



Çanakkale ilinde Karnabahar mozaik virüsü (*Cauliflower mosaic virus*; CaMV) izolatlarının tanınması ve karakterizasyonu

Identification and characterization of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) isolates in Çanakkale province

Hasan Tuna TUZLALI, Savaş KORKMAZ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 17020, Çanakkale, Türkiye

Sorumlu yazar (*Corresponding author*): H.T. Tuzlalı, e-posta (*e-mail*): tunatuzlali@comu.edu.tr

MAKALE BİLGİSİ

Alınış tarihi 25 Nisan 2013
Düzeltilme tarihi 1 Kasım 2013
Kabul tarihi 4 Kasım 2013

Anahtar Kelimeler:

Çanakkale
Karnabahar mozaik virüsü
DAS-ELISA
klonlama
sekanslama

ÖZ

Bu çalışmada Çanakkale ili ve ilçelerinde 2010-2011 üretim yılları içinde bir sorvey çalışması yürütülerek Karnabahar mozaik virüsü (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV)'ne benzer semptom gösteren karnabahar ve lahanalar bitkilerinden 84 örnek toplanmıştır. Toplanan örnekler CaMV'nin varlığını belirlemek amacıyla DAS-ELISA yöntemiyle test edilmiştir. DAS-ELISA testi sonucunda 84 örnekten 63'ü CaMV ile infekteli bulunmuştur. İnfekteli bulunan örnekler içerisinde seçilen 6 izolatin moleküler özelliklerini belirlemek amacıyla kılıf protein (CP) genleri klonlanarak nükleik asit dizilimleri belirlenmiştir. Klonlama ve sekans analizi yapılan CaMV izolatlarına özgü nükleotid dizilimleri gen bankasında bulunan ve dünyanın farklı üretim bölgelerinden CaMV izolatlarının kılıf protein genleriyle karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalar sonucunda Çanakkale izolatlarının CP nükleotid dizilimlerinin kendi içinde % 93-100, dünya izolatları ile % 92-97 oranında bir benzerliğe sahip olduğu bulunmuştur. Yapılan filogenetik analizler sonucunda Çanakkale izolatlarının dünyanın farklı bölgelerindeki izolatlarla farklı düzeylerde ilişki gösterdiği saptanmıştır.

ARTICLE INFO

Received 25 April 2013
Received in revised form 1 November 2013
Accepted 4 November 2013

Keywords:

Çanakkale
Cauliflower mosaic virus
DAS-ELISA
Cloning
sequencing

ABSTRACT

In this study, a survey was conducted in Çanakkale province and sub provinces on cauliflower and cabbage plants that show *Cauliflower mosaic virus*-like symptoms between the years 2010-2011. A total of 84 samples were collected from these areas and tested by DAS-ELISA for the presence of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). As a result of the DAS-ELISA analysis 63 out of 84 samples were found infected with CaMV. The coat protein genes of 6 isolates were cloned and sequenced. Isolates were further characterized and the sequences obtained from CaMV isolates of Çanakkale were compared with known sequences from other part of the world to determine the genetic differences and evolutionary relationships among CaMV isolates from Çanakkale and the other parts of the world. Comparison of CP genes revealed that CP gene of CaMV isolates from Çanakkale province and sub provinces showed 93-100 % and isolates with the world 92-97 % identity in their nucleotide sequence, respectively. Phylogenetic analysis of the CP gene sequences showed that CaMV isolates from Çanakkale province and sub provinces displayed different level of genetic relationship with CaMV isolates from those of the world.

1. Giriş

Tüm dünyada ve ülkemizde önemli bir yer tutan sebze tarımı günümüzde gerek birim alandan elde edilen yüksek getirisi ile gerekse de hızla artan nüfusun ihtiyaçlarının karşılanması adına son derece önem arz etmektedir.

Karnabahar ve lahananın ülkemizde ve dünyada konukçusu olduğu birçok hastalık ve zararlı vardır. Bu hastalık ve zararlılar karnabahar ve lahanalar üretimini azaltmakta, kalite ve pazarlama değerlerini düşürmektedirler. Bu etmenlerden bir tanesi de

Karnabahar mozaik virüsü (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV)'dür. CaMV karakteristik olarak *Caulimovirus* grubu üyesi ve çift sarmal DNA içeren bir virüsdür (Shephard 1981). CaMV 50 nm çapında izometrik partiküllere sahiptir ve alt birimi 420 kapsid proteinden oluşmuştur; CaMV'nin dairesel çift sarmal genomu 8 kb'dir (Cheng ve ark. 1992).

CaMV doğada yaprak bitleriyle taşınabilmektedir (Palacios ve ark. 2002). CaMV'nin vektörü olduğu bilinen en az 27 tür

yaprak biti tanımlanmıştır (Kennedy ve ark. 1962). Mekanik olarak da taşınabilen CaMV, tohumla ve polenle taşınmamaktadır (Blanc ve ark. 2001). Ülkemizde CaMV ile ilgili ilk çalışma Erkan ve ark. (1990) tarafından yürütülmüş, çalışma kapsamında kullandıkları biyolojik ve serolojik yöntemler sonucunda CaMV'yi saptamışlardır. Karnabahar ve lahanada üzerindeki virüs semptomları ilk defa Türkiye'de bu çalışma ile gösterilmiştir. Korkmaz ve ark. (2011) Güneybatı Marmara Bölgesi'nde 2007-2008 üretim sezonu içinde yetiştirilen *Alliaceae* ve *Brassicaceae* familyasına ait bazı sebzelerde ve yabancı otlarda virüs hastalıklarını belirlemek amacıyla bir sörvey çalışması yürütmüşlerdir. Ticari poliklonalantibadiler kullanılarak yaptıkları DAS-ELISA testleri sonucunda 72 örnekten 47'sini CaMV ile infekteli olarak bulmuşlardır.

