5
Lapseki	Pırasa	10	
	Soğan	2	
	Sarımsak	5	
Ezine	Pırasa	1	
	Soğan	0	
	Sarımsak	0	
Çanakkale Toplam			150
Bursa	Karacabey	Pırasa	17
		Soğan	64
		Sarımsak	2
	Mustafa Kemalpaşa	Pırasa	15
		Soğan	1
		Sarımsak	4
	Gürsu	Pırasa	20
		Soğan	47
		Sarımsak	11
Bursa Toplam			181
Balıkesir	Merkez	Pırasa	27
		Soğan	28
		Sarımsak	101
	Edremit	Pırasa	2
		Soğan	0
		Sarımsak	3
	Burhaniye	Pırasa	2
		Soğan	0
		Sarımsak	0
Balıkesir Toplam			163
Toplam			494

Çizelge 4.2’de görüldüğü üzere örnekleme yapılan ilçeler arasında Çanakkale Merkez ilçe, Balıkesir Merkez ilçe ile Bursa ili, Karacabey ve Gürsu ilçeleri en fazla örnek toplanan ilçeler olarak dikkat çekmiştir. Bu ilçeler arasında Çanakkale Merkez ilçe % 50,66, Balıkesir Merkez ilçe % 95,70 ve Bursa ili, Gürsu ve Karacabey ilçeleri sırası ile % 48,61 ve % 45,85 oranları ile bağlı oldukları illerde en fazla örnek toplanan ilçeleri oluşturmaktadırlar.

Bu tez çalışmasında, araştırma bölgesi olarak Güney Marmara Bölgesi sınırlarında bulunan Bursa ve Balıkesir illeri *Allium* cinsi bitkilerin üretiminde hem bölgede hem de ülke içerisinde söz sahibi olmaları nedeni ile tercih edilmiş, ayrıca bu bölge içerisinde yer alan Yalova ve Bilecik illerinin *Allium* cinsi bitkilerin üretiminde oldukça geri planda kalması bu illerin arazi çalışmalarına dahil edilmemesi fikrini ortaya çıkarmıştır. Çalışma kapsamında bulunan Çanakkale ili ise araştırmanın yürütüldüğü merkez olması nedeni ile çalışma içerisinde değerlendirilmiştir.

Yapılan literatür çalışmalarında araştırmacıların farklı sebepler ile araştırma bölgelerini seçtikleri ve bu bölgelerde gerçekleştirdikleri çalışmalarda da örnekleme sayılarını araştırmaya bağlı olarak tesadüfi ya da sistematik bir örnekleme doğrultusunda belirledikleri görülmektedir. Bu çalışmada Güney Marmara Bölgesi *Allium* cinsi bitkilerde hedeflenen amaçlardan birisi bu bitkileri enfekte eden Potyvirusleri tespit etmek olduğu için tesadüfi örnekleme ile virüs ya da virüs benzeri simptom gösteren bitkilerden örnekleme yapılmıştır. Bu şekilde daha fazla hastalıklı bitki toplanması sağlanmıştır. Ülkemizde yapılan benzer bir çalışmada Fidan (2010), tesadüfi örnekleme yöntemi ile topladığı izolatları, ülkemiz sarımsak, soğan ve pırasa üretiminin en üst basamaklarında yer alan Doğu Akdeniz Bölgesi illeri ile baş kalitesi ve depolanabilirlik özelliği ile bilinen Taşköprü sarımsağının bulunduğu Kastamonu ilinden temin etmiştir. Fayad-Andre ve ark. (2011) Brezilya’da sarımsaklarda tarım üretim sistemlerinin, virüs hastalıklarının verim ve yayılımına etkisini araştırmak amacı ile 5 farklı tarım üretim sistemini barındıran ve ülke üretiminin % 76’sını karşılayan 4 farklı ili araştırma bölgesi olarak seçmişler ve örnekleme yöntemlerini tesadüfi olarak gerçekleştirmişlerdir. Bir başka çalışmada Gera ve ark. (1997) yine tesadüfi örnekleme yolu ile elde ettiği pırasa izolatlarını ticari üretim yapılan seralardan toplamışlar, Klukackova ve ark. (2007) ise sarımsaklarda viral hastalık etmenlerini belirlemek amacı ile gerçekleştirdikleri çalışmada izolatlarını market ve pazarlardan herhangi bir örnekleme sistematigine dayanmadan tesadüfi olarak temin etmişlerdir. Tesadüfi örnekleme yönteminden farklı olarak Gilani ve ark. (2016) sarımsaklarda OYDV ve LYSV’nin yaygınlık ve dağılımını incelemek amacı ile

Pakistan'nın Punjap eyaletinde 4 farklı şehirde 29 tarladan 290 ve Khyber Pakhtunkhwa eyaletinde 8 farklı şehirde 40 farklı tarladan 400, toplam olarak 690 örneği, her bir tarlada Z çiçek şeklinde eşit mesafelerden, simptom oluşumu gözlemeksizin 10'ar örnek toplayarak sistematik bir örnekleme yolu izlemişlerdir. Benzer şekilde Ward ve ark (2009) da çalışmaları kapsamında örneklemelemlerini bir sistematik içerisinde gerçekleştirmişler ve bu amaçla, Yeni Zelanda'da bulunan Pukehoda Bölgesi'nde *Allium* cinsi bitkiler içerisinde yer alan süs bitkileri ve ticari önemi olan bitkileri her bir tarlada W çiçek şeklinde olmak üzere 50-100 arasında örnek toplamışlardır.

Tez kapsamında gerçekleştirilen arazi çalışmaları genelinde, farklı şiddetlerde olmak üzere, mozaik oluşumları, düzensiz sarı çizgiler ve renk açılmaları, yapraklarda yassılaşıma ve incelmeye, şekil bozuklukları, bodurlaşma, sararma, gelişme geriliği, yaprakların geriye doğru kıvrılması ve benzeri belirtiler gözlenmiştir.

Bu belirtiler, soğanların bir bölümünde sararma ve renk açılmaları ile sarı-yeşil çizgi şeklinde renk açılmalarının oluştuğu belirtiler, bir kısmında ise mozaik, boğum aralarında daralma, bodurluk, yapraklarda yassılaşıma ve genişleme, geriye doğru kıvrılma ile çokça sayıda ve ince yaprak oluşumları olarak saptanmıştır. Bu belirtileri gösteren soğan bitkilerinden bir kısmına ait fotoğraflar Şekil 4.2'de yer almaktadır.



Şekil 4.2. Örnekleme yapılan soğan bitkilerinin gösterdiği belirtiler; a, b, c, d: parlak sarı-yeşil çizgi oluşumu, e: boğum aralarında daralma, f: kıvrılma, g, h: bodurlaşma, boğum aralarında daralma ve renk açılmaları belirtileri

Pırasa bitkilerinde, orta damara paralel renk açılmaları ve çizgi oluşumları, mozaik, bodurlaşma ve bitki genelinde matlaşma belirtileri en sık gözlenen belirtiler olmuştur. Bu belirtilere ek olarak, gelişim geriliğine bağlı, gövde çapında daralma ve zayıf bitki oluşumları da sıklıkla gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Örnekleme yapılan pırasa bitkilerinin gösterdiği belirtiler; a, b: orta damara paralel renk açılmaları, çizgi oluşumları ve mozaik, c: yapraklarda matlaşma, d: bodurlaşma belirtileri

Sarımsaklarda erken dönemde genel olarak yapraklarda kıvrılma ve gelişme geriliği belirtileri saptanmıştır. Bu belirtiler soğanlarda ve pırasalarda görülen belirtilerin aksine daha çok tek tip olup, tarlaların genelinde yaygın olarak gözlenmiştir. Özellikle erken dönemde sıklıkla oluşan bu belirtileri taşıyan bitkilerde önemli ölçülerde gelişme geriliği gözlenmiştir. Bu belirtilerin dışında yapraklarda çizgi şeklinde renk açılmaları, sararma ve mozaik belirtileri de görülmüştür (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Örnekleme yapılan sarımsak bitkilerinin gösterdiği belirtiler; a, b: yapraklarda kıvrılma ve gelişme geriliği, c, d: çizgi şeklinde renk açılmaları, sararma ve mozaik belirtileri

Bu çalışmada saptanan belirtiler, literatür çalışmalarına paralellik göstermektedir. *Allium* cinsi bitkiler ile ilgili yapılan birçok çalışmada araştırmacılar, Potyvirusler veya diğer gruplara ait viral hastalık etmenleri tarafından enfekte edilen bitkileri, bu çalışmada gözlenen belirtilere benzer şekilde tanımlamışlardır. Bu çalışmalar arasında, Van Dijk (1993a), Diekmann (1997) ve Takaichi ve ark. (1998) Potyvirusler ve/veya Allexivirusler'in neden olduğu çeşitli *Allium* cinsi bitkilerin yaprakları üzerindeki görsel belirtiler için bu çalışma kapsamında toplanan örneklerin oluşturduğu belirtilere benzer şekilde, OYDV'nin parlak sarı-yeşil çizgilere, LYSV'nin ise genç yapraklarda düzensiz açık ve koyu yeşil çizgilere neden olduğunu ifade etmişlerdir. Bos (1976), OYDV'nin konukçularında mozaik ve sarı çizgi belirtileri, şerit oluşumları, çiçek saplarının kıvrılması ve yapılarının bozulması, çiçek ve tohum sayısının azalması ve tohum kalitesinin bozulmasına neden olduğunu bildirmiştir. Kumar ve ark. (2012) enfekteli olduğunu bildirdikleri izolatlarını, bu çalışmada toplanan soğan örneklerinin oluşturduğu belirtilere benzer şekilde; sararma, bitki yapısında bozulma ve yapraklarda kıvrılma şeklinde ifade etmişlerdir. Korkmaz ve Çevik (2009), pırasa bitkilerinde LYSV'nin neden olduğu semptomlara benzer mozaik, sarı çizgi, zayıflama ve bodurluk semptomlarını, Chen ve Adams (2001), mozaik belirtisi gösteren sarımsak bitkilerini, Dovas ve Vovlas (2003), sarımsak ve soğan ekim alanlarında, büyüme geriliği, klorotik çizgiler ile yapraklarında kıvrılma ve sararma belirtilerini, Sivaprasad ve ark. (2017) yapraklarında düzensiz çizgiler, aşağı doğru kıvrılma ve bodurlaşma belirtileri gözlemledikleri ve hastalıklı olduğunu düşündükleri soğan izolatlarını bu çalışmada gözlenen belirtilere benzer olarak rapor etmişlerdir. Çalışmada, literatür çalışmalarına paralel olarak benzer belirtiler gösteren ve enfekteli olduğu düşünülen örnekler ile birlikte normal seyrinin dışında belirti gösteren ve az sayıda semptom göstermeyen 494 örnek toplanmış ve bu örneklerde LYSV, OYDV ve TuMV hastalık etmenlerinin varlığı DAS-ELISA ile belirlenmiştir.

4.2. DAS-ELISA Testi Bulguları

Arazi çalışmaları sonucunda toplanan pırasa, sarımsak ve soğan örneklerinin oluşturduğu 494 örneğin tamamı OYDV, LYSV ve TuMV hastalık etmenlerine karşı DAS-ELISA analizleri ile test edilmiştir. Analizlerde örneklere ait yaprak dokuları kullanılmış olup, sonuçlar pozitif ve negatif kontroller varlığında ELISA okuyucusunda değerlendirilmiştir. DAS-ELISA bulguları sonucunda elde edilen 494 örneğe ait iller ve türler düzeyinde hastalıklı bitki sayıları ve toplam bitki sayıları Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. İller ve türler düzeyinde hastalıklı bitki sayıları ve toplam bitki sayıları

	LYSV				OYDV				LYSV+OYDV				TuMV			
	Çanakkale	Balıkesir	Bursa	Toplam	Çanakkale	Balıkesir	Bursa	Toplam	Çanakkale	Balıkesir	Bursa	Toplam	Çanakkale	Balıkesir	Bursa	Toplam
Pırasa	27/62	10/32	11/48	48/142	10/62	3/32	5/48	18/142	9/62	6/32	6/48	21/142	0/62	0/32	0/48	0/142
Soğan	1/48	0/33	2/116	3/197	5/48	0/33	0/116	5/197	1/48	1/33	0/116	2/197	0/48	0/33	0/116	0/197
Sarımsak	0/40	1/98	0/17	1/155	26/40	41/98	10/17	77/155	3/40	8/98	1/17	12/155	0/40	0/98	0/17	0/155
Toplam	28/150	11/163	13/181		41/150	44/163	15/181		13/150	15/163	7/181		0/150	0/163	0/181	
	52/494				100/494				35/494				0/494			

Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi DAS-ELISA bulguları sonucunda toplam 494 örneğin 187'si, LYSV ve/veya OYDV ile enfekteli olarak (% 37,85) bulunurken, örneklerin hiçbirinde TuMV enfeksiyonları tespit edilememiştir. Bu örneklerden 52'sinin (% 10,52) yalnızca LYSV ile 100'ünün ise (% 20,24) tek başına OYDV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 35 örnekte (% 7,08) karışık enfeksiyon (OYDV+LYSV) bulunduğu tespit edilmiştir.

LYSV ile enfekteli türler arasında, pırasa izolatları (% 92,30), OYDV ile enfekteli bitkiler arasında ise sarımsak izolatları (% 77) en fazla enfeksiyonu oluşturmuştur. Pırasa, sarımsak ve soğan bitkileri içerisinde hastalıklı bitki sayıları ve toplam bitki sayıları esas alınarak belirlenen enfeksiyon yüzdelerine göre en fazla pırasaların (% 61,26) en az ise soğan (% 5,07) bitkilerinin enfekteli olduğu saptanmış, sarımsak bitkilerinde ise enfeksiyon oranı % 58,06 olarak belirlenmiştir.

Çanakkale ili ve ilçelerinden toplanan 150 örneğin, 82'si (% 54,66) LYSV ve/veya OYDV ile enfekteli bulunmuştur. Bu ilde LYSV enfeksiyonları % 18,66, OYDV enfeksiyonları % 27,33 olarak belirlenirken, karışık enfeksiyon oranı ise % 8,66 olarak belirlenmiştir. Balıkesir ili ve ilçelerinden toplanan 163 örnekte 70'i (% 42,94) LYSV ve/veya OYDV ile enfekteli bulunmuştur. Balıkesir ilinde LYSV enfeksiyonları % 6,74, OYDV enfeksiyonları % 26,99 karışık enfeksiyon oranı ise % 9,20 olarak tespit edilmiştir. Bursa ili ve ilçelerinde 181 örnek viral etmenlere karşı test edilmiş ve bu analizler sonucunda örneklerin 35'inde (% 19,33) LYSV ve/veya OYDV enfeksiyonları belirlenmiş, LYSV enfeksiyonları % 7,81, OYDV enfeksiyonları % 8,28, karışık enfeksiyon oranı ise % 3,86 olarak saptanmıştır. Çalışma kapsamında, farklı üretim sezonları süresince toplanan örneklerin DAS-ELISA yöntemi ile test edilmesi sonucu belirlenen enfekteli bitki sayısı oranlarının, surveyler sırasında farklı üretim alanlarının seçimi, iklimsel değişiklikler ve bu değişikliklerin viral etmenlerin vektörler ile taşınmaları üzerine etkileri, üretim deseninin ve tarla büyüklüklerinin lokasyonlara göre farklılık göstermesi ve yıldan yıla ekilen ürünlerin değişkenlik göstermesi gibi etkenlerden dolayı farklılık gösterdiği düşünülmektedir.

Dünya literatürlerinde, bu çalışmada olduğu üzere, DAS-ELISA bulguları sonucunda LYSV ve OYDV enfeksiyonlarının varlığının ve enfeksiyon oranlarının bildirildiği birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar içerisinde Şevik ve Akcura (2013), Amasya'da soğan üretim alanlarından topladıkları 332 örneğe uyguladıkları DAS-ELISA testleri sonucunda örneklerin 57'sinde (% 17,16) OYDV ve/veya LYSV etmenlerinin varlığını belirlemiş ve en fazla enfeksiyonun bu çalışmaya benzer şekilde OYDV'de (% 12,33)

olduğunu, LYSV enfeksiyonlarının ise % 3,60 olduğunu bildirmişlerdir. Dovas ve ark. (2001) Yunanistan'da *Allium* cinsi bitkilerde her iki etmenin varlığını belirlemişler ve enfeksiyon oranlarını OYDV için % 98,5 ve LYSV için ise % 98,7 olarak bildirmişlerdir. Kluckackova ve ark. (2007) sarımsaklarda oluşan virüs enfeksiyonlarının varlığının belirlenmesi üzerine gerçekleştirdikleri çalışmada enfeksiyon oranlarını OYDV için % 75,4, LYSV için % 31,2 olarak belirlemişlerdir.

Bu çalışma kapsamında elde edilen izolatların hiçbirinde TuMV ile enfekteli örnek saptanamamıştır. Dünya literatürlerinde bu çalışmanın sonuçlarından farklı olarak *Allium* cinsi bitkilerde TuMV'nin varlığını işaret eden az sayıda çalışma yer almaktadır. Bu çalışmalar içerisinde Stefanac ve Plese (1980) Yugoslavya'da, Barg ve ark. (1994) Almanya'da, Alper ve ark. (1984), Cohen ve ark (1996) İsrail'de yaptıkları çalışmalar ile *Allium* cinsi bitkilerde TuMV'nin varlığını rapor etmişlerdir.

Bu tez çalışması kapsamında toplanan örnekler içerisinde enfekteli pırasa ve sarımsak bitkilerinde OYDV ve LYSV izolatlarının genel olarak ayırt edici olmayan benzer belirtiler oluşturduğu görülmüştür. Bu belirtileri oluşturan enfekteli pırasa ve sarımsak bitkilerine ait fotoğraflardan bazıları sırası ile Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.5. DAS-ELISA testi sonucu enfekteli olduğu belirlenen ve orta damara paralel renk açılmaları ile çizgi oluşumuna neden olan pırasa bitkileri a: LYSV ile enfekteli pırasa izolatı, b: OYDV ile enfekteli pırasa izolatı



Şekil 4.6. DAS-ELISA testi sonucu enfekteli olduğu belirlenen ve yapraklarında sararma, renk açılmaları ile mozaik oluşumuna neden olan sarımsak bitkileri a: LYSV ile enfekteli sarımsak izolatu, b: OYDV ile enfekteli sarımsak izolatu

Çalışmada, viral hastalık etmenleri ile enfekteli olduğu düşünülen çok sayıda soğan örneği toplanmış ve bu örneklerde LYSV ve/veya OYDV etmenlerinin varlığının son derece sınırlı olduğu sonuçlarına ulaşılmıştır. Soğanlarda düşük enfeksiyon bulgularının sebepleri incelendiğinde bu durumun nedenleri arasında LYSV ve/veya OYDV ile bulaşık olduğu şüphelenilen soğan örneklerinin, Carlavirüs ve Alexivirüs belirtileri ya da *Onion yellows phytoplasma* belirtisi ile yakın benzerlik göstermesi, virüs konsantrasyonlarının ELISA yöntemi ile saptanamayacak kadar düşük olabilmesi ya da mevcut ırkların, soğan izolatlarını enfekte edemeyen streynlerden oluşması gibi nedenlerin yer aldığı düşünülmektedir.

DAS-ELISA testleri sonucunda, pırasa bitkilerinde LYSV enfeksiyonlarının (% 33,80), sarımsak bitkilerinde ise OYDV enfeksiyonlarının (% 49,67) daha yaygın olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca toplam bitki sayısı içerisinde her iki etmenin oluşturduğu enfeksiyon yüzdeleri kıyaslandığında, OYDV enfeksiyonlarının daha yaygın olduğu belirlenmiştir. OYDV ve LYSV etmenlerinin yaygınlık oranlarının, bölgede yetiştiriciliği yapılan *Allium* cinsi bitkilere, kullanılan tohumlara ve etmenlerin streynlerine bağlı olarak değişkenlik gösterdiği düşünülmektedir. Benzer çalışmalarda da araştırmacıların her iki etmenin oluşturduğu enfeksiyonlar arasında farklılıkları rapor ettikleri gözlenmiştir. Bu

çalışmadaki sonuçları destekler niteliği taşıyan bazı çalışmalarda Canavelli ve ark. (1998); Lot ve ark. (1998) OYDV'nin, Fransa ve Arjantin gibi ülkelerde oluşturduğu yüksek enfeksiyon oranları ile sarımsakların sertifikasyonunda tek endişe kaynağı oluşturan etmen olduğunu bildirmişlerdir. Buna ek olarak, Klukackova ve ark. (2007) Çekya'da, Dovas ve ark. (2001) Yunanistan'da, Dovas ve Vovlas (2003) Yunanistan ve İtalya'da OYDV enfeksiyonlarını LYSV enfeksiyonlarına göre daha yaygın olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen bulgulardan farklı olarak, Daniels (1999) ve Fajardo ve ark. (2001) Brezilya'da Takaichi ve ark. (1998; 2001) Japonya'da, LYSV enfeksiyonlarının OYDV enfeksiyonlarına oranla daha yaygın olduğunu rapor etmişlerdir.

Bitki virüs hastalıklarının teşhisinde birçok yöntem kullanılabilirle beraber bu yöntemler içerisinde serolojik bir yöntem olan DAS-ELISA yöntemi, düşük maliyetleri, kolay uygulanabilir olması, moleküler yöntemlere oranla daha az bilgiye ihtiyaç duyulması ve çok sayıda örneğin aynı anda test edilebilmesi avantajları ile bilinen bir yöntemdir. ELISA analizlerinin, bahsedilen bu avantajlarının yanı sıra dezavantajları da bulunmaktadır. Serolojik açıdan oldukça benzerlik gösteren LYSV ve OYDV etmenleri özellikle kılıf protein sekanslarının benzerliği nedeni ile DAS-ELISA yönteminde çapraz reaksiyonlar oluşturabilirler. Bu durumun oluşturduğu dezavantajlar farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Bunlar içerisinde Conci ve ark. (1999) diğer virüs gruplarının aksine Potyviruslerde oluşabilecek çapraz reaksiyonların, sonuçların yanlış yorumlanmasına neden olabileceği için serolojik yöntemlerin iyi bir parametre olmadığını, Shukla ve Ward (1988) serolojinin, Potyviruslerin tespiti için kullanılabilir olduğunu ancak yöntemin taksanomi için uygun olmadığını, Arya ve ark. (2006) OYDV izolatlarının kılıf proteinlerinin N-terminal bölgesindeki değişkenliğinin, serolojik olarak farklı OYDV streynlerinin oluşumu ile sonuçlanabileceğini ve bu nedenle ELISA yönteminin, OYDV tespiti için tercih edilen bir yöntem olmadığını ileri sürmüşlerdir.

