

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**ELMA MOZAIK VİRÜS (ApMV)'ÜNE KARŞI RNA PROBU GELİŞTİREREK
VİRÜSÜN VAN İLİNDE ELMALARDAKİ YAYGINLIĞININ MOLEKÜLER
HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Gülüstan KORKMAZ

DANIŞMAN: Prof. Dr. Hikmet Murat SİPAHİOĞLU

VAN-2015

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**ELMA MOZAIK VİRÜS (ApMV)'ÜNE KARŞI RNA PROBU GELİŞTİREREK
VİRÜSÜN VAN İLİNDE ELMALARDAKİ YAYGINLIĞININ MOLEKÜLER
HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Gülüstan KORKMAZ

Bu çalışma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2009-FBE-YL019 No'lu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2015

KABUL VE ONAY SAYFASI

Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Hikmet Murat SİPAHİOĞLU danışmanlığında; Gülüstan KORKMAZ tarafından sunulan, “**Elma Mozaik Virüs (ApMV)'üne Karşı RNA Probu Geliştirerek Virüsün Van İlinde Elmalardaki Yaygınlığının Moleküler Hibridizasyon Yöntemi İle Araştırılması**” isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 13/03/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. H. Murat SİPAHİOĞLU İmza:

Üye: Prof. Dr. Suat ŞENSOY İmza:

Üye: Yard. Doç. Dr. Mustafa USTA İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../2015 tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../2015

Prof. Dr. Dr. Turgut AYGÜN
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Gülüstan KORKMAZ

ÖZET

ELMA MOZAIK VİRÜS (ApMV)'ÜNE KARŞI RNA PROBU GELİŞTİREREK VİRÜSÜN VAN İLİNDE ELMALARDAKİ YAYGINLIĞININ MOLEKÜLER HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

KORKMAZ, Gülüstan
Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. H. Murat SİPAHİOĞLU
Mart 2015, 51 sayfa

Doğu Anadolu Bölgesi'nin iki önemli elma üreticisi ilindeki (Malatya ve Van) elma bahçelerinde ApMV (*Apple mosaic virus*) infeksiyonları; moleküler hibridizasyon (MH) tekniği ApMV'nin teşhisi için optimize edilerek araştırılmıştır. ApMV'nin MH ile teşhisinde en uygun ekstraksiyonu belirlemek için 3 farklı ekstraksiyon yöntemi test edilmiştir. Elma örneklerinin RNA ekstraksiyonunda ön MH testlerinde en iyi sonucu veren silika yakalama yöntemi tercih edilmiştir. 2010 yılında Van ilindeki ticari elma bahçelerinde yapılan survey ile 440 elma örneği toplanmış, MH yöntemi ile test edilen numunelerin hiçbirinde ApMV infeksiyonuna rastlanmamıştır. MH testlerinde kullanılan RNA ekstraktlarının %5'i RT-PCR yöntemi ile testlenmiş örneklerin hiçbirinde ApMV infeksiyonuna rastlanmamıştır. Malatya ilinden 2011 yılında 41 elma numunesi toplanarak RT-PCR yöntemi ile testlenmiş ve örneklerden dördünün ApMV ile infekteli olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen iki ApMV izolatının (ApMV-M ve ApMV-G) kılıf protein (CP) genlerinin tamamı klonlanmış, nükleotid ve amino asit dizileri (Gen bankası erişim numarası: JX155668 ve JX155669) saptanarak, 224 amino asit rezidüsü içerdikleri tespit edilmiştir. Nükleik asit dizilerine dayalı olan filogenetik ağaç neighbor-joining ve unweighted pair-group mean arithmetic (UPGMA) metodları kullanılarak 100 tekerrürlü olarak oluşturulmuş, karşılaştırıldıkları 21 dünya izolatu ile sırasıyla 88 ile 99% ve 91 ile 99% arasında değişen bir varyasyon göstermişlerdir.

Anahtar kelimeler: ApMV, Moleküler hibridizasyon, Survey, Karakterizasyon

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF RIBOPROBE AGAINST APPLE MOSAIC VIRUS (ApMV) AND INVESTIGATION OF ITS INCIDENCE IN APPLES GROWN IN VAN PROVINCE BY USING DOT BLOT HYBRIDIZATION METHOD

KORKMAZ, Gülüstan
M.Sc, Plant Protection Science
Supervisor: Prof. Dr. H. Murat SİPAHİOĞLU
March 2015, 51 Pages

The apple orchards of two main apple growing cities (Van and Malatya) of Eastern Anatolia were surveyed to determine the incidence of ApMV (*Apple mosaic virus*, ApMV) infections by molecular hybridization (MH) after optimizing the technique for the diagnosis of ApMV. In order to determine the most suitable RNA extraction method for MH test, three different RNA preparation procedures were tested. The best result in MH was obtained with silica capture method which was preferred to extract plant total RNA. During the surveys a total of 440 apple samples were collected from commercial apple orchards in Van province in 2010. The 5% of RNA preparations were used in RT-PCR tests. None of the tested samples were infected by ApMV. In Malatya province a total of 41 apple samples were collected in 2011 and tested by RT-PCR method. A total of 4 samples were found infected by ApMV. The coat protein (CP) genes of two viral isolates selected from Malatya (ApMV-G and ApMV-M) were cloned and their complete nucleotide sequences and deduced amino acids (Genbank access. no JX155668 and JX155669) were determined. Both isolates contained 224 amino acid residues. Phylogenetic trees based on nucleic acid sequences were constructed by the neighbor-joining and the unweighted pair-group mean arithmetic (UPGMA) methods with 100 bootstrap replicates and the CP sequence of varied among the 21 isolates, with overall identity ranging from 88 to 99% to 91-99% at the nucleotide level, respectively.

Key words: ApMV, Molecular hybridization, Survey, Characterization

ÖN SÖZ

Elma (*Malus communis* L.), ülkemizde uzun yıllardan beri yetiştiriciliği yapılan, üretim ve alan bakımından öteki ılıman iklim meyvelerinin başında gelen bir meyve türüdür (Anonim, 2001). Elma yetiştiriciliğini sınırlayan hastalık etmenleri arasında yer alan önemli virüs hastalıklarından birisi de elma mozaik virüsü (*Apple mosaic virus*: ApMV)'dür. Viral hastalık etmenleri ile mücadele stratejilerinin doğru belirlenmesinde, hastalığın yaygınlığının hassas teşhis yöntemleri ile ortaya konması büyük önem arz etmektedir. ApMV'ünün ilimizdeki coğrafik yayılımı, ekonomik önemi ve yayılma şekli hakkında detaylı bilgiler bulunmamaktadır. Bu çalışmada ApMV'ye karşı RNA probu geliştirerek virüsün Van ve Malatya illerinde elmalardaki yaygınlığının moleküler hibridizasyon yöntemi ile araştırılması ile Malatya'da tespit edilen ApMV izolatlarının moleküler karakterizasyonlarının yapılması amaçlanmıştır. Ayrıca ApMV'nin teşhisinde 3 farklı ekstraksiyon yöntemi ile ön çalışma yapılarak en iyi sonucu veren ekstraksiyon yöntemi ile moleküler hibridizasyon çalışmalarının sürdürülmesi amaçlanmıştır. Çalışma ile ekstraksiyon yöntemlerinden birinin diğerlerinden daha iyi sonuç vermesi ApMV'nin teşhisinde daha sonra yapılacak araştırmalara ışık tutarak katkıda bulunacaktır. Van ve çevresinde elma yetiştiriciliği yapılan alanlarda bu virüsün varlığına rastlanılmaması bölgenin ApMV'den arı olduğunu göstererek yapılacak olan tarımsal üretim çalışmalarına ve bilimsel çalışmalara yol gösterebileceği kanaatindeyim.

Yürüttüğüm çalışmaları sabır ve anlayışla yönlendiren, bilgisi, önerileri ve her türlü yardımıyla araştırmalarım katkıda bulunan ve destekleyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. H. Murat SİPAHİOĞLU'na, çalışmam esnasında her türlü yardım ve desteğini gördüğüm Yard. Doç. Dr. Mustafa USTA'ya, beni destekleyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışmanın yürütülmesi için; 2009-FBE-YL019 nolu proje ile gerekli finansal desteği sağlayan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına teşekkür ederim.

Van, 2015

Gülüstan KORKMAZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
SEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
EKLER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	3
3. MATERYAL VE YÖNTEM	7
3.1. Materyal	7
3.1.1. Kullanılan virüs izolatu	7
3.1.2. Survey çalışmaları ve total nükleik asit ekstraksiyonu	7
3.1.3. Komplemanter DNA (cDNA) sentezi	8
3.1.4. Polimeraz zincir reaksiyon (PCR) çalışmaları	8
3.1.5. Agaroz jel elektroforez ve jelin görüntülenmesi çalışmaları	8
3.1.6. Klonlama çalışmaları	8
3.1.7. Riboprob (digoxigenin ile işaretli RNA probu) sentezi çalışmaları	9
3.1.8. Moleküler hibridizasyon çalışmaları	9
3.1.9. Kimyasal ışınma çalışmaları	9
3.1.10. Biyoinformatik yöntemler ile dizi analizi ve filogenetik analiz	10
3.2. Yöntem	10
3.2.1. Malatya ApMV izolatına spesifik primerlerin dizaynı	10
3.2.2. Total nükleik asit ekstraksiyonu çalışmaları	10
3.2.2.1. Sitrat tamponu, Qiagen RNA ekstraksiyon kiti ve silika yöntemi	11
3.2.3. Komplemanter DNA sentezi ve PCR testinin uygulanması	11

3.2.4. Elektroforez analizi ve agaroz jelin görüntülenmesi	12
3.2.5. Moleküler Klonlama	13
3.2.5.1. <i>Pfu</i> DNA polimeraz enzimi ile RT-PCR testi ve elde edilen küt uçlu DNA fragmentlerinin jelde görüntülenmesi	13
3.2.5.2. DNA fragmentlerinin agaroz jel'den temizlenmesi (purifikasyon)	14
3.2.5.3. DNA fragmentlerinin uçlarına dATP'nin eklenmesi (A tailing)	14
3.2.5.4. DNA fragmentlerinin PCR parametrelerinden arındırılması	14
3.2.5.5. Ligasyon (DNA'nın plazmide aktarılması)	15
3.2.5.6. Rekombinant plazmidin bakteriye aktarılması (transformasyon)	15
3.2.5.7. Plazmid aktarılmış bakterilerden kültür oluşturma ve plazmid purifikasyonu	17
3.2.5.8. DNA fragmentlerinin plazmide aktarılıp aktarılmadığının kontrol edilmesi	18
3.2.6. Riboprob Sentezi	19
3.2.7. Moleküler hibridizasyon yöntemi ile ApMV'nin hassas teşhisinin yapılması	20
3.2.7.1. Ön hibridizasyon	22
3.2.7.2. Hibridizasyon	22
3.2.7.3. Yıkama ve RNase ile muamele	23
3.2.7.4. Bloklama ve anti-dig antikorlar ile reaksiyon	23
3.2.7.5. Kimyasal ışımaya (chemiluminescence) ve otoradyografi ile teşhis	24
3.2.8. ApMV'ye ait kılıf protein geninin klonlanması ve dizilenmesi.	25
4. BULGULAR	26
4.1. ApMV'ye Karşı En İyi Ekstraksiyon Yöntemi Belirlenmesi	26
4.2. Moleküler Hibridizasyon Yöntemi ile ApMV'nin Surveyi	27
4.3. ApMV İzolatlarının Moleküler Klonlaması, Dizilenmesi ve Filogenetik Analiz	29
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	33
KAYNAKLAR	37
EKLER	42
ÖZ GEÇMİŞ	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa	
Şekil 3.1.	Boyama sonrası jelden istenmeyen materyallerin uzaklaştırılması.	14
Şekil 3.2.	Rekombinant plazmidin elektroşok uygulaması ile bakteriye aktarılması; a.Küvete transfer, b.Ec2 programı ile elektroşok uygulaması.	16
Şekil 3.3.	Plazmid aktarılmış bakteri süspansiyonunun inkübe edilerek ekim yapılması; a. Elektroşoktan sonra 37 °C de inkübasyon, b. IPTG ve X-Gal içeren petriye ekim.	16
Şekil 3.4.	Transformasyon sonrası ampisilin içeren LB ortamında gelişen mavi ve beyaz koloniler. Sadece beyaz olanlarda rekombinant DNA bulunmaktadır.	17
Şekil 3.5.	a. Dikey elektroforez tankına yükleme, b. Elektroforez uygulaması.	19
Şekil 3.6.	Elmalardan ekstrakte edilen RNA'nın dot blot aparatı ile pozitif yüklü naylon membrana denatüre edilerek işlenmesi.	21
Şekil 3.7.	a. Ön hibridizasyon için mesh'in 2X SSC solüsyonu ile ıslatılması, b. Membranla beraber rulo haline getirilmesi, c. hibridizasyon şişesine yerleştirilmesi.	22
Şekil 3.8.	RNA probu uygulaması sonrası 56 °C'de hibridizasyon fırınında inkübasyon uygulanması; a. Prob ilavesi, b. Hibridizasyon fırınında döner vaziyette inkübasyon.	23
Şekil 3.9.	CSPD uygulaması; a. plastik filmin köşelerinden yapıştırarak gerilmesi, b. CSPD içeren Tamponun muamele edilmesi.	24
Şekil 3.10.	CSPD ile muamele gören membranların plastik filme sarılması.	25
Şekil 4.1.	Hibridizasyon testi ile Qiagen kiti, Sitrat tamponu ve Silika yöntemlerinin ApMV'yi teşhis etmedeki etkinliğinin araştırılması.	26