Daubert ve Routh (1990) CaMV'nin ORF VI üzerinde oluşan nokta mutasyonu sonucunda konukçu spesifitesi ve semptom değişikliği üzerine yaptıkları çalışmada CaMV D4 streyninin mutasyonu sonucunda viral DNA sekansındaki değişikliklerle ilişkili olarak konukçu spesifitesi üzerine değişimleri irdelemişler ve D4 streyninin mutantının, gen VI üzerindeki değişikliklerden dolayı orijinal streynden farklılık gösterdiğini ve bu değişimlerin ORF VI üzerindeki mutasyondan kaynaklandığını belirtmişlerdir. Hardwick ve ark. (1994) İngiltere ve Galler'de 1992 ve 1993 yıllarında kolzalarda CaMV, *Beet western yellowsvirus* (BWYV) ve TuMV'nin varlığı ve şiddeti üzerine yürüttükleri çalışma sonucunda CaMV enfeksiyonlarının 1992 yılında % 14 ve 1993 yılında ise % 25 olarak belirlemişlerdir.

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

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Arazi çalışması

Arazi çalışması karnabahar ve lahanada üretiminin yapıldığı Çanakkale ili ve ilçelerinde 2010 ve 2011 üretim sezonlarında yürütülmüştür. Üretim sezonu boyunca arazi çıkışları yapılmış, bitkiler görsel olarak incelenmiş ve CaMV semptomlarına benzer semptom gösteren bitkilerden örnekler alınmıştır. Yapılan arazi çıkışları sonucunda toplanan örnekler soğuk zincirde muhafaza edilerek laboratuara getirilmiştir.

2.2. DAS-ELISA testi

CaMV'nin serolojik bir yöntem olan ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) testi ile tanınmasında Bioreba (İsviçre) firmasından sağlanan ELISA komple kiti ve 96 çukur içeren ELISA tabakaları kullanılmıştır. ELISA testi üretici firmanın önerileri doğrultusunda Clark ve Adams (1977)'in belirttiği yöntem temel alınarak yapılmıştır. Yöntemin uygulanmasında öncelikle tabaka virüse özgül antibadi ile kaplanmış, ikinci aşamada örnekler ilave edilmiştir. Üçüncü aşamada ise konjugat ilave edilmiş ve son aşamada ise substrat eklenerek 405 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda sonuçlar değerlendirilmiştir. Antibadi ve konjugat firmanın önerileri doğrultusunda 1:1000 oranında sulandırılmış, örnekler ise örnek tampon çözeltisi içerisinde 1:10 oranında sulandırılarak kullanılmıştır. Test sonucunda 405 nm dalga

boyunda okuma işlemi yapılmıştır. Negatif kontrolün 2 katı ve üzerinde olan örnekler infekteli olarak değerlendirilmiştir.

2.3. Oligonükleotid primerlerin hazırlanışı

Çalışma kapsamında PCR ve klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere laboratuvarımızda bir primer çifti tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler CaMV kılıf protein geninin 614 bp (base pair)'lik bölgesini içeren SK3 CaMV CP-F 5' ATG GCC GAA TCA ATT TTA GAC AG 3' ve SK4 CaMV CP-R 5' GTA TTT CGG ATT AAC TCC TTG GC 3' adı ve dizisine sahip spesifik primerlerdir.

2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere DAS-ELISA sonucu pozitif sonuç veren 6 izolat (CaMV-10, CaMV-11, CaMV-26, CaMV-41, CaMV-84, CaMV-91) PCR analizi çalışmalarında kullanılmıştır. PCR analizinde kullanılan kitler TaKaRa (Japonya) firmasından temin edilmiş ve firmanın önerileri doğrultusunda kullanılmıştır.

DNA izolasyonunda Suehiro ve ark. (2005) tarafından geliştirilen basitleştirilmiş doğrudan tüpe bağlanma (Simple-direct-tube, SDT) yöntemi kullanılmıştır. PCR işleminin gerçekleşmesi için öncelikle PCR karışımı hazırlanmıştır. Bu karışımında her bir örnek için 10X PCR tampon solüsyonundan (50 mM KCL, 10 mM Tris HCl 25 °C pH: 9.0, % 1 Triton X-100) 2.5 µl, 10 mM dNTP 1 µl, CaMV kılıf protein geninin bir kısmına spesifik primerlerden 0.5 µl, Taq polimeraz solüsyonundan 0.25 µl, cDNA'lerden 5 µl ve steril sudan 15.25 µl konularak toplam hacim 25 µl olan PCR karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan PCR karışımı 94°C 3 dakika, 40 defa tekrarlanan 94°C'de 30 sn, 55°C'de 30 sn ve 72°C'de 45 sn, 72°C'de 5 dakika ve daha sonra da 4°C'de bekleyecek şekilde programlanmış olan PCR makinesine konularak kılıf protein genlerinin çoğaltılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri % 1'lik agaroz jelde 1 saat 100 V elektroforeze tabi tutulmuş ve etidyum bromür ile boyanmıştır.

2.5. Klonlama çalışmaları

Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen 6 CaMV izolatının (CaMV-10, CaMV-11, CaMV-26, CaMV-41, CaMV-84, CaMV-91) CP genlerini içeren korunmuş bölgeleri PCR yoluyla çoğaltıldıktan sonra Çevik ve ark. (1995) ve Jiang ve ark. (2008) tarafından belirtilen yöntem ile modifiye edilerek T-A klonlama yöntemi ile klonlanmıştır.

Öncelikle PCR ile çoğaltılmış CaMV CP genlerinin ürünleri EZ-10 Column PCR pürifikasyon kiti (BioBasic, Kanada) kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda saflaştırılmıştır. Saflaştırılan CaMV kılıf protein genlerinden her bir örnek için 3 µl alınarak 1 µl pGEM T Easy plazmidi, 1 µl T4 DNA ligaz enzimi ve 5 µl 2X ligasyon tampon çözeltisi (0.05 M Tris-HCl pH 8.0, 0.01 M MgCl₂, 1 mM ATP ve 50 µg/ml bovine serum albumin) içeren 10 µl'lik ligasyon karışımı hazırlanmıştır. Karışım 16 saat süreyle 4°C'de bekletilerek ligasyon işlemi tamamlanmıştır. Ligasyon karışımının bir kısmı hücre duvarı kimyasal uygulamalarla geçirmeye hale getirilmiş (competent) *Escherichia coli* bakterisinin JM109 ırkına aktarılmış ve 42°C'de 1 dakika süreyle ısı şoku uygulanmış ve transformasyon işlemi tamamlanmıştır.