ELISA yönteminde test edilecek örneklerin optimizasyonu da uygulanabilirlik açısından önem arz etmektedir. Bu bağlamda survey zamanı, bitkiden örnek alınacak kısım ve saklama koşulları, sonuçların değerlendirilmesinde önemli farklılıklar oluşturabilir. Dovas ve ark. (2001) sarımsaklarda yaşlı yaprakların kullanımının LYSV'nin DAS-ELISA ile test edilmesinde sorun oluşturduğunu, LYSV ve OYDV ile enfekteli örneklerin -30° C'de 6 ay bekletildikten sonra negatif sonuç verdiğini, 4 °C'de saklandığında ise ilk 12 gün içerisinde testlerin gerçekleştirilmesi gerektiğini, aksi takdirde bitki hücrelerindeki degradasyondan ve virüslerin enzimlere maruz kalmasından dolayı konsantrasyonlarda azalmalar meydana geldiğini rapor etmişlerdir.

Bu çalışma kapsamında toplanan izolatlar, 4 °C’de saklanmış ve survey çalışmalarını takiben birkaç gün içerisinde DAS-ELISA ile test edilmişlerdir. Dovas ve ark. (2001), virüs konsantrasyonunun dağılımının, gelişimini tamamlamış genç yapraklarda, yaşlı yapraklara ve bitkinin orta kısmında bulunan aksanlara oranla daha yoğun olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada gerçekleştirilen ELISA testlerinde bu bilgiyi destekler nitelikte, bitkilerin genç yapraklarından ve ayrıca semptomların belirgin olduğu kısımlardan alınan örnekler ile analizler gerçekleştirilmiştir.

Günümüzde ELISA yöntemi, bitki virüs hastalıklarının teşhisinde sık kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir. Potyvirus grubu üyesi LYSV ve OYDV etmenleri gibi birbirlerine serolojik olarak oldukça benzerlik gösteren etmenlerin teşhisinde mutlaka daha hassas olan moleküler yöntemler ile ELISA bulguları desteklenmelidir.

4.3. RT-PCR Testi Bulguları

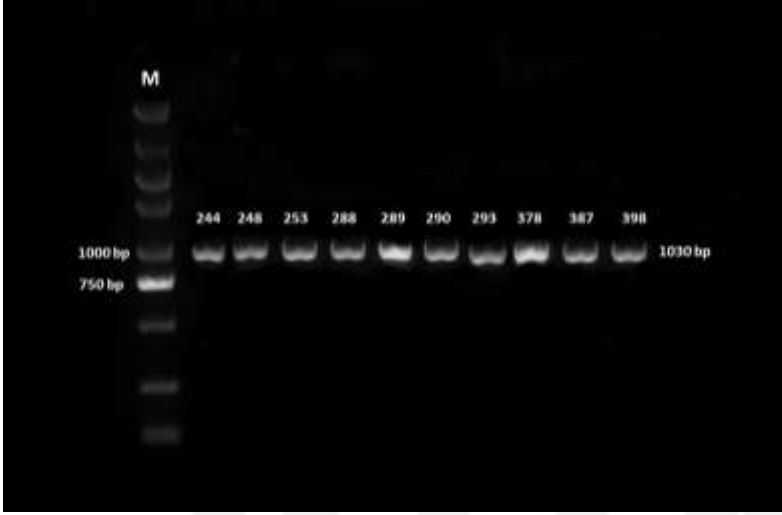
RT-PCR analizleri, klonlama çalışmaları için gerçekleştirilmiş olup, DAS-ELISA testleri sonucunda enfekteli olduğu belirlenen izolatlar arasından LYSV ve OYDV için 10’ar izolat belirlenerek RT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. RT-PCR analizleri ile aynı zamanda bu izolatlara ait DAS-ELISA bulguları da desteklenmiştir.

RT-PCR analizleri için seçilen izolatlar, DAS-ELISA testleri sonucu enfekteli olduğu belirlenen izolatlar arasından ve yüksek absorbans verenler içerisinde, elde edildikleri bölgeler ve türler göz önünde bulundurularak seçilmiştir. RT-PCR çalışmaları için kullanılan LYSV ve OYDV izolatları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

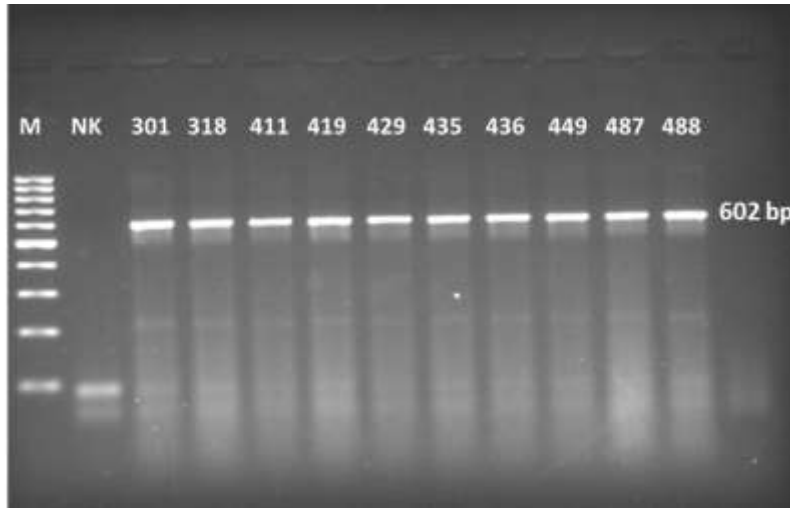
Çizelge 4.4. RT-PCR çalışmaları için kullanılan LYSV ve OYDV izolatları

İzolat Adı	LYSV		İzolat No.	OYDV	
	Konukçu	Toplandığı Yer		Konukçu	Toplandığı Yer
ÇAN 244	Pırasa	Çanakkale	BUR 301	Sarımsak	Bursa
ÇAN 248	Pırasa	Çanakkale	BUR 318	Sarımsak	Bursa
ÇAN 253	Pırasa	Çanakkale	ÇAN 411	Sarımsak	Çanakkale
BUR 288	Pırasa	Bursa	ÇAN 419	Sarımsak	Çanakkale
BUR 289	Pırasa	Bursa	ÇAN 429	Sarımsak	Çanakkale
BUR 290	Pırasa	Bursa	BAL 435	Sarımsak	Balıkesir
BUR 293	Sarımsak	Bursa	BAL 436	Sarımsak	Balıkesir
BAL 378	Sarımsak	Balıkesir	BAL 449	Sarımsak	Balıkesir
BAL 387	Sarımsak	Balıkesir	BUR 487	Pırasa	Bursa
BAL 398	Pırasa	Balıkesir	BUR 488	Pırasa	Bursa

RT-PCR çalışmalarının tamamlanmasından sonra elde edilen PCR ürünleri, DNA büyüklük markörleri ile birlikte ultraviyole ışık altında görüntülenerek analiz edilmiştir. LYDV ve OYDV izolatlarına ait RT-PCR analizleri sonucu görüntüleri Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.7. LYDV izolatlarına ait RT-PCR sonuçları: M: Markör (100-5000 bp), ÇAN 244 (Pırasa), ÇAN 248 (Pırasa), ÇAN 253 (Pırasa), BUR 288 (Pırasa), BUR 289 (Pırasa), BUR 290 (Pırasa), BUR 293 (Sarımsak), BAL 378 (Sarımsak), BAL 387 (Sarımsak) BAL 398 (Pırasa) enfekteli izolatlar



Şekil 4.8. OYDV izolatlarına ait RT-PCR analizleri sonucu: M: Markör (100-5000 bp), NK: Negatif Kontrol, BUR 301 (Sarımsak), BUR 318 (Sarımsak), ÇAN 411 (Sarımsak), ÇAN 419 (Sarımsak), ÇAN 429 (Sarımsak), BAL 435 (Sarımsak), BAL 436 (Sarımsak), BAL 449 (Sarımsak), BUR 487 (Pırasa), BUR 488 (Pırasa) enfekteli izolatlar

RT-PCR çalışmaları, klonlama analizlerinde kullanılmak üzere gerçekleştirildiği için seçilen izolatlar ile sınırlı tutulmuştur. Çalışmada, kalıp RNA moleküllerinin elde edilmesi için gerçekleştirilen RNA izolasyonu çalışmalarında RNA izolasyon kiti ve basit doğrudan tüpe bağlanma (SDT) yönteminin kullanılması sonuçlarda bir farklılık oluşturmamış ayrıca tek ve iki aşamalı olarak yürütülen analizlerin her ikisinde de istenilen sonuçlara ulaşılmıştır. Analizler sonucunda LYSV için 1030 bp, OYDV için ise 602 bp büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir.

Genomu RNA içeren bazı bitki virüsleri için bir PCR protokolünün geliştirilmesi mevcut tanılama teknolojisinin gelişimine katkı sağlamaktadır. PCR primerlerinin tasarımı için gerekli nükleotit dizileri birçok virüs için kolaylıkla bulunur, ancak bitki dokularındaki nükleik asit ekstraksiyonu, RT-PCR prosedürlerinde zahmetli ve zaman alıcı bir adımdır (Suehiro ve ark. 2005). Son yıllarda, bitki virüslerini RT-PCR kullanarak saptamak için basit ve hızlı teknikler ile ilgili çok sayıda rapor bulunmaktadır. Bunların arasında, direct binding (DB)-RT-PCR (Rowhani ve ark., 1995) ve tube capture (TC)-RT-PCR (James, 1999) yöntemleri fenol-kloroform ekstraksiyonu ve antikorlar kullanılmadan odunsu bitkilerin virüslerini tespit etmek için kolay ve kullanışlı protokollerdir. Bu yöntemlerde bağlanma, testte kullanılan tüplere virüs parçacıklarının tutunması temeline dayanır.

Bu ve benzeri yöntemlerin kullanılmasında RNA'ların elde edilmesi için harcanan sürelerin kısaltılabilmesi yeni teknikler ile gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemlerden birisi de Suehiro ve ark. (2005) tarafından geliştirilen ve bu çalışmada kullanılan (SDT) metodudur. Yöntem, inkübasyon sürelerini minimize etmesi ve santrifüj aşamalarının ekarte edilmesi sebepleri ile avantaj sağlamaktadır. Özellikle çok sayıda örneğin RT-PCR ile taranmasını gerektiren çalışmalar için düşük maliyetli ve pratik olması nedenleri ile tercih edilebilir bir yöntemdir. Araştırmacı, ilk olarak ipliksi yapıda partikülleri bulunan ve Potyvirus grubu üyesi olan TuMV'de geliştirdiği metodu, çubuk şeklinde partikülleri bulunan *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV; Tobamovirus) ve küre şeklinde partikülleri bulunan *Cucumber mosaic virus* (CMV; Cucumovirus) hastalık etmenlerinde de başarı ile kullanılmıştır.

Temaja ve ark. (2012) *Tomato chlorosis virus* (ToCV; Crinivirus), *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV; Crinivirus), *Chrysanthemum virus B*, (CVB; Carlavirus) ve *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), Kajihara ve ark. (2009) *Japanese yam mosaic virus* (JYMV) ve *Yam mild mosaic virus* (YMMV) hastalık etmenlerinin izolasyonunda SDT yöntemlerini kullanmışlardır. Ayrıca ülkemizde Korkmaz ve ark. (2011) *Citrus tristeza virus* (CTV), Tuzlalı (2012) *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), Karanfil (2014) *Lettuce*

mosaic virus (LMV) hastalık etmenlerinin RNA izolasyonlarında başarılı sonuçlar elde etmişlerdir.

Bu çalışmada, SDT yöntemi ile izolasyonlar gerçekleştirilmiş ve elde edilen RNA'lar çalışma sürecinde -80 °C'de saklanmıştır. Farklı zaman periyodlarında kullanılan RNA'ların uzun süreli muhafazalarının, etkinliklerinin azalmasına neden olduğu gözlemlenmiş ve bu nedenle süreçte RNA izolasyon kitinden de faydalanılmıştır. RNA izolasyon kitinin çalışma prensibi, silika esaslı bir membranın seçici bağlanma özelliklerinin yüksek hızlı mikrosipin teknolojisi ile kombinasyonu şeklinde açıklanabilir.

Günümüzde RNA izolasyon kitleri birçok araştırmacı tarafından kullanılmaktadır. Bu kitler farklı üretici firmalardan temin edilebilmektedir. *Allium* cinsi bitkiler ile gerçekleştirilen çalışmalarda da farklı üretici firmalara ait RNA izolasyon kitlerinin kullanımına ilişkin birçok literatür bulunmakta ve araştırmacılar firma önerileri doğrultusunda çalışmalarını gerçekleştirmektedirler. Lunello ve ark. (2005), Takaki ve ark. (2006), Klukackova ve ark. (2007), Ward ve ark. (2009), Fayad-Andre ve ark. (2011), Celli ve ark. (2013), Manglli ve ark. (2014), Scrace ve ark. (2015) *Allium* cinsleri ile ilgili yürüttükleri RT-PCR çalışmaları kapsamında RNA izolasyonlarında farklı üretici firmalara ait kitler ile analizlerini gerçekleştirmişlerdir.

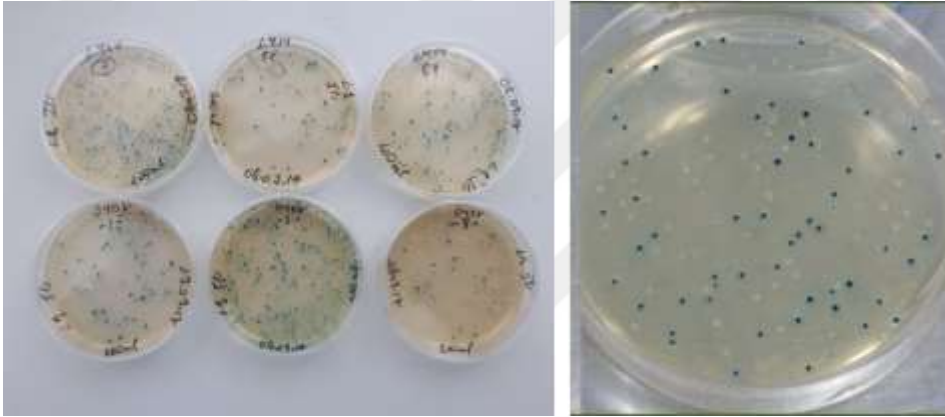
Bu çalışmada LYSV ve OYDV'ye özgü primerler ile sırası ile 1030 bp ve 620 bp büyüklüğünde DNA parçacıkları elde edilmiş ve elde edilen RT-PCR ürünleri klonlama çalışmalarında kullanılmıştır. PCR tabanlı analizlerde çoğaltılmak istenilen bölgeler çalışmanın amacına göre araştırmacılar tarafından belirlenebilmekte ve bu bölgelere ait genlerin başarılı bir şekilde çoğaltılabilmesi sağlanabilmektedir. *Allium* cinsi bitkilerde viral hastalık etmenlerinin moleküler olarak teşhis edilmesi üzerine birçok araştırma gerçekleştirilmiştir. Bunlar içerisinde, Sivaprasad ve ark. (2017), Zheng ve ark. (2008) tarafından Nib bölgesi esas alınarak tasarlanan universal primerler ile yürüttükleri çalışma ile kullandıkları izolatlara ait 350 bp boyutunda DNA parçacıkları elde etmişlerdir. Bir başka çalışmada Dovas ve Vovlas (2003), nuclear inclusion b (Nib) bölgelerinden dizayn ettikleri dejenere primerler ile tek aşamalı IC/RT-PCR yöntemini modifiye ederek *Allium* cinsi bitkilerde LYSV ve OYDV arasındaki tekli ya da karışık enfeksiyon farklılıklarını belirlemeyi amaçlamışlardır. İspanya'da gerçekleştirilen bir başka çalışma da Tabanera ve ark. (2017), ülkenin kuzey yarısında pırasalarda OYDV etmeninin varlığını belirlemek amacı ile bir çalışma yürütmüşler ve elde ettikleri izolatlarda gerçekleştirdikleri iki aşamalı RT-PCR çalışmaları sonucunda 234 bp boyutunda bantlar elde etmişlerdir.

4.4. Klonlama Analizi Bulguları

Klonlama analizi çalışmaları kapsamında, RT-PCR analizleri gerçekleştirilen 20 izolata ait (Çizelge 4.4) PCR ürünleri saflaştırılmış ve pGEM-T Easy plazmit vektörüne (Promega, ABD), Çevik ve ark. (1995) ve Jiang ve ark. (2008) tarafından belirtilen yöntem ile klonlanmıştır.

Çalışmada, öncelikle ligasyon ve transformasyonu gerçekleştirilen *E. coli* bakterilerinin LB besi (ampisilin, X-Gal, IPTG) ortamında oluşturduğu mavi-beyaz koloniler içerisinde LYSV ve OYDV genlerini içeren plazmitleri taşıdığı belirlenen beyaz bakterilerin seçimi gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında transformasyonu gerçekleştiren bakterilerin oluşturduğu mavi-beyaz kolonilere ait belirtiler Şekil 4.9.'da verilmiştir.



Şekil 4.9. *E. coli* bakterilerinin LB (ampisilin, X-Gal, IPTG) besi ortamında oluşturdukları mavi-beyaz koloniler

Bu petrilerden beyaz koloniler seçilerek, daha sonra kullanılmak üzere yalnızca ampisilin içeren LB katı besi ortamında büyütülmesi sağlanmıştır (Şekil 4.10).

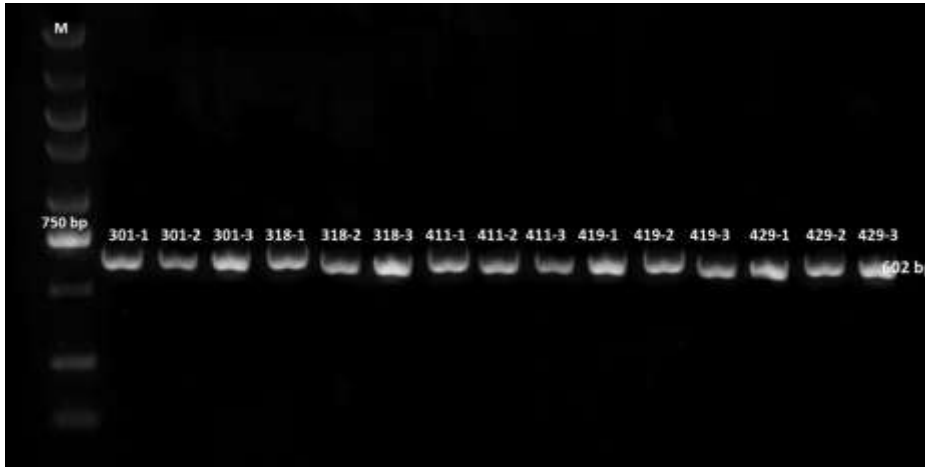


Şekil 4.10. Seçilen beyaz kolonilerin LB (ampisilin) besi ortamına çizimi

Klonlamaları gerçekleştirilen, LYSV ve OYDV genlerini içeren bakterilerin belirlenmesi mavi-beyaz kolonilerin seçimi ile yapılmış ve bu koloniler içerisinde beyaz kolonilerin hedeflenen genleri taşıyıp taşımadıklarını kesin olarak belirlemek için koloni PCR yöntemi ile beyaz kolonilerin taraması gerçekleştirilmiştir. Koloni PCR aşamasında her bir izolat için beyaz kolonilerden 3'er tanesi seçilmiştir. LYSV ve OYDV izolatların bir kısmına ait koloni PCR sonuçları sırası ile Şekil 4.11 ve Şekil 4.12.'de verilmiştir.

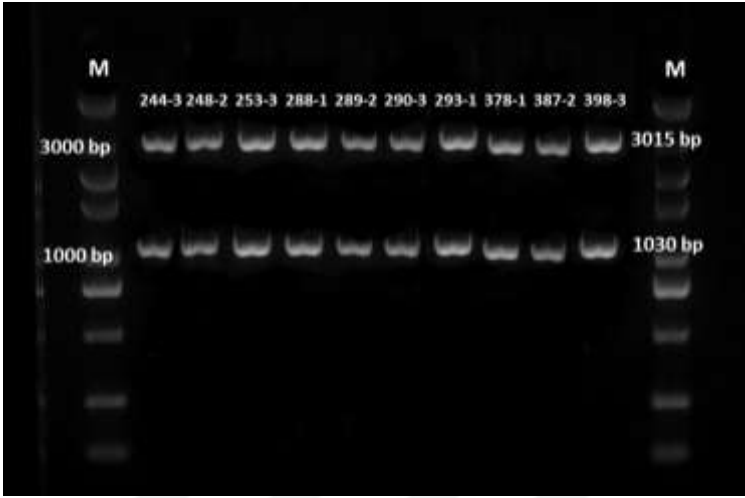


Şekil 4.11. LYSV izolatlarına ait koloni PCR sonuçları (M: Markör; ÇAN 244-1, ÇAN 244-2, ÇAN 244-3, ÇAN 248-1, ÇAN 248-2, ÇAN 248-3, ÇAN 253-1, ÇAN 253-2, ÇAN 253-3, BUR 290-1, BUR 290-2, BUR 290-3, BUR 293-1, BUR 293-2, BUR 293-3 izolat numaraları)

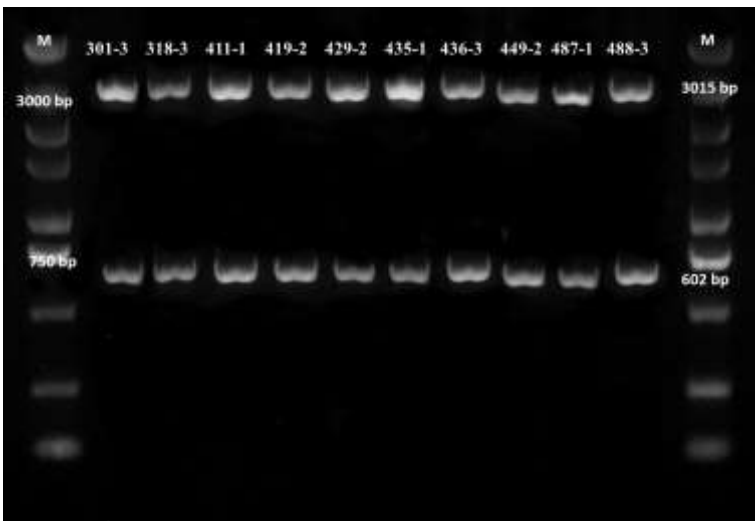


Şekil 4.12. OYDV izolatlarına ait koloni PCR sonuçları (M: Markör; BUR 301-1, BUR 301-2, BUR 301-3, BUR 318-1, BUR 318-2, BUR 318-3, ÇAN 411-2, ÇAN 411-3, ÇAN 419-1, ÇAN 419-2, ÇAN 419-3, ÇAN 429-1, ÇAN 429-2, ÇAN 429-3 izolat numaraları)

Pozitif çıkan kolonilerden plazmit izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan bu plazmit DNA'lar, T-A klonlaması yapılan bölgenin her iki yanında bulunan *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesme bölgelerinden kesilerek DNA parçası plazmitten ayrılmıştır. Kesilen DNA'lar daha sonra agaroz jelde incelenmiş ve 3015 bp büyüklüğünde pGEM-T Easy plazmit DNA'sı ile LYSV ve OYDV genlerine ait bantlar görüntülenmiştir. LYSV ve OYDV genleri taşıyan plazmitlerin *EcoRI* enzimi ile kesilmesi sonucunda elde edilen sonuçlara ait jel fotoğrafları sırası ile Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te gösterilmektedir.