Şekil 4.2.	Malatya ilindeki bir bahçede ApMV'den şiddetli etkilenen ağaçların yapraklarında gözlemlenen mozaik belirtileri.	27
Şekil 4.3.	Dot blot moleküler hibridizasyon testi ile testlenen elma numunelerinin hiçbirinde ApMV enfeksiyonuna rastlanmamıştır. A12 ve C12 ApMV pozitif kontrol, G12 ve H12 Kit pozitif kontrol, E12 ve F12 negatif kontrol.	28
Şekil 4.4.	Kılıf protein geni baz alınarak ApMV-G ve M izolatları ile coğrafik olarak farklı ApMV izolatlarının Neighbor-joining yöntemine göre oluşturulan dendogramları Karşılaştırmada kullanılan İzolatlar Çizelge 4.2'de verilmiştir. Dendogram 100 tekerrürlü olarak elde edilmiştir; a. nükleotid dendogramı b. amino asit dendogramı	30
Şekil 4.5.	ApMV-G (JX155668) ve ApMV-M (JX155669) izolatlarına ait CP gen bölgesinde nükleotid değişikliği içeren bölge. Şekildeki ok nükleotid değişikliğinin olduğu bölgeyi göstermektedir.	30
Şekil 4.6.	a.,b. UPGMA yöntemine göre Türk ApMV izolatlarının diğer ApMV izolatları ile evrimsel ilişkisini gösteren filogenetik ağaçlar. Dendogram 100 tekerrürlü oluşturulmuştur. Bu analizde kullanılan izolatlar Çizelge 4.2.'de verilmiştir.	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. ApMV virüsünü RT-PCR testi ile tespit etmek için dizayn edilen primer dizisine ait bilgiler	10
Çizelge 3.2. Ligasyon işlemi de kullanılan olan kit bileşenlerine ait bilgiler	15
Çizelge 3.3. PAGE jeli bileşenlerine ait bilgiler (Laemmli, 1970)	18
Çizelge 3.4. <i>SacII</i> ile kesim bileşenlerine ait bilgiler.	20
Çizelge 4.1. Dot blot moleküler hibridizasyon ve RT-PCR testleriyle belirlenen, Van ve Malatya illerinde ApMV görülme sıklığı. MH ve/veya RT-PCR ile test edilen örnekler “+” simgesiyle gösterilmiştir.	28
Çizelge 4.2. Bu çalışmada incelenen ApMV virüs izolatu , ana türler, orijin ülkesi, ApMV-G ve M izolatlarının erişim numarası ve veri tabanında kullanılabilir gen dizileri.	32

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μ	Mikron
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
gr	Gram
Da	Dalton
dk	Dakika
kg	Kilogram
kDa	Kilodalton
pmol	Pikomol
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MW	Molekül ağırlığı (weight)
nm	Nanometre
U	Ünite
V	Volt
v/v	Hacim/hacim
w/v	Ağırlık/hacim

Kısaltmalar

A	Adenin
Aa	Amino asit
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ApMV	Apple Mosaic Virus
ArLV	Artichoke latent virüs
C	Sitozin
CP	Coat protein (Kılıf proteini)
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
DNase	Deoxyribonükleaz
dATP	Deoksiadenozintrifosfat
dNTP	Deoksinüklotidtrifosfat
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EtOH	Ethanol
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
CH_3COOH	Glacial acetic acid
HCl	Hidro klorik asit
IC	Immuno Capture
KH_2PO_4	Potasyum di Hidrojen Sülfat
LB	Laura Bertani

ME	Mercaptoethanol
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MH	Moleküler hibridizasyon
MR	Movement protein
Nt	Nükleotid
NaCl	Sodyum klorür
NaI	Sodyum iyodit
NaOAc	Sodyum asetat
Na ₂ SO ₃	Sodyum sülfat
PCR = PZR	Polymerase Chain Reaction : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PNRSV	Prunus Necrotic Ringspot Virus
PVP (40)	Polivinilpirolidon
RNA	Ribonükleik asit
RNAse	Ribonükleaz enzim
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
RT	Reverse Transcriptase
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
T	Timin
TNA	Total Nükleik Asit
TAE	Tris Asetat EDTA
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	Termo stabil DNA polimeraz enzimi
TBE	Tris Borate EDTA
U	Urasil
UPGMA	Unweighted pair-group mean arithmetic

EKLER DİZİNİ

	Sayfa
Ek 1. Total RNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler	42
Ek 2. Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Tampon Çözeltiler	44
Ek 3. Klonlama Çalışmasında Kullanılan Besi Ortamlarının ve Kompetan Bakteri Hücrelerinin Hazırlanması	45
Ek 4. Dot Blot Hibridizasyon Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler.	47

1. GİRİŞ

Elma (*Malus communis* L.), ülkemizde uzun yıllardan beri yetiştiriciliği yapılan, üretim ve alan bakımından öteki ılıman iklim meyvelerinin başında gelen bir meyve türüdür. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü) 2012 yılı verilerine göre ülkemizde yıllık elma üretimi yaklaşık 2.89 milyon tondur. Elmanın gen merkezlerinden biri olan Türkiye; üretim açısından Çin (37 milyon ton) ve ABD (4.11 milyon ton) 'den sonra Dünya'da üçüncü sırada yer almakta ve 76 milyon ton olan Dünya elma üretiminin yaklaşık % 4'ünü karşılamaktadır (Anonim, 2012). Van Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü verilerine göre Van ilinde en çok yetiştiriciliği yapılan meyve türü elmadır.

Elma yetiştiriciliğini sınırlayan birçok viral hastalık etmeni bulunmaktadır. Bu virüs hastalıklarından en önemlilerinden olan ApMV ilk defa 19. yüzyılın başlarında belirlenmiş; bunu takiben bugün elma yetiştiriciliği yapılan birçok ülkede tespit edilmiştir (Howell ve ark., 1991). Çok geniş bir konukçu dizisine sahip olan ApMV 19 familyadan 65 bitki türünü hastalandırmaktadır (Zeki, 1991). Bu denli geniş konukçu dizisine sahip olan ApMV Türkiye'de iç karantinaya tabi hastalıklar arasında da yer almaktadır (Anonim, 2007). ApMV belirtileri, virüs ırkı virülensi, bitki türü, çevre şartlarına göre ve yıldan yıla değişmekle beraber, yapraklarda açık sarı kenarları belirgin lekeler ve mozaiklenme, yaprak damarlarında renk açılması görülür. Bu lekeler hassas çeşitlerde bütün yapraklarda, tolerat çeşitlerde ise birkaç yaprakta görülür. İlerleyen zamanlarda bu lekeler kahverengine döner ve hassas çeşitlerde olgun yapraklar dökülür.

Viral hastalık etmenlerinin ve yaygınlığının hassas teşhis yöntemleri ile ortaya konması, üretim alanlarında uygun mücadele stratejilerinin planlanması için oldukça önemlidir. Moleküler hibridizasyon tekniği bitki virolojisinde ilk olarak viroidlerin teşhisinde kullanılmış (Owens ve Diener, 1981) daha sonraları yine teşhis amaçlı bitki virüslerine uyarlanmıştır (Garger ve ark., 1983, Maule ve ark., 1983). Moleküler hibridizasyon testinin temeli pürin ve pirimidin bazlarınının A-T ve G-C şeklinde bazların eşleşerek nükleik asitlerin hibrid moleküller oluşması esasına dayanmaktadır. Hedef nükleik asit ile birleşen nükleik asit genellikle işaretlidir ve prob olarak

isimlendirilmektedir. Oluşan hibrit moleküllerin stabilitesi iki iplik arasındaki hidrojen bağlarının sayısı ile bu moleküller arasındaki elektrostatik ve hidrofobik güçlerin varlığına bağlıdır (Pallas ve ark., 1998).

Dot blot, Southern blot, Northern blot ve *in situ* hibridizasyon yöntemlerinden oluşan bu teknik içerisinde en yaygın olan dot-blot hibridizasyon tekniğidir. Bu tez çalışmasında da kullanılan Dot Blot yönteminde nükleik asit ekstraksiyonu nitroselülaz veya naylon membran gibi katı bir desteğe direkt uygulanır ve sonradan eklenen spesifik problemler ile teşhis yapılır (Pallas ve ark., 2003).

ApMV'nin Van ilindeki ticari yetiştiricilik alanlarında infeksiyon durumu, yayılma şekli ve ekonomik önemi hakkında detaylı bilgiler mevcut değildir. Bu çalışmada virüsün Van ve Malatya illerinde ticari alanlarda yetiştirilen elmalardaki yaygınlığının ApMV'ye spesifik RNA probu oluşturularak moleküler hibridizasyon yöntemi ile araştırılması amaçlanarak, ApMV'nin teşhisinde 3 farklı ekstraksiyon yöntemi ile ön çalışma yapılarak en iyi sonucu veren ekstraksiyon yöntemi ile moleküler hibridizasyon çalışmalarının sürdürülmesi hedeflenmiştir. Ayrıca çalışmalar esnasında Malatya ilinde teşhis edilen ApMV izolatlarının moleküler karakterizasyonlarının ortaya konması amaçlanmıştır. Çalışma ile araştırılan ekstraksiyon yöntemlerinden birinin diğerlerinden daha iyi sonuç vermesi, ApMV'nin teşhisinde daha sonra yapılacak araştırmalara ışık tutarak katkıda bulunacaktır. Malatya ilinde tespit edilen 2 ApMV izolatının karakterizasyonunun belirlenmesi ve diğer izolatlarla karşılaştırılmasıyla dünyanın diğer bölgelerinde tespit edilmiş olan ApMV'leri ile akrabalık ilişkisi ortaya konmuştur. Van ve çevresinde ticari elma yetiştiriciliği yapılan alanlarda ApMV etmenine rastlanılmaması ile bölgenin virüsten arı olduğu ortaya konulduğu bu çalışma ile yapılacak olan tarımsal üretim çalışmalarına katkıda bulunabileceği ve bilimsel araştırmalara ışık tutabileceği öngörülmektedir.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Elma (*Malus communis* L.), ülkemizde uzun yıllardan beri yetiştiriciliği yapılan, üretim ve alan bakımından öteki ılıman iklim meyvelerinin başında gelen bir meyve türüdür. FAO 2012 verilerine göre ülkemizde yıllık elma üretimi yaklaşık 2.89 milyon tondur. Elmanın gen merkezlerinden biri olan Türkiye, üretim açısından Çin (37 milyon ton) ve ABD (4.11 milyon ton)'den sonra Dünya'da üçüncü sırada yer almakta ve Dünya elma üretiminin yaklaşık % 4'ünü karşılamaktadır (Anonim, 2012).

Elma yetiştiriciliğini sınırlayan hastalık etmenleri arasında en önemli virüs hastalıklarından birisi ApMV'dir. İlk defa 19. yüzyılın başlarında belirlenen ApMV, bunu takiben bugün elma yetiştiriciliği yapılan birçok ülkede tespit edilmiştir. ApMV, *Bromoviridae* familyası içerisinde *Ilarvirus* cinsine üye olup 3 parçalı ssRNA genomları izometrik olan bir virüstür (Bradford ve Joly, 1933). ApMV yaklaşık 25-29 nm çapındadır (Howell ve ark., 1991).

Oldukça geniş bir konukçu dizisine sahip olan elma mozaik virüsü 19 familyadan 65 bitki türünü hastalandırmaktadır (Zeki, 1991). Bu denli geniş bir konukçu dizisine sahip olan ApMV Türkiye'de iç karantinaya tabi hastalıklar arasında da yer almaktadır (Anonim, 2007). Virüs odunsu bitkilerden böğürtlen, ahududu, elma, kayısı, kiraz, badem, erik ve şeftali, fındık, gül ve şerbetçi otunda belirlenmiştir. Ayrıca, ApMV'nin dişbudak, huş ağacı, atkestanesi ve kırmızı atkestanesinde de varlığı saptanmıştır (Polak ve Zieglerova, 1997).