Transformasyonu yapılan bakterilere LB bakteriyel sıvı besi ortamından 750 µl eklenerek bakteriler 37°C'de 180 rpm hızla çalkalamalı inkübatörde 1 saat süreyle büyütülmüştür. Daha

sonra büyütülen bakteriler $60 \mu\text{g ml}^{-1}$ ampisilin ve $80 \mu\text{g ml}^{-1}$ 5-bromo-4-chloro-3-indoly-B-galacto-pyranoside (X-gal) ve 0.5 m Misopropyl β -D-1- thiogalactopyranoside (IPTG) maddesi içeren LB katı ortamı (% 2 bacto-trytone, % 0.5 bacto-yeastekstrakt, 0.05 M NaCl,) bulunan petri kaplarına ekilerek 37°C 'de 16 saat inkübe edilmiştir. CaMV CP genini taşıyan pGEM-T Easy plazmidlerini içerdiği düşünülen beyaz kolonilerin belirlenmesi için koloni PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Her bir izolat için en az 3 adet beyaz koloni seçilerek koloni PCR yöntemiyle test edilmiştir. $2.5 \mu\text{l}$ 10X PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM TrisHCl pH 9.0, % 1 Triton X-100), $0.5 \mu\text{l}$ 10mM dNTP, $2.5 \mu\text{l}$ 25 mM MgCl_2 , 20 pmol plazmid T-A klonlaması yapılan bölgenin alt ve üst kısımlarına spesifik SK3 CaMV ve SK4 CaMV primerlerinden $0.5 \mu\text{l}$ ve $0.125 \mu\text{l}$ 2.5 ünite Taq DNA polimeraz (Fermentas, Kanada) eklenerek koloni PCR için karışım hazırlanıp PCR tüplerine konulmuştur. PCR tüplerine konulan karışıma çizilerek büyütülen beyaz renkli bakteri kolonilerinden steril bir pipet ucuyla alınarak bakteri kolonisi eklenmiştir. Bakteri eklenen koloni PCR karışımı 94°C 3 dakika, 40 defa tekrarlanan 94°C 'de 30 sn, 55°C 'de 30 sn ve 72°C 'de 45 sn, 72°C 'de 5 dakika ve daha sonra da 4°C 'de bekleyecek şekilde programlanan PCR makinesinde yapılmıştır. Koloni PCR'ın tamamlanmasından sonra elde edilen PCR ürünleri 100-1000 bp DNA büyüklük markörü ile birlikte % 1'lik agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir.

Koloni PCR sonuçlarından sonra CaMV CP genini taşıyan pGEM-T Easy plazmidini içerdiği kesin olarak belirlenen koloniler seçilerek plazmid izolasyonu yapılmıştır. Her bir izolat için koloni PCR'da pozitif sonuç veren en az 2 koloni seçilmiştir. Her bir CaMV izolatu için koloni PCR sonuçlarına göre seçilen koloniler, $2 \mu\text{l}$ ampisilin içeren 5 ml LB sıvı besi ortamına inokule edilerek 37°C 'de 16 saat 180 rpm hızda çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Safılaştırılan pGEM-T Easy plazmit DNA'larından $10 \mu\text{l}$ alınarak, $1 \mu\text{l}$ 20000 ünite *EcoRI* enzimi, $2 \mu\text{l}$ 10X *EcoRI* enzimi tampon solüsyonu (50 mM NaCl, 100 mM Tris HCl, 10 mM MgCl_2 , % 0.025 Triton X-100 pH7.5) ve $0.2 \mu\text{l}$ bovine serum albumin (BSA) ve $6.8 \mu\text{l}$ steril saf su eklenerek bir tüp içerisinde toplam $20 \mu\text{l}$ 'lik bir digestion karışımı hazırlanmıştır. Elde edilen bu karışım 37°C 'de 6 saat bekletilerek plazmitlerin *EcoRI* enzimiyle kesilme işlemi tamamlanmıştır.

2.6. Kılıf protein geninin dizisinin belirlenmesi ve filogenetik analizi

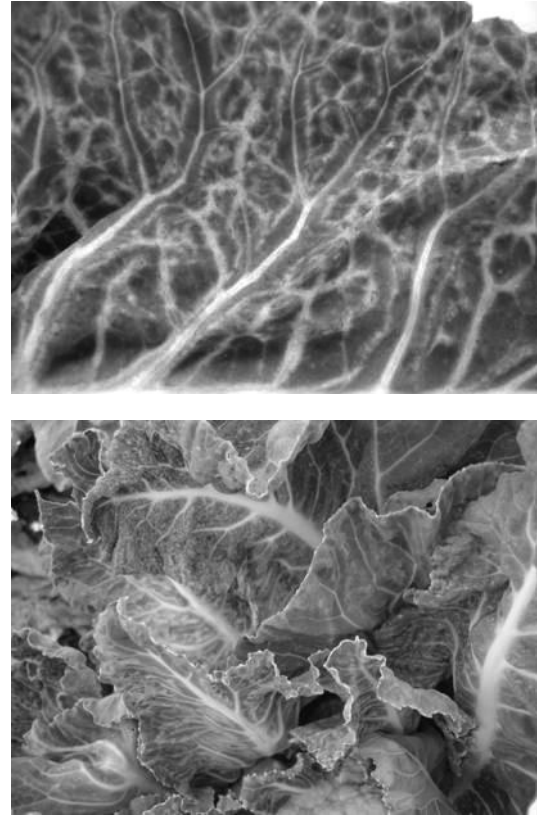
DNA dizilimi Refgen Biyoteknoloji (Ankara) firmasında hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. DNA dizilimi pGEM-T Easy plazmidinin T-A klonlama bölgesinin yaklaşık 50 bp üst ve alt kısmındaki bölgelere spesifik M13F ve M13R üniversal primerleri kullanılarak döngü dizileme yöntemiyle otomatik DNA dizileme cihazıyla yapılmıştır. Elde edilen ham DNA dizilimleri Vector NTI DNA dizi analiz programına aktarılmış ve CaMV CP genine ait nükleotid dizilimi elde edilmiştir. Kılıf protein genlerine ait nükleotid dizileri Align X programında çoklu dizi karşılaştırması yapılarak birbirleriyle ve dünya izolatlarıyla olan benzerlik oranları yüzde olarak belirlenmiştir. CaMV CP genine ait çoklu karşılaştırma dosyaları Clustal X programına aktararak filogenetik analizler yapılmıştır. Filogenetik analiz verileri kullanılarak Kiamura iki parametre alogaritması uygulanan Neighbor-joining yöntemiyle filogenetik soyağacı oluşturulmuştur. Oluşturulan soy ağacının doğruluğunu istatistik olarak belirlemek amacıyla 100