Şekil 4.13. LYSV geni içeren plazmitlerin *EcoRI* enzimi ile kesimine ait jel görüntüsü (M: Markör; ÇAN 244-3, ÇAN 248-2, ÇAN 253-3, BUR 288-1, BUR 289-2, BUR 290-3, BUR 293-1, BAL 378-1, BAL 387-2, BAL 398-3 plazmitlere ait örnek numaraları)



Şekil 4.14. OYDV geni içeren plazmitlerin *EcoRI* enzimi ile kesimine ait jel görüntüsü (M: Markör; BUR 301-3, BUR 318-3, ÇAN 411-1, ÇAN 419-2, ÇAN 429-2, BAL 435-1, BAL 436-3, BAL 449-2, BUR 487-1, BUR 488-3 plazmitlere ait örnek numaraları)

Klonlama analizlerinin aşamaları sorunsuz olarak gerçekleştirilmiştir. LYSV ve OYDV genlerini içerdiği bilinen 20 izolat başarı ile klonlanmış ve *EcoRI* restriksiyon enzimiyle kesme işlemi ardından elde edilen plazmit DNA sekans analizlerine gönderilmiştir.

Klonlama analizleri, hedef alınan bir genin konukçu hücre tarafından çoğaltılmasının sağlanması prensibine dayanmaktadır. Yöntemde bir DNA parçasının vektör içine sokularak rekombinant DNA molekülleri oluşturulur ve konukçu hücre içine gönderilir. Konukçu olarak sıklıkla *Escherichia coli* bakterisi kullanılır ve konukçu hücre içindeki vektör çok sayıda kopyasını taşıdığı genleri de kopyalayarak oluşturur. Yapay olarak *In vitro* koşullarda kazanılan rekombinant DNA molekülü, hücre bölünmelerinin ardından koloniler oluşturur. Bu kolonideki her bir hücre en az bir veya daha fazla rekombinant DNA molekül kopyasını içerir ve bu sayede gen klonlanmış olur.

Genlerin, gen parçacıklarının ve diğer DNA dizilerinin klonlanması, günümüzde moleküler biyolojinin yaygın bir unsuru haline gelmiştir. Belirli bir DNA sekansının fonksiyonunu incelemek için çeşitli modifikasyonlar uygulanabilmektedir. Bu modifikasyonlar, PCR yöntemi ile veya restriksiyon enzimleri ile arzu edilen DNA fragmanlarını, en yaygın *E. coli* olan ve canlı hücrelerde çoğaltılabilen klonlama vektörlerine kesip yapıştırmak şeklinde gerçekleştirilebilmektedir. Bunlardan PCR kullanımı, DNA'ların her seferinde bir vektöre iletilmeden ve miktarının azalması durumunda hedef DNA'yı yeniden artırma seçeneği sunması açısından bir avantajı sahiptir. Alternatif olarak PCR ürünleri daha sonraları *E. coli*'ye transfer edilebilen ve çoğaltılabilen uygun bir vektör içine bağlanabilir. Klonlama yöntemleri, PCR sırasında Taq DNA polimeraz gibi 3' 5' ekzonükleaz aktivitesi olmayan DNA polimerazlar ile çoğaltılan DNA'ların 3' ucuna fazladan bir Adenin (A) eklenmesine dayanmaktadır. Taq DNA polimeraz gibi 3' 5' ekzonükleaz aktivitesine sahip olmayan ve bir DNA polimeraz kullanılarak üretilen PCR ürünleri, her bir DNA zincirinin 3' ucunda tek bir bağımsız nükleotit içerir (Clark, 1988; Newton ve Graham, 1994). En yaygın olarak Adenin (A) olan bu tek nükleotit uzantısı, tamamlayıcı bir 3'tek Timin uzantısına sahip T-vektörleri ile hibridizasyona ve klonlamaya izin verir. *Pfu* DNA polimeraz gibi bir düzeltme DNA polimerazı kullanılarak üretilen PCR ürünleri, küt uçlara sahiptir ve bir küt uçlu vektör içine klonlanır veya bir T vektörüne bağlanmak için eklenen tek bir 3'A çıkıntıya ihtiyaç duyulur (Knoche ve Kephart, 1999). Bu şekilde çoğaltılan 3' ucunda fazladan bir adenin içeren DNA'lar 5' ucunda bir tane Timin (T) taşıyan T-A klonlama vektörleri olarak

adlandırılan plazmitler ile birleştirilmekte ve PCR ürünleri DNA ligaz enzimi yardımı ile plazmit vektörlerine klonlanmaktadır.

4.5. Sekans ve Filogenetik Analizi Çalışmaları Bulguları

Bu çalışma kapsamında, çoklu dizi karşılaştırmaları nükleotit ve amino asit düzeylerinde gerçekleştirilmiştir. Sekans analizleri sonucunda elde edilen ham DNA dizileri üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda LYSV'nin kılıf protein geninin tamamı ile Nİb bölgesinin bir bölümünü içeren 1030 bp ve 1032 bp, OYDV için ise kılıf protein bölgesinin 602 bp'lik bölümünü içeren DNA dizileri elde edilmiştir. Elde edilen bu DNA dizilerinden OYDV için tamamı çoklu dizi karşılaştırmaları ve filogenetik analizlerde kullanılırken, LYSV için ise gen bankası veri tabanlarında yapılan karşılaştırmalar sonucunda elde edilen yaklaşık 1032 bp'lik kısma karşılık gelen yeterli sayıda ve farklı coğrafi bölgelerden izolatların bulunmaması nedeni ile 964 bp'lik kısmı kullanılmıştır. Sekans ve filogenetik analiz çalışmalarında Çizelge 4.4'te belirtilen izolatlar kullanılmıştır. Bu izolat numaralarına ilaveten Bursa izolatları için BUR, Balıkesir izolatları BAL ve Çanakkale izolatları için ÇAN ön ekleri kullanılarak izolatlar adlandırılmıştır. Dünyanın farklı bölgelerinden toplanan izolatlar ise gen bankasında bulunan erişim numaraları ile verilmiştir. Çalışmada kullanılan dünya izolatlarına ait erişim numaraları, elde edildiği ülke (orijin) ve konukçu bilgileri Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Sekans ve filogenetik analizlerinde kullanılan dünya izolatları

LYSV			OYDV		
Erişim No.	Orijin	Konukçu	Erişim No.	Orijin	Konukçu
X89711	Almanya	Pırasa	JX433020	Almanya	Soğan
KF597284	Avustralya	Sarımsak	JX433019	Arjantin	Soğan
AY007693	Arjantin	Pırasa	AB219833	Japonya	Sarımsak
AB005612	Japonya	Pırasa	KF623541	Sudan	Soğan
DQ299381	Çekya	Sarımsak	AJ409311	Çin	Sarımsak
JQ899450	Avustralya	Sarımsak	KF862685	Polonya	Sarımsak
DQ299380	Çekya	Sarımsak	AJ292223	Çin	Sarımsak
AB194623	Japonya	Sarımsak	DQ925455	Vietnam	Pırasa
KR075504	Sırbistan	Pırasa	JX429964	İspanya	Sarımsak
KF597283	Meksika	Sarımsak	KJ451436	Hindistan	Soğan

4.5.1. Sekans Analizi Bulguları

Çalışma kapsamında Bursa, Balıkesir ve Çanakkale illerinden toplanan eşit sayıda LYSV ve OYDV izolatları için elde edilen DNA dizilerinin kendi içlerinde ve dünya izolatları ile gerçekleştirilen çoklu dizi karşılaştırmaları, Clustal W programında nükleotit ve amino asit düzeylerinde gerçekleştirilmiştir.

4.5.1.1. Nükleotit Düzeyinde Çoklu Dizi Karşılaştırmaları

Güney Marmara Bölgesi, LYSV izolatlarının DNA dizilerinin kendi aralarında gerçekleştirilen çoklu nükleotit ve amino asit dizi analizleri sonucunda sırası ile % 79,55-99,81 ve % 80,69-100 benzerlik gösterdiği, OYDV izolatlarının DNA dizilerinin kendi aralarında gerçekleştirilen çoklu nükleotit ve amino asit dizi analizleri sonucunda ise sırası ile % 76,25-99,67 ve % 83,50-100 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Güney Marmara Bölgesi'nden elde edilen izolatların, gen bankasında bulunan ve dünyanın farklı bölgelerinden (Almanya, Avusturya, Arjantin, Japonya, Çekya, Sırbistan, Meksika, Sudan, Polonya, İspanya ve Vietnam) 11'i sarımsak, 3'ü soğan ve 5'i pırasa olmak üzere 20 izolat ile gerçekleştirilen çoklu dizi karşılaştırmalarında ise sırası ile nükleotit ve amino asit düzeylerinde LYSV için % 77,90-99,27 ve % 78,19-99,69, OYDV için ise % 74,09-84,72 ve % 79,00-92,50 arasında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bursa, Balıkesir ve Çanakkale illerini temsil eden LYSV izolatlarının nükleotit dizi benzerlik oranları Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Güney Marmara Bölgesi *Leek yellow stripe virus* izolatlarının nükleotit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları (%)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BAL 378	1		99,13	98,83	80,14	79,75	80,72	80,72	80,72	79,84	80,81
BUR 293	2	99,13		98,74	80,14	79,55	80,72	80,72	80,72	79,84	80,81
BAL 387	3	98,83	98,74		80,33	79,75	80,91	80,91	80,91	80,04	81,01
ÇAN 253	4	80,14	80,14	80,33		97,67	91,09	91,09	91,09	91,09	91,38
ÇAN 248	5	79,75	79,55	79,75	97,67		91,86	91,86	91,86	92,25	91,76
BUR 289	6	80,72	80,72	80,91	91,09	91,86		99,81	99,32	97,77	97,67
BUR 290	7	80,72	80,72	80,91	91,09	91,86	99,81		99,52	97,97	97,87
BUR 288	8	80,72	80,72	80,91	91,09	91,86	99,32	99,52		98,06	97,97
BAL 398	9	79,84	79,84	80,04	91,09	92,25	97,77	97,97	98,06		96,80
ÇAN 244	10	80,81	80,81	81,01	91,38	91,76	97,67	97,87	97,97	96,80	

Çizelge 4.6’da görüldüğü üzere, LYSV için elde edilen DNA dizilerinin kendi aralarında gerçekleştirilen çoklu nükleotit dizi analizleri sonucunda, ÇAN 248 pırasa izolatu, BUR 293 sarımsak izolatu ile % 79,55 benzerlik göstererek en az benzerlik taşıyan izolatları oluşturmuşlardır. Bu izolatları takiben ÇAN 248 pırasa izolatu, BAL 378 ve BAL 387 sarımsak izolatları ile % 79,75 benzerlik göstermiştir. ÇAN 248 ve BUR 293 ile ÇAN 243, BAL 378 ve BAL 387 izolatlarının birbirlerine uzak mesafelerde bulunması ve farklı konukçulardan oluşması, benzerlik oranlarının da uzak olmasına neden olmaktadır. Ayrıca pırasalarda LYSV’nin vektör böcekler ile aktif bir şekilde taşınması (Blackman ve Eastop, 2000), sarımsaklarda ise enfeksiyonların çoğunlukla, ağır viral enfeksiyonları oluşturan enfekteli vejetatif üretim materyalleri (dişler) ile bir ürün döngüsünden diğerine geçebilmesi (Conci ve ark., 2003) ile açıklanabilir. Enfekteli dişlerin, üretim materyali olarak uzak mesafelere yayılması, viral etmen ya da etmenlerin de kolaylıkla taşınmasını sağlar. En yakın benzerliği ise % 99,81 ile BUR 289 pırasa ve BUR 290 pırasa izolatları göstermiştir. Aynı bölgeden ve muhtemelen aynı fide üreticisinden temin edilen bu izolatların, oluşturduğu bu benzerlik oranlarının yüksek çıkması beklenen bir sonuçtur.

Güney Marmara Bölgesi, OYDV izolatlarına ait DNA dizilerinin kendi aralarında gerçekleştirilen çoklu dizi analizleri benzerlik oranı Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Güney Marmara Bölgesi *Onion yellow dwarf virus* izolatlarının nükleotit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları (%)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BUR 301	1		99,17	97,18	95,02	94,35	76,74	77,08	76,91	76,41	76,58
BAL 436	2	99,17		97,01	94,52	95,18	77,08	77,08	76,58	76,74	76,91
ÇAN 411	3	97,18	97,01		94,68	94,68	77,24	77,24	77,08	76,91	77,41
ÇAN 429	4	95,02	94,52	94,68		98,01	76,74	76,41	77,08	76,58	76,74
BUR 318	5	94,35	95,18	94,68	98,01		76,58	76,58	76,25	76,74	76,58
BAL 435	6	76,74	77,08	77,24	76,74	76,58		99,67	99,34	99,50	98,84
BUR 487	7	77,08	77,08	77,24	76,41	76,58	99,67		99,34	99,17	98,50
BUR 488	8	76,91	76,58	77,08	77,08	76,25	99,34	99,34		99,17	98,50
BAL 449	9	76,41	76,74	76,91	76,58	76,74	99,50	99,17	99,17		98,67
ÇAN 419	10	76,58	76,91	77,41	76,74	76,58	98,84	98,50	98,50	98,67	

Çizelge 4.7’de görüldüğü üzere, OYDV izolatlarına ait DNA dizilerinin kendi aralarında gerçekleştirilen çoklu dizi analizleri sonucunda % 76,25-99,67 oranlarında benzerlik elde edilmiştir. BUR 488 pırasa izolatu ile BUR 318 sarımsak izolatları % 76,25 benzerlik oranı ile en az benzerliğe sahip izolatları oluştururken, bu oranın kaynağı farklı

vejetatif üretim materyalleri ve/veya coğrafi uzaklıktan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. İzolatlar içerisinde en yüksek benzerlik oranlarını ise BAL 435 sarımsak ve BUR 487 pırasa izolatları arasında % 99.67 oranlarında görülmektedir. İller arasında uzak mesafeler olmasına rağmen benzerlik oranlarının yüksek olması, Bursa, Balıkesir ve Çanakkale illeri içerisinde sarımsak dişlerinin temininin genel olarak Balıkesir ilinden gelen dişlerle yapılması ile açıklanabilir. Bu dişler ile üretimi gerçekleştirilen sarımsak bitkileri, üretim alanlarında etmen virüslerin yaprak bitleri ile de kolayca taşınabilmeleri nedeni ile virüsün yayılabilmesi açısından konukçu görevi görebilmektedirler (Klukackova ve ark., 2007). Son dönemlerde bölgeye İran ve Çin sarımsağının giriş yapması, potansiyel tehlikenin artması ihtimalini kuvvetlendirmektedir. İkinci en yüksek benzerlik oranları ise BAL 449 ile BAL 435 sarımsak izolatlarında (% 99,50) görülmüştür. İzolatlar arasındaki bu benzerlik oranlarının yüksek çıkması üretim materyali olarak kullanılan dişlerin üreticiler arasında paylaşılmasından kaynaklanabilir.

Güney Marmara Bölgesi'nden toplanan LYSV izolatlarının, gen bankasında bulunan dünya izolatları ile gerçekleştirilen çoklu dizi karşılaştırmaları sonucunda nükleotit düzeylerinde % 77,90-99,27 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Benzerlik oranları Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Güney Marmara Bölgesi *Leek yellow stripe virus* izolatları ile dünya izolatlarının nükleotit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
BAL 378	1	99,06	99,27	98,75	79,46	79,46	79,56	78,53	79,56	78,42	78,32	79,46	78,84	78,53	78,11	79,46	78,94	78,63	79,25	78,84	
BUR 293	2	99,06		99,17	98,65	79,46	79,46	79,56	78,53	79,56	78,42	78,11	79,46	78,84	78,32	78,11	79,67	79,05	79,05	78,84	79,05
KF597283	3	99,27	99,17		98,86	79,88	79,88	79,98	78,94	79,98	78,63	78,32	79,67	79,05	78,73	78,42	79,67	78,73	79,05	79,05	79,05
BAL 387	4	98,75	98,65	98,86		79,67	79,67	79,77	78,73	79,77	78,63	78,22	79,67	79,05	78,53	77,90	79,46	78,53	78,84	79,05	78,84
BUR 289	5	79,46	79,46	79,88	79,67		99,79	99,38	97,61	97,51	95,85	93,57	96,37	90,46	91,39	89,32	84,13	83,82	84,23	84,02	84,13
BUR 290	6	79,46	79,46	79,88	79,67	99,79		99,59	97,82	97,72	96,06	93,78	96,58	90,46	91,39	89,32	84,34	84,02	84,44	84,23	84,34
BUR 288	7	79,56	79,56	79,98	79,77	99,38	99,59		98,03	97,93	96,27	93,98	96,78	90,56	91,49	89,21	84,23	83,71	84,34	83,92	84,65
BAL 398	8	78,53	78,53	78,94	78,73	97,61	97,82	98,03		96,58	95,33	93,46	95,44	90,46	91,80	88,59	83,61	83,30	83,92	83,40	83,40
ÇAN 244	9	79,56	79,56	79,98	79,77	97,51	97,72	97,93	96,58		95,23	93,05	95,44	90,77	91,29	89,11	84,13	83,82	84,34	83,40	84,54
KR075504	10	78,42	78,42	78,63	78,63	95,85	96,06	96,27	95,33	95,23		91,91	94,71	89,42	90,04	89,21	84,02	83,82	83,92	83,20	84,13
AY007693	11	78,32	78,11	78,32	78,22	93,57	93,78	93,98	93,46	93,05	91,91		94,81	88,49	89,11	86,72	83,20	82,99	83,82	83,09	82,99
X89711	12	79,46	79,46	79,67	79,67	96,37	96,58	96,78	95,44	95,44	94,71	94,81		90,25	90,87	89,00	84,54	84,02	85,06	84,44	84,54
ÇAN 253	13	78,84	78,84	79,05	79,05	90,46	90,46	90,56	90,46	90,77	89,42	88,49	90,25		97,61	88,49	83,82	84,85	85,06	85,27	83,82
ÇAN 248	14	78,53	78,32	78,73	78,53	91,39	91,39	91,49	91,80	91,29	90,04	89,11	90,87	97,61		87,86	83,82	84,44	84,54	84,85	83,82
AB005612	15	78,11	78,11	78,42	77,90	89,32	89,32	89,21	88,59	89,11	89,21	86,72	89,00	88,49	87,86		83,92	83,82	84,02	84,23	82,47
DQ299381	16	79,46	79,67	79,67	79,46	84,13	84,34	84,23	83,61	84,13	84,02	83,20	84,54	83,82	83,82	83,92		94,71	94,19	91,80	90,77
AB194623	17	78,94	79,05	78,73	78,53	83,82	84,02	83,71	83,30	83,82	83,82	82,99	84,02	84,85	84,44	83,82	94,71		93,78	92,22	90,66
KF597284	18	78,63	79,05	79,05	78,84	84,23	84,44	84,34	83,92	84,34	83,92	83,82	85,06	85,06	84,54	84,02	94,19	93,78		93,05	91,70
DQ299380	19	79,25	78,84	79,05	79,05	84,02	84,23	83,92	83,40	83,40	83,20	83,09	84,44	85,27	84,85	84,23	91,80	92,22	93,05		90,35
JQ899450	20	78,84	79,05	79,05	78,84	84,13	84,34	84,65	83,40	84,54	84,13	82,99	84,54	83,82	83,82	82,47	90,77	90,66	91,70	90,35	

Çizelge 4.8’de görüldüğü üzere Bursa, Balıkesir ve Çanakkale illerinden elde edilen LYSV izolatları ile dünyanın farklı bölgelerinden elde edilen LYSV izolatları, nükleotit düzeyinde kıyaslanmıştır. Bu izolatlar içerisinde AB005612 erişim numaralı Japonya pırasa izolatı BAL 387 sarımsak izolatı ile en az benzerliği (% 77,90) göstermiştir. Bu oranı takiben AB005612 erişim numaralı Japonya pırasa izolatı, BAL 378, BUR 293 sarımsak izolatları ile ve AY007693 erişim numaralı Arjantin pırasa izolatı da BUR 293 sarımsak izolatı ile % 78,11 benzerlik oluşturmuşlardır. Bu benzerlik oranları, etmenin farklı streynlerinden kaynaklanabileceği gibi, coğrafi kökenden de kaynaklanabilmektedir. Üretim materyali olarak kullanılan sarımsak dışlarının kıtalararası taşınabilmesi, benzerlik oranlarının artmasına neden olabilmektedir. KF597283 erişim numaralı Meksika sarımsak izolatı BAL 378 sarımsak izolatı ile % 99,27 ve BUR 293 sarımsak izolatı ile % 99,17 oranında benzerlik göstermesi etmenin kaynağının aynı olma ihtimalini işaret etmektedir.

Güney Marmara Bölgesi LYSV izolatlarının, DNA dizilerinin dünya izolatları ile gerçekleştirilen çoklu dizi karşılaştırmalarının nükleotit düzeylerindeki sonuçlarının literatür çalışmalarında elde edilen bazı bulgularla benzer sonuçları içerdiği görülmektedir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada Kurtuluş (2012) Çanakkale ili ve ilçelerinden elde ettiği LYSV izolatlarının CP genlerini, nükleotit düzeyinde dünya izolatları ile kıyasladığı çalışmada bu çalışmada belirlenen oranlara yakın benzerlik oranları (% 77-95) tespit etmiştir. Bir başka çalışmada Fidan ve ark. (2009), LYSV Taşköprü ve Doğu Akdeniz izolatlarının dünyanın farklı bölgelerinden elde edilen izolatlarla yakın benzerlik (% 97) içerdiğini, ancak Taşköprü izolatları ile Doğu Akdeniz Bölgesi izolatlarının farklı coğrafi bölge izolatları ile benzerlik oluşturmasının izolatlar arasında farklılıktan kaynaklandığını bildirmiştir. Brezilya’da yapılan bir çalışmada ise Fajardo ve ark. (2001) sarımsak bitkisinden elde ettiği LYSV izolatının dünyanın farklı bölgelerinden izolatlar ile % 81 oranında benzerlik gösterdiğini bildirmiştir.