Viral hastalık etmeni olarak ApMV ilk olarak gül (*Rosa* spp.) ve (*Malus domestica*) bitkilerinde (Bradford ve Joley 1933) bildirilmiştir. Dünya'da ApMV elmada ilk olarak Granny Smith çeşidinde belirlenmiş ve bu çeşitle birlikte yayılmıştır. Bunun nedeni Granny Smith çeşidinin virüsün simptomsuz taşıyıcısı olmasıdır (Anonim, 2001).

ApMV'nin tohum ve vektörle taşındığına ilişkin bir kayıt bulunmamaktadır (Zeki, 1991). Buna karşı virüsün aşı ve polen ile taşınabilen ancak mekanik olarak zor taşınan bir virüs olduğu bildirilmiştir (Zeki, 1991; Petrzik ve Lenz, 2002; Anonim, 2003).

Elmada mozaik virüs hastalığı, ağacın gelişmesini % 20 geriletmekte, meyve verimini de % 30 düşürmektedir (Meijneke ve ark., 1963, Bauman, 1972). Ticari olarak

yetiştirilen elma varyetelerinin çoğu ApMV'nin konukçusudur (Yılmaz ve ark., 1995). ApMV belirtileri, bitki türü, virüs irki ve virülensi, çevre şartlarına göre ve yıldan yıla değişmekle beraber, tipik simptomları yapraklarda sarımsı- beyaz renklenmeler, halkalı lekeler ve damar bantlaşması şeklindedir. Kuvvetli güneş ışığında yapraklarda nekrozlar oluşmakta ve erken döküme rastlanmaktadır. Hastalık yapraklarda küçük sarı noktalar halinde de kendini gösterebilmektedir. Belirtiler genellikle yazın erken dönemde görülmekte olup sıcaklığın yükselmesiyle maskelenebilmektedir. *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Apple stem pitting virus* ve *Apple stem grooving virus* yumuşak çekirdekli meyve türlerinde ApMV'de olduğu gibi belirgin simptom oluşturmazlar (Mink, 1989; Desvignes, 1999).

Choi ve ark. (2003), RT-PCR tekniği ile ApMV izolatına ait CP (kılıf protein) geni bölgesini çoğaltmış ve plazmide aktararak klonlamışlardır. Klonlanan rekombinant plazmidin kılıf protein dizilimini belirlemişlerdir. Buna göre ApMV K izolatının klif protein geni bölgesinin 218 aminoasit içerdiği ve bu izolatın diğer ApMV izolatların klif protein gen bölgesinin aminoasit uzunluğundan 3-5 aminoasit daha kısa olduğu sonucuna varmışlardır.

Petrzik ve Lenz (2002), yürüttükleri bir çalışmada RT-PCR yöntemi ile testledikleri İspanya'daki 320 fındık ağacından 311 tanesinde, Almanya'daki 1045 huş ağacından 4'ünde, Çek Cumhuriyeti'ndeki 44 atkestanesi ağacından 3'ünde, ApMV tespit etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada ApMV virüsü'nün *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) ve *Prune dwarf virus* (PDV) ile karışık infeksiyon halinde bulunduğunu fakat ApMV yoğunluğunun daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Buzkan ve ark., (2006) yaptıkları çalışmada Kahramanmaraş Sert Kabuklu Meyveler Araştırma Merkezinin kayısı parselinde virüs hastalıklarını teşhis ve kontrolü amaçlı yürüttükleri çalışmada 183 ağaçtan aldıkları yaprak örneklerini testlemişler ve % 1.63 oranında ApMV infeksiyonu tespit etmişlerdir. Ayrıca ApMV'nin kayısı ağaçlarında neden olduğu simptomların yapraklarda uç kısımlardan başlayıp geriye doğru ilerleyen genel sarılık şeklinde olduğunu bildirmişlerdir.

Doğu Akdeniz Bölgesi'nde erik ve kayısı ağaçları üzerinde yürütülen bir çalışmada PNRSV ve PDV'nin tek tek veya karışık infeksiyonları tespit edilmiş, ancak ApMV infeksiyonuna rastlanılmamıştır (Çağlayan-Yıldızgördü ve Çalı., 1994).

Van ve civarında yetiştiriciliği yapılan sert çekirdekli meyvelerde sorun olan viral ve fungal hastalıkları tespit etmek amacıyla Sipahioğlu ve ark. (2003), *Prunus Necrotic Ringspot* (Erik Nekrotik Halkalı Leke, PNRSV), *Apple Chlorotic Leaf Spot* (Elma Klorotik Yaprak Leke, ACLSV), ApMV, *Prune Dwarf* (Erik Cücelik, PDV) ve *Plum Pox* (Erik Şarka, PPV) virüslerinin tespiti için bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada ELISA ile testledikleri 306 ağacın 154'ünü kayısı, 45'ini kiraz, 23'ünü şeftali, 41'ini erik ve 32'sini vişne oluşturmuştur. Testlenen örneklerde PDV ve ACLSV enfeksiyonları tespit edilmiştir. Çalışmada PDV'nin neden olduğu enfeksiyon oranı; kayısıda %0.6, kirazda %7.1 ve vişnede ise %31.2 olarak belirlenmiştir. ACLSV enfeksiyonuna sadece şeftalilerde %39.1 oranında rastlanılmıştır. Kayısı, erik, vişne, kiraz ve şeftali örneklerinin hiçbirinde PNRSV, PPV ve ApMV enfeksiyonlarına rastlanmamıştır.

Çağlayan ve ark. (2005), Türkiye'de elma yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Ankara, Bursa, Adana, Osmaniye, İçel, Amasya illerinde yürütülen survey çalışmasında 20 ayrı meyve bahçesinden 1000'den fazla ağaçtan topladıkları numunelerde dört elma virüsünü ELISA ve RT-PCR yöntemiyle araştırmışlardır. Survey sırasında az sayıda mozaik simptomu gözlemlenmiş uygulanan teşhis teknikleri sonucunda ticari meyve bahçelerinden toplanan 80 numunenin %10'unda rastgele meyve bahçesinden toplanan 94 numunenin %6.38'inde ApMV tespit etmişlerdir.

Uzunoğulları ve İlbağı (2009), yaptıkları bir çalışmada Güneydogu Marmara Bölgesi'nde yumusak çekirdekli meyve üretimi yapılan Bursa, Kocaeli, Sakarya ve Yalova illeri ile bu 4 ile bağlı 11 ilçedeki 170 bahçeden *Applemosaic virus* (ApMV)'nu saptamak amacıyla yaprak örnekleri toplamışlardır. Yapılan surveylerde 164 elma, 103 armut, 104 ayva ağacından toplanan 371 yaprak örneğine yapılan das-elisa testi sonucunda 11 farklı elma çeşidinin %15.8, 12 farklı armut çeşidinin %24.7 farklı ayva çeşidinin ise %21 oranında ApMV ile enfekteli olduğunu bildirmişlerdir. Virüs ile enfekteli olduğu saptanan en önemli çeşidin elmada; Starking Delicious ve Golden Delicious, armutta Santa Maria, Akça ve Deveci, ayvada ise Esmе çeşidi olduğunu bildirmişlerdir.

Kutluk-Yılmaz ve ark. (2005), Tokat ili elma bahçelerinde ApMV'nin yayılışını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada 116 adet bitki yaprak örneği toplamışlar ve das-elisa yöntemi ile testleyerek, %6.9'nun ApMV ile bulaşık olduğunu bildirmişlerdir.

Virüse bölgede sadece Tokat Merkez (%15.09)'e bağlı Fidanlık ve Geyraz mevkilerindeki iki bahçede rastlamışlar ve hastalığın belirlendiği çeşidi ise Granny Smith olarak bildirmişlerdir.

Moleküler hibridizasyon tekniği bitki virolojisinde ilk olarak viroidlerin teşhisinde kullanılmış (Owens ve Diener, 1981) daha sonraları yine teşhis amaçlı bitki virüslerine uyarlanmıştır (Garger ve ark., 1983; Maule ve ark., 1983). Moleküler hibridizasyon testinin temeli pürin ve pirimidin bazlarının A-T ve G-C şeklinde bazların eşleşerek nükleik asitlerin hibrid moleküller oluşması esasına dayanmaktadır. Hedef nükleik asit ile birleşen nükleik asit genellikle işaretlidir ve prob olarak isimlendirilmektedir. Oluşan hibrit moleküllerin stabilitesi iki iplik arasındaki hidrojen bağlarının sayısı ile bu moleküller arasındaki elektrostatik ve hidrofobik güçlerin varlığına bağlıdır (Pallas ve ark., 1998).

Dot blot, Southern blot, Northern blot ve *in situ* hibridizasyon yöntemlerinden oluşan bu teknik içerisinde en yaygın olan dot-blot hibridizasyon tekniğidir. Bu yöntemde nükleik asit ekstraksiyonu nitroselülaz veya naylon membran gibi katı bir desteğe direkt uygulanır ve sonradan eklenen spesifik problemler ile teşhis yapılır (Pallas ve ark., 2003).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan virüs izolatu

Malatya ilinde 2007 yılında yapılan çalışmalar sırasında şüpheli görülerek, laboratuarda RT-PCR testi ile ApMV etmeni ile infekteli olduğu tespit edilen elma bitkisinden alınmış olan aşı gözlerinin Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü uygulama ve araştırma arazisindeki Golden Delicious çeşidi elmaya aşılacak suretiyle koruma altına alınan ApMV Malatya izolatu pozitif kaynak olarak kullanılmıştır.

ApMV-Malatya izolatına ait Coat Protein (CP) gen bölgesi kendi dizayn ettiğimiz primer kullanılarak RT-PCR testi ile çoğaltılmıştır ve uygun bir vektörde klonlanmıştır. Klonlanan bu gen bölgesi ile riboprob sentezlenerek moleküler hibridizasyon testlerinde kullanılmıştır. ApMV Malatya örneklerinden rastgele iki tanesi seçilerek Kılıf protein gen bölgelerinin tamamı klonlanmıştır. Klonlanan bu bölgeler dizilerek filogenetik analizleri yapılmıştır.

3.1.2. Survey çalışmaları ve total nükleik asit ekstraksiyonu

Yapılan survey çalışmalarında 2010 yılında Van ili Merkez, Edremit, Gevaş, Muradiye ve Erciş ilçesinde toplam 440 örneğe ApMV etmenine karşı hibridizasyon testi yapılmıştır. Survey çalışmalarında belirti gösteren ve göstermeyen ağaçlardan bahçeyi temsil edecek şekilde rastgele örneklemeler yapılmıştır. Malatya ilinden 41 elma numunesi toplanmıştır.

Hibridizasyon testlerinde kullanılmak üzere Total nükleik asit (TNA) izolasyon çalışmalarında toplanan bitki yaprak örneklerinden elde edilen ekstraktlar kullanılmıştır. Elde edilen TNA'lar -20 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır. TNA izolasyon çalışmaları sırasında kullanılan kimyasallar ve tampon çözeltilerin hazırlanışı Ek 1' de verilmiştir.

3.1.3. Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Komplementer DNA (cDNA) sentezi sağlamak için Fermantas (Vilnius, LITHUANIA) firmasından temin edilen cDNA sentez kiti kullanılmıştır. Firmanın önerdiği prosedüre göre cDNA sentezi yapılmıştır. Uygun taşınma koşulları ile temin edilen kit tüm çalışma süresince -20°C 'de derin dondurucuda saklanmıştır.

3.1.4. Polimeraz zincir reaksiyon (PCR) çalışmaları

ApMV virüsüne spesifik bu çalışma ile dizayn edilen (CP gen bölgesi) primer seti İontek A.Ş. (Merter, İSTANBUL) firmasına sentez ettirilmiştir. TNA ekstraksiyonu sonucunda elde edilen hedef nükleik asitlerin çoğaltılması için gerekli olan 10 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), ısıya dayanıklı *Taq* DNA polimeraz enzimi, 10X PCR tamponu, 25mM MgCl_2 Promega (Madison WI, USA) ve Fermantas (Vilnius, LITHUANIA) firmalarından temin edilmiştir. Nükleik asitler Eppendorf Master Cycler Personal marka PCR cihazı ile çoğaltılmıştır.

3.1.5. Agaroz jel elektroforez ve jelin görüntülenmesi çalışmaları

PCR ile çoğaltılan virüs izolatının CP gen bölgesine ait DNA ürünleri, agaroz jel elektroforezde materyal olarak kullanılmıştır. Agaroz jel elektroforez işleminde, BIO-RAD firmasına ait Elektroforez aparatları (Mini wide sub cell GT) kullanılmıştır. Elektroforez edilen DNA ürünleri Syngene (Synoptipcs Ltd. Cambridge, GB) marka jel görüntüleme analiz sistemi ile görüntülenmiştir.