tekrürlü Bootstrap analizi yapılmıştır. Son olarak oluşturulan soy ağaçları TreeView soyağacı görüntüleme programı kullanılarak CaMV izolatlarının birbiriyile yakınlık dereceleri ve genetik ilişkileri ortaya konulmuştur.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Arazi çalışması bulguları

Arazi çalışmaları karnabahar ve lahana üretiminin yapıldığı Çanakkale ili ilçelerinde 2010 ve 2011 üretim sezonlarında yapılmıştır. Arazi çalışmaları süresince 84 örnek toplanmıştır. Toplanan örneklerde tipik olarak mozaik, damar açılmaları, damar bantlaşması, nekrotik lekeler, şekil bozuklukları ve kloroz belirtileri gözlenmiştir. Bu belirtilerden bazıları Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Karnabahar mozaik virüsü'nün karnabahar ve lahana bitkilerinde neden olduğu belirtiler.

Figure 1. Symptoms caused by *Cauliflower mosaic virus* on cauliflower and cabbages.

CaMV konukçularında streynlere, konukçu ve çevre koşullarına bağlı olarak ılımlıdan şiddetliye doğru değişen çeşitli kloroz, mozaik, damar açılması ve bodurlaşma gibi sistemik belirtilere neden olmaktadır (Melcher 1989; Wintermantel ve ark. 1993). Al-kaff ve Covey (1995) CaMV izolatlarının biyolojik çeşitliklerinin iki *Brassica* türü üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada infekteli konukçularda sistemik enfeksiyonlar, damar açılmaları, damar bantlaşmaları ve şiddetli klorozlar saptamışlardır. Farzadfar ve ark. (2005) CaMV'nin varlığını belirlemek için yürüttükleri çalışmada izolatlarda beneklenme, bantlaşma, mozaik, nekrotik lekeler, şekil bozuklukları ve kloroz belirtilerine rastlamışlardır. Bu çalışma kapsamında yapılan

sörveyler sırasında elde edilen izolatlarda görülen semptomların birçok çalışmada belirtilen semptomlara benzer olduğu gözlemlenmiştir.

3.2. DAS-ELISA testi bulguları

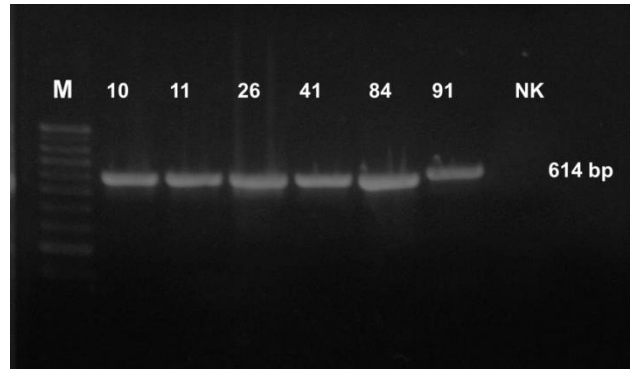
Çanakkale ili ve ilçelerinde 2010 ve 2011 yıllarında yapılan arazi çıkışları sonucunda 84 örnek DAS-ELISA ile test edilmiştir. Testler sonucunda toplanan 66'sı karnabahar, 18'i lahana olmak üzere 84 örnekten 63'ü (% 75) CaMV ile infekteli bulunmuştur. Infekteli bitki sayısının çok yüksek olması büyük bir olasılıkla CaMV ile infekteli bitkilerin çok tipik semptom göstermesi ve bu tip bitkilerin kolaylıkla belirlenebilmesinden kaynaklanmaktadır. CaMV yaprak bitleri ile taşınan bir etmendir. Yaprak biti popülasyonu, hastalığın yayılmasında ve dolayısıyla da enfeksiyon oranının artmasında oldukça önemli bir rol oynamaktadır. CaMV'nin enfeksiyon oranının belirlenmesi üzerine yapılan benzer çalışmalarda Moreno ve ark. (2004) CaMV, *Alfalfa mosaic virus* (AMV) *Broad bean wilt virus* (BBWV 1), BWYV, Hıyar mozaik virüsü (CMV), *Pea-seed born mosaic virus* (PSbMV), TuMV ve Domates lekeli solgunluk virüsleri (TSWV)'nin varlığını araştırmışlar ve virüslerin farklı bitki türlerinde farklı kombinasyonlarda karışık enfeksiyon şeklinde bulunabileceğini ve 366 örneğin 40'ında (% 10.9) CaMV'nin varlığını saptamışlardır. Shahaeren (2012) kanola bitkisinde görülen virüs hastalıkları üzerine yaptığı çalışmada topladığı örnekleri BWYV, CaMV, TuMV, *Turnipcrinkle virus* (TCV), TYMV, *Radish mosaic virus* (RaMV), TsWV ve CMV'ye karşı DAS-ELISA ile test etmiş ve CaMV'nin enfeksiyon oranını % 40.2 olarak belirlemiştir. Arazi çalışmaları sonucu toplanan örneklerde elde edilen hastalıklı bitki sayıları çalışmanın yapıldığı ürün grubunun çeşitliliğine, viral etmenin taşınma şekillerine, hastalığı taşıyan vektörlerin popülasyonuna ve bu vektörlere karşı yapılan mücadele yöntemlerinin etkisine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Diğer yandan CaMV semptomlarına benzer semptom gösteren ancak DAS-ELISA testinde negatif çıkan izolatların büyük bir olasılıkla diğer virüs hastalıkları ile infekteli olduğu düşünülmektedir.