Güney Marmara Bölgesi OYDV izolatlarının, dünya izolatları ile gerçekleştirilen çoklu dizi karşılaştırmaları sonucunda nükleotit düzeylerinde benzerlik oranları % 74,09-84,72 olarak belirlenmiştir. Güney Marmara Bölgesi OYDV izolatlarının, dünya izolatları ile benzerlik oranları Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Güney Marmara Bölgesi *Onion yellow dwarf virus* izolatları ile dünya izolatlarının nükleotit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
JX433020	1	92,19	83,55	80,56	80,56	80,73	80,40	80,56	77,08	77,41	77,08	76,91	76,74	73,75	76,08	73,42	74,25	74,09	77,08	77,24
JX433019	2	92,19	84,88	80,90	80,56	81,73	80,40	80,23	76,25	76,25	76,58	76,08	76,25	73,09	76,08	73,42	73,92	73,92	75,75	75,58
KF623541	3	83,55	84,88	79,57	79,90	80,73	79,73	80,56	74,09	74,09	74,09	74,09	74,09	73,26	74,75	72,92	73,92	72,43	74,58	74,25
BUR 301	4	80,56	80,90	79,57	99,17	97,18	95,02	94,35	76,74	77,08	76,91	76,41	76,58	75,25	75,25	75,25	75,58	75,08	75,91	75,58
BAL 436	5	80,56	80,56	79,90	99,17	97,01	94,52	95,18	77,08	77,08	76,58	76,74	76,91	75,58	75,58	75,91	75,91	75,08	75,91	75,58
ÇAN 411	6	80,73	81,73	80,73	97,18	97,01	94,68	94,68	77,24	77,24	77,08	76,91	77,41	75,25	76,25	75,58	75,91	75,08	76,41	76,08
ÇAN 429	7	80,40	80,40	79,73	95,02	94,52	94,68	98,01	76,74	76,41	77,08	76,58	76,74	74,58	75,91	76,25	76,91	75,42	76,58	76,41
BUR 318	8	80,56	80,23	80,56	94,35	95,18	94,68	98,01	76,58	76,58	76,25	76,74	76,58	74,92	76,74	76,91	77,74	75,25	76,08	75,91
BAL 435	9	77,08	76,25	74,09	76,74	77,08	77,24	76,74	76,58	99,67	99,34	99,50	98,84	82,39	82,23	84,39	84,05	79,40	80,23	79,73
BUR 487	10	77,41	76,25	74,09	77,08	77,08	77,24	76,41	76,58	99,67	99,34	99,17	98,50	82,56	81,89	84,39	84,05	79,40	79,90	79,40
BUR 488	11	77,08	76,58	74,09	76,91	76,58	77,08	77,08	76,25	99,34	99,34	99,17	98,50	82,23	81,89	84,05	83,89	78,90	79,90	79,73
BAL 449	12	76,91	76,08	74,09	76,41	76,74	76,91	76,58	76,74	99,50	99,17	99,17	98,67	82,23	82,39	84,22	83,72	79,40	80,07	79,90
ÇAN 419	13	76,74	76,25	74,09	76,58	76,91	77,41	76,74	76,58	98,84	98,50	98,50	98,67	82,39	82,89	84,72	83,72	79,57	80,07	79,73
AJ292223	14	73,75	73,09	73,26	75,25	75,58	75,25	74,58	74,92	82,39	82,56	82,23	82,23	82,39	84,88	85,38	83,22	76,41	77,91	77,41
DQ925455	15	76,08	76,08	74,75	75,25	75,58	76,25	75,91	76,74	82,23	81,89	81,89	82,39	82,89	84,88	85,55	82,72	76,74	78,24	78,41
AB219833	16	73,42	73,42	72,92	75,25	75,91	75,58	76,25	76,91	84,39	84,39	84,05	84,22	84,72	85,38	85,55	85,55	78,57	78,90	77,74
JX429964	17	74,25	73,92	73,92	75,58	75,91	75,91	76,91	77,74	84,05	84,05	83,89	83,72	83,72	83,22	82,72	85,55	78,74	77,41	77,57
KJ451436.1	18	74,09	73,92	72,43	75,08	75,08	75,08	75,42	75,25	79,40	79,40	78,90	79,40	79,57	76,41	76,74	78,57	78,74	76,58	77,08
AJ409311	19	77,08	75,75	74,58	75,91	75,91	76,41	76,58	76,08	80,23	79,90	79,90	80,07	80,07	77,91	78,24	78,90	77,41	76,58	97,34
KF862685	20	77,24	75,58	74,25	75,58	75,58	76,08	76,41	75,91	79,73	79,40	79,73	79,90	79,73	77,41	78,41	77,74	77,57	77,08	97,34

Çizelge 4.9’da görüldüğü üzere Güney Marmara Bölgesi OYDV izolatlarının, dünya izolatları ile gerçekleştirilen çoklu dizi karşılaştırmaları sonucunda, KF623541 erişim numaralı Sudan soğan izolatının BAL 435 sarımsak, BUR 487 pırasa, BUR 488 pırasa, BAL 449 sarımsak ve ÇAN 419 sarımsak izolatları ile en az benzerliği (% 74,09) gösterdiği belirlenirken en fazla benzerliği (% 84,72) ise AB219833 erişim numaralı Japonya sarımsak izolatı ile ÇAN 419 sarımsak izolatları göstermiştir.

Ülkemizde bölgelere göre değişmekle birlikte Çin ve İran sarımsağının kullanımı, uzak coğrafi alanlardaki izolatlarla dahi yüksek benzerlikler oluşmasını sağlayabilmektedir. Bu görüşü doğrular nitelikteki çalışmalarda Fidan ve ark. (2009) Kahramanmaraş ve Gaziantep’ten elde ettiği OYDV izolatlarından birinin nükleotit düzeyinde bir Çin izolatı ile % 99 oranında diğer izolatların da % 86-96 oranında benzerlik gösterdiğini bulmuş, bu yüksek oranda benzerliğin, bölgede kullanılan Çin sarımsağından kaynaklandığını bildirmiştir. Bir başka çalışmada Berada ve ark. (2015) OYDV ile enfekteli soğan izolatlarından oluşan Polonya izolatlarının karşılaştırmalı nükleotit analizleri sonucunda dünya üzerindeki sarımsak izolatları ile % 88-100 oranında benzerlik gösterdiğini ve bu izolatlar içerisinde Asya orijinli bir izolatın (Japonya) bulunduğunu rapor etmiştir. Majumder ve ark. (2017) ise OYDV ile enfekteli Nijerya sarımsak izolatının, sekans analizleri sonucunda bir Asya (Vietnam) izolatı ile nükleotit dizilimi bakımından en fazla (% 87) benzerliği taşıdığını bildirmişlerdir.

4.5.1.2. Amino Asit Düzeyinde Çoklu Dizi Karşılaştırmaları

LYSV izolatlarının DNA dizilerinin kendi aralarında gerçekleştirilen amino asit dizi analizleri sonucunda % 80,69-100 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Benzerlik oranları Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Güney Marmara Bölgesi *Leek yellow stripe virus* izolatlarının amino asit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BAL 378	1	98,75	98,44	81,62	81,31	81,31	81,31	81,31	81,31	81,31
BAL 387	2	98,75	97,81	81,00	80,69	80,69	80,69	80,69	80,69	80,69
BUR 293	3	98,44	97,81	81,62	81,31	81,31	81,31	81,31	81,31	81,31
ÇAN 253	4	81,62	81,00	81,62	99,38	95,33	95,33	95,33	95,33	95,33
ÇAN 248	5	81,31	80,69	81,31	99,38	94,70	94,70	94,70	94,70	94,70
BUR 289	6	81,31	80,69	81,31	95,33	94,70	100,00	100,00	99,38	99,07
BUR 290	7	81,31	80,69	81,31	95,33	94,70	100,00	100,00	99,38	99,07
BUR 288	8	81,31	80,69	81,31	95,33	94,70	100,00	100,00	99,38	99,07
BAL 398	9	81,31	80,69	81,31	95,33	94,70	99,38	99,38	99,38	99,07
ÇAN 244	10	81,31	80,69	81,31	95,33	94,70	99,07	99,07	99,07	99,07

Çizelge 4.10'da görüldüğü üzere BAL 387 sarımsak izolatı, ÇAN 244, ÇAN 248, BUR 288, BUR 289 ve BUR 290 pırasa izolatları ile % 80,69 ile en az benzerlik oranları gösterirken, ÇAN 253 pırasa izolatı ile BAL 387 sarımsak izolatları ise ikinci en az benzerlik oranı (% 81,00) göstermiştir. İzolatlar arasındaki düşük benzerlik oranının coğrafi uzaklık farkından kaynaklandığı düşünülmektedir. En yakın benzerlik oranlarını BUR 288, BUR 289, BUR 290 pırasa izolatları (% 100) oluşturmuştur. Aynı ilçeden toplanan her üç izolat da belirgin ve birbirlerinden farklı belirtiler gösteren, ikisi ev bahçelerinden biri üretim alanından toplanan izolatlardan oluşmaktadır. Bu izolatların enfeksiyon kaynağının aynı olma olasılığına istinaden en yakın benzerliğe sahip olmaları beklenen bir sonuçtur. Bursa ilinde ticari olarak pırasa üretimi yapılan alanlarda sertifikalı tohum kullanımı yaygındır. Bunun dışında pazar alanlarında satılan ve hobi bahçelerinde ya da ev bahçelerinde kullanılmak amacı ile temin edilen sertifikalı olmayan tohumlarla veya fidelerle de ekimler gerçekleştirilebilmektedir. Generatif çoğalmaya sahip, soğan ve pırasa gibi bitkiler, virüsten ari bitkiler olarak yaşam döngüsüne başlarlar (Salomon, 2002). Fakat bu bitkilerin yetiştirme süreci boyunca yaprak bitleri tarafından enfekte edilmesi, tohumluk olarak kullanımlarında inokulum kaynağı oluşturmalarına neden olabilmektedir. Bu ve benzeri üretim modelleri viral hastalık etmenlerinin uzak mesafelere de

yayımlarına hizmet edebilmektedir. Güney Marmara Bölgesi, OYDV izolatlarının amino asit düzeyinde benzerlik oranları % 83,50-100 olarak belirlenmiştir. Bu izolatlara ait benzerlik oranları Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Güney Marmara Bölgesi *Onion yellow dwarf virus* izolatlarının amino asit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BUR 301	1	100,00	100,00	99,00	99,00	84,00	83,50	84,00	84,00	83,50
BAL 436	2	100,00	100,00	99,00	99,00	84,00	83,50	84,00	84,00	83,50
ÇAN 411	3	100,00	100,00	99,00	99,00	84,00	83,50	84,00	84,00	83,50
ÇAN 429	4	99,00	99,00	99,00	99,00	84,00	83,50	84,00	84,00	83,50
BUR 318	5	99,00	99,00	99,00	99,00	84,00	83,50	84,00	84,00	83,50
BAL 435	6	84,00	84,00	84,00	84,00	84,00	99,50	100,00	100,00	99,00
BAL 449	7	83,50	83,50	83,50	83,50	83,50	99,50	99,50	99,50	98,50
BUR 488	8	84,00	84,00	84,00	84,00	84,00	100,00	99,50	100,00	99,00
BUR 487	9	84,00	84,00	84,00	84,00	84,00	100,00	99,50	100,00	99,00
ÇAN 419	10	83,50	83,50	83,50	83,50	83,50	99,00	98,50	99,00	99,00

Çizelge 4.11’de görüldüğü üzere BAL 449 sarımsak izolatı, BUR 301, BAL 436, ÇAN 411, ÇAN 429 ve BUR 318 sarımsak izolatları ile en az benzerliği (% 83,50) gösterirken ÇAN 411 sarımsak izolatı, BUR 301 ve BAL 436 sarımsak izolatları ile en fazla benzerliği (% 100) göstermiştir. Sarımsak izolatları arasındaki benzerlik oranlarının farklılıkları bölgede bulunan sarımsak dişlerinin orijini ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Aynı bölge içerisinde benzerlik oranlarının izolatlar arasındaki farklılık göstermesi, kaynağı farklı üretim materyallerinin varlığını işaret etmektedir. Bursa ve Çanakkale illerinde sarımsak yetiştiriciliğinin ticari anlamda yok sayılacak kadar az olması ve her iki ilin kendine ait çeşidinin bulunmaması, bölge içerisinde Balıkesir sarımsağının ve Balıkesir iline erkencilik amacı ile getirilen ve az da olsa ekim alanlarında kullanılan İran ve Çin sarımsağının bu ilimizde de bulunmasını sağlamıştır. Literatürde sarımsak viral kompleksini içerdiği bildirilen bu dişler ile yapılan üretimler sekans sonuçlarında farklılıklar oluşturabilmektedir. Van Dijk (1993a), LYSV ve OYDV etmenlerinin dünya genelinde rapor edildiğini ve diğer viral etmenler ile de bulaşık sarımsak bitkilerinin enfeksiyon kaynağı oluşturduğunu bildirmiştir. İran ve Çin’den gelen üretim materyalleri (dişler) ile gerçekleştirilen üretimlerin, bölgede orijini farklı üretim materyallerinden kaynaklı enfeksiyonların oluşturabileceği düşünülmektedir.

Güney Marmara Bölgesi LYSV izolatlarının dünya izolatları ile amino asit

düzeyinde gerçekleştirilen sekans analizleri sonucunda % 78,19-99,69 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Güney Marmara Bölgesi LYSV izolatları ile dünya izolatlarının amino asit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları Çizelge 4.12’de verilmiştir.



Çizelge 4.12. Güney Marmara Bölgesi *Leek yellow stripe virus* izolatları ile dünya izolatlarının amino asit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
KF597283	1	99,69	99,06	98,75	84,74	82,24	83,49	81,31	81,62	82,24	81,93	81,93	81,00	79,75	81,31	81,31	81,31	81,00	81,00	79,13	
BAL 378	2	99,69		98,75	98,44	84,42	81,93	83,18	81,62	81,31	81,93	81,62	81,62	80,69	79,44	81,00	81,00	81,00	80,69	80,69	78,82
BAL 387	3	99,06	98,75		97,81	83,80	81,31	82,55	81,00	80,69	81,31	81,00	81,00	80,06	78,82	80,37	80,37	80,37	80,06	80,06	78,19
BUR 293	4	98,75	98,44	97,81		84,74	82,24	83,80	81,00	81,93	81,62	81,62	80,69	79,44	81,00	81,00	81,00	80,69	80,69	78,82	
DQ299381	5	84,74	84,42	83,80	84,74		96,57	97,51	94,08	93,15	90,03	89,41	89,10	87,85	86,60	89,10	89,10	89,10	88,47	88,47	86,92
AB194623	6	82,24	81,93	81,31	82,24	96,57		97,20	95,02	93,46	91,28	90,65	89,72	88,16	85,98	88,79	88,79	88,79	88,79	88,79	86,92
KF597284	7	83,49	83,18	82,55	83,80	97,51	97,20		95,95	95,02	92,21	91,59	90,03	89,41	87,23	90,03	90,03	90,03	89,41	89,41	87,23
DQ299380	8	81,31	81,62	81,00	81,00	94,08	95,02	95,95		92,83	90,03	89,41	88,16	86,92	84,74	87,54	87,54	87,54	87,54	87,54	85,36
JQ899450	9	81,62	81,31	80,69	81,93	93,15	93,46	95,02	92,83		90,34	89,72	89,41	88,79	86,29	89,41	89,41	89,41	88,79	88,79	86,60
ÇAN 253	10	82,24	81,93	81,31	81,93	90,03	91,28	92,21	90,03	90,34		99,38	95,64	94,70	91,59	95,33	95,33	95,33	95,33	95,33	93,46
ÇAN 248	11	81,93	81,62	81,00	81,62	89,41	90,65	91,59	89,41	89,72	99,38		95,02	94,08	90,97	94,70	94,70	94,70	94,70	94,70	93,15
AB005612	12	81,93	81,62	81,00	81,62	89,10	89,72	90,03	88,16	89,41	95,64	95,02		93,46	90,03	94,70	94,70	94,70	94,70	94,70	92,83
X89711	13	81,00	80,69	80,06	80,69	87,85	88,16	89,41	86,92	88,79	94,70	94,08	93,46		94,08	97,82	97,82	97,82	97,20	96,88	94,70
AY007693	14	79,75	79,44	78,82	79,44	86,60	85,98	87,23	84,74	86,29	91,59	90,97	90,03	94,08		94,39	94,39	94,39	93,77	93,46	91,28
BUR 289	15	81,31	81,00	80,37	81,00	89,10	88,79	90,03	87,54	89,41	95,33	94,70	94,70	97,82	94,39	100,00	100,00	100,00	99,38	99,07	96,88
BUR 290	16	81,31	81,00	80,37	81,00	89,10	88,79	90,03	87,54	89,41	95,33	94,70	94,70	97,82	94,39	100,00		100,00	99,38	99,07	96,88
BUR 288	17	81,31	81,00	80,37	81,00	89,10	88,79	90,03	87,54	89,41	95,33	94,70	94,70	97,82	94,39	100,00	100,00		99,38	99,07	96,88
BAL 398	18	81,00	80,69	80,06	80,69	88,47	88,79	89,41	87,54	88,79	95,33	94,70	94,70	97,20	93,77	99,38	99,38	99,38		99,07	96,88
ÇAN 244	19	81,00	80,69	80,06	80,69	88,47	88,79	89,41	87,54	88,79	95,33	94,70	94,70	96,88	93,46	99,07	99,07	99,07	99,07		96,57
KR075504	20	79,13	78,82	78,19	78,82	86,92	86,92	87,23	85,36	86,60	93,46	93,15	92,83	94,70	91,28	96,88	96,88	96,88	96,88	96,88	

Çizelge 4.12’de görüldüğü üzere Güney Marmara Bölgesi izolatları ile dünya LYSV izolatlarının nükleotit dizi benzerlik oranları arasında en az benzerliğin KR075504 erişim numaralı Sırbistan pırasa izolatı ile BAL 387 sarımsak izolatı (% 78,19) arasında olduğu ve bu izolatın BUR 293 sarımsak izolatı ile de ikinci en az benzerlik oranı (% 78,82) gösterdiği belirlenmiştir. Aynı benzerlik oranlarını AY007693 erişim numaralı Arjantin pırasa izolatı ve BAL 387 sarımsak izolatları da gösterirken, en fazla benzerliğin ise % 99,69 oranı ile KF597283 erişim numaralı Meksika sarımsak izolatı ile BAL 378 sarımsak izolatları göstermiştir. Bu benzerlik oranı dünya genelinde enfekteli sarımsakların vejetatif üretim materyali olarak yayılımını destekler niteliktedir. Bu sonuçlara benzer çalışmalarda Fajardo ve ark. (2001) Brezilya’da LYSV ile enfekteli sarımsak izolatlarının CP genlerinin amino asit düzeyinde dünyanın farklı coğrafi bölgelerinde bulunan izolatlar ile % 85,9-88,6 oranlarında benzerlik taşıdığını, Sivaprasad ve ark. (2017) elde ettikleri Ekvador izolatının, dünyanın farklı ülkelerden elde edilen izolatlar ile farklılık gösterdiğini ve amino asit düzeyinde maksimum % 91,1 ve % 98,1 benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Güney Marmara Bölgesi OYDV izolatları ile gen bankasında bulunan dünya izolatlarının amino asit düzeyinde benzerlik oranlarının % 79,00-92,50 arasında olduğu belirlenmiştir. Güney Marmara Bölgesi OYDV izolatları ile dünya izolatlarının amino asit düzeyinde oluşturdukları benzerlik oranları Çizelge 4.13’te verilmiştir.

Çizelge 4.13. Güney Marmara Bölgesi *Onion yellow dwarf virus* izolatları ile dünya izolatlarının amino asit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
AJ409311	1	98,50	81,00	79,50	82,00	81,50	81,50	81,50	81,50	81,50	80,00	79,50	80,00	80,00	79,50	82,00	83,00	81,00	80,00	78,50
KF862685	2	98,50		80,50	79,00	81,50	80,50	80,50	80,50	80,50	79,50	79,00	79,50	79,50	79,00	81,00	82,50	79,50	79,00	79,00
JX433019	3	81,00	80,50		94,50	95,50	91,50	91,50	91,50	91,50	83,00	82,50	83,00	83,00	82,50	79,50	81,50	81,50	81,00	83,50
KF623541	4	79,50	79,00	94,50		90,00	88,00	88,00	88,00	87,50	87,50	80,50	80,00	80,50	80,50	80,00	77,50	80,00	79,50	81,00
JX433020	5	82,00	81,50	95,50	90,00		91,00	91,00	91,00	91,00	91,00	82,50	82,00	82,50	82,50	82,00	80,00	82,50	80,50	81,00
BUR 301	6	81,50	80,50	91,50	88,00	91,00		100,00	100,00	99,00	99,00	84,00	83,50	84,00	84,00	83,50	79,50	81,50	81,00	83,50
BAL 436	7	81,50	80,50	91,50	88,00	91,00	100,00		100,00	99,00	99,00	84,00	83,50	84,00	84,00	83,50	79,50	81,50	81,00	83,50
ÇAN 411	8	81,50	80,50	91,50	88,00	91,00	100,00	100,00		99,00	99,00	84,00	83,50	84,00	84,00	83,50	79,50	81,50	81,00	83,50
ÇAN 429	9	81,50	80,50	91,50	87,50	91,00	99,00	99,00	99,00		99,00	84,00	83,50	84,00	84,00	83,50	79,50	81,50	81,00	82,50
BUR 318	10	81,50	80,50	91,50	87,50	91,00	99,00	99,00	99,00	99,00		84,00	83,50	84,00	84,00	83,50	79,50	81,50	81,00	82,50
BUR 487	11	80,00	79,50	83,00	80,50	82,50	84,00	84,00	84,00	84,00	84,00		99,50	100,00	100,00	99,00	89,50	90,00	92,50	91,00
BAL 449	12	79,50	79,00	82,50	80,00	82,00	83,50	83,50	83,50	83,50	83,50	99,50		99,50	99,50	98,50	89,00	89,50	92,00	90,50
BAL 435	13	80,00	79,50	83,00	80,50	82,50	84,00	84,00	84,00	84,00	84,00	100,00	99,50		100,00	99,00	89,50	90,00	92,50	91,00
BUR 488	14	80,00	79,50	83,00	80,50	82,50	84,00	84,00	84,00	84,00	84,00	100,00	99,50	100,00		99,00	89,50	90,00	92,50	91,00
ÇAN 419	15	79,50	79,00	82,50	80,00	82,00	83,50	83,50	83,50	83,50	83,50	99,00	98,50	99,00	99,00		89,00	89,50	92,00	90,50
AJ292223	16	82,00	81,00	79,50	77,50	80,00	79,50	79,50	79,50	79,50	79,50	89,50	89,00	89,50	89,50	89,00		91,50	91,50	89,50
DQ925455	17	83,00	82,50	81,50	80,00	82,50	81,50	81,50	81,50	81,50	81,50	90,00	89,50	90,00	90,00	89,50	91,50		92,00	88,00
AB219833	18	81,00	79,50	81,50	79,50	80,50	81,00	81,00	81,00	81,00	81,00	92,50	92,00	92,50	92,50	92,00	91,50	92,00		90,50
JX429964	19	80,00	79,00	81,00	79,50	81,00	83,50	83,50	83,50	82,50	82,50	91,00	90,50	91,00	91,00	90,50	89,50	88,00	90,50	
KJ451436	20	78,50	79,00	83,50	81,00	82,50	84,00	84,00	84,00	83,00	83,00	85,50	85,00	85,50	85,50	85,00	80,50	83,00	83,50	87,00