3.1.6. Klonlama çalışmaları

Transformasyonda *Escherichia coli* (JM 109 ırkı) bakterisi, Purifikasyonda ZymoClean Gel DNA Recovering kit, dATP eklenmiş DNA fragmentlerinin temizlenmesinde ZymoClean DNA Concentration kit, ligasyon işleminde Promega firmasından temin edilen pGEM T-Easy Vector kiti, Plazmidlerin purifikasyon işleminde ise Fermantas GeneJET Plasmid Mini Prep kit kullanılmıştır.

3.1.7. Riboprob (digoxigenin ile işaretli RNA probu) sentezi çalışmaları

Klonlama sonrasında rekombinant plazmidler SP6 promoter bölgesinden linearize edilmiştir. Linearize edilen plazmid+DNA'dan Roche firmasından temin edilen Dig-Labeling kit kullanılarak digoxigenin ile işaretli riboprob sentezi firmanın bidirdiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Riboprob sentezi çalışmasında kitle beraber verilen plazmid+DNA kontrolü de kullanılmıştır. Transkripsiyon sonrasında ApMV'üne karşı spesifik riboprolar (Digoxigenin ile işaretli RNA probu) elde edilmiştir.

3.1.8. Moleküler hibridizasyon çalışmaları

Survey çalışmalarında toplanan örneklerden ekstrakte edilen RNA dot blot aparatı ile pozitif yüklü naylon membranlara denatüre edilerek işlenmiştir. Membran daha sonra 5 dk süre ile crosslinker cihazında UV'ye maruz bırakılmıştır. UV uygulaması ile nükleik asitlerin membrana tutunmaları sağlanmıştır. Membran steril bir mesh ile beraber rulo yapılarak hibridizasyon şişesine yerleştirilmiş ve Riboprob uygulaması sonrası 56 °C'de Thermo marka hibridizasyon fırınında inkübe edilmiştir.

3.1.9. Kimyasal ışımaya çalışmaları

Riboprob uygulamasından sonra problar üzerinde bulunan digoxigenini yakalaması için membranlara Anti-Dig-AP antikor uygulanmış, Thermo marka hibridizasyon fırınında döner vaziyette inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonra CSPD (Disodium 3-(4 methoxyspiro {1,2-dioxane 3,2'-(5 chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}4-yl) phenyl phosphate) substratı uygulaması gerçekleştirilmiş ve kimyasal ışımının (chemilluminescence) olması sağlanmıştır. Işığa duyarlı Kodak marka röntgen filmi karanlık bir odada membran üzerine kapatılarak Exposure Casette'e yerleştirilmiş ve 10 dk süre ile bu şekilde inkübe edilmiştir. Daha sonra film yine karanlık odaya alınarak önce geliştirme (developing) solusyonunda (KODAK) 1-2 dk daha sonra sabitleme (fixing) solusyonunda (KODAK) 1-2 dk bekletilmek suretiyle banyo edilmiş ve çeşme suyuyla yıkandıktan sonra incelenerek resimlenmiştir.

3.1.10. Biyoinformatik yöntemler ile dizi analizi ve filogenetik analiz

ApMV Malatya örneklerinden iki tanesinin kılıf protein bölgesinin (tamamı) moleküler klonlaması sonucunda elde edilen fragmentlerin DNA dizilemeleri İntek A.Ş. (Merter, İSTANBUL) yaptırıldıktan sonra filogenetik analizleri Geneious ve Vector NTI programları yardımı ile gerçekleştirilmiştir

3.2. Yöntem

3.2.1. Malatya ApMV izolatına spesifik primerlerin dizaynı

ApMV'nin CP gen bölgesine, gen bankasında yer alan genom bilgilerinden yararlanarak Vector NTI programı ile spesifik primer dizayn edilmiştir (Çizelge 3.1.). Dizayn edilen primer ile ApMV Malatya izolatının CP gen bölgesi RT-PCR yöntemi ile çoğaltılmış ve ardından klonlama çalışması yapılmıştır. Klonlama çalışmasından sonra elde edilen DNA segmentleri ile riboprob sentezlenerek moleküler hibridizasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. ApMV virüsünü RT-PCR testi ile tespit etmek için dizayn edilen primer dizisine ait bilgiler

Bölge	Primer dizisi	Çoğaltılan alanın uzunluğu (pb)
Kılıf Protein	CPsense 5'-GTCAAGCGAACCCGAATAAG-3' Cpantisense 5'-ACCAACCCAATCCATCCA-3'	289

3.2.2. Total nükleik asit ekstraksiyonu çalışmaları

Y.Y.Ü. Bitki Koruma Bölümü uygulama ve araştırma arazisindeki ApMV ile infekteli olan bitkinin tomurcuk ve kabuk dokuları öncelikle 3 farklı metod ile ekstrakte edilmiştir. Farklı metodlarla ekstraksiyon yapıldıktan sonra hibridizasyon testine tabi tutulmuştur. Survey alanlarından toplanan örnekleri dot blot moleküler hibridizasyon testi ile araştırmada en iyi sonucu verecek metodun belirlenmesi amaçlanmıştır.

3.2.2.1. Sitrat tamponu, Qiagen RNA ekstraksiyon kiti ve silika yöntemi

Y.Y.Ü. Bitki Koruma Bölümü uygulama arazisindeki ApMV ile infekteli bitkinin kabuk ve tomurcuk dokuları Sipahioğlu ve ark. (2007)'nin bildirdiği sitrat tamponu yöntemine göre total nükleik asitler izole edilmiştir.

Qiagen kitiyle ApMV ile infekteli bitki kabuk ve tomurcuk dokuları kullanılarak total RNA izolasyonu ilgili firmanın bildirdiği prosedüre göre kullanılarak total nükleik asit ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Silika yöntemi ile RNA total RNA ekstraksiyonu ise Foissac ve ark, (2001)'in bildirdiği yöntemine göre yapılmıştır. Buna göre 100 mg tomurcuk veya kabuk dokusu 1 ml ekstraksiyon tamponu (grinding buffer-Ek1) ile steril havan veya plastik torba içerisinde ezilerek homojenize hale getirilmiştir. Homojenize edilen ekstraktan 500 µl hacimde alınıp ve üzerine 100 µl 10% Sodium lauryl sarcosyl solüsyonu ilave edilip tüpler ara sıra sallanmak kaydı ile 10 dakika süreyle 70°C de inkube edilmiş ve daha sonra 5 dakika süreyle buza daldırılmıştır. Tüpler 10 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra üstteki sıvının 300 µl'si boş steril eppendorf tüplerine transfer edilmiş ve içerisine 150 µl ethanol, 25 µl resuspense silica (Ek1) ve 300µl 6M sodium iodide (Ek1) ilave edilmiştir. Karışım, oda sıcaklığında sallayıcı (shaker) üzerinde 10 dakika inkube edilmiştir. Tüpler 6000 rpm de 1 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı (supernatant) atılmış ve 500µl yıkama tamponu (washing buffer-Ek1) ile oluşan pelletler yıkanmış ve 6.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra tekrar eppendorf tüplerindeki pelletler 500µl yıkama tamponu (washing buffer-Ek1) ile yıkanmışlardır. Elde edilen pelletler, 150 µl RNase-free su ile çözdürüldükten sonra ve 4 dakika 70°C de benmaride inkübe edilmişlerdir. Tüpler 3 dakika 14.000 rpm de santrifüj edildikten sonra, supernatant yeni hazırlanan eppendorf tüplerine transfer edilmiş ve pelletler atılmıştır. Böylece elde edilen total nükleik asit ekstraktı complemenenter DNA elde edilmeye ve moleküler hibridizasyon testine hazırlanmıştır.

3.2.3. Komplementer DNA sentezi ve PCR testinin uygulanması

Komplementer DNA (cDNA) sentezi, Reverse Transcriptase enzimi kullanarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre nükleaz-free mikrofuju tüp içerisine 1µl 2 pmol/µl spesifik

primer (Çizelge 1), 2µl total RNA, 1µl 10mM dNTP karışımı eklenmiştir. RNAase free su ile 12µl'ye tamamlanmış olan karışım köpürtmeden vortekslenmiş ve tüpün cidarlarındaki damlaları tüpün dibine indirmek için 4–5 bin rpm'de kısa bir dönü yapılmıştır. Karışım 5 dakika 65 °C de kuru blok ısıtıcıda inkübe edildikten hemen sonra buza daldırmak suretiyle hızla soğutulmuştur. Daha sonra buz üzerinde 4 µl 5x First Strand Buffer, 2µl 0.1M DTT ve 1µl RNAse inhibitörü eklenmiştir. Tüpler vorteksledikten sonra 2 dakika 42 °C de inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben tüplere 1µl reverse transcriptase enzimi eklenerek 42 °C de 50 dakika inkübe etmek suretiyle transkripsiyon gerçekleştirilmiştir. RT'yi inaktive etmek için inkübasyon sonrası tüpler 15 dakika süreyle 70 °C sıcaklıkta benmaride bekletilmişlerdir. Transkripsiyon sonrası ortamdaki RNA'ların eliminasyonu için 1µl (2 unite) *E.coli* RNAase'nin ekleneceği tüpler 20 dakika 37 °C de inkübe edilmişlerdir. PCR için hazır olan cDNA'lar PCR işlemi yapılıncaya kadar –20 °C de saklanmışlardır.

ApMV'nin PCR ile teşhisinde steril bir tüp içerisine 5 µl 10X PCR Buffer'ı (200mM) Tris –HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 3 µl 25mM MgCl₂, 1µl spesifik primer (Çizelge 3.1.) (10µM), 0.4 µl *Taq* DNA polimeraz enzimi (5U/µl), 2µl cDNA, 36.6µl RNAse free su konulmuştur. Tüpler köpürtülmeden dikkatlice karıştırıldıktan sonra PCR cihazına yerleştirilmişler ve PCR cihazı Petrzik, (2005)'in bildirdiği sıcaklık aralıklarına programlanarak çalıştırılmıştır. PCR sonrası elde edilen ürünler elektroforez edilinceye kadar -20 °C'de saklanmışlardır.

3.2.4. Elektroforez analizi ve agaroz jelin görüntülenmesi

PCR sonrası elde edilen ürünleri %1.5'lik agaroz jelde elektroforez yapılmıştır. Bunun için bir buçuk gram agaroz, 100 ml 1X TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu içersinde mikrodalga fırında, 2-3 dakika eriyinceye kadar ısıtılmıştır. Hazırlanan agaroz 50 °C' ye kadar soğutulduktan sonra kabarcık oluşturmayacak şekilde jel tepsisine dökülmüştür. Jelin donması için oda sıcaklığında 30 dakika beklenmiştir. Katılaştıran jel, tepsisi ile birlikte tankın içine yerleştirilmiş ve 1X kuvvetindeki TAE tamponu jeli kapatacak kadar dökülmüş ve jel üzerindeki tarak çıkarılmıştır. Jel çukurlarının ilk veya son çukuruna, 2 µl DNA markırı 3µl 6X yükleme tamponu ve 3µl RNase ari su parafilm üzerinde köpürtülmeden karıştırılarak jelin çukurlarına yerleştirilmiştir. Yaklaşık 10 µl

hacimdeki PCR ürünleri ise 5µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jelin çukurlarına yüklenmiştir. Yatay elektroforez tankı güç kaynağına bağlanarak 85 Voltta 45 dk süre ile elektroforez edilmiştir.

Elektroforez işlemi sonunda elde edilen jel uygun bir kap içerisinde 100 ml steril saf su ve 30µl EtBr (0.5 µg/ml) solüsyonunda 20 dakika süreyle sallayıcı platform üzerinde boyanmıştır. Böylece jel ethidium bromide (EtBr) ile boyanarak DNA görünür hale getirilmiştir (Sambrook ve ark., 1989). Boyama sonrası jel'deki bantlar, SYNGENE (Synoptics Ltd.Cambridge, GB) marka jel görüntüleme ve analiz sisteminde görüntülenmiştir.