3.3. Polimeraz zincir reaksiyonu analizi bulguları

PCR analizinde kullanılmak üzere yapılan DNA izolasyonunda Suehiro ve ark. (2005) tarafından geliştirilen basitleştirilmiş doğrudan tüpe bağlanma (Simple-direct-tube, SDT) yöntemi kullanılmıştır. SDT yöntemi genellikle konsantrasyonu yoğun olan virüslerde başarılı sonuçlar vermesine karşın çalışma kapsamında kullanılan tüm örneklerde bu yöntem ile DNA izolasyonu başarılı bir şekilde yapılabilmektedir. PCR çalışmalarında kılıf protein geninin 614 bp'lik korunmuş bir bölgeyi çoğaltan SK3 CaMV ve SK4 CaMV primerleri kullanılmıştır. Daha öncesinde yapılan DAS-ELISA bulgularında pozitif sonuç vermiş örnekler arasından seçilen 6 örneğe PCR analizi uygulanmış ve örneklerin tamamında 614 bp büyüklüğünde belirgin bantlar elde edilmiştir. PCR sonucunda elde edilen bu bantlar Şekil 2'de verilmiştir.

CaMV'nin moleküler bir yöntem olan PCR ile teşhis edilmesinde araştırmacılar tasarladıkları farklı primerlerle PCR yönteminden faydalanmışlardır. Agama ve ark. (2002) *Arabidopsis thaliana* Tsu-0 ekotipinin CaMV'ye olan direncini kırmak üzere yürüttükleri çalışmada Tsu-0 ve Col-0 ekotipleri ile farklı CaMV izolatlarını kullanmışlar ve çalışma kapsamında yapılan biyolojik testleri doğrulamak için yaptıkları PCR analizleri sonucunda tüm ekotiplerde 724 bp büyüklüğünde

bantlar elde ederken, sadece bir ekotipte 430 bp büyüklüğünde bant elde etmişlerdir. Farzadfar ve ark. (2005) CaMV'nin varlığını belirlemek amacı ile yapmış olduğu çalışmada ORF II genine göre modifikasyonu yapılan ve spesifik primerler kullanarak yaptıkları PCR analizleri sonucunda yaklaşık 750 bp büyüklüğünde bantlar elde etmişlerdir. Bu çalışmada PCR analizi ile çoğaltılması hedeflenen bölge, kılıf protein geninin belirli bir kısmına spesifik olan bir bölgedir. Benzer çalışmalarda yapılan PCR analizleri sonucu elde edilen bant büyüklüklerinin farklı olması DNA içerisinde yer alan, dizisi belli iki segment arasında çoğaltılması istenen özgün bölgenin belirlenmesi ile ilişkilidir ve PCR çalışmalarında yapılan tüm modifikasyonlar araştırmacıların çalışma amaçlarına göre farklılıklar gösterebilmekte ve bu nedenle de farklı büyüklükte bantlar elde edilebilmektedir.



Şekil 2. PCR analizi sonuçları. M: Marker (100-1000 bp), 10, 11, 26, 41, 84, 91; CaMV ile infekteli izolatlar. NK: Negatif Kontrol.

Figure 2. Results of PCR analysis. M: Marker(100-1000 bp), 10, 11, 26, 41, 84, 91; isolates infected by CaMV. NC: Negative Control.

3.4. Klonlama çalışmaları bulguları

Çalışma kapsamında yapılan ve PCR analizi sonucunda pozitif olduğu bilinen 6 örnek T-A klonlama yöntemi ile klonlanmıştır. Bu yöntem, PCR sırasında Taq DNA polimeraz gibi 3'5' ekzonükleaz aktivitesi olmayan DNA polimerazlarla çoğaltılan DNA'ların 3' ucuna fazladan bir Adenin (A) eklenmesine dayanmaktadır. Bu şekilde çoğaltılan 3' ucunda fazladan bir adenin içeren DNA'lar 5' ucunda bir tane Timin (T) taşıyan T-A klonlama vektörleri olarak adlandırılan plazmidlerle birleştirilmekte ve klonlama öncesi saflaştırılan PCR ürünleri DNA ligaz enzimi yardımı ile plazmid vektörlerine klonlanmaktadır.

Çalışmada klonlama yapılan genleri içeren bakterilerin belirlenmesinde mavi-beyaz koloni seçimi ilk aşamada kullanılmaktadır. Mavi-beyaz koloniler içerisinde CaMV CP genini taşıyan pGEM-T Easy plazmidini içeren bakteriler büyüyerek beyaz renkli kolonileri oluştururken, sadece pGEM-T Easy plazmidini içerenler ise mavi renkli kolonileri oluşturmaktadır. Burada hedeflenen koloniler, kılıf protein genini içerdiği düşünülen beyaz kolonilerdir. Beyaz kolonilerin istenilen CaMV CP genlerini taşıyıp taşımadıklarını kesin olarak belirlemek amacı ile elde edilen beyaz kolonilerden en az 3 tanesi koloni PCR yöntemi ile beyaz kolonilerin taraması yapılmıştır. Koloni PCR sonucunda 6 izolatın tamamının CaMV CP genlerini taşıdığı belirlenmiştir. Bu kolonilerden seçilen bakteriler büyütülmüş ve bunlardan plazmid izolasyonu yapılmıştır.

Klonlanan DNA parçalarının plazmidten ayrılması için, saflaştırılan plazmid DNA'lar T-A klonlaması yapılan bölgenin her iki yanında bulunan *EcoRI* restriksiyon enzimi kesme bölgelerinden *EcoRI* restriksiyon enzimiyle kesilmiştir. Kesilen DNA'lar incelendiğinde pozitif olan yaklaşık 3000 bp büyüklüğünde pGEM-T Easyplazmid DNA'sı ve yaklaşık 650 bp büyüklüğünde CaMV CP genine ait bantlar görülmüş ve bu durum *EcoRI* restriksiyon enzimiyle kesme işleminin başarıyla gerçekleştiğini göstermiştir.