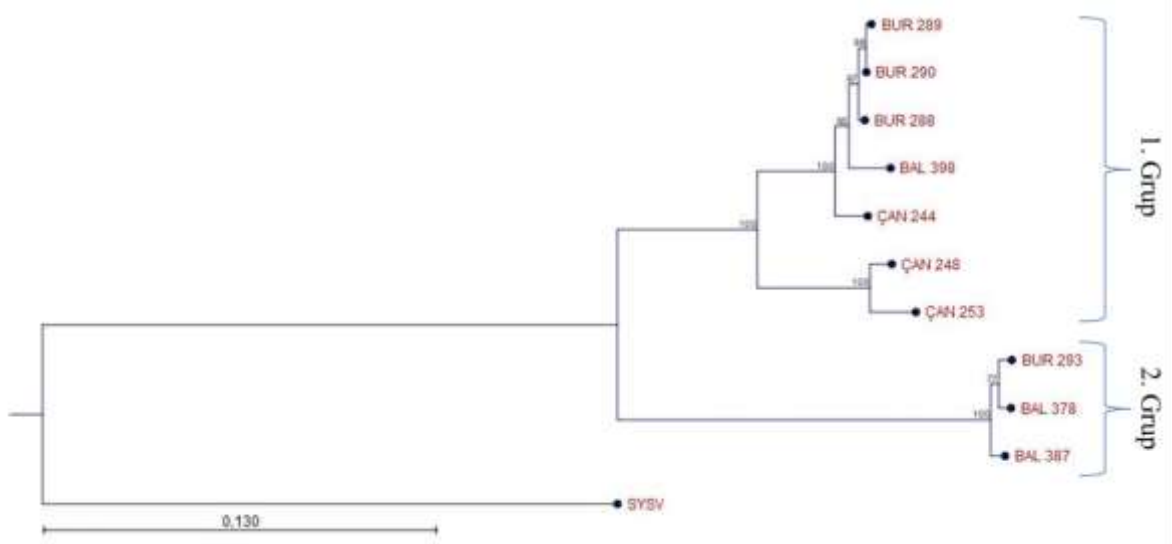
Çizelge 4.13’de görüldüğü üzere Güney Marmara Bölgesi OYDV izolatları ile gen bankasında bulunan dünya izolatlarının amino asit düzeyinde benzerlik oranları incelendiğinde bu izolatlar içerisinde KF623541 erişim numaralı Sudan soğan izolatı, ÇAN 419 sarımsak ve BAL 449 sarımsak izolatları ile en az benzerliği (% 79,00) sahip olduğu görülmektedir. AB219833 erişim numaralı Japonya izolatı, BUR 449 ve BAL 435 sarımsak izolatları ile en fazla (% 92,50) benzerliği göstererek bölgede Asya orijinli sarımsakların varlığını işaret etmiştir. Bu sonucu destekler nitelikte gerçekleştirilen bir çalışmada Arya ve ark. (2006) OYDV izolatları ile elde ettikleri sekans verileri ile yaptıkları kıyaslamalar sonucunda Hindistan Delhi izolatlarının dünyanın diğer bölgesindeki izolatlar ile amino asit düzeylerinde % 79-96,1 benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu benzerlik oranları içerisinde en fazla benzerliğin bir Brezilya izolatı ile olduğunu ve her iki izolatın Asya orijinli, Çin ve Japon izolatları ile yakın ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Sarımsak viral kompleksi ile bulaşık üretim materyalleri, kıtalararası mesafelere dahi kolaylıkla taşınabilmeleri nedeni ile tüm dünya genelinde enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Bu çalışmada da görüldüğü üzere Güney Marmara Bölgesi izolatları dünyanın farklı coğrafi bölgelerinden izolatlar ile farklı düzeylerde benzerlikler taşımaktadır. *Allium* cinsi bitkiler ile gerçekleştirilen çalışmalarda bu bilgiyi destekler nitelikte bir başka çalışmada Kumar ve ark. (2015) soğan bitkisinden izole ettikleri OYDV ile enfekteli RR-1 Hindistan izolatının, dünyanın farklı coğrafi bölgelerinde bulunan diğer OYDV izolatları ile amino asit düzeyinde % 75-98 benzerlik gösterdiğini ve izolatların MS/SW1 Avustralya ve SG1 İspanya soğan izolatları ile en yakın benzerlik taşıdığını bildirmişlerdir.

4.5.2. Filogenetik Analiz Bulguları

Filogenetik soyağaçlarının belirlenmesi ile ilgili çalışmalar kapsamında Güney Marmara Bölgesine ait LYSV ve OYDV izolatlarının birbirleri ile ve dünyanın farklı bölgelerinden elde edilmiş 20 farklı izolat ile genetik ilişkilerini belirleyebilmek amacı ile nükleotit ve amino asit dizileri kullanılarak filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, Clustal W programı kullanılarak gerçekleştirilen çoklu dizi dosyaları kullanılmış, elde edilen çoklu dizi dosyaları neighbor joining metodu ve 1000 tekrarlı bootstrap analizi ile LYSV ve OYDV izolatlarının filogenetik ilişkileri ortaya çıkarılmıştır. Filogenetik ilişkilerinin belirlenmesinde *Shallot yellow stripe virus* (SYSV), oluşturulan filogenetik ağaçlarının doğruluğunu arttırmak için dış grup olarak kullanılmıştır.

4.5.2.1. Nükleotit Dizilimlerine Göre Filogenetik Analizler

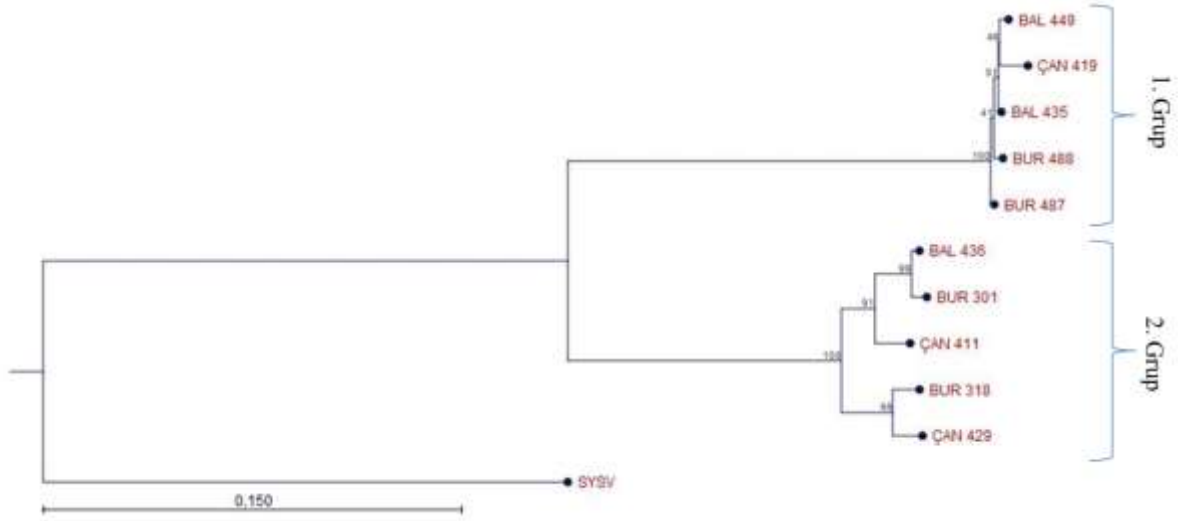
Güney Marmara Bölgesi LYSV izolatlarının, kendi aralarında nükleotit düzeyinde oluşturduğu filogenetik soyağacının, iki gruba ayrıldığı görülmektedir. Güney Marmara Bölgesi LYSV izolatlarının nükleotit dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı Şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.15. Güney Marmara Bölgesi *Leek yellow stripe virus* izolatlarının nükleotit dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı

Şekil 4.15'te görüldüğü üzere bu gruptan birincisinde BUR 288, BUR 289, BUR 290, BAL 398, ÇAN 244, ÇAN 248 ve ÇAN 253 pırasa izolatları, ikincisinde ise BUR 283, BAL 378 ve BAL 387 sarımsak izolatlarının yer aldığı görülmektedir. Buna göre, Güney Marmara Bölgesi LYSV izolatlarının nükleotit dizilimi kullanılarak görüntülenen filogenetik soyağacının, konukçuya spesifik olarak pırasa ve sarımsak izolatlarından oluşan iki ayrı gruptan oluştuğu belirlenmiştir. Her iki grubun farklı konukçulardan oluşması, etmenin kaynağının farklı olma ihtimalini oluşturmaktadır. Sarımsak dişlerinin vejetatif üretim materyali olarak bölgede üreticiler arasında paylaşılması ve pırasaların özellikle vektör mücadelesi yapılmayan üretim alanlarında yaprak bitleri tarafından etkin bir şekilde enfekte edilmesi, bu ifadeyi doğrular niteliktedir. Blackman ve Eastop (2000), LYSV'nin yayılımında vejetatif materyalin oldukça önem taşıdığını ve *Myzus persicae* ve *Aphis fabae*'in etmenin yaygın vektörleri olduğunu ve beslenmeleri sırasında LYSV'yi non-persistent olarak taşıdıklarını bildirmişlerdir.

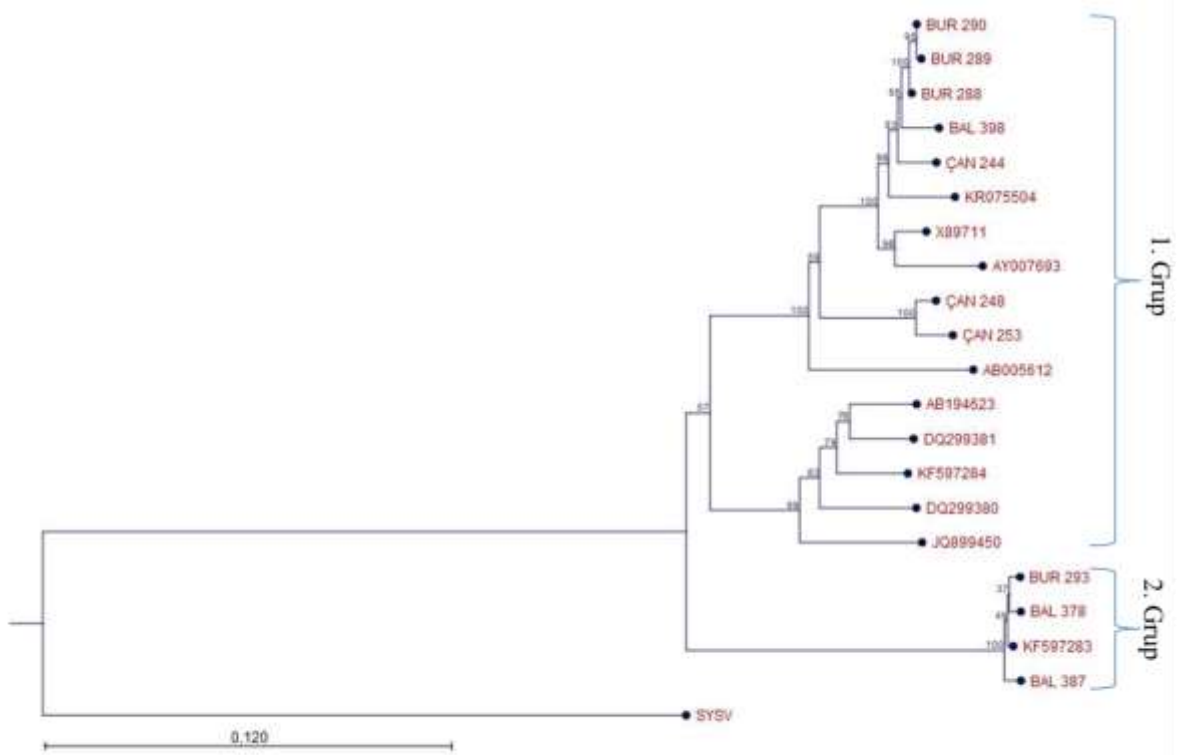
Güney Marmara Bölgesi OYDV izolatlarının, kendi aralarında nükleotit düzeyinde oluşturduğu filogenetik soyağacının iki gruba ayrıldığı görülmektedir. Güney Marmara Bölgesi OYDV izolatlarının nükleotit dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı Şekil 4.16’da verilmiştir.



Şekil 4.16. Güney Marmara Bölgesi *Onion yellow dwarf virus* izolatlarının nükleotit dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı

Şekil 4.16’da görüldüğü üzere Güney Marmara Bölgesi OYDV izolatlarından oluşan bu grupların her ikisinde de eşit sayıda izolat bulunmaktadır. Birinci grupta BAL 449, ÇAN 419 ve BAL 435 sarımsak izolatları ile BUR 488 ve BUR 487 pırasa izolatları yer alırken, 2. grupta ise BAL 436, BUR 301, ÇAN 411, BUR 318, ÇAN 429 sarımsak izolatları yer almaktadır. OYDV sarımsak izolatlarının iki ayrı grupta yer alması, bu bitkilerdeki OYDV enfeksiyonlarının kaynağının farklı olma ihtimalini oluşturmaktadır. Ülkemiz sarımsak yetiştiriciliğinde sertifikalı tohum kullanılmaması, sarımsaklarda bulunan olası viral komplekslerin bölgeye girmesi hususunda tehlike arz etmektedir. Lot ve ark. (1998) OYDV’nin, Fransa ve Arjantin gibi ülkelerde oluşturduğu yüksek enfeksiyon oranları ile sarımsakların sertifikasyonunda tek endişe kaynağı oluşturan etmen olduğunu bildirmişlerdir. İkinci grupta yer alan izolatların yalnızca sarımsak izolatlarından oluşması, bu grup içerisinde konukçu düzeyinde bir bütünlük oluştuğu, izolatların orijinlerinin aynı olduğu ve virüsün tek bir kaynaktan yayıldığı izlemine vermektedir. Buna ek olarak iki ayrı alt grubun oluştuğu 2. grup izolatlarının hem Çanakkale hem de Bursa izolatlarından oluşması, vejetatif olarak çoğaltımda kullanılan enfekteli sarımsak dişlerinin bu iller arasında yayıldığını işaret etmektedir.

Güney Marmara Bölgesi LYSV izolatları ile dünyanın farklı coğrafi bölgelerinden elde edilen izolatların nükleotit düzeyinde oluşturduğu filogenetik soyağacı incelendiğinde 2 farklı grup olduğu ve bu gruplardan birincisinin kendi arasında alt gruplar oluşturduğu gözlenmektedir. Güney Marmara Bölgesi LYSV izolatları ile dünya izolatlarının nükleotit dizilimleri kullanılarak görüntülenen filogenetik soyağacı Şekil 4.17’de verilmiştir.

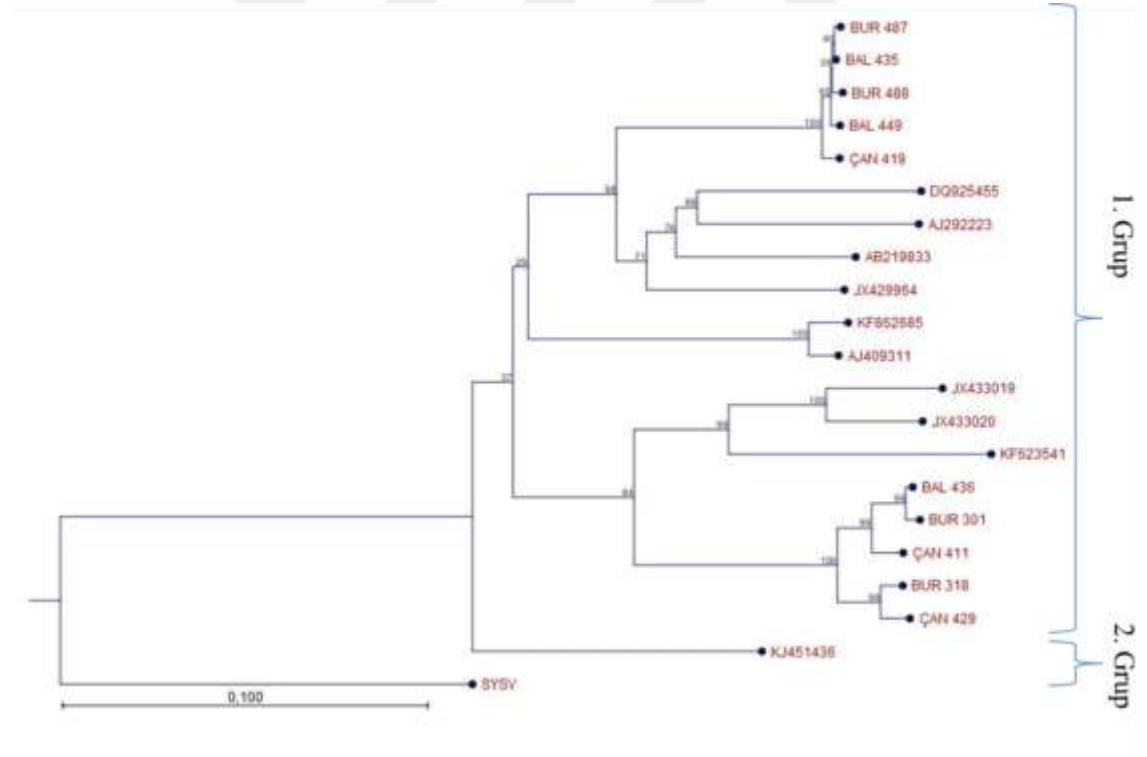


Şekil 4.17 Güney Marmara Bölgesi *Leek yellow stripe virus* izolatları ile dünya izolatlarının nükleotit dizilimleri kullanılarak görüntülenen filogenetik soyağacı

Şekil 4.17’de görüldüğü üzere 1. grupta 7’si Güney Marmara Bölgesi LYSV izolatları ve 9’u dünya izolatlarından oluşan 16 izolat yer almaktadır. İkinci grupta ise 3 Güney Marmara Bölgesi izolatı ile bir dünya izolatının yer aldığı görülmektedir. Birinci grupta yer alan AB194623 erişim numaralı Japonya, DQ299380 ve DQ299381 erişim numaralı Çekya, KF597284 ve JQ899450 erişim numaralı Avustralya sarımsak izolatlarının dünyanın farklı coğrafi bölgelerinde bulunmalarına rağmen konukçuya spesifik alt grup oluşturduğu görülmektedir. Literatürlerde filogenetik soyağaçları ile ilgili çalışmalarda, Asya orijinli izolatların, dünyanın farklı bölgelerindeki izolatlar ile yakın benzerlik göstererek aynı grup ve/veya alt gruplarda yer aldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Bu literatürler içerisinde çalışmamız bulgularına benzer sonuçları, Fidan

(2010) elde ettiği Akdeniz LYSV izolatlarının Çin, Taşköprü LYSV izolatlarının ise Japonya izolatı ile aynı gruplarda yer aldığını ayrıca, Chen ve Adams (2001; 2002), Takaki ve ark (2005) Asya'dan elde etikleri LYSV izolatlarının dünyanın farklı bölgelerinden elde edilen izolatlar ile aynı gruplarda bulunduğu rapor etmişlerdir. Bu çalışmalarda tespit edilen bu filogenetik ilişkiler, Katis ve ark. (2012) tarafından ileri sürülen, OYDV'nin orijini Asya'dır tezini destekler niteliktedirler. Güney Marmara izolatlarının yer aldığı bir diğer alt grupta ise KR075504 erişim numaralı Sırbistan pırasa izolatı ve Güney Marmara izolatları BUR 288, BUR 289, BUR 290, BAL 398 ve ÇAN 244 pırasa izolatları ile bir başka alt grup oluştururken, AB005612 erişim numaralı Japonya pırasa izolatı da ÇAN 248, ÇAN 253 pırasa izolatları ile konukçuya spesifik bir diğer alt grubu oluşturmuşlardır. İkinci grupta ise KF597283 erişim numaralı Meksika sarımsak izolatının BUR 293, BAL 378 ve BAL 387 sarımsak izolatları ile aynı grupta yer aldığı görülmektedir.

Güney Marmara Bölgesi OYDV izolatları ile dünya izolatlarının nükleotit dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı Şekil 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.18. Güney Marmara Bölgesi *Onion yellow dwarf virus* izolatları ile dünya izolatlarının nükleotit dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı

Şekil 4.18'de görüldüğü üzere Güney Marmara Bölgesi, OYDV izolatları ile oluşturulan filogenetik soyağacında KJ451436 erişim numaralı Hindistan soğan izolatının, sarımsak, pırasa ve soğan izolatlarından oluşan 1. gruptan ayrılarak yalnız başına 2. grubu

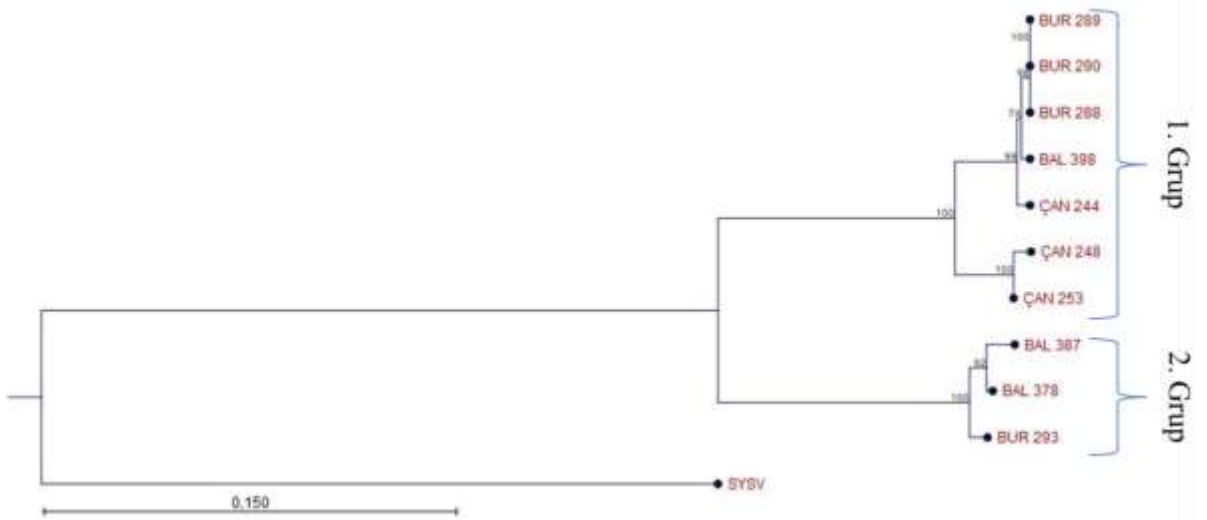
oluşturması dikkat çekmektedir. Yapılan literatür araştırması sonucunda, Kumar ve ark. (2015) tarafından tüm genomunu elde edilen KJ451436 soğan izolatının, poliproteinleri arasındaki ikili nükleotit ve amino asit benzerliklerindeki varyasyonların, P1 ve P3 protein dizilerinin diğer olgun protein dizilerinden önemli ölçüde değişken olduğu ve buna bağlı olarak oluşan farklılığın rekombinasyon yada mutasyondan kaynaklanabileceği sonucu elde edilmiştir.