3.2.5. Moleküler klonlama

Önceki aşamada yapılan görüntüleme sonucunda, ApMV izolatına ait CP gen bölgesi kendi dizayn ettiğimiz primerle (Bkz. Çizelge 3.1.) PCR ile çoğaltıldıktan sonra moleküler klonlama aşamasına geçilmiştir. Klonlama için önceki aşamada elde edilen cDNA'lar kullanılarak *Pfu* DNA polimeraz enzimi ile bir PCR çalışması daha yapılmıştır. *Pfu* DNA polimeraz enzimi küt uçlu fragmentlerin oluşumunu sağlamaktadır. Bu da uçlarına dATP eklenmesine imkan vermektedir. Bunun için Steril bir PCR tüpüne 5 µl 10X PCR tamponu (200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 3 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl dNTP (10 mM), 1 µl her bir spesifik primer (100 pmol/µl), 0.4 µl *Pfu* DNA polimeraz enzimi (5U/µl), 2µl cDNA ve 36.6 µl RNase ari su konularak PCR işlemi daha önce anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

3.2.5.1. *Pfu* DNA polimeraz enzimi ile RT-PCR testi ve elde edilen küt uçlu DNA fragmentlerinin jelde görüntülenmesi

PCR ile çoğaltılan DNA fragmentleri %1'lik agaroz jelde her bir örnek için en az 10 µl hacimde 2 yada daha fazla jel çukurunda elektroforez edilerek bantlar görülmüştür. Boyama sonrası jel yaklaşık 150 ml steril saf su içerisinde 30 dk sallayıcı platformda bekletilerek istenmeyen materyallerin uzaklaştırılması sağlanmıştır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Boyama sonrası jelden istenmeyen materyallerin uzaklaştırılması.

3.2.5.2. DNA fragmentlerinin agaroz jel'den temizlenmesi (purifikasyon)

Jel UV üzerinde görüntülenmiş ve jelin temizlendiğine kanaat getirildikten sonra bantlar UV üzerinde steril bir bisturi ile kesip çıkarılmıştır (Bkz. şekil 3.1.). Çıkarılan dikdörtgen jel parçaları steril bir tüpe konmuş ve ticari bir kit yardımı ile jelden DNA fragmentleri temizlenmiştir. Purifikasyon ZymoClean Gel DNA Recovering kit ile yapılmıştır. Bu işlem firmanın bildirdiği prosedüre göre uygulanmıştır.

3.2.5.3. DNA fragmentlerinin uçlarına dATP'nin eklenmesi (A tailing)

DNA fragmentinin ligasyonla yerleştirileceği vektörün uçları dATP ile bittiğinden purifikasyondan sonra elde edilen PCR ürünlerinin uç kısımlarına dATP eklemesi yapılmıştır. dATP ekleme işlemi steril bir tüp içerisine 25 µl küt uçlu DNA fragmenti, 3 µl dATP (2mM), 3 µl 10 X PCR bufferı, 1.5 µl MgCl₂, 0.5 µl *Taq* DNA polimeraz enzimi eklenip 70⁰C'de 1 saat inkube edilerek gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ürünler -20⁰C'de saklanmışlardır.

3.2.5.4. DNA fragmentlerinin PCR parametrelerinden arındırılması

Uçlarına dATP eklenmiş DNA fragmentleri dATP ekleme esnasında farklı enzim ve tamponlar içerisinde bulunduğundan klonlama çalışmalarını olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle DNA fragmentlerinin bu bileşenlerden uzaklaştırılması

gerekmektedir. Bu işlem ZymoClean DNA Concentration kiti ile firmanın bildirdiği şekilde uygulanmıştır.

3.2.5.5. Ligasyon (DNA'nın plazmide aktarılması)

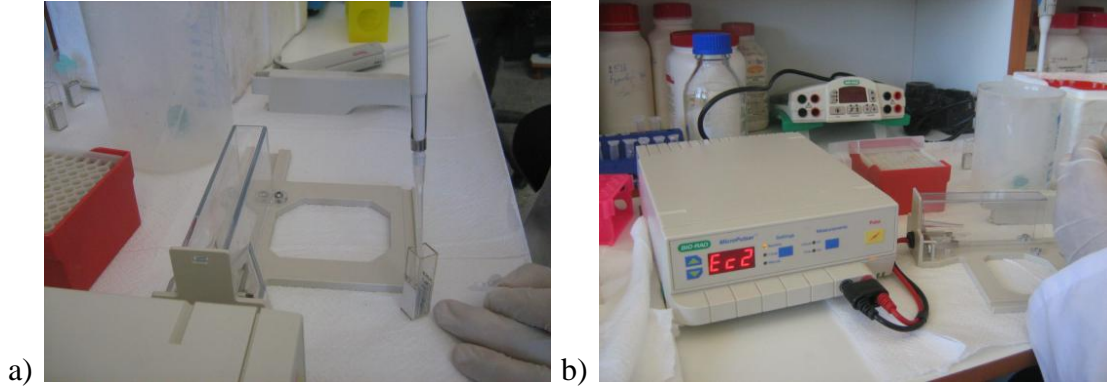
Önceki aşamada ticari bir kit ile saflaştırılan DNA fragmentleri (insert) DNA ligase enzimi kullanılarak plazmid DNA'sına aktarılmışlardır. Ligasyon işleminde ise Promegafirmasının pGEM T Easy vector sistemi kit kullanılmıştır. Kit bileşenleri(Çizelge 3.2.) firmanın bildirdiği şekilde oluşturulmuştur.

Çizelge 3.2. Ligasyon işleminde kullanılmış olan kit bileşenlerine ait bilgiler

Bileşen	Miktar
2x Rapid Ligation Buffer	5 µl
pGEM-T Easy vector	1 µl
Küt uçlu PCR ürünü	2 µl
T4 DNA ligase enzimi	1 µl
RNasedan ari su (son hacim)	10 µl

3.2.5.6. Rekombinant plazmidin bakteriye aktarılması (transformasyon)

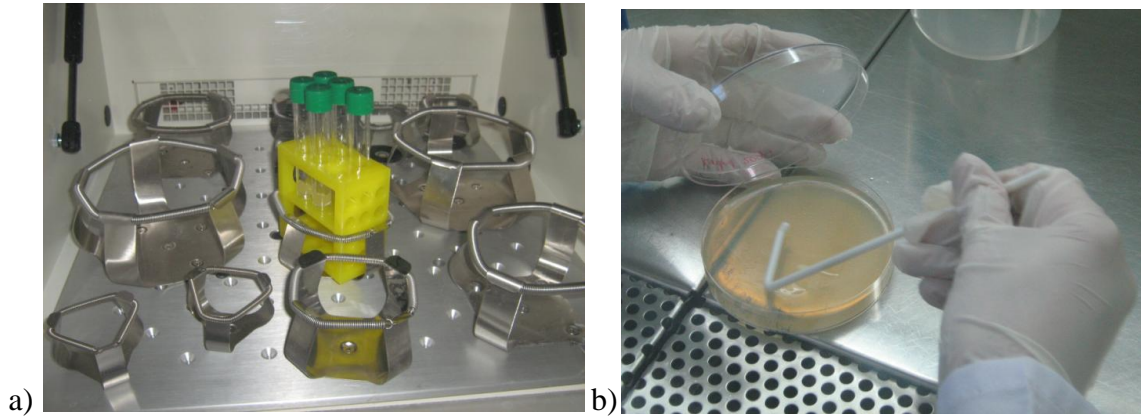
Ligasyon sonrası elde edilen rekombinant plazmidler kitle sağlanan bakteri hücrelerine (kompetan hücreler) elektroşok uygulaması ile transfer edilmiştir. Bu amaçla 3-4 µl rekombinant plazmit 100 µl bakteri (*Escherchia coli* JM 109 ırkı) süspansiyonuna eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra 5 dk buzda inkube edilmiştir. Elektrik akımı uygulaması Micropulser cihazı (BioRad) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 0.2'lik küvete yukarıdaki karışım eklendikten sonra Ec2 programı ile elektrik akımı uygulanmıştır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Rekombinant plazmidin elektroşok uygulaması ile bakteriye aktarılması;
a.Küvete transfer, b.Ec2 programı ile elektroşok uygulaması.

Şok evresi olarak nitelendirilen bu aşamadan sonra küvetteki bakteri süspansiyonuna hızla 900 µl SOC solüsyonu ilave edilerek bünyesine rekombinant plazmit alan ve elektrik akımına maruz kalan bakterilerin canlılığını devam ettirebilmek için karışım 37 °C de 1 saat inkübe edilmiştir (Şekil 3.3.a).

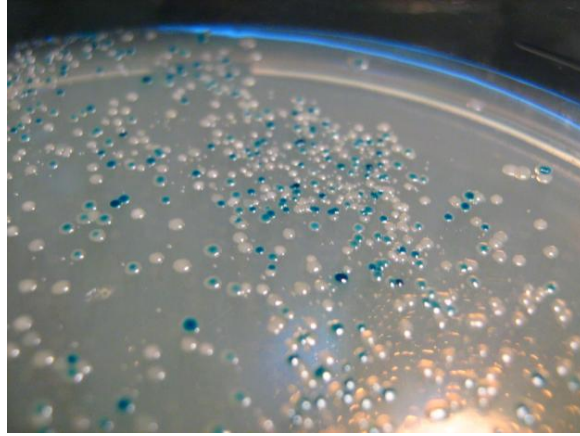
İnkübasyon devam ederken ampisilin içeren LB petrileri buzdolabından alınarak 1 saat 37 °C de inkube edilmiş ve petri yüzeyine 10 µl IPTG (1M) ile 30 µl X-Gal solüsyonu eklenerek petri yüzeylerine yayılmışlardır. İnkübe edilen bakteri süspansiyonundan 200 µl alınarak her bir numune için iki plate ekim yapılmıştır (Şekil 3.3.b) ve 37 °C'de bir gece ters çevirerek inkübe edilmiştir.



Şekil 3.3. Plazmid aktarılmış bakteri süspansiyonunun inkübe edilerek ekim yapılması;
a. Elektroşoktan sonra 37 °C de inkübasyon, b. IPTG ve X-Gal içeren petriye ekim.

3.2.5.7. Plazmid aktarılmış bakterilerden kültür oluşturma ve plazmid purifikasyonu

Transformasyonda kullanılan bakterilerin kromozomlarında ampisiline dayanıklılık geni bulunmamaktadır. Ampisiline dayanıklılık geni plazmid üzerinde bulunmaktadır. Bu nedenle transformasyon sonrası ampisilin içeren besi ortamına ekilen bakterilerden sadece bünyesine plazmid girenler canlılığını muhafaza edebilmektedir. Ampisilin içeren katı besi ortamında iki tip bakteri kolonisi gelişmektedir. Bu kolonilerden ilki bünyesine rekombinant plazmid alan diğeri ise sadece kendine sirküle olmuş plazmid alan bakteri kolonileridir. Bu kolonilerden ilki beyaz diğeri ise mavi koloni oluşturmuşlardır (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Transformasyon sonrası ampisilin içeren LB ortamında gelişen mavi ve beyaz koloniler. Sadece beyaz olanlarda rekombinant DNA bulunmaktadır.

Plazmid aktarılmış bakterilerden kültür oluşturma amacıyla 2 ml' lik steril eppendorf tüplerine 100 µl/ml ampisilin ile %0.8 glycerol içeren sıvı LB ortamı konulmuş ve sonra steril kürdan yardımı ile beyaz koloniler (Bkz. Şekil 3.4.) seçilerek eppendorf tüplerine ekim yapılmıştır. Bu çalışma kontaminasyonu önlemek bakımından steril kabinde gerçekleştirilmiştir. Ekimden sonra transforme olmuş bakteriler eppendorf tüpleri 37 °C'ye ayarlanmış sallayıcı platform üzerinde 1 gece inkübe edilerek çoğaltılmışlardır. Besi ortamındaki ampisilin bünyesinde plazmid olmayan bakterinin gelişmesine engel olmaktadır. Gelişen bakterilerden ticari bir kit yardımı ile (Fermantas GeneJET Plazmid Mini Prep Kiti) plazmid purifikasyonu firmanın bildirdiği şekilde gerçekleştirilmiş ve linearizasyonda kullanılmıştır.

3.2.5.8. DNA fragmentlerinin plazmide aktarılıp aktarılmadığının kontrol edilmesi

DNA fragmentinin plazmide aktarılıp aktarılmadığının kontrol edilmesi için purifiye edilen rekombinant plazmid ekstraktlarından bir kısım alınarak taşıdıkları fragmentleri ayıracak biçimde EcoRI enzimi ile enzimatik kesime maruz bırakılmışlardır. Kontrol amaçlı ise iki örneğe enzimatik kesim uygulanmamıştır. Ayrıca kontrol amaçlı olarak enzimatik kesim uygulanmayan su kullanılmıştır. DNA ürünleri %5'lik denatüre edici olmayan (non denaturing) poliakrilamid jel (PAGE)'de elektroforez yapılarak analiz edilmişlerdir. PAGE jeli Laemmli (1970)'ye göre (Çizelge 3.3.) verilen oranlar kullanılarak hazırlanmıştır.