CaMV'nin klonlanması ile ilgili benzer bir çalışmada Schoelz ve ark. (1986) CaMV'nin, *Solanaceae* familyasından konukçuları üzerindeki simptomların belirlenmesinde önemli rol oynayan ORF VI üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışmada CaMV'nin D4 streyni ile CM 1841, Cabb-B streynleri ve bu streynlerin 9 rekombinant genomlarını kullanmışlar ve *Solanaceae* familyasından konukçuları infekte edebilme özelliklerini test etmişlerdir. Klonlama işlemleri kapsamında bu çalışmaya benzer olarak ligasyon aşamasında T4 DNA ligaz enzimini kullanmışlar ve pürifiye ettikleri virüsü *E. coli* bakterisine aktarmışlar, elde ettikleri plasmidleri saflaştırdıktan sonra tüm amplifikasyon ürünlerinin enzimatik kesme işleminde *EcoRI* enzimine ilaveten *Sall*, *XhoI*, *SacI*, *HgiAI*, *PvuII*, *BstII* ve *HpaI* enzimlerinden de faydalanmışlardır. Çalışma sonucunda CaMV'nin 496 bp içeren ORF VI genomunun ilk yarısını kapsayan segmentte meydana gelen değişimlerin CaMV ırkları arasında konukçu reaksiyonlarında değişime yol açtığını belirlemiştir.

3.5. Kılıf protein geninin sekans analizi bulguları

Çanakkale ili ve ilçelerinden alınan CaMV izolatlarının nükleotid dizimleri kendi aralarında karşılaştırıldığında izolatlar arasında % 93-100 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Benzerlik oranlarına bakıldığında en fazla benzerliğin (% 100) Ayvacı ilçesi merkezinden alınan CaMV-84 izolatı ve yine aynı ilçeye bağlı Kösedere köyünden alınan CaMV-91 izolatı arasında olduğu belirlenmiştir. En fazla farklılık ise (% 93) CaMV-26 izolatı ile CaMV-84 ve CaMV-91 izolatları arasında gerçekleşmiştir (Çizelge 1).

Çanakkale'den elde edilen 6 izolat ile dünyanın farklı bölgelerinden elde edilmiş ve gen bankasındaki veri tabanında nükleotid dizimleri bilinen 9 izolat karşılaştırılmış ve benzerlik oranları belirlenmiştir. Tüm bu verilere göre ülkemiz izolatları ile dünya izolatları arasında % 92-97 arasında benzerlik olduğu belirlenmiştir. En fazla benzerliğin % 97 ile CaMV-26 izolatı ile Amerika (CaMV MCACGDH) izolatı arasında olduğu gözlenmektedir. İkinci en yüksek benzerliğin ise % 96 oranında CaMV-41 izolatı ile Amerika (CaMV NC-001497) izolatı ve Fransa (CaMV V00141) izolatları arasında olduğu ve yine aynı oranla CaMV-11 izolatı ile Amerika (CaMV MCACGDH) izolatı arasında olduğu gözlenmektedir. Bununla birlikte en fazla farklılığa sahip izolatların ise % 92 benzerlik oranı ile CaMV-10 izolatı ile Arjantin (CaMV JF809616) izolatı arasında olduğu görülmektedir. Bu çalışmada kullanılan 6 CaMV izolatı ile dünyada bulunan 9 farklı CaMV izolatı arasındaki benzerlik oranları Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Çanakkale CaMV izolatları ile dünyadaki CaMV izolatlarının nükleotid dizilerinin benzerlik oranları (%).

Table 1. Resemblance rate (%) of nucleotide sequence between Çanakkale CaMV and world's isolates.

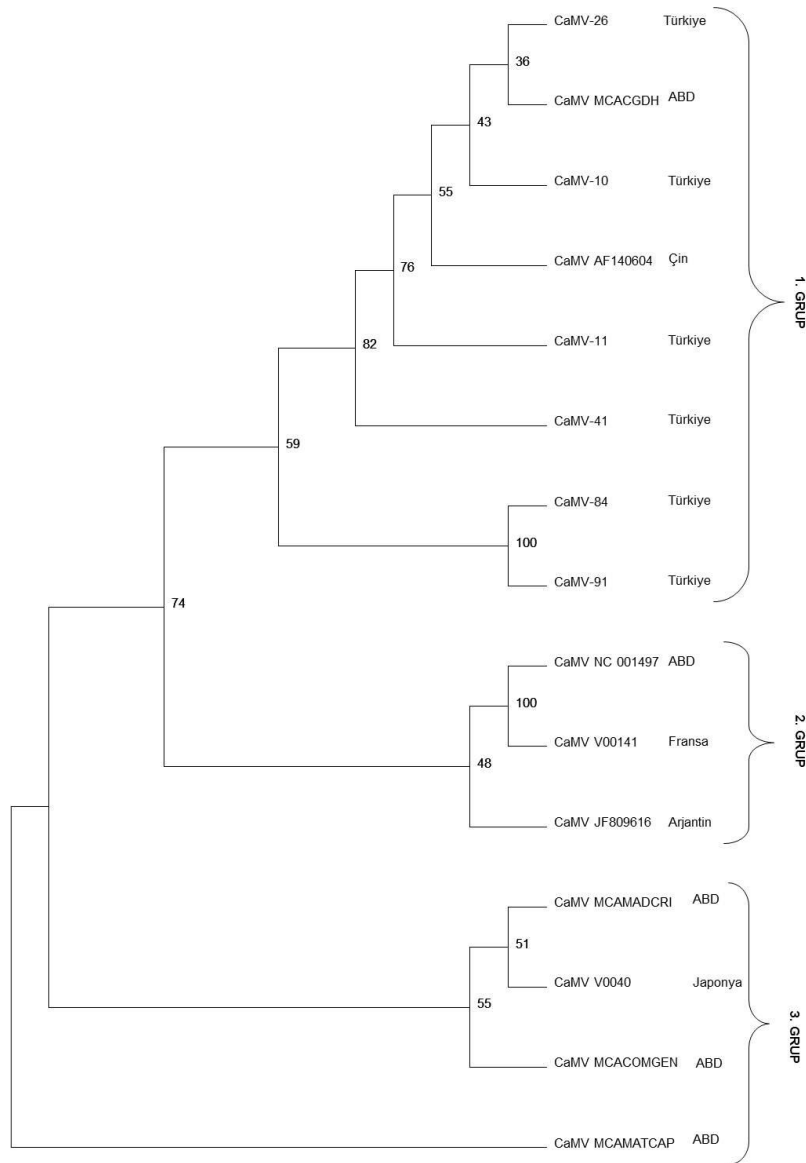
	CaM V- 26	CaMV AF1406 04	CaMV MCACG DH	CaM V- 11	CaM V- 41	CaM V- 84	CaM V- 91	CaMV JF8096	CaMV NC_0014	CaM V V001 41	CaMV MCAMATC AP	CaMV MCACOMG EN	CaMV MCAMAD CRI	Ca MV V00 40
CaMV-10	96	94	96	94	95	94	94	92	93	93	93	93	93	93
CaMV-26		95	97	95	94	93	93	93	94	94	94	93	94	94
CaMV AF140604			96	95	93	94	94	93	93	93	93	92	94	94
CaMV MCACGDH				96	95	94	94	93	94	94	94	93	94	93
CaMV-11					94	94	94	94	95	95	94	93	94	94
CaMV-41						95	95	94	96	96	94	94	94	94
CaMV-84							100	95	95	95	94	95	94	95
CaMV-91								95	95	95	94	95	94	95
CaMV JF809616									97	97	95	96	96	96
CaMV NC_001497										100	96	95	95	96
CaMV V00141											96	95	95	96
CaMV MCAMATC AP												96	96	96
CaMV MCACOMG EN													97	97
CaMV MCAMADC RI														97