Birinci grupta iki alt grup yer almaktadır. Her iki alt grup içerisinde Güney Marmara Bölgesi izolatları ile dünya izolatlarının ayrıldığı bir alt grubun daha olduğu gözlenmiştir. Bu alt grupların birinde BUR 487 ve BUR 488 pırasa ile BAL 435, BAL 449 ve ÇAN 419 sarımsak izolatları ile çoğunluğunu Asya orijinli izolatların oluşturduğu DQ925455 erişim numaralı Vietnam pırasa, AJ292223 erişim numaralı Çin, AB219833 erişim numaralı Japonya ve JX429964 erişim numaralı İspanya sarımsak izolatları aynı alt grupta yer almıştır. Ülkemiz izolatları ile gerçekleştirilmiş bir başka çalışmada, bu sonuca benzer şekilde Fidan (2010) Doğu Akdeniz Bölgesi'nden elde ettiği OYDV ile enfekteli izolatların Asya orijinli izolatlar ile aynı grupta yer aldığını bildirmiştir.

Diğer alt grupta ise sarımsak izolatlarından oluşan ve Güney Marmara Bölgesi'ni temsil eden ÇAN 429, ÇAN 411, BUR 301, BUR 318 ve BAL 436 izolatları, JX433019 erişim numaralı Arjantin, JX433020 erişim numaralı Almanya ve KF623541 erişim numaralı Sudan soğan izolatları ile aynı alt grupta yer alarak aynı orijinden olabilecekleri ihtimalini oluşturmuşlardır. OYDV ile enfekteli üretim materyallerinin dünyanın farklı bölgelerine yayılımı, izolatların filogenetik ilişkiler sonucunda yakın benzerlikler oluşturabilmelerine neden olmaktadır. Bu durumu destekler nitelikteki bir çalışmada Mangli ve ark. (2014) İtalya'nın güneyinden elde ettikleri OYDV izolatlarının, Almanya, Arjantin ve Sudan izolatları ile aynı grupta yer aldığını bildirmişlerdir. Benzer sonuçları, Arya ve ark. (2006), Celli ve ark. (2013) elde ettikleri izolatların, dünyanın farklı bölgelerinden elde edilen izolatlar ile oluşturulan filogenetik soyağaçlarında, aynı grupta yer aldıklarını rapor etmişlerdir.

4.5.2.2. Aminoasit Dizilimlerine Göre Filogenetik Analizler

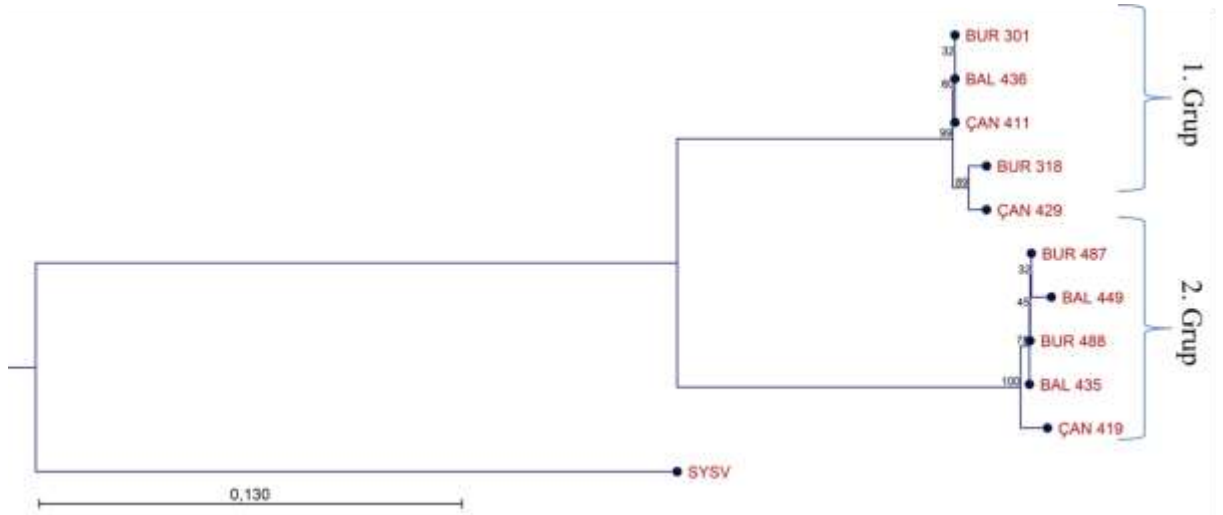
Güney Marmara Bölgesi LYSV izolatlarının, amino asit dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı Şekil 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.19. Güney Marmara Bölgesi *Leek yellow stripe virus* izolatlarının, amino asit dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı

Şekil 4.19’da görüldüğü üzere Güney Marmara Bölgesi LYSV izolatlarının oluşturduğu filogenetik soyağacının, konukçuya spesifik olarak pırasa ve sarımsak izolatlarından oluşan iki ayrı gruptan oluştuğu belirlenmiştir. Bu soyağacında yer alan BUR 288, BUR 289, BUR 290, BAL 398, ÇAN 244, ÇAN 248 ve ÇAN 253 pırasa izolatları 1. grup izolatlarını, 2. grup izolatları ise BUR 283, BAL 378 ve BAL 387 sarımsak izolatları oluşturmuştur. Birinci grup izolatları da kendi içerisinde bir alt grup oluşturmuş ve bu alt grup içerisinde ÇAN 248 ve ÇAN 253 pırasa izolatları ile ÇAN 244 pırasa izolatı aynı grup içerisinde farklı alt gruplarda yer almışlardır. İkinci grubu oluşturan sarımsak izolatlarının ise tek bir kaynaktan yayıldığı düşünülmektedir. Balıkesir ilinden civar illere yayılan yemeklik sarımsakların, üretim materyali olarak Güney Marmara Bölgesi içerisinde dağılması, bölgeden elde edilen izolatların yakın filogenetik ilişkisini sağlamaktadır.

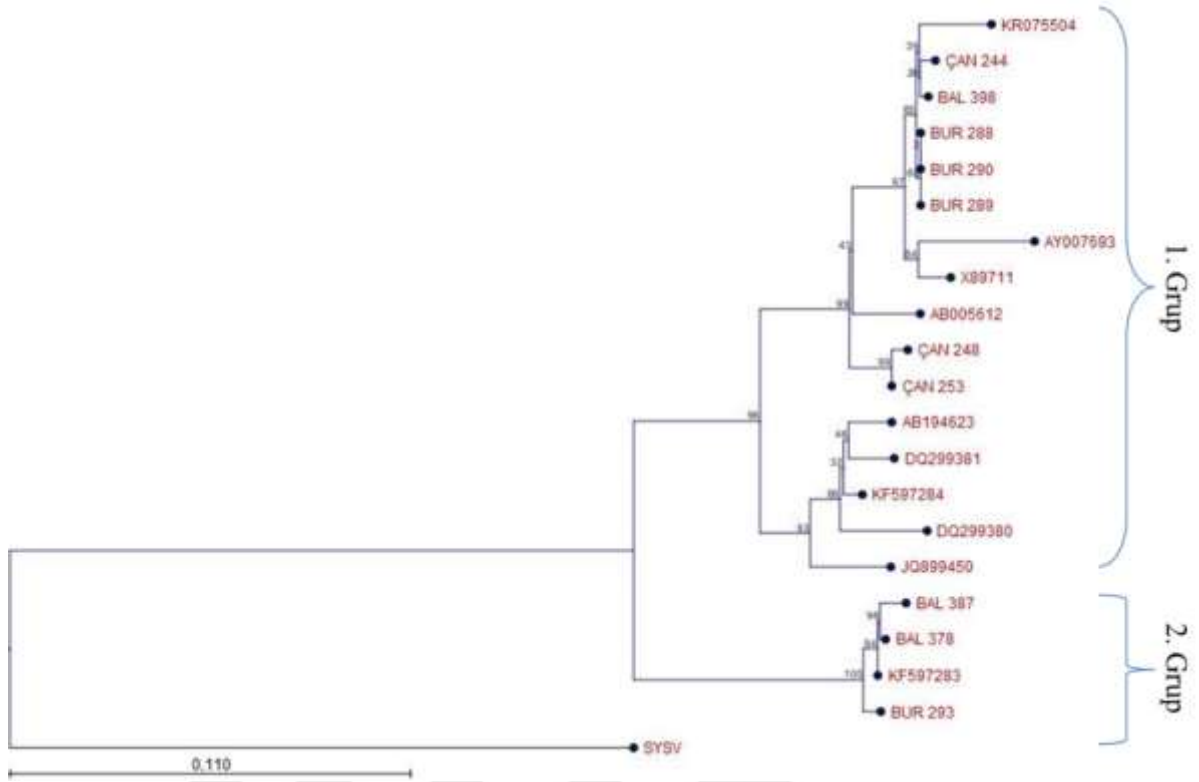
Güney Marmara Bölgesi OYDV izolatlarının, amino asit dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı Şekil 4.20’de verilmiştir.



Şekil 4.20. Güney Marmara Bölgesi *Onion yellow dwarf virus* izolatlarının amino asit dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı

Şekil 4.20’de görüldüğü üzere Güney Marmara Bölgesi OYDV izolatlarının, amino asit dizilimi kullanılarak görüntülenen filogenetik soyağacının iki gruptan oluştuğu görülmektedir. Bu gruplardan birincisinde BUR 301, BAL 436, ÇAN 411, BUR 318 ve ÇAN 429 sarımsak izolatları, diğerinde ise BAL 449, ÇAN 419 ve BAL 435 sarımsak izolatları ile BUR 488 ve BUR 487 pırasa izolatları yer almaktadır. Bu soyağacında 1. grubun, sarımsak izolatları ile konukçu düzeyinde spesifik bir grup oluşturduğu, 2. grubun ise hem sarımsak hem de pırasa izolatlarından oluştuğu gözlenmiş ve coğrafi olarak illere özgü bir grup ya da alt grubun oluşmadığı belirlenmiştir. Güney Marmara Bölgesi OYDV izolatlarını oluşturan tüm sarımsak izolatlarının aynı grupta bulunmaması, bu izolatların kaynağının farklı olması ihtimalini oluşturmaktadır. Güney Marmara Bölgesi’nde üretim materyali olarak temin edilen sarımsak dişlerine son yıllarda İran ve Çin orijinli dişlerin de eklendiği bilinmektedir.

Güney Marmara Bölgesi LYSV izolatları ile dünya izolatlarının amino asit dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı Şekil 4.21’de verilmiştir.



Şekil 4.21. Güney Marmara Bölgesi *Leek yellow stripe virus* izolatları ile dünya izolatlarının amino asit dizimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı

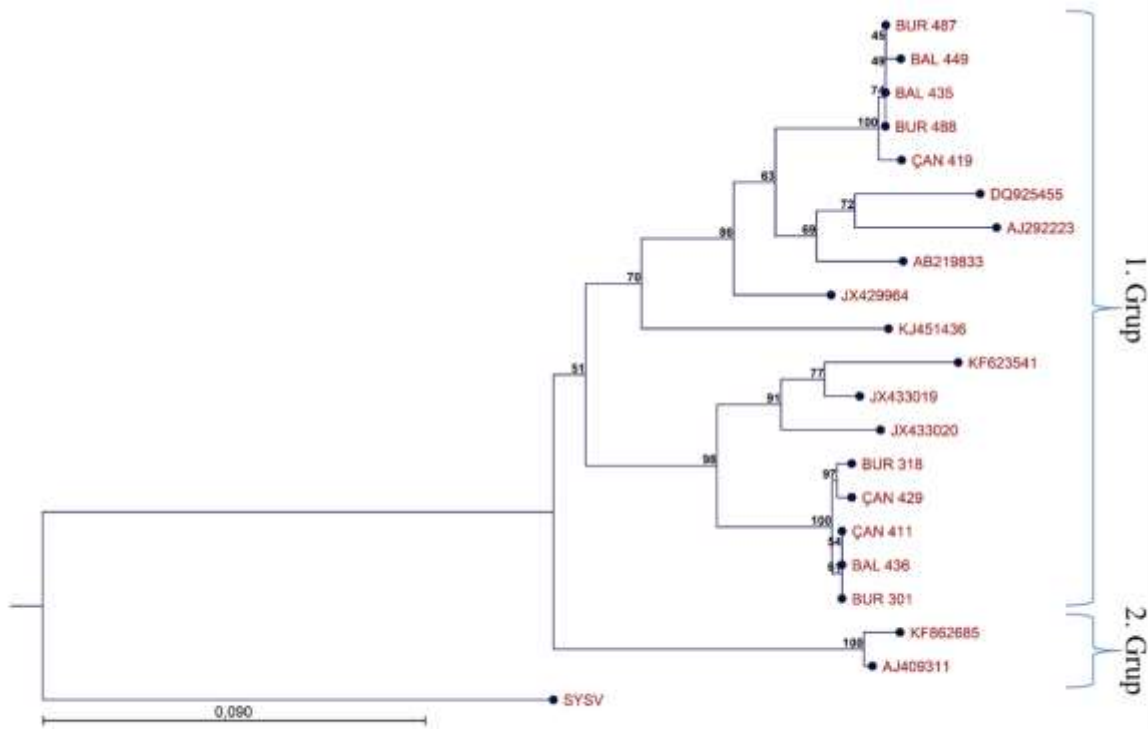
Şekil 4.21’de görüldüğü üzere 1. grup içerisinde Güney Marmara Bölgesi LYSV pırasa izolatlarının da olduğu 16 izolatın yer aldığı, 2. grupta ise Güney Marmara Bölgesi sarımsak izolatları ile bir dünya izolatının yer aldığı görülmektedir. Aynı zamanda 1. grup içerisinde iki farklı alt grubun oluştuğu ve bu gruplardan birinde ÇAN 248 ve ÇAN 253 pırasa izolatlarının, diğer Güney Marmara Bölgesi izolatlarından farklı bir alt grup içerisinde bulunduğu belirlenmiştir.

Soyağacı içerisinde 1. grupta yer alan ve farklı coğrafi alanları temsil eden AB194623 erişim numaralı Japonya, DQ299380 ve DQ299381 erişim numaralı Çekya, JQ899450 ve KF597284 erişim numaralı Avustralya sarımsak izolatlarının, Güney Marmara Bölgesi izolatları ile aynı alt grupta yer almadığı ve konukçuya spesifik olarak alt grup oluşturdukları belirlenmiştir.

Güney Marmara Bölgesi izolatlarının yer aldığı bir diğer alt grupta ise KR075504 erişim numaralı Sırbistan pırasa izolatı, Güney Marmara Bölgesi, BUR 288, BUR 289, BUR 290, BAL 398 ve ÇAN 244 pırasa izolatları ile bir başka alt grup oluştururken, AB005612 erişim numaralı Japonya pırasa izolatı ve ÇAN 248 ile ÇAN 253 pırasa izolatları konukçuya spesifik ayrı birer alt grup oluşturmuşlardır.

Çalışmada elde edilen filogenetik soyağacının Chen ve Adams (2002) ve Tsuneyoshi ve ark (1998) tarafından elde edilen sonuçlara benzer şekilde iki gruba ayrıldığı ayrıca Avrupa ve Japonya orijinli izolatların aynı grupta yer aldığı belirlenmiştir. Benzer sonuçları Kurtuluş ve Korkmaz (2014) Çanakkale LYSV pırasa izolatlarının Japonya, Kore, Hollanda ve İsrail izolatları ile aynı grupta yer aldığı, Gupta ve ark. (2017) LYSV Hindistan sarımsak izolatlarının Asya izolatlarının yanı sıra Avrupa izolatları ile aynı grupta yer aldığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar, vejetatif çoğaltım materyallerinin bir genetik materyal unsuru olarak korunması ve dağıtımını üzerine alınması gerekli tedbirlerin önemini vurgulamaktadır. İkinci grupta ise KF597283 erişim numaralı Meksika sarımsak izolatının BUR 293, BAL 378 ve BAL 387 sarımsak izolatları ile aynı grupta yer aldığı görülmektedir. İkinci grup içerisinde yer alan bu izolatların sarımsak izolatlarından oluşması, vejetatif üretim materyallerinin kontrolsüz dağılımını destekler sonuçları işaret etmektedir.

Güney Marmara Bölgesi OYDV izolatları ile dünya izolatlarının amino asit dizilimleri kullanılarak görüntülenen filogenetik soyağacı Şekil 4.22’de verilmiştir.



Şekil 4.22. Güney Marmara Bölgesi *Onion yellow dwarf virus* izolatları ile dünya izolatlarının amino asit dizilimleri kullanılarak görüntülenen filogenetik soyağacı

Şekil 4.22’de görüldüğü üzere Güney Marmara Bölgesi OYDV izolatları ile dünya izolatlarının amino asit dizilimi kullanılarak görüntülenen filogenetik soyağacı iki farklı grup oluşturmuştur. Bu gruplardan birincisinde Güney Marmara izolatları iki ayrı alt grupta yer alırken, pırasa ve sarımsak izolatlarından oluşan BUR 487, BAL 449, BAL 435, BUR 488, ÇAN 419 izolatları, Asya orijinli DQ925455 erişim numaralı Vietnam pırasa, AJ292223 erişim numaralı Çin ve AB219833 erişim numaralı Japonya sarımsak izolatları ile aynı alt grupta yer aldığı görülmüştür.

BUR 318, ÇAN 429, ÇAN 411, BAL 436 ve BUR 301 sarımsak izolatlarından oluşan diğer alt grup ise KF623541 erişim numaralı Sudan, JX433020 erişim numaralı Arjantin ve JX433020 erişim numaralı Almanya soğan izolatları ile aynı alt grup içerisinde yer alarak farklı coğrafi alanlarda bulunmalarına rağmen aynı alt grupta yer almışlardır. Filogenetik çalışmalarda, Asya orijinli etmenlerin varlığı sıklıkla bildirilmektedir. Çin’in dünya sarımsak üretiminin yaklaşık % 80’ini oluşturması ve bu ülkeden, sarımsak viral kompleksini içerdiği düşünülen dişlerin farklı coğrafyalara kolaylıkla yayılması, filogenetik çalışma bulgularında oluşan Asya orijinli izolatlardan kaynaklanan yakın ilişkileri açıklamaktadır. Filogenetik çalışmalarda bu bilgiyi destekler çalışmalar içerisinde, Berada ve ark. (2015) Polonya’da elde ettikleri OYDV ile enfekteli soğan izolatlarının İtalya, Almanya ve Japonya izolatları ile birlikte aynı alt grupta bulunduğunu ve bu çalışmaya benzer şekilde Asya orijinli bir izolatın, Avrupa izolatları ile aynı alt grupta yer aldığını rapor etmişlerdir. Arya ve ark. (2006) Hindistan’da, OYDV ile enfekteli tek bir sarımsak izolatının bulunduğu soyağacının bu çalışmada oluşturulan soyağacına benzer şekilde iki gruba ayrıldığını ve bu gruplar içerisinde Hint izolatının, Çin, Japonya, Hollanda ve Brezilya izolatları ile birlikte aynı grupta bulunduğunu, Majumder ve ark. (2017) Nijerya’da OYDV sarımsak izolatının Asya orijinli izolatlarla aynı grupta yer aldığını bildirmişlerdir.

4.6. Mekanik Taşınma Denemeleri Bulguları

Klonlama çalışmalarında kullanılan 20 izolat içerisinde seçilen 9 izolat ile gerçekleştirilen mekanik taşınma denemeleri sonucunda, bu izolatlardan 3’ünün indikatör bitkilere taşınabildiği, DAS-ELISA analizleri ile tespit edilmiştir.

Bu kapsamda, soğan ve sarımsak bitkilerinden oluşan indikatör bitkilere uygulanan inokulasyonlar sonucunda, LYSV ile enfekteli BUR 293 sarımsak izolatı ve OYDV ile enfekteli BUR 301 ve BAL 449 sarımsak izolatlarının, sarımsak bitkilerine inokule edildiği belirlenmiş, soğanlarda ise inokulasyonlar sonucunda enfeksiyon tespit

edilememiştir. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen mekanik taşınma denemeleri sonuçları Çizelge 4.14’de verilmiştir.

Çizelge 4.14. Mekanik taşınma denemeleri sonuçları

İzolat Adı	Konukçu	Toplandığı Yer	Etmen	Mekanik Taşınma Denemeleri Sonuçları*
ÇAN 244	Pırasa	Çanakkale	LYSV	-
BUR 288	Pırasa	Bursa	LYSV	-
BUR 293	Sarımsak	Bursa	LYSV	+
BAL 378	Sarımsak	Balıkesir	LYSV	-
BAL 398	Pırasa	Balıkesir	LYSV	-
BUR 301	Sarımsak	Bursa	OYDV	+
ÇAN 419	Sarımsak	Çanakkale	OYDV	-
BAL 449	Sarımsak	Balıkesir	OYDV	+
BUR 487	Pırasa	Bursa	OYDV	-

*+: enfekteli, -: sağlıklı

Mekanik taşınma denemeleri kapsamında, indikatör bitkilere inokulasyonları gerçekleştirilen BUR 293, BUR 301 ve BAL 449 sarımsak izolatlarının, arazi çalışmaları sırasında Potyvürüslerin (LYSV ve OYDV) sarımsaklarda meydana getirdiği tipik belirtiler olan sararma, bodurlaşma, mozaik, renk açılmaları, kesikli çizgi oluşumları ve yapraklarda kıvrılma belirtilerine benzer belirtileri, indikatör bitkilerde de oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.23 ve Şekil 4.24).



Şekil 4.23. BUR 293 sarımsak izolatının mekanik taşınma denemeleri sonucunda indikatör bitkilerinde oluşturduğu belirtiler 293a, 293b: kesikli çizgi ve renk açılması belirtileri



Şekil 4.24. BUR 301 ve BAL 449 numaralı OYDV izolatlarının mekanik taşınma denemeleri sonucunda indikatör bitkilerinde meydana getirdiği yapraklarda kıvrılma ve renk açılma belirtileri

Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen mekanik taşınma denemeleri, daha çok *Allium* cinsi bitkilerin mekanik olarak bitki özsuğu ile indikatör bitkilere taşınabilir olduğunu kanıtlamak amacı ile gerçekleştirilmiştir. Klonlama analizlerinde kullanılan izolatlar içerisinde toplandığı yer, enfekteli olduğu etmen ve konukçuları göz önünde

bulundurularak gerçekleştirilen analizler sonucunda, hem LYSV'nin hem de OYDV'nin indikatör bitkilere taşındığı belirlenmiştir.