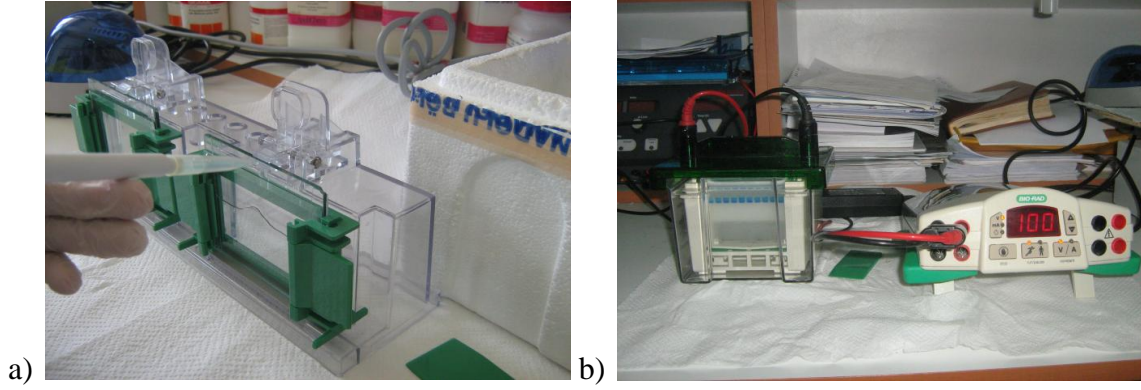
Çizelge 3.3.'teki miktarlardan oluşan karışım dikey elektroforez tankının iki cam levha arasına döküldükten sonra tarak dikkatlice yerleştirilmiş ve 30 dakika süre ile oda sıcaklığında polimerazyon için bekletilmiştir. Katılaştıran jelden tarak dikkatlice alındıktan sonra ilk çukura 2µl DNA markırı 3µl 6X yükleme tamponu ve 3µl RNase ari su ile köpürtülmeden karıştırılarak yerleştirilmiştir (Şekil 3.5.a.). PCR ürünü DNA ise 10µl hacimde alınarak 5µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jelin kalan çukurlarına yüklenmiştir. Dikey elektroforez tankı güç kaynağına bağlanarak 100 Voltta 60 dk süre ile elektroforez edilmiştir (Şekil 3.5.b.)

Çizelge 3.3. PAGE jeli bileşenlerine ait bilgiler. (Laemmli, 1970)

%1 Bis	3.9 ml
%30 Acrylamide	5 ml
1.5 M Tris, pH 6.7	3.75 ml
Destile su	10.5 ml
%10 Ammonium persulfate	150 µl
TEMED	5 µl

Elektroforez işlemi sonunda elde edilen jel uygun bir kap içerisinde 100 ml steril saf su ve 30µl EtBr (0.5 µg/ml) solüsyonunda 20 dakika süreyle sallayıcı platform üzerinde boyanmıştır. Jel ethidium bromide (EtBr) ile boyanarak DNA görünür hale getirilmiştir (Sambrook ve ark., 1998). Boyama sonrası jel, SYNGENE (Synoptipcs

Ltd., Cambridge, GB) marka jel görüntüleme ve analiz sistemine yerleştirilerek resmi görüntülenmiştir.



Şekil 3.5. a. Dikey elektroforez tankına yükleme, b. Elektroforez uygulaması.

3.2.6. Riboprob sentezi

Plazmitin DNA fragmenti taşıyıp taşımadığı kontrol edildikten sonra DNA fragmenti taşıyan numunelerden biri seçilerek riboprob sentezi aşamasına geçilmiştir. Riboprob sentezi için rekombinant plazmidin linearize edilmesi gerekmektedir. Üzerinde DNA fragmenti bulunan sirküler plazmitlerin linearize edilmesi amacı ile *SacII* enzimi ile kesim yapılmıştır. Üretilecek digoxigenin ile işaretli RNA problemlerinin patojenin genetik materyaline komplementer nitelikte olması son derece önem taşımaktadır. Hibridizasyon testinde patojenin genetik materyali ile problemlerin hibrit moleküller oluşturabilmesi için farklı yönde (polaritede) olmaları gerekmektedir. Şayet üretilen prob ve genom aynı yönlü olursa hibridizasyon testinde hibrit moleküller oluşmayacaktır. Bu bakımdan viral genomun komplementeri olabilmesi bakımından *SacII* enzimi ile kesim yapılmıştır. Enzimatik kesim Çizelge 3.4.'te belirtilen şekilde uygulanmıştır.

Kesim sonrası linearize edilen rekombinant plazmidlerin saflaştırılması için Zymo Clean DNA Concentration kiti ile firmanın bildirdiği şekilde uygulanarak enzim ve diğer komponentlerden arındırılmışlardır ve kullanılıncaya kadar -20°C 'de saklanmışlardır.

Uygun bir kesim enzimi ile linearize edilen plazmid+DNA Roche firmasından temin edilen Dig-Labeling kit kullanılarak digoxigenin ile işaretli riboprob sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla steril bir tüp içerisine 4 ul linearize purifiye plazmid, 2

μl dNTP karışım (10mM GTP, 10mM CTP 10mM ATP, 6.5mM UTP ve 3.5mM Dig-UTP) 1 μl SP6 RNA polimeraz enzimi ve 1 μl RNase inhibitör ilave edilerek 1 saat 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Riboprob sentezi çalışmasında kitle beraber verilen plazmid+DNA kontrolü de kullanılmıştır. Transkripsiyon sonrasında ApMV'ye karşı spesifik riboproblar elde edilmiştir.

Çizelge 3.4. *SacII* ile kesim bileşenlerine ait bilgiler

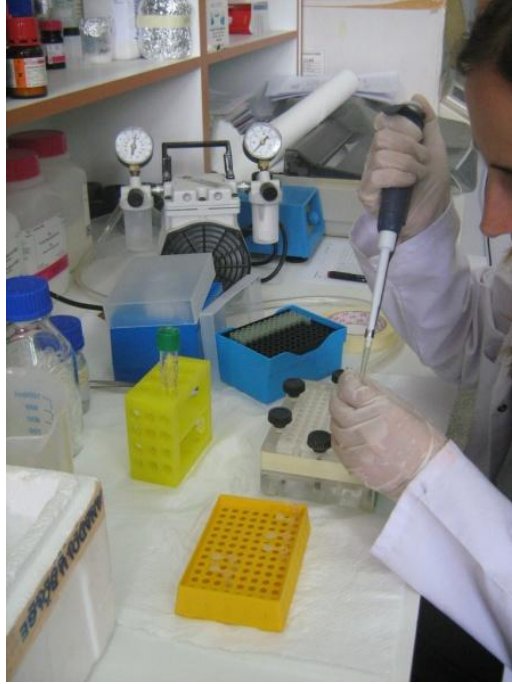
Bileşenler :	1 örnek için :
Steril su	15.3 μl
BSA	0.2 μl
10XBuffer	2 μl
Plazmit DNAsı	2 μl
<i>SacII</i> kesim enzimi	0.5 μl
Toplam hacim	20 μl

Kit ile sağlanan plazmid+DNA kontrolüne sentezlenen RNA probu hibridizasyon testlerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Hibridizasyon testlerinde bu pozitif kontrole ek olarak aynı zamanda ApMV içermeyen negatif kontrol de bulundurulmuştur.

3.2.7. Moleküler hibridizasyon yöntemi ile ApMV'nin hassas teşhisinin yapılması

Bitkisel materyallerdeki ApMV'nin saptanmasında uygulanan moleküler hibridizasyon testi Pallás ve ark., (1998)'na göre aşağıda anlatıldığı şekilde yürütülmüştür. Van ilinde yapılan surveylerde toplanmış elma bitkisi örneklerinin silica yöntemi ile ekstrakte edilen RNA'ları dot blot aparatı içerisine yerleştirilen pozitif yüklü naylon membrana 100mM NaOH ve 5mM EDTA'dan oluşan denatürasyon solüsyonu ile vakum altında işlenmişlerdir (Şekil 3.6.) Bir parça membran ile membran büyüklüğünde kesilen iki adet 3M Whatman kurutma kâğıdı permabiliteyi arttırmak için 2X kuvvetindeki SSC solüsyonuna (Ek 4) daldırılarak ıslatılmıştır. Hibridizasyon

aparata önce kurutma kâğıdı sonra membran yerleştirilmiş ve aparat sıkıca kapatılmıştır. Öte yandan yeni hazırlanmış steril eppendorf tüplerinde eşit miktarlarda denaturasyon solüsyonu ile ekstrakte edilen total RNA (her biri 40'ar μ l) konmuş 5 dk süre ile oda sıcaklığında denatüre edilmiştir. Örnekler aparattaki membrana denatürasyon solüsyasyonunda dahil olmak üzere 80 μ l olarak işlenmiştir. Örnekler membrana işlenirken eş zamanlı olarak örnek numaraları bilgisayar çıktısı bir çizelgeye kaydedilmiştir. Denaturasyonu durdurmak gerektiğinde tüp buza daldırılmıştır. Membran daha sonra 5 dk süre ile crosslinker cihazında UV'ye maruz bırakılmıştır. UV uygulaması ile nükleik asitlerin membrana tutunmaları sağlanmıştır Bu halde membran oda sıcaklığında testler gerçekleştirilinceye kadar muhafaza edilebilmiştir.



Şekil 3.6. Elmalardan ekstrakte edilen RNA'nın dot blot aparatı ile pozitif yüklü naylon membrana denatüre edilerek işlenmesi.

Bir parça membran ile membran büyüklüğünde kesilen iki adet 3M Whatman kurutma kâğıdı permabiliteyi arttırmak için 2X kuvvetindeki SSC solüsyonuna (Ek 4) daldırılarak ıslatılmıştır. Hibridizasyon aparatına önce kurutma kâğıdı sonra membran yerleştirilmiş ve aparat sıkıca kapatılmıştır. Öte yandan yeni hazırlanmış steril eppendorf tüplerinde eşit miktarlarda denaturasyon solüsyonu ile ekstrakte edilen total RNA (her biri 40'ar μ l) konmuş 5 dk süre ile oda sıcaklığında denatüre edilmiştir.

Örnekler aparatındaki membrana denatürasyon solüsyonunda dahil olmak üzere 80 μ l olarak işlenmiştir. Örnekler membrana işlenirken eş zamanlı olarak örnek numaraları bilgisayar çıktısı bir çizelgeye kaydedilmiştir. Denatürasyonu durdurmak gerektiğinde tüp buza daldırılmıştır. Membran daha sonra 5 dk süre ile crosslinker cihazında UV'ye maruz bırakılmıştır. UV uygulaması ile nükleik asitlerin membrana tutunmaları sağlanmıştır. Bu halde membran oda sıcaklığında testler gerçekleştirilinceye kadar muhafaza edilebilmiştir.

3.2.7.1. Ön hibridizasyon

Hibridizasyon fırını 56°C'ye ayarlanmıştır. Membran ve membrandan biraz daha büyük olan mesh hibridizasyon şişesine yerleştirmeden önce 2X SSC solüsyonu (Ek 1) ile ıslatılmıştır (Şekil 3.7.a.). Daha sonra membran mesh ile beraber rulo yapılarak (Şekil 3.7. b) hibridizasyon şişesi içerisine yerleştirilmiş (Şekil 3.7.c.) pre-hibridizasyon solüsyonu (Ek 4) ile (50 cm²'ye 5-10ml solüsyon gelecek şekilde) 56⁰C'de 1-2 saat süreyle hibridizasyon fırınında döner vaziyette yıkanarak ön hibridizasyon gerçekleştirilmiştir.

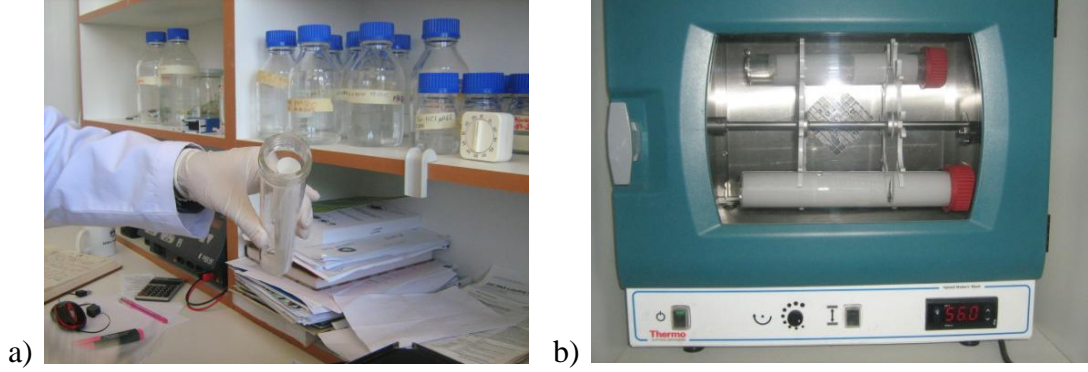


Şekil 3.7. a. Ön hibridizasyon için mesh'in 2X SSC solüsyonu ile ıslatılması, b. Membranla beraber rulo haline getirilmesi, c. Hibridizasyon şişesine yerleştirilmesi.