Çalışma kapsamında yapılan filogenetik analizler, CaMV izolatlarının üç ana gruba ayrıldığını göstermiştir. Bu izolatların kılıf protein genlerinin nükleik asit dizilimine göre oluşturulan filogenetik soyağacı Şekil 3'te verilmiştir. Sözü edilen bu grupların birincisinde 6 ülkemiz izolatının yanı sıra bir Amerika ve Çin izolatı, ikincisinde bir Amerikan, bir Fransa ve bir Arjantin izolatı, üçüncüsünde ise üç Amerika izolatı ile bir Japonya izolatı olmak üzere toplam 15 izolat yer almaktadır. Aynı grup içerisinde yer alan ülkemiz izolatları ile başta Amerika (CaMV MCACGDH) izolatı olmak üzere ve Çin (CaMV AF140604) izolatları birbirine yakın olan izolatlar olarak belirlenmiştir. Bu durum Çanakkale izolatının orijini hakkında bilgi verse de daha net sonuçlar için daha geniş alanlardan daha fazla izolat elde edilmesi gerekmektedir.

Benzer bir çalışma Alan (2012) tarafından ülkemizde gerçekleştirilmiş ve çalışmada CaMV ile infekteli marul

bitkisinden izole ettiği CaMV-1 izolatını kullanmıştır. CaMV-1 izolatının, Çin izolatları AF140604.1 ve D00335.1 ile sırasıyla % 95, % 80, Fransa izolatları X79465.1 ve X53860.1'nin her ikisi ile de % 80 oranında benzerlik gösterdiğini bildirmiştir. Yapmış olduğu filogenetik analizler sonucunda ise CaMV-1 izolatının AF140604.1 Çin izolatı ile aynı grupta yer aldığını, % 80 benzerlik göstermiş olduğu X53860.1 ve X79465.1 Fransa izolatları ve % 81 benzerlik gösterdiği şalgam bitkisinden elde ettiği D00335.1 izolatları ile de ayrı grupta yer aldığını bildirmiştir. Çanakkale izolatları ile % 93-95 oranlarında benzerlik gösteren ve soyağacında aynı grupta yer alan AF140604.1 Çin izolatının Alan (2012) tarafından yapılan çalışmada da % 95 benzerlik göstermesi olağan bir sonuçtur.

Ülkemize yakın bir coğrafyada gerçekleştirilen bir başka çalışma Farzadfar ve ark. (2007), tarafından İran'da gerçekleştirilmiş, dizi analizi çalışmalarında gen bankasında



Şekil 3. Çanakkale ve dünya izolatlarına ait dendrogram.

Figure 3. Dendrogram of Çanakkale and world's isolates.

bulunan diğer izolatlarla yapılan kıyaslamada Macaristan izolatlarının aralarında % 99.1 ve % 96.7 oranında benzerlik gösterdiği ve İran izolatlarının bu grupta yer aldığı ve bu izolatların Kuzey Amerika izolatları ile ayrı kümelerde gruplandığını bildirmişleridir.

4. Sonuç

Bu çalışmada Çanakkale ili ve ilçelerinde CaMV izolatlarının tanınması ve karakterizasyonu yapılmış ve yapılan serolojik ve moleküler yöntemler başarılı bir şekilde sonuçlanmıştır.

Arazi çıkışlarında, CaMV'nin tipik simptomları yoğun olarak gözlenmiştir. Toplanan örneklerle yapılan ELISA testi sonucunda hastalığın yaygın olduğu belirlenmiştir. 6 CaMV izolatının CP genlerini içeren korunmuş bölgeleri PCR yoluyla çoğaltıldıktan sonra klonlanmış ve dizi analizleri yapılmıştır. Çoklu dizi karşılaştırması sonucunda Çanakkale izolatları arasında benzerlik oranı % 93-100, Çanakkale izolatları ile dünya izolatları arasındaki benzerlik oranı ise % 92-97 olarak belirlenmiştir. Yapılan filogenetik analizler sonucunda ise ülkemiz izolatları ile Amerika (CaMV MCACGDH) izolatı ve Çin (CaMV AF140604) izolatı birbirine yakın olan izolatlar olarak belirlenmiştir.