Bitki virüs hastalıklarının tanılanmasında kullanılan ve biyolojik yöntemler içerisinde yer alan mekanik inokulasyon çalışmalarının başarısı, virüs-konukçu ilişkisine göre farklılık gösterebilmektedir. *Allium* virüsleri, sınırlı bir konukçu aralığı ile karakterize edilmelerine (King ve ark., 2011) rağmen dünya literatürlerinde, *Allium* cinsi bitkilerin sınırlı olan konukçularının mekanik olarak taşınmasına ilişkin birçok çalışma yer almaktadır. Bu çalışmalarda, çoğunlukla indikatör bitki olarak yabancı formda bulunan *Chenopodium* türlerinin kullanıldığı görülmekle birlikte *Allium* cinsinde yer alan ve ticari önemi bulunan kültür bitkileri ile gerçekleştirilen çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmalar içerisinde *C. amaranticolor* ve *C. quinoa* indikatör bitkilerinin kullanıldığı çalışmalarda, Bos ve ark. (1978), Noda ve Inouye (1989), Fidan (2010), bu bitkilerde klorotik lokal lezyon ve/veya nekrotik lokal lezyonlar tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bu bitkilerin yanı sıra sarımsak, soğan veya pırasa bitkilerinin de kullanıldığı çalışmalar arasında, Kurtuluş (2012) LYSV ile enfekteli 8 pırasa izolatu ile gerçekleştirdiği inokulasyonlar sonucunda izolatların tamamını pırasa fidelerine inokule etmeyi başarmış ve indikatör bitkilerde izolatlara göre değişmekle birlikte farklı şiddetlerde sararma ve bodurlaşma belirtilerini rapor etmiştir. Mahmoud ve ark. (2007) Mısır'da bu araştırmaya benzer sonuçları elde ettikleri çalışmalarında, OYDV ile enfekteli sarımsak bitkilerinden izole ettikleri bitki özularını, *C. amaranticolor* indikatör bitkisine inokule ettikten sonra oluşan lokal lezyon içerisinde tekrar izole ettikleri etmeni, doku kültürü yöntemi ile virüsten arı olduğunu belirledikleri iki farklı sarımsak çeşidine ve pırasa bitkilerine inokule etmişler ve yalnızca sarımsak bitkilerinde inokulasyonların gerçekleştiğini ve sarımsaklarda oluşan belirtileri, bu çalışmada gözlenen belirtilere benzer şekilde belirgin kesikli çizgi oluşumları, sararma ve yapraklarda kıvrılma şeklinde tanımlamışlardır. Bir başka çalışmada Wahab ve ark. (2009) OYDV ile enfekteli pırasa soğan ve sarımsak izolatlarını, *C. murale* ve *Datura innoxia* yabancı bitkilerinin yanı sıra, pırasa soğan, sarımsak ve zambak bitkilerinden oluşan indikatör bitkilere inokule etmişler ve bu çalışmaya benzer şekilde sarımsaktan izole ettikleri etmeni tekrar sarımsak bitkisine taşımayı başarmışlardır. Sarımsak bitkileri arasında % 60 oranında başarıyla gerçekleştirdikleri inokulasyon çalışmaları sonucunda indikatör bitkilerde bu çalışmada gözlenen belirtilere benzer şekilde, mozaik, çizgi oluşumu, sararma ve bodurlaşma belirtileri gözlemişlerdir.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

“Güney Marmara Bölgesi’nde *Allium* Cinsi Bitkilerde Potyviruslerin Tanılanması ve Karakterizasyonu” isimli doktora tez çalışması kapsamında 2014-2017 yılları arasında, Bursa, Balıkesir ve Çanakkale illerinde pırasa, sarımsak ve soğan bitkilerinde gerçekleştirilen ve OYDV, LYSV ve TuMV hastalıklarının bölgede mevcut durumlarının belirlenmesi ve elde edilen izolatların karakterizasyonları ile ilgili çalışmalara ait sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- 2014-2017 yılları arasında gerçekleştirilen survey çalışmaları sonucunda 142’si pırasa, 197’si soğan ve 155’i sarımsak bitkilerinden oluşan 494 örneğin, 181’i Bursa, 163’ü Balıkesir ve 150’si Çanakkale illeri ve ilçelerinden toplanmıştır.
- Toplanan örneklerin tamamı OYDV, LYSV ve TuMV hastalıklarına karşı DAS-ELISA yöntemi ile test edilmiş ve 494 örnekten 187’si tek başına veya karışık enfeksiyon şeklinde LYSV ve/veya OYDV ile enfekteli olarak (% 37,85) bulunmuştur. Örneklerin hiçbirinde TuMV enfeksiyonları tespit edilememiştir.
- DAS-ELISA testi bulgularına göre, toplanan örneklerin 52’sinin (% 10,52) yalnızca LYSV ile enfekteli olduğu belirlenmiş, 100 örnekte ise (% 20,24) tek başına OYDV enfeksiyonları saptanmıştır. Buna ek olarak 35 izolatın (% 7,08) karışık enfeksiyon (OYDV+LYSV) şeklinde bulunduğu tespit edilmiştir.
- LYSV ile enfekteli türler arasında, pırasa izolatları en fazla enfeksiyonu (% 92,30) oluşturan tür olurken, OYDV ile enfekteli türler arasında ise sarımsak izolatları (% 77) en fazla enfeksiyon oluşturan tür olmuştur.
- Pırasa, sarımsak ve soğan bitkileri içerisinde hastalıklı bitki sayıları ve toplam bitki sayıları esas alınarak belirlenen enfeksiyon oranlarına bakıldığında, en fazla pırasaların (% 61,26) en az ise soğan (% 5,07) bitkilerinin enfekteli olduğu saptanmış, sarımsak bitkilerinde ise bu oran % 58,06 olarak belirlenmiştir.
- Çanakkale ili ve ilçelerinden toplanan 150 örneğin, 82’si (% 54,66) LYSV ve/veya OYDV ile enfekteli bulunmuştur. Çanakkale ilinde LYSV enfeksiyonları % 18,66, OYDV enfeksiyonları % 27,33 olarak belirlenirken karışık enfeksiyon oranı ise % 8,66 olarak saptanmıştır.

- Balıkesir ili ve ilçelerinden toplanan 163 örneğin ise 70'i (% 42,94) LYSV ve/veya OYDV ile enfekteli bulunmuştur. Buna göre, LYSV enfeksiyonları % 6,74, OYDV enfeksiyonları % 26,99 olarak belirlenirken, karışık enfeksiyon oranı ise % 9,20 olarak saptanmıştır.
- Bursa ili ve ilçelerinden 181 örnek toplanmış ve bu örneklerin 35'inde (% 19,33) LYSV ve/veya OYDV enfeksiyonları belirlenmiştir. Bursa'da LYSV enfeksiyonları % 7,81, OYDV enfeksiyonları % 8,28, karışık enfeksiyon oranı ise % 3,86 olarak saptanmıştır.
- Enfekteli türler içerisinde pırasa bitkilerinde orta damara paralel renk açılmaları ve çizgi oluşumları, mozaik, bodurlaşma ve bitki genelinde matlaşma belirtileri en sık gözlenen belirtiler olmuştur. Sarımsak bitkilerinde ise genel olarak yapraklarda kıvrılma ve gelişme geriliği ile bodurlaşma belirtileri saptanırken, soğanlarda ise oluşan belirtilerin gelişme geriliği başta olmak üzere sararmalar şeklinde olduğu gözlenmiştir. Simptomatolojik gözlemler sonucunda her üç tür için de geçerli olmak üzere bahsi geçen belirtilerin LYSV ve OYDV enfeksiyonları için ayırt edici belirtiler olmadığı ve bu belirtilerin görüldüğü bitkilerde LYSV ve/veya OYDV enfeksiyonlarının olma olasılığının önemli ölçüde var olduğu sonucuna varılmıştır.
- Klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere gerçekleştirilen ve örneklerin toplandığı iller ve türlerin göz önünde bulundurulduğu RT-PCR çalışmaları sonucunda LYSV ve OYDV ile enfekteli 10'ar izolatta, hedeflenen büyüklükte bantlar (LYSV: 1030 bp; OYDV: 602 bp) elde edilmiştir.
- LYSV ve OYDV ile enfekteli olduğu bilinen izolatlarla ait RT-PCR ürünleri, klonlama yöntemi ile plazmit vektörüne başarı ile klonlanmış ve restriksiyon enzimi ile kesme işlemi ardından elde edilen plazmit DNA'lardan 20 tanesi seçilerek sekans analizine gönderilmiştir.
- Sekans analizleri kapsamında, Güney Marmara Bölgesi LYSV izolatlarının, DNA dizilerinin kendi aralarında gerçekleştirilen çoklu nükleotit ve amino asit dizi analizleri sonuçlarının sırası ile % 79,55-99,81 ve % 80,69-100 benzerlik taşıdığı belirlenmiştir.
- Güney Marmara Bölgesi OYDV izolatlarının, DNA dizilerinin kendi aralarında gerçekleştirilen çoklu nükleotit ve amino asit dizi analizleri sonucunda ise sırası ile % 76,25-99,67 ve % 83,50-100 benzer olduğu belirlenmiştir.

- Güney Marmara Bölgesi'nden elde edilen izolatların, gen bankasında bulunan ve dünyanın farklı bölgelerinden elde edilen 20 izolat ile gerçekleştirilen çoklu dizi karşılaştırmaları sonucunda LYSV izolatlarının nükleotit ve amino asit düzeylerinde sırası ile % 77,90-99,27 ve % 78,19-99,69 benzerlik gösterdiği saptanmıştır.
- Güney Marmara Bölgesi'nden elde edilen izolatların, gen bankasında bulunan ve dünyanın farklı bölgelerinden elde edilen 20 izolat ile gerçekleştirilen çoklu dizi karşılaştırmaları sonucunda OYDV izolatlarının nükleotit ve amino asit düzeyinde sırası ile % 74,09-84,72 ve % 79,00-92,50 benzerlik gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.
- Filogenetik analizler sonucunda oluşturulan soyağaçları, Güney Marmara Bölgesi LYSV izolatlarının nükleotit ve amino asit düzeyinde konukçuya spesifik olarak pırasa ve sarımsak izolatlarından oluşan iki ayrı gruptan oluştuğunu göstermiştir.
- Güney Marmara Bölgesi OYDV izolatlarının nükleotit ve amino asit düzeyinde oluşturduğu soyağacında eşit sayıda izolatın bulunduğu iki gruptan birinde yalnızca sarımsak izolatlarının yer aldığı, diğer grupta ise pırasa ve sarımsak izolatlarının birlikte bulunduğu belirlenmiş ve bu grupta yer alan alt grupların ise farklı illere ait izolatların bir araya gelmesinden oluştuğu belirlenmiştir.
- Güney Marmara Bölgesi LYSV izolatları ile dünya izolatlarının nükleotit ve amino asit dizilimi kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı, KR075504 erişim numaralı Sırbistan ve AB005612 erişim numaralı Japonya pırasa izolatlarının Güney Marmara Bölgesi pırasa izolatları ile birer alt grup oluşturduğu görülmüştür. Ayrıca, KF597283 erişim numaralı Meksika sarımsak izolatı, Güney Marmara Bölgesi sarımsak izolatları ile ayrı bir grupta yer alarak pırasa ve sarımsak türlerinin farklı gruplar altında oluştuğu sonuçlarını ortaya çıkarmıştır.
- Güney Marmara Bölgesi OYDV izolatları ile dünya izolatlarının nükleotit ve amino asit dizilimi kullanılarak görüntülenen filogenetik soyağacı, bölge izolatlarının iki farklı alt grupta yer aldığını göstermiştir. Buna göre sarımsak ve pırasa izolatlarından oluşan birinci alt grubun, DQ925455 erişim numaralı Vietnam pırasa, AJ292223 erişim numaralı Çin, AB219833 erişim numaralı Japonya ve JX429964 erişim numaralı İspanya sarımsak izolatları ile aynı alt grupta yer aldığı belirlenmiştir. Sarımsak izolatlarından oluşan diğer alt grubun ise

JX433019 erişim numaralı Arjantin, JX433020 erişim numaralı Almanya ve KF623541 erişim numaralı Sudan soğan izolatları ile aynı alt grupta bulunduğu sonuçlarına varılmıştır.

- Mekanik taşınma denemeleri kapsamında, klonlama çalışmalarında kullanılan izolatlardan 9 tanesi indikatör bitkilere inokule edilmiş ve inokulasyonlar sonucunda sarımsak izolatları içerisinde 2 OYDV izolatu ile 1 LYSV izolatu sarımsak bitkilerine mekanik olarak taşındığı belirlenmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar, Güney Marmara Bölgesi'nde LYSV ve OYDV etmenlerinin varlığını doğrular sonuçları ortaya çıkarmıştır. Pırasa, soğan ve sarımsak bitkilerinin yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlarda bu etmenlerin varlığı bilinmektedir. LYSV ve OYDV viral hastalık etmenlerinin verim ve kalite kayıplarına yol açtığı, literatürlerde de desteklenmekte olup, bu kayıpların azaltılabilmesi ve bundan sonra gerçekleştirilecek olan çalışmalara katkı sunabilmesi için sunulan öneriler aşağıda özet olarak verilmiştir.

- Sarımsak virüs kompleksini oluşturan viral hastalık etmenlerinin, vejetatif üretim materyalleri ile inokulum kaynağı oluşturmaları ve uzak mesafelere kolaylıkla taşınabilmeleri nedeni ile üretimde sertifikalı tohum kullanımına geçilmesi gerekmektedir.
- Ülkemiz Bitki Karantinası Yönetmeliği'ne göre, ithal edilen yemeklik sarımsakların mevzuat dahilinde bitki sağlığı açısından gerekli analizleri yapılmakta fakat, viral etmenler yönünden analizler gerçekleştirilmemektedir. Yemeklik olarak gelen bu sarımsakların ülkemizde üretim amaçlı olarak da kullanılması, viral etmenler açısından risk oluşturduğu ve bu bağlamda yönetmelikte güncellemelerin yapılması gerektiğini ortaya çıkarmaktadır.
- Sarımsak üretim alanları, tohumluk ve yemeklik olarak ayrılmalı, oluşturulacak bu alanların birbirlerine uzak mesafelerde olması sağlanmalıdır.
- *Allium* cinsi bitkilerin virüs hastalıklarına karşı dayanıklı çeşitleri geliştirilmeli ve bu çeşitlerin adaptasyonları sağlanmalıdır.
- Potyviruslerin yaprak bitleri ile çoğalıcı olmayan formda hızlı ve etkin bir şekilde bulaşması, *Allium* cinsi bitkilerin bu viral etmen grubu ile enfekte olmasını kolaylaştırmaktadır. Bu durumun önüne geçilebilmesi için, vektör böcekler ile etkin mücadele yöntemleri uygulanmalı ve bu mücadele yöntemlerinin üreticiler arasında yaygınlaştırılması ve sürdürülebilir olması gerekmektedir.

- Bir viral etmenin kontrol edilebilme olasılığı, o etmenin ne zaman, nasıl ve nerede ortaya çıktığının bilinmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu kapsamda moleküler tabanlı analizler ile oluşturulan filogenetik soyağacı çalışmaları son derece önem arz etmektedir. *Allium* cinsi bitkilerde viral etmenlerden kaynaklı oluşacak zararların azaltılması ya da önüne geçilebilmesi için gerçekleştirilecek çalışmaların da, günümüz bilimsel teknolojilerine paralel nitelikte olması ve tüm hızı ile devam ettirilmesi gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- Alper M., Levy S., Loebenstein G., 1984. Virus Diseases in Anemones. Hassadeh 5, 105-106.
- Anonim, 2013. <http://www.megep.meb.gov.tr>.
- Anonim, 2017a. <http://www.fao.org/statistics/en/>.
- Anonim, 2017b. <http://www.tuik.gov.tr>.
- Arya M., Baranwal V.K., Ahlawat Y.S., Singh L., 2006. RT-PCR Detection and Molecular Characterization of *Onion Yellow Dwarf Virus* Associated with Garlic and Onion. *Current Science* 91 (9): 1230-1234.
- Barg E., Lesemann D.E., Vetten H.J., Green S.K., 1997. Viruses of *Alliums* and Their Distribution in Different *Allium* Crops and Geographical Regions. First International Symposium on Edible Alliaceae 607-616.
- Bereda M., Elżbieta P., Kalinowska M., Stefan S., 2015. Genetic Diversity and Evidence of Recombination in the Coat Protein Gene of *Onion Yellow Dwarf Virus* *European Journal of Plant Pathology* 377-387.
- Blackman R.L., Eastop V.F., 2000. Aphids on the World's crops: An Identification and Information Guide. John Wiley and Sons Ltd., Chichester.
- Bos L., 1976. Onion Yellow Dwarf Virus. C.M.I./A.A.B. Descr. P1. *Viruses*. 158:4.
- Bos L., Huijberts N., Huttinga H. ve Maat D.Z., 1978. *Leek Yellow Stripe Virus* and its Relationships to *Onion Yellow Dwarf Virus* - Characterization, Ecology, and Possible Control. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 84(5): 185-204.
- Bos L., 1981. *Leek Yellow Stripe Virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. 240.
- Bos L., 1983. Viruses and Virus Diseases of Allium Species. *Acta Hort.*, 127: 11-29.
- Bremer H., 1937. Cberdiebisherfalschlich "Zwiebelrotz" Genannte Gelbstreifigkeit an Zwiebelsamenträgern. *Phytopath. Z.* 10: 79-105.
- Brierley P., Smith F.F., 1944. The Perennialtree Onion a Carrier of *Onion Yellow Dwarf Virus*. *Phytopathology* 34: 506-507.

- Brierley P., Smith F.F., 1946. Reaction of Onion Varieties to Yellow Dwarf Virus and to Three Similar Viruses Isolated From Shallot, Garlic And Narcissus. *Phytopathology* 36: 292-296.
- Burnie G., Forrester S., Greig D., Guest S., Harmony M., Hobley S., Jackson G., Lavarack P., Melanie L., Donald R.M., Macoboy S., Molyneux B., Moodie D., Moore J., North T., Newan D., Pienaar K., Purdy G., Silk J., Ryan S., Schien G., 1999. *Botanica: The Illustrated A-Z of Over 10,000 Garden Plants* Random House Australia Pty Ltd, New South Wales. 74.
- Canavelli A., Nome S., Conci V.C., 1998. Incidencia De Las Virosis En Cultivos De Ajo Rosado Paraguayo. *Fitopatologia Brasileira* 23: 354-358.
- Celli M.G., Torrico A.K., Kiehr M., Conci V.C., 2013. Striking Differences in the Biological and Molecular Properties of Onion and Garlic Isolates of *Onion Yellow Dwarf Virus*. *Archives of Virology* 158 (6): 377-1382.
- Chen J., Adams M.J., 2001. Molecular Characterisation of a Complex Mixture of Viruses in Garlic with Mosaic Symptoms in China. *Arch Virol.*, 146: 1841-1853.
- Chen J., Adams M.J., 2002. Characterisation of Some Carla and Potyviruses from Bulb Crops in China. *Arch Virol.*, 147: 419-428.
- Clark M. F., Adams A.N. 1977. Characteristic of the Microplate Method of Enzyme Linked Immune Sorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *J. Gen. Virol.*, 34: 475-483.
- Clark J. M., 1988. Novel Non-templated Nucleotide Addition Reactions Catalyzed by Procaryotic and Eucaryotic DNA Polymerases. *Nucleic Acids Res.*, 16: 9677-86.
- Cohen J., Franck A., Umiel N., Hadar E., Finckelstein S., Gera A., 1996. Virus Diseases in Anemone. *Phytoparasitica* 24: 170-171.
- Conci V. C., Helguera M., Nome S.F., 1999. Serological and Biological Comparison of *Onion Yellow Dwarf Virus* from Onion and Garlic in Argentina. *Fitopatologia Brasileira* 24: 73-75.

- Conci V.C., Canavelli P., Lunello J., Rienzo D., Nome S.F., Zumelzu G., Italia R., 2003. Yield Losses Associated with Virus-infected Garlic Plants During Five Successive Years. *Plant Dis.*, 87: 1411-1415.
- 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. IOCV, University of California, Riverside, CA. Pp: 47-53.
- Daniels J., 1999. Occurrence of Viruses in Garlic in The State of Rio Grande de Sul Brazil. *Fitopatol Brasil* 24, 91.
- Diekmann M., 1997. FAO/IPGRI Technical Guidelines For The Safe Movement of Germplasm No.18. *Allium* spp. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. International Plant Genetic Resources Institute, Rome. 76: 594-596.
- Dovas C.I., Hatziloucas E., Salomon R., Barg E., Shibolet Y., Katis N.I., 2001. Incidence of Viruses Infecting *Allium* spp. in Greece. *European Journal of Plant Pathology* 107: 677-684.
- Dovas C.I., Hatziloukas E., Salomon R., Barg E., Shibolet Y., Katis N.I., 2002. Comparisons of Methods For Virus Detection in *Allium* spp. *J. Phytopath.*, 149: 11-12.
- Dovas, C.I. ve Vovlas C., 2003. Viruses Infecting *Allium* ssp. in Southern Italy. *J. Plant Pathol.*, 85: 135-135.
- Drake C.J, Tate H.D. ve Harris H.M., 1933. The Relationship of Aphids to The Transmission of Yellow Dwarf of Onion. *Journal of Economic Entomology* 26: 841-846.
- Edwardson J.R., Christie R.G., 1991. *CRC Handbook of Viruses Infecting Legumes*. Boca Raton, FL, USA. CRC Press.
- 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.

- Fajardo T.V.M., Nishijima M., Buso J.A., Torres A.C., Avila A.C., Resende R.O., 2001. Garlic Viral Complex: Identification of Potyviruses and Carlavirus in Central Brazil. *Fitopatologia. Brasileira* 26: 619-626.
- Fayad-Andre M., Dusi A.N., Resende R.O., 2011. Spread of Viruses in Garlic Fields Cultivated Under Different Agricultural Production Systems in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 36: 341-349.
- Fidan H., Baloğlu S., Koç G., Birişik N., 2009. Soğan ve Sarımsakda Saptanan Türkiye İçin Yeni Virüs Hastalıkları: *Onion Yellow Dwarf Virus* ve *Shallot Latent Virus*. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi. 15-18 Temmuz 2009. Van.
- Fidan H., 2010. Sarımsak, Soğan ve Pırasa'daki Virüs Hastalıklarının Saptanması ve Taşköprü 56 Sarımsak Tipinin En Yaygın Virüse Karşı Reaksiyonunun Belirlenmesi. Doktora Tezi. ukurova Üniversitesi, Türkiye.
- Gallitelli D., Minafra, A., 1994. Electroforesis Course on Plant Virus Diagnosis. 15-30 October 1994. Adana. Turkey. P.89-99.
- Gardner M.W., Kendrick J.B., 1921. Turnip Mosaic. *Journal of Agricultural Research*. 22: 123-124.
- Gera A.D., Lesemann D.E., Cohen J., Franck A., Levy S. ve Salomon R., 1997. The Natural Occurrence of *Turnip Mosaic Potyvirus* in *Allium ampeloprasum*. *Journal of Phytopathology* 145: 289-293.
- Gilani S. T., Hameed S., Shah H., 2016. Occurance and Distribution of Potyviruses Infectig Garlic in Pakistan. *J. Agric. Res.*, Vol. 29 No.1.
- Gupta N., Islam S., Sharma S.K. ve Baranwal V.K., 2017. Complete Genome Sequence of an Isolate of Leek Yellow Stripe Virus From Garlic in India. *Journal of Plant Pathology* 99: (3).
- Hardtl H., 1965. Gelbstreifigkeitbeiporree. *Gesunde Pflangen* 17: 235-236.
- Heinrich P.K., Larry D.L., 1996. Garlic The Science and Therapeutic Application of *Allium sativum* L. and Related Species. Williams and Willkins, Maryland, USA. 21201-2436.
- Heinze K., 1952. Überdas Verhaltenunbeständiger Phytopathogener Virenbei der

- Übertragung durch Blattläuse. *Phytopath.*, 59: 3.
- Henderson W.J., 1935. Yellow Dwarf, a Virus Disease of Onion and its Control. *Res. Bull. Of Agric. Exp., Stn. of the Iowa State College of Agricultural and Mechanical Arts.* 188: 209-255.
- Hutinga H., 1975. Purification by Molecular Sieving of a Leek Virus Related to *Onion Yellow Dwarf Virus*. *Neth. J. Pl. Path.*, 81-83.
- James D., 1999. A simple and Reliable Protocol for the Detection of Apple Stem Grooving Virus by RT-PCR and in a Multiplex PCR Assay. *J. Virol. Methods* 83: 1-9.
- Jiang B., Hong N., Wang G.P., Hu J., Zhang J.K., Wang C.X., 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.
- Kajihara H., Muramoto K., Fuji S., Tanaka S., Ito S., 2009. Simultaneous Detection of *Japanese Yam Mosaic Virus* and *Yam Mild Mosaic Virus* from Yam Leaves Using a Tube Capture Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assay. *Gen Plant Pathol.*, 75: 72-75
- Karanfil A., 2014. Çanakkale İlinde Marul Mozaik Virüsü (*Lettuce Mosaic Virus*; LMV) İzolatlarının Tanınması Ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Türkiye.
- Katis N.I., Maliogka V.I., Dovas C.I., 2012. Viruses of The Genus *Allium* in the Mediterranean Region. In: *Viruses and Virus Diseases of Vegetables in the Mediterranean Basin* (Lecoq H., Loebenstein G., ed.). Academic Press, San Diego, CA, USA. 163-208.
- King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., 2011. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego. USA.
- Klukackova J., Navratil M., Duchoslav M., 2007. Natural Infection of Garlic (*Allium sativum* L.) by Viruses in the Czech Republic. *J Plant Dis Protect.*, 114 (3): 97-100.