3.2.7.2. Hibridizasyon

Ön hibridizasyondan sonra; 5-10 μ l işaretli prob 500 μ l hibridizasyon solüsyonu ile karıştırılmış ve tüp içerisindeki karışım 2 dk süre ile 70°C'de denatüre edilerek şişe içerisindeki hibridizasyon solüsyonuna mikro pipetle eklenmiştir. Burada prob süspansiyonunu membrana püskürtülmeden direk hibridizasyon solüsyonuna

karıştırılmıştır. Ayrıca hibridizasyon şişesinde herhangi bir sızıntı olup olmadığı kontrol edilmiştir RNA probu uygulaması 56 °C'de bir gece hibridizasyon fırınında döner vaziyette gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.8.a., b.).



Şekil 3.8. RNA probu uygulaması sonrası 56 °C'de hibridizasyon fırınında inkübasyon uygulanması; a. Prob ilavesi, b. Hibridizasyon fırınında döner vaziyette inkübasyon.

3.2.7.3. Yıkama ve Rnase A ile muamele

Membran ertesi gün fazla RNA problemlerinin uzaklaştırması için oda sıcaklığında 2 kez 10'ar dk süre ile % 0.1 SDS içeren 2X SSC 50ml yıkama tamponu 1 (Washing solution 1) ile yıkanmış ve daha sonra 0.1X SSC ve 0.1 SDS içeren yıkama tamponu 2 (Washing solution 2) ile 68°C'de 15 dakika hibridizasyon fırınında yıkanmıştır. Bu yıkama öncesinde yıkamada kullanılan solüsyon benmaride 68 °C'ye ısıtılmıştır.

Membranlar daha sonra Rnase A (10µl Rnase A +100ml 2X SSC) enzimi ile 30 dk muamele edilmiştir. Bu uygulama ile tek iplikli bütün RNA'lar yok edilmiştir. Bu da membran üzerinde geriye sadece hibridize olmuş RNA'ların kalmasını sağlamıştır. Ortamdaki fazla RNase enzimini uzaklaştırmak amacıyla membran 2X SSC solüsyonu ile 5 dakika daha yıkanmıştır. RNase ile muamelede kullanılan yıkama kabını başka çalışmalar için kullanılmamıştır.

3.2.7.4. Bloklama ve anti-dig antikorlar ile reaksiyon

Membran steril bir kap içerisinde % 0,3 Tween-20 içeren 50 ml Tampon 1 (Buffer 1) ile 5 dk süre ile yıkanmıştır. Bu arada 100 ml Tampon 2 (Buffer 2) Ek4'te

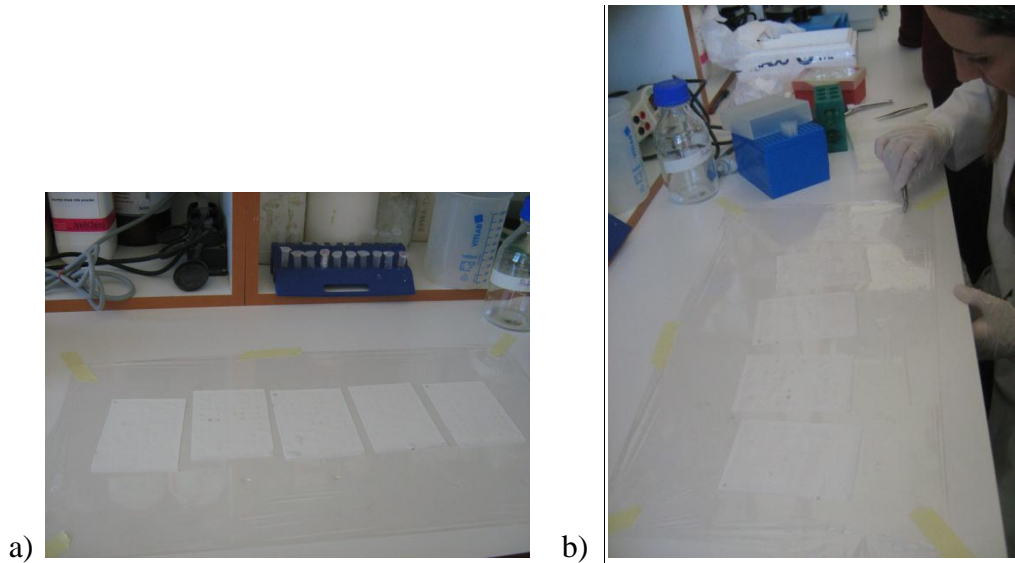
bildirilen bileşenler ile hazırlanmış ve 10ml'si bir sonraki aşamada kullanılmak üzere bir kenara ayrılmıştır.

Membran 90ml Tampon 2 ile 1 saat süresince oda sıcaklığında yıkanmıştır. Kitle (Roche) beraber sağlanan antikorlar 1:10000 oranında Tampon 2 içerisinde süspansiyon edilmiştir (1 mikrolitre antikor 10 ml tampon 2'ye eklenmiştir). Membran antikor ile yaklaşık 30dk, oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Bu işlem hibridizasyon şişesi içerisinde gerçekleştirilmiştir. Membran %0,3 Tween-20 içeren 50ml 1X kuvvetindeki Buffer 1 ile 15'şer dk süre ile 2 defa yıkanmıştır.

3.2.7.5. Kimyasal ışımaya (chemiluminescence) ve otoradyografi ile teşhis

Membran 1X kuvvetindeki Tampon-3 (Buffer-3: 10X: 1M Tris-HCl pH 9.5, 1M NaCl, 500 mM MgCl₂)'te 2dk bekletilmiştir. Her membran için 1ml Tampon-3'e ihtiyaç duyulmuştur.

10 µl CSPD (Roche)'yi 1ml Tampon 3'te süspansiyon edilmiştir. Laboratuvar tezgâhı üzerine plastik bir film köşelerinden yapıştırarak gerilmiştir (Şekil 3.9.a.). CSPD içeren 1ml Tampon 3 plastik film üzerine boşaltılarak steril bir pens yardımı ile membranın her iki yüzeyi bu solüsyon üzerinde ters düz edilerek muamele edilmiştir (Şekil 3.9.b.).



Şekil 3.9. CSPD uygulaması; a. plastik filmin köşelerinden yapıştırarak gerilmesi, b. CSPD içeren tamponun muamele edilmesi.

Membran birkaç dakikalık muameleden sonra plastik bir filme sarılarak (Şekil 3.10.) 37°C’de 15 dk inkübe edilmiştir. Karanlık bir odada membran ışık geçirmeyen bir klasör (exposure castette) içerisine yerleştirilmiş ve üzerine röntgen filmi konularak yaklaşık 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.



Şekil 3.10. CSPD ile muamele gören membranların plastik filme sarılması.

Süre bitiminde film karanlık odada çıkartılarak film ebadından daha büyük bir kaptaki geliştirme solüsyonu (developing solution)’nda 2-3dk bekletilmiştir. Film başka bir kaptaki musluk suyunda daldırıp çıkartıldıktan sonra sabitleme solüsyonu (fixing solution)’nda 2-3 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda film musluk suyunda yıkanarak aydınlık bir ortamda incelenmiştir.

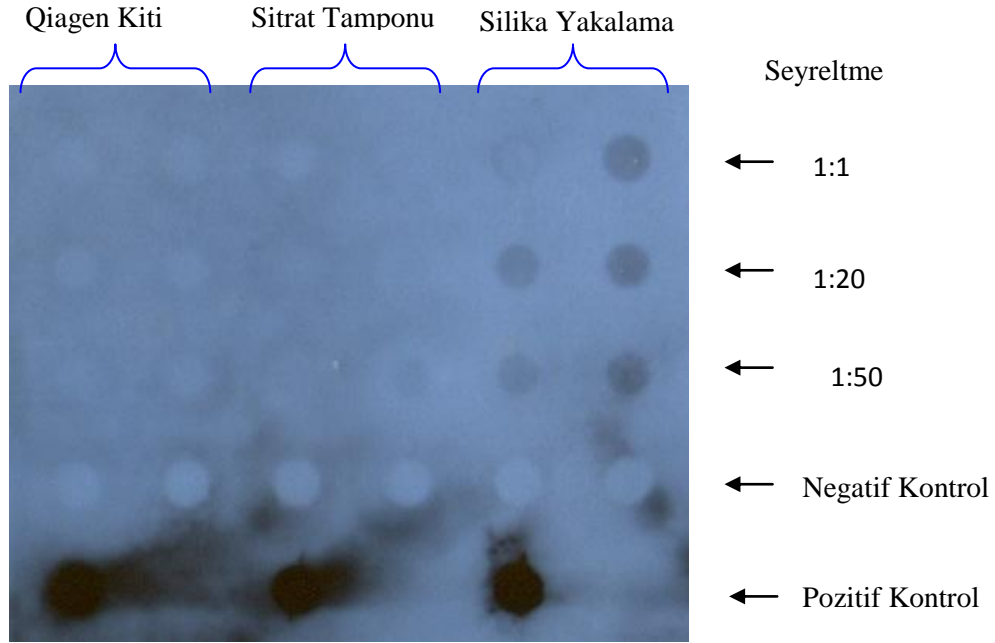
3.2.8. ApMV’ye ait kılıf protein geninin klonlanması ve dizilenmesi

ApMV-Malatya izolatlarına (Malatya 2 ve 6) ait kılıf protein geninin her iki ucuna dizayn edilen ve bünyelerinde *Hind*III ve *Pst*I kesim bölgelerini içeren spesifik primerler (ApMV-*Hind*III-F-5’-CAGTAAGCTTATCGTCTGCAAGTACTGCAAT-3’ ApMV-*Pst*I-R-5’- CAGTCTGCAGTCATAATTCTAACAAATC-3’) ile kılıf protein geninin tamamı RT-PCR ile çoğaltılmış ve pSPT18 vektöründe (Roche Inc.) Bölüm 3.2.5’te belirtilen şekilde klonlanmıştır. Elde edilen rekombinant plazmidlerin dizileme işlemi ise tek yönlü olarak İONTEK AŞ (İstanbul)’ye yaptırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. ApMV'ye Karşı En İyi Ekstraksiyon Yönteminin Belirlenmesi

ApMV'üne karşı en iyi RNA ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi için Silika Yöntemi, Sitrat Tamponu Yöntemi ve Qiagen Kiti yöntemi olmak üzere üç farklı ekstraksiyon yöntemi uygulanarak karşılaştırılmıştır (Şekil 4.1.). Bu amaçla Y.Y.Ü. Bitki Koruma Bölümü uygulama ve araştırma arazisindeki ApMV ile infekteli elma bitkisinden alınan yaprak örneklerine üç farklı ekstraksiyon yöntemi uygulanarak, hibridizasyon testine tabi tutulmuşlardır. Hibridizasyon testinde en başarılı sonuç ise Şekil 4.1.'de görüldüğü üzere silika yakalama yönteminde elde edilmiştir.



Şekil 4.1. Hibridizasyon testi ile Qiagen kiti, Sitrat tamponu ve Silika yöntemlerinin ApMV'yi teşhis etmedeki etkinliğinin araştırılması.

Saflaştırılan ApMV RNA'ları virüsü tespit etme hassasiyetini belirlemek için dot blot hibridizasyon testi için pozitif yüklü naylon membrana uygulanırken seyreltmeler (1:1, 1:20, 1:50) yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara doğrultusunda silika yakama yöntemi kullanılarak elde edilen RNA ekstraktlarındaki viral RNA'yı tespit etme hassasiyetinin 1:20 sulandırma oranına kadar daha etkin olduğu tespit edilmiştir. Testte

kullanılan proplar Şekil 4.1.'de görüldüğü üzere sağlıklı yaprak örnekleri ile herhangi bir reaksiyon göstermemiş sadece seyreltilmiş RNA örnekleri ile spesifik olarak hibridize olmuşlardır. Ticari bir RNA ekstraksiyon kiti (QIAGEN KİTİ) ve sitrat tamponu yöntemleri ile hiçbir hibridizasyon sinyali görülmemiştir. Bu sonuçlar ışığında survey çalışmaları doğrultusunda toplanan elma örneklerine uygulanan RNA ekstraksiyonunda silika yakalama yöntemi kullanılmıştır.

4.2. Moleküler Hibridizasyon Yöntemi ile ApMV'nin Surveyi

Survey çalışmalarında elma bahçeleri ve fidanlıklarda 11.000 den fazla elma ağacı bireysel olarak incelenmiş ve rastgele 481 örnek toplanmıştır. Van ilinde gözlem yapılan bahçelerdeki ağaçların, simptomatolojik olarak homojen ve sağlıklı olduğu gözlemlenmiş herhangi bir hastalık belirtisine rastlanılmamıştır. Ancak, Malatya ilindeki bir bahçede hastalık belirtilerine rastlanmıştır. Şiddetli etkilenen ağaçların yapraklarında mozaik belirtileri gözlemlenmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Malatya ilindeki bir bahçede ApMV'den şiddetli etkilenen ağaçların yapraklarında gözlemlenen mozaik belirtileri.

Bu çalışmada Van ve Malatya illerinde yetiştiriciliği yapılan elma ağaçlarında moleküler teşhis yöntemleri ile ApMV taraması yapılmıştır. Van İlinde 2010 yılında toplanan elma yaprak örneklerinde MH ve RT-PCR teknikleri uygulanmıştır. Çalışmada, Malatya ilinden 2011 yılında toplanan örnekler için ise sadece RT-PCR tekniği uygulanmıştır. Van ilindeki meyve bahçelerinden ve ticari alanlardan (Çizelge

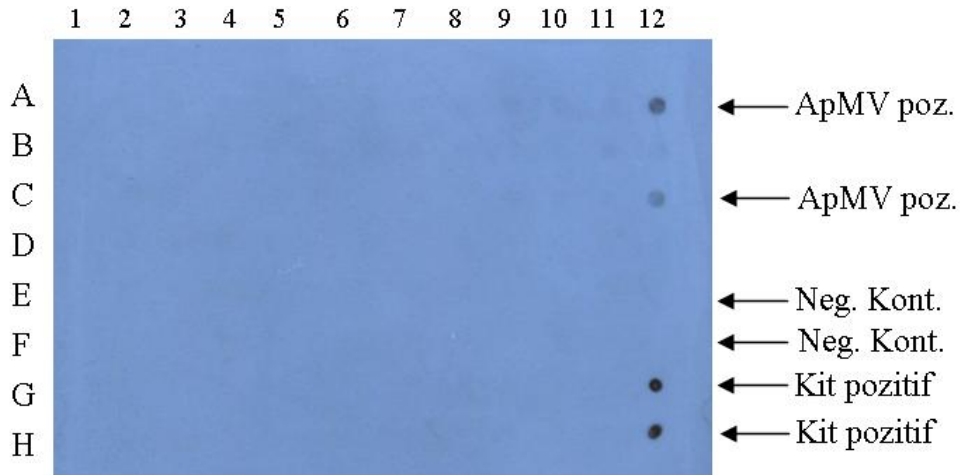
4.1.) toplam 440 elma yaprak örneği toplanılmış ve dot blot moleküler hibridizasyon yöntemiyle test edilmiştir.

Çizelge 4.1. Dot blot moleküler hibridizasyon ve RT-PCR testleriyle belirlenen, Van ve Malatya illerinde ApMV görülme sıklığı. MH ve/veya RT-PCR ile test edilen örnekler “+” simgesiyle gösterilmiştir.

Test edilen elma örnekleri					
İl	Bahçe Sayısı	Testlenen/Enfekteli	MH	RT-PCR	İnfeksiyon (%)
Malatya	5	41/4		+	9,7
Van	22	440/0	+	+*	0
Toplam	27	481/4			0,8

*= toplanan örneklerin 5%'ine RT-PCR testi yapılmıştır.

Genel olarak herhangi bir viral belirti göstermeyen elma yaprak örneklerinin hiçbirinden hibridizasyon sinyali elde edilmemiştir. Pozitif hibridizasyon sinyalleri sadece ApMV ile enfekteli pozitif kontrol bitki örneklerinden (Yüzüncü Yıl Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Arazisindeki elma bitkisinde devam ettirilen ApMV izolatu ile kitle sağlanan pozitif kontroller Şekil 4.3.) elde edilmiştir.



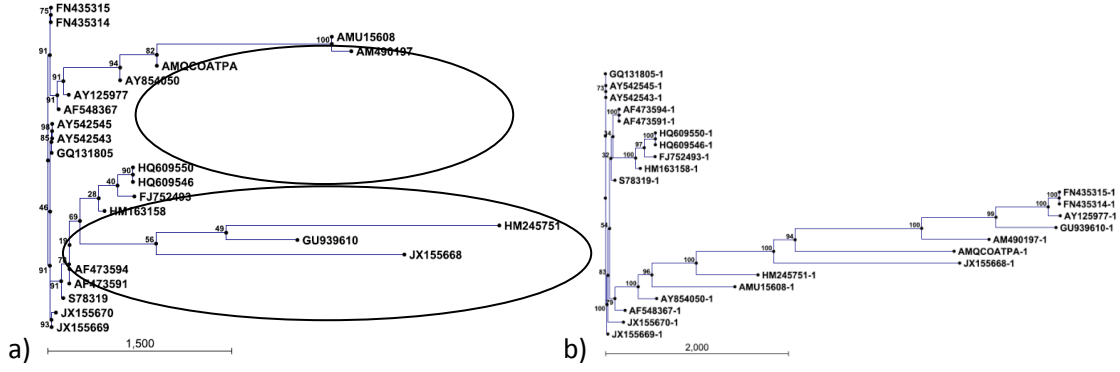
Şekil 4.3. Dot blot moleküler hibridizasyon testi ile testlenen elma numunelerinin hiçbirinde ApMV enfeksiyonuna rastlanmamıştır. A12 ve C12 ApMV pozitif kontrol, G12 ve H12 Kit pozitif kontrol, E12 ve F12 negatif kontrol.

4.3. ApMV İzolatlarının Moleküler Klonlaması, Dizilenmesi ve Filogenetik Analiz

Seçilen iki ApMV (ApMV-G ve ApMV-M) izolatına ait kılıf protein (CP) genlerinin tamamı uçtan uca gen spesifik dizayn edilen primerler yardımı ile pSPT18 vektöründe klonlanmış ve dizilemeleri gerçekleştirilmiştir. Her iki izolata ait CP geninin 672 bp uzunluğunda olduğu ve 224 amino asit rezidüsünü kodladığı tespit edilmiştir. CP geninin karşılaştırılmasını ve soy ağacı oluşturulmasını içeren filogenetik analiz Neighbour-Joining (Saitou ve Nei 1987) ve UPGMA yöntemleri ile elde edilmiştir. Gen Bankasında BLAST analizi ile yapılan karşılaştırmada en yüksek benzerliğin her iki Malatya izolatu (Gen Bankası erişim numarası: JX155668 ve JX155669) arasında olduğunu, bu da bu virüslerin her iki ağacı infekteleyen aynı izolat olabileceğini göstermiştir.

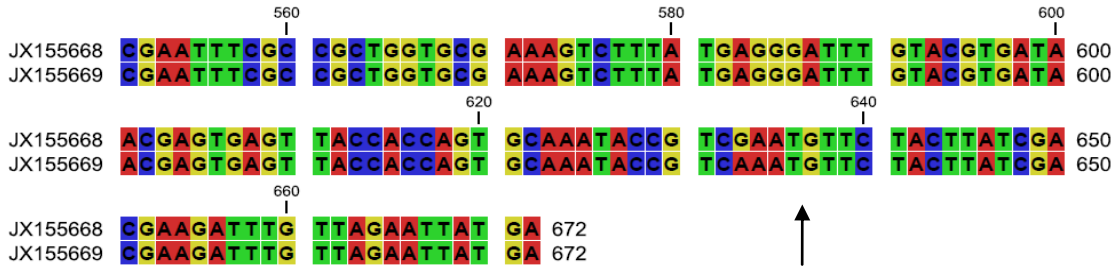
Genetik karşılaştırma Türk izolatının CP gen bölgesinin dünyaki farklı diğer ApMV izolatlarının gen dizileriyle yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Özellikle, ApMV-G ve M izolatu CP dokuz Hint izolatının ilgili ApMV geni % 96 oranında daha yüksek bir yüzde ile homoloji göstermiştir. İkili karşılaştırmalar da ise nükleotid dizileri % 99-88 arasında değişen benzerlik göstermiştir. ApMV Türk izolatlarının Dünya'daki diğer ApMV izolatları ile CP amino asit dizisi karşılaştırılmıştır. Amino asit dizileri karşılaştırılma sonucunda % 98-87 arasında değişen benzerlikler göstermiştir.

CP amino asit dizileri temel alınarak izolatların filogenetik ilişkileri arasında benzer bir diziliş gözlemlenmiştir. Filogenetik ağaç üzerindeki iki dalda nükleotid (Şekil 4.4.a.) ve amino asit (şekil 4.4.b) dizilerinin Neighbor joining yöntemine göre yapılan gruplandırmalar açıkça görülmüştür. İki ağacın topolojisi Şekil 4.4.a. ve b.'de görüldüğü gibi çok benzerdir.



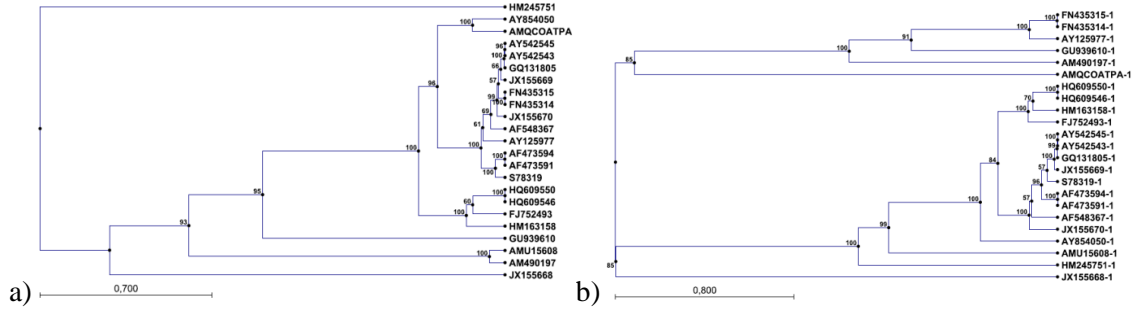
Şekil 4.4. Kılıf protein geni baz alınarak ApMV-G ve M isolatları ile coğrafik olarak farklı ApMV izolatlarının Neighbor-joining yöntemine göre oluşturulan dendogramları Karşılaştırmada kullanılan İzolatlar Çizelge 4.2’de verilmiştir. Dendogram 100 tekerrürlü olarak elde edilmiştir; a. nükleotit dendogramı b. amino asit dendogramı

Toplam 672 olan bp uzunluğundaki ApMV-G izolatı ile ApMV-M izolatlarının 633-634 nükleotidleri arasında Şekil 4.5.’te gösterildiği gibi ApMV-M izolatı Guanin yerine Adenin bazı bulunmakta ve bir nükleotidin farklılık gösterdiği saptanmıştır.



Şekil 4.5. ApMV-G (JX155668) ve ApMV-M (JX155669) izolatlarına ait CP gen bölgesinde nükleotid değişikliği içeren bölge. Şekildeki ok nükleotid değişikliğinin olduğu bölgeyi göstermektedir.

UPGMA metoduna göre 100 tekerrürlü olarak oluşturulan evrimsel filogenetik ağaçlar Şekil 4.6’da görülmektedir. Oluşturulan ağaçlarda Türk ApMV izolatları Almanya, Brezilya, Hindistan, Litvanya ve diğer Türk izolatları ile gruplanmışlardır. Buda izolatlar arasında coğrafik olarak bir ilişki olmadığını göstermektedir. Yapılan analizler 672 nükleotid uzunluğundaki her iki ApMV izolatının (ApMV-G ve M) yaklaşık sırasıyla 25.6 kDa ve 25.3 kDa büyüklüğündeki kılıf proteinlerini kodladığını ortaya koymuştur.



Şekil 4.6.a,b. UPGMA yöntemine göre Türk ApMV izolatlarının diğer ApMV izolatları ile evrimsel ilişkisini gösteren filogenetik ağaçlar. Dendogram 100 tekerrürlü oluşturulmuştur. Bu analizde kullanılan izolatlar Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Bu çalışmada incelenen ApMV virüs izolatu , ana türler, orijin ülkesi, ApMV-G ve M izolatlarının erişim numarası ve veri tabanında kullanılabilir gen dizileri.

Virus/izolat adı	Ülke	Gen Bankası erişim numarası	Yıl	İzolat Kaynağı (Bilimsel adı)	Uzunluğu bp
ApMV/Kashmir	Hindistan	FN435315	2011	<i>Malus domestica</i>	689
ApMV	Hindistan	FN435314	2011	<i>Malus domestica</i>	689
ApMV	ABD	U15608	1996	<i>Malus domestica</i>	2056
ApMV/KMi2	Çin	AM490197	2007	<i>Malus domestica</i>	2094
ApMV	ABD	L03726	1996	<i>Malus domestica</i>	944
ApMV