Karnabahar ve lahanalarda üretimi sınırlayan etmenler içerisinde bulunan CaMV'nin kimyasal mücadelesinin olmaması ve etmen virüsün vektörlerle uzak ve geniş alanlara kolaylıkla yayılabilmesi bu hastalık etmenini daha da önemli kılmaktadır. CaMV'nin çıkışı ve yayılmasını engelleyecek tüm tedbirlerin alınmasının yanı sıra ileriye yönelik dayanıklılık çalışmalarına katkı sağlamak amacı ile bilimsel çalışmaların tüm hızıyla devam ettirilmesi gerekmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma, 2011-052 proje numarasıyla, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiş olan yüksek lisans projesinin bir bölümüdür.

Acknowledgment

This study was supported by Çanakkale Onsekiz Mart University, Administration Unit of Scientific Research Project (Project No. 2011-052)

Kaynaklar

- Agama K, Beach J, Schoelz J, Leisner SM (2002) The 5'-third of *Cauliflowermosaicvirus* gene VI conditions resistance breakage in *Arabidopsis* ecotype Tsu-0. *Phytopathology* 92:190-196.
- Al-Kaff NS, Covev SN (1995) Biological diversity of *Cauliflowermosaicvirus* isolates expressed in two *Brassica* species. *Plant Pathology* 44: 516-526.
- Alan B (2012) Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yetiştirilen bazı kışlık sebzelerde görülen virüslerin tanınması ve karakterizasyonu. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Blanc S, Hebrard E, Drucker M, Froissart R (2001) Molecular basis of vector transmission *Cauliflowermosaicvirus* Cabb-S strain and S Delta II hybrid by two species of aphid: *Myzus persicae* (sulzer) and *Brevicoryne brassicae* (L.). *Res. Virol.* 141: 677-683.
- Cheng RH, Olson NH, Baker TS (1992) *Cauliflower Mosaic Virus*: A 420 subunit (T=7), multilayer structure. *Virology* 186: 655-668.

- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- Çevik B, Pappu SS, Pappu HR, Benschel D, Lee RF, Futch SH., Rucks P, Niblett CL (1995) Molecular cloning and sequencing of coat protein genes of *Citrustristeza virus* isolated from Meyer lemon and homely tangor trees in Florida. In: Proc. Intern Org. Citrus Virologist. IOCV University of California Riverside, CA. 47-53.
- Daubert S, Routh G (1990) Point mutations in *Cauliflowermosaicvirus* gene IV confer host specific symptoms virus gene IV confer host specific symptoms changes. *Mol. Plants Mic. Interac.* 3: 341-345.
- Erkan S, Eşiyok D, Eser B (1990) A New viral agent affecting cauliflower and cabbage plants in Turkey. *Journal of Turkish Phytopathology* 19: 95-97.
- Farzadfar S, Pourrahim R, Golnaraghi AR, Ahounmanesh A (2005) Occurrence of *Cauliflowermosaicvirus* in different *Cruciferous* plants in Iran. *Plant Pathol.* 54: 810.
- Farzadfar S, Ahounmanesh A, Mosahebi GH, Oshima K, Koohi-Habibi M, Pourrahim R, Golnaraghi AR (2007) Partial biological and molecular characterization of *Cauliflowermosaicvirus* isolates in Iran. *Plant Pathology Journal* 6: 291-298.
- Hardwick NV, Davies JML, Wright DM (1994) The incidence of three virus diseases of winter oilseed rape in England and Wales in the 1991/92 and 1992/93 growing seasons. *Plant Pathol.* 43: 1045-1049.
- Jiang B, Hong N, Wang GP, Hu J, Zhang JK, Wang CX, Liu Y, Fan XD (2008) Characterization of *Citrustristeza virus* strains from southern China based on analysis of restriction patterns and sequences of their coat protein genes. *Virus Genes* 37: 185-192.
- Kennedy JS, Day MF, Eastop VF (1962) A conspectus of aphids as vectors of plant viruses. Common Wealth Institute of Entomology London, The Eastern Press Ltd, London.
- Korkmaz S, Çevik B, Kurtuluş E, Tuzlalı HT (2011) Güneybatı Marmara Bölgesi'nde *Brassicaceae* ve *Alliaceae* familyasına bağlı bitkilerde virüs hastalıklarının teşhisi. Çanakkale Tarım Sempozyumu Dünyü, Bugünü Geleceği, Çanakkale s. 460-467.
- Melcher U (1989) Symptoms of *Cauliflowermosaicvirus* in infection *Arabidopsis thaliana* and turnip. *Bot Gaz.* 150:137-139.
- Moreno A, Blas CDE, Burrin R, Nebrada M, Palacios I, Duque M, Ferreres A (2004) The incidence and distribution of viruses infecting lettuce, cultivated *Brassica* and associated natural vegetation in Spain. *Ann. Appl. Biol.* 144: 339-346.
- Palacios I, Drucker M, Blanc S, Leite S, Moreno A (2002) *Cauliflowermosaicvirus* is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors. *J. Genet. Virol.* 83: 3163-3171.
- Shahraeen N (2012) An overview of oilseed rape (canola) virus diseases in Iran. *International Research Journal of Microbiology* Vol. 3: 24-28.
- Schoelz J, Shepherd RJ, Daubert S (1986) Region VI of *Cauliflowermosaicvirus* encodes a host range determinant. *Mol. Cell. Biol.* 6: 2632-2637.
- Shepherd R J (1981) *Cauliflowermosaicvirus*. AAB Descriptions of Plant Viruses No. 243.
- Suehiro N, Matsuda K, Okuda S, Natsuaki T (2005) A simplified method for obtaining plant viral RNA for RT-PCR. *J. Virol Methods* 125: 67-73.
- Wintermantel WM, Anderson EJ, Schoelz JE (1993) Identification of domains within gene VI of *Cauliflowermosaicvirus* that influence systemic infection of *Nicotiana glauca* in a light-dependent manner. *Virology* 196: 789-798.