- Knoche K., Kephart D., 1999. Cloning Blunt-end Pfu DNA Polymerase-generated PCR Fragments into pGEM-T Vector Systems. *Promega Notes*. 71: 10-13.
- Koch M., Salomon R., 1994. Serological Detection of *Onion Yellow Dwarf Virus* in Garlic. *Plant Dis.*, 78: 785-788.
- Korkmaz S., Çevik B., 2009. Marmara Bölgesi Pırasa Üretim Alanlarında Yeni Bir Virüs Hastalığı: Pırasa Sarı Çizgi Virüsü. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi. Van. Türkiye. 15-19 Ağustos 2009. s. 55-55.
- Korkmaz S., Çevik B., Kurtuluş E., Tuzlalı H.T., 2011. Marmara Bölgesi Soğan Üretim Alanlarında Yeni Bir Virüs Hastalığı: Soğan Sarı Cücelik Virüsü. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri. Kahramanmaraş. Türkiye. s. 397.
- Kumar P., Dhawan P., Mehra R., 2012. Symptoms and Losses Caused by *Onion Yellow Dwarf Virus* and *Iris Yellow Spot Virus* Diseases of Onion Crop in Northern India. *Journal of Mycology and Plant Pathology*. 42 (1): 153-160.
- Kumar P., Verma R., Mishra R., Petrov N.M., Stoyanova M., Stoev A., Bakardjieva N.V., Gaur R.K., 2015. Molecular Characterization and Recombination Analysis of an Indian Isolate of *Onion Yellow Dwarf Virus*. *Eur J Plant Pathol.*, India.
- Kurtuluş E., 2012. Çanakkale İlinde Pırasa Sarı Çizgi Virüsü (*Leek Yellow Stripe Virus*; LYSV)'nün Biyolojik ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Türkiye.
- Kurtuluş E., Korkmaz S., 2014. Çanakkale İlinde Pırasa Sarı Çizgi Virüsü (Leek yellow stripe virus) İzolatlarının Tanınması ve Karakterizasyonu. Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, 3-5 Şubat 2014, Antalya.
- Lee J.B., Kim S.M., Lee J.S., Park J.W., Choi H.S., Lee J.H., Lee K.W., Lee S.H., 2005. Incidence and Variation of The Viruses in The Northern Ecotype Garlic. *J Virol Methods*. 124 (1): 55-56.
- Lot H., Chevelon V., Souche S., Dellecolle B., 1998. Effects of *Onion Yellow Dwarf Virus* and *Leek Yellow Stripe Virus* on Symptomatology and Yield Loss of Three French Garlic Cultivars. *Plant Dis.*, 82: 1381-1385.

- Lunello P., Ducasse D., Conci V., 2005. Improved PCR Detection of Potyviruses in *Allium* Species. *European Journal of Plant Pathology* 112: 371-378.
- Lunello P., Di Rienzo J., Conci VC., 2007. Yield Loss in Garlic Caused by *Leek Yellow Stripe Virus* Argentinean Isolate. *Plant Dis.* 91: 153-158.
- Mahmoud S. Y. M., Abo-el-Maaty S. A., El-Borollosy A. M., Abdel-Ghaffar M. H., 2007. Identification of *Onion Yellow Dwarf Potyvirus* as One of the Major Viruses Infecting Garlic in Egypt. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science.* Vol.2 No.6 pp.746-755.
- Majumder S., Yadav V., Yakasai M.A., Muhammad J.Y., 2017. First Report of *Onion Yellow Dwarf Virus* in Garlic From Nigeria. *Journal of Plant Pathology* 99 (1): 287-304.
- Mangli A., Heyam S.M., El Hussein A.A., Giovanni E., Albanese G., Tomassoli L., 2014. Molecular Analysis of the 3' Terminal Region of *Onion Yellow Dwarf Virus* from Onion in Southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 53 (3): 438-450.
- Melhus I.E., Reddy C.S., Henderson W.J., Vestal E., 1929. A New Virus Disease Epidemic Ononions. *Phytopathology* 19: 73-77.
- Newton C.R., Graham A., 1994. In: PCR, BIOS Scientific Publishers. Ltd., Oxford, UK. 13.
- Noda C., Inouye N., 1989. Leek Yellow Stripe Virus Isolated from an Ornamental *Allium* Plant in Japan. *Ann Phytpath. Soc., Japan.* 55: 208-215.
- Novak J.B., 1959. A Contribution to the Knowledge of the Viroses of Bulbous Vegetables in the Czechoslovak Republic 287-309.
- Ohshima K., Yamaguchi Y., Hirota R., 2002. Molecular Evolution of *Turnip Mosaic Virus*: Evidence of Host Adaptation, Genetic Recombination and Geographical Spread. *Journal of General Virology* 83: 1511-1521.
- Pramesh D., Baranwal V.K., 2015. Production of Virus Free Garlic Trough Meristem Tip Culture After Solar or Hot Air Treatment of Cloves. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnolgy.* Volume 90: 180-186.

- Provvidenti R., Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J., Gibbs A.J., Watson L. 1996. *Turnip Mosaic Potyvirus*. In: *Viruses of Plants*, Wallingford, CAB International, UK. pp. 1340-1343.
- Rowhani A., Maningas M.A., Lile L.S., Daubert S.D., Golino D.A., 1995. Development of a Detection System for Viruses of Woody Plants Based on PCR Analysis of Immobilized Virions. *Phytopathology* 85: 347-352.
- Saffar Z.N., Torabi S., Naghavi M., Golnaraghi A.R., Aryakia E., 2013. *Onion Yellow Dwarf Virus* on Leek, Onion, Shallot And Welsh Onion in Iran. *Journal of Plant Pathology* 95 (4, Supplement). 4: 69-77.
- Salomon R., 2002. Virus Diseases in Garlic and the Propagation of Virus-free Plants. In: *Allium Crop Science: Recent Advances*. Rabinowitch H.D., Currah L. (ed.). New York. CABI Publ., 311-328.
- Schultz E.S., 1921. A Transmissible Mosaic Disease of Chinese Cabbage, Mustard and Turnip. *J Agric Res.*, 22: 173-177.
- Scrace., Denton J.O., Clover G.R.G. 2015. Potyviruses and Tobraviruses Infecting Ornamental *Allium* Species in the United Kingdom. *New Disease Reports* 32, 13.
- Şevik M.A., Akcura C., 2013. Viruses Occurring in Onion Crop in Amasya Province, the Major Onion Producing Region in Turkey. *Indian Journal of Virology* 24, 78-81.
- Şevik M.A., Temiz A., 2011. Amasya İli Soğan Üretim Alanlarında *Onion Yellow Dwarf Virus* (OYDV)'un Belirlenmesi. *Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi, Kahramanmaraş. Bildiri Özetleri*. s. 398.
- Shahraeen N., Lesemann D.E., Ghotbi T., 2008. Survey for Viruses Infecting Onion, Garlic and Leek Crops in Iran. *Bull OEPP/EPPO Bull.* 38: 131-135.
- Shukla D.D., Ward C.W., 1988. Amino Acid Sequence Homology of Coat Proteins as a Basis for Identification and Classification of the Potyvirus Group. *Journal of General Virology* 69: 2703-2710.
- Simon P.W., Jenderek M.M., 2003. Flowering, Seed Production and the Genesis of Garlic Breeding. *Plant Breeding Reviews*. Vol. 23: 211-244.

- Sivaprasad Y., Sivaprasad P., Garrido K., Mendez P., Silvia A., Garrido L., 2017. First Report of *Onion Yellow Dwarf Virus* Infecting Onion in Ecuador. *Journal of Plant Pathology* 99 (1): 287-304.
- Stefanac Z., Plese N., 1980. *Turnip Mosaic Virus* in Two Mediterranean *Allium* Species, Proc. 5th Congr. Mediterranean Phytopathological Union. Patras, Greece. 37-38.
- 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.
- Sumi S., Tsuneyoshi T., Fututani H., 1993. Novel Rod-shaped Viruses Isolated from Garlic, *Allium sativum*, Possessing a Unique Genome Organization. *Journal of General Virology* 74: 1879-1885.
- Tabannera N., Fernández-Tabanera E., Lunello P., Garcia-Arenal F., 2017. First Report of *Onion Yellow Dwarf Virus* in Leek (*Allium ampeloprasum* var. porrum) in Spain.
- Takaichi M., Yamamoto M., Nagakubo T., Oeda K., 1998. Four Garlic Viruses Identified by Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction and Their Regional Distribution in Northern Japan. *Plant Dis.*, 82: 694-698.
- Takaichi M., Nagakubo T., Oeda K., 2001. Mixed Virus Infection of Garlic Determined by a Multivalent Polyclonal Antiserum and Virus Effects on Disease Symptoms. *Plant Dis.*, 85: 71- 75.
- Takaki F., Sano T., Yamashita K., 2006. The Complete Nucleotide Sequence of Attenuated Onion Yellow Dwarf Virus: A Natural Potyvirus Deletion Mutant Lacking The N-Terminal 92 Amino Acids Of HC-Pro. *Arch Virol*. 151: 1439-1445.
- Takaki F., Sano T., Yamashita K., Fujita T., Ueda K., Kato T., 2005. Complete Nucleotide Sequences of Attenuated and Severe 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.
- Taşkın H., Baktemur G., Kurul M., Büyükalaca S., 2013. Use of Tissue Culture Techniques for Producing Virus-Free Plant In Garlic and Their Identification Through Real-Time Pcr. Hindawi Publishing Corporation the Scientific World Journal. Volume 5.

- Tate H.D., 1940. Insects as Vectors of Yellow dwarf, a Virus Disease of Onion. Iowa State College Journal of Science. 14: 267-294.
- Temaja I.G.R.M., Puspawati N.M., Mayadewi N.N.A., 2012. Utilization of SDT-RT-PCR For Plant Virus Detection. J. Agric. Sci. and Biotechnol.
- Tsuneyoshi T., Matsumi T., Natsuaka K. T., Sumi S., 1998. Nucleotide Sequence Analysis of Virus Isolates Indicates the Presence of Three Potyvirus Species in *Allium* plants. Arch. Virol 143: 97-113.
- Tuzlalı H.T., 2012. Çanakkale İlinde Karnabahar Mozaik Virüsü (*Cauliflower Mosaic Virus*; Camv) İzolatlarının Tanılanması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Türkiye.
- Van der Vlugt R.A.A., Steffens P., Cuperus C., Barg E., Lesemann D.E., Bos L., Vetten H.J., 1999. Further Evidence That Shallot Yellow Stripe Virus (SYSV) is a Distinct Potyvirus and Re Identification of *Welsh Onion Yellow Stripe Virus* as a SYSV Strain. Phytopathology 89: 148-155.
- Van Dijk P., 1993a. Carlavirus Isolates From Cultivated *Allium* Species Represent Three Viruses. Netherlands J. Plant Pathol. 99: 233-257.
- Van Dijk P., 1993b. Survey and Characterisation of Potyviruses and Their Strains of *Allium* Species. Neth. J. Plant Pathol. 99, 1-48.
- Vieira R.L., Silva A.L., Zaffari G.R., Steinmacher D.A., Fraga H.P.F, Guerra M.P., 2015. Efficient Elimination of Virus Complex from Garlic (*Allium sativum* L.) by Cryotherapy of Shoot Tips. Acta Physiologiae Plantarum 37: 1733.
- Wahab A.S.A., Elnagar S., El-Sheikh M.A.K., 2009. Incidence of Aphid-Borne *Onion Yellow Dwarf Virus* (OYDV) in *Alliaceae* Crops and Associated Weeds in Egypt 4 th Conference on Recent Technologies in Agriculture.
- Walsh J.A., Jenner C.E., 2002. *Turnip Mosaic Virus* and the Quest for Durable Resistance. Molecular, Plant Pathology 3 (5): 289-300.
- Ward L.I., Perez-Egusquiza Z., Fletcher J. D., Clover G. R. G., 2009. A Survey of Viral Diseases of *Allium* crops in New Zealand Australasian Plant Pathology 38: 533-539.

Yamashita K., Sakai J., Hanada K., 1996. Characterization of a New Virus Garlic (*Allium sativum* L.), Garlic Mite-borne Mosaic Virus. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 62: 483-489.

Zheng L., Wayper P.J., Gibbs A.J., Fourment M., Rodoni B.C., Gibbs M.J. 2008. Accumulating Variation at Conserved Sites in Potyvirus Genomes is Driven by Species Discovery and Affects Degenerate Primer Design. *PLoS ONE* 3: 186.





EK 1. DAS-ELISA ANALİZLERİNDE KULLANILAN TAMPON ÇÖZELTİLER

A. Agdia Kitinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

Carbonate Coating buffer (1X) pH 9.6, 1000 ml saf su içerisinde

Sodium carbonate (anhydrous)	1,59 g
Sodium bicarbonate	2,93 g
Sodium azide	0,2 g

PBST Buffer (Wash Buffer) (1X) pH 7.4, 1000 ml saf su içerisinde

Sodium chloride 8.0 g	8,0 g
Sodium phosphate, dibasic (anhydrous)	1,15 g
Potassium phosphate, monobasic (anhydrous)	0,2 g
Potassium chloride	0,2 g
Tween-20	0,5 g

ECI Buffer (1X) pH 7.4, 1000 ml PBST içerisinde

Bovine serum albumin (BSA)	2 g
Polyvinylpyrrolidone (PVP) MW 24-40,000	20 g
Sodium azide	0,2 g

PNP Buffer (1X) pH 9.8, 1000 ml saf su içerisinde

Magnesium chloride hexahydrate	0,1 g
Sodium azide	0,2 g
Diethanolamine	97 ml

General Extract Buffer (GEB 1X) pH 7.4, 1000 ml PBST içerisinde

Sodium sulfite (anhydrous)	1.3 g
Polyvinylpyrrolidone (PVP) MW 24-40,000	20 g
Sodium azide	0,2 g
Powdered egg (chicken) albumin, Grade II	2 g

B. Bioreba Kitinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

Washing buffer PBS-Tween pH 7.4, 1000 ml saf su içerisinde

NaCl	8 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 g

Coating buffer pH 9.6, 1000 ml saf su içerisinde

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
NaN ₃	0,2 g

Conjugate buffer pH 7.4, 1000 ml saf su içerisinde

TRIS	2,4 g
NaCl	8 g
PVP K25 (MW 24000)	2 g
Tween 20	0,5 g
BSA (bovine serum albumin)	2.00 g
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,2 g
KCl	0,2 g

Substrate buffer pH 9.8, 1000 ml saf su içerisinde

Diethanolamine	97 ml
NaN ₃	0,2 g

Extraction buffer General pH 7.4, 1000 ml saf su içerisinde

TRIS	2,4 g
NaCl	8 g
PVP K25 (MW 24000)	2 g
Tween 20	0,5 g
KCl	0,2 g
NaN ₃	0,2 g

EK 2. RT-PCR Analizleri Kapsamında Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. 50X TAE buffer pH:8.3, 1000 ml saf su içerisinde

10mM Tris, 0,5 mM EDTA

Tris	1.211 g
Glicol Asetik asit	57.1 g
EDTA	100 ml

2. 0,5 M EDTA pH:8.0, 1000 ml saf su içerisinde

EDTA	186,1 g
------	---------

3. 1 M Tris pH:8.0, 1000 ml saf su içerisinde

Tris	121,1 g
------	---------

4. Ethidium bromide, 1000 ml saf su içerisinde

Ethidium bromide	10 mg
------------------	-------

EK 3. Klonlama Analizleri Kapsamında Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. IPTG stock solution (0.1M), 50 ml su içerisinde

Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 1,2 g

2. X-Gal (2ml)

5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -d-galactoside 100 mg

3. LB ortamı ph:7.0, 1000 ml saf su içerisinde

Bacto-tryptone 10 g

Bacto-yeast extract 5g

NaCl 5g

4. LB (ampicillin)

1 lt LB ortamına 15 g agar eklenir ve otoklav edilir. Karışım 50 °C'ye düşünce 400 μ l ampicillin eklenir.

5. LB (Xgal, IPTG, ampicillin)

1 lt LB ortamına 15 g agar eklenir ve otoklav edilir. Karışım 50 °C'ye düşünce, hazırlanan stoklardan olmak üzere 1ml IPTG, 1 ml X-Gal eklenir.

EK 4. Mekanik Taşınma Denemelerinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. 1X Fosfat Tampon Çözeltisi, pH 7.4

NaCl	8 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KCl	0,2 g
NaN ₃	0,2 g
H ₂ O	1000 ml

%0.1 Mercaptoethanol eklenmiştir.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Hasan Tuna TUZLALI

Doğum Yeri: ADANA

Doğum Tarihi: 24.07.1984

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce, YDS 75.00 (C)

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI –Diğer

Karanfil A., Tuzlalı H. T ve Korkmaz S. Molecular Characterization of Apple Mosaic Virus Isolates From Apple Orchards of Çanakkale Province in Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, Volume 26- No: 3, 2139-2144. 2017.

Elbeaino T., Kubaa A.K., Tuzlalı H.T ve Digiario M. *Pittosporum cryptic virus* 1: Genome Sequence Completion Using Next-Generation Sequencing. *Arch Virol*, 2016.

Tuzlalı, H.T. ve Korkmaz, S. Çanakkale İlinde Karnabahar mozaik virüsü (*Cauliflower mosaic virus*; CaMV) İzolatlarının Tanılanması ve Karakterizasyonu". Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 27(1): 1-7, 2014.

Tuzlalı, H.T., Karanfil A., Korkmaz, S. Güney Marmara Bölgesi'nde *Allium* Cinsi Bitkilerde Soğan Sarı Cücelik Virüsü'nün ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi. VII. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 25-29 Ağustos 2015, Çanakkale.

b) Bildiriler -Uluslararası –Ulusal

Korkmaz, S., Çevik, B., Kurtuluş, E. ve Tuzlalı, H.T. Güneybatı Marmara Bölgesi'nde *Brassicaceae* ve *Alliaceae* Familyasına Bağlı Bitkilerde Virüs Hastalıklarının Teşhisi. *Çanakkale Tarımı Sempozyumu, Dünü Bugünü Geleceği*, 10-11 Ocak 2011, Çanakkale, 460-467.

Karanfil A., Tuzlalı H.T., Korkmaz S. Çanakkale İlinde Marul Mozaik Virüsü (*Lettuce mosaic virus*; LMV) İzolatlarının Tanılanması ve Karakterizasyonu. *VII. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi*, 25-29 Ağustos 2015, Çanakkale, 27.

Kundakçı E., Tuzlalı H.T., Korkmaz S. Çanakkale İlinde Elma mozaik virüsü (*Apple mosaic virus*; ApMV) İzolatlarının Tanılanması ve Karakterizasyonu. Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, 3-5 Şubat 2014, Antalya, 265.

Çevik B., Korkmaz S., Satar S., Tuzlalı H.T. Turunçgil Trizteza Virüsü İzolatlarının *Aphis gossypii* Vektörü Tarafından Alımınının Real-Time RT-PCR Yöntemiyle Tanılanması. *Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi*, 3-5 Şubat 2014, Antalya, 273.

Korkmaz, S., Çevik, B., Satar, S., Koç, N.K., Akdura N., Kurtuluş, E. ve Tuzlalı, H.T. Ülkemizde Bulunan Turunçgil Tristeza Virüsü İzolatlarının Tek Sarmal Konformasyonel Polimorfizm (Single Strand Conformation Polymorphism; SSCP) Profillerinin Belirlenmesi. *Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi*, 28-30 Haziran 2011, Kahramanmaraş, 81.

Tuzlalı, H.T. ve Korkmaz, S. Çanakkale İlinde Karnabahar Mozaik Virüsü (Cauliflower mosaic virus; CaMV)'nün Serolojik ve Moleküler Yöntemlerle Tanılanması. *Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi*, 28-30 Haziran 2011, Kahramanmaraş, 396.

Korkmaz, S., Çevik, B., Kurtuluş, E. ve Tuzlalı, H.T., 2011. Marmara Bölgesi Soğan Üretim Alanlarında Yeni Bir Virüs Hastalığı: Soğan Sarı Cücelik Virüsü. *Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi*, 28-30 Haziran 2011, Kahramanmaraş, 397.

Tuzlalı H.T, Korkmaz, S. Identification and Characterization of Cauliflower mosaic virus (CaMV) Isolates in Çanakkale Province. *14th International Symposium Prospects For The 3rd Millenium Agriculture*, 24th-26th of September 2015, Cluj-Napoca, Romania.

Tuzlalı H.T, Korkmaz, S. Determination of Leek Yellow Stripe Virus (LYSV) in *Aliium* Genus Plants in South Marmara Region by DAS-ELISA Method. *14th International Symposium Prospects For The 3rd Millenium Agriculture*, 24th-26th of September 2015, Cluj-Napoca, Romania.

Karanfil A., Korkmaz S., Tuzlalı H.T., Current Situation of Citrus Tristeza Virus in Turkey. *Second Student Scientific Conference, Ecology and Enviroment*, May 16-17, 2014, Bulgaria.

Karanfil A., Tuzlalı H.T., Korkmaz S., Plant Viruses Relation with Aphids and Manners of Transmission. *Second Student Scientific Conference, Ecology and Enviroment*, May 16-17, 2014, Bulgaria.

İŞ DENEYİMİ

Mersin Zirai Karantina Müdürlüğü: 25.02.2016 – devam ediyor

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü: 26.08.2009-16.02.2016

İLETİŞİM

E-posta Adresi: tunatuzlali@comu.edu.tr, hasantuna.tuzlali@tarim.gov.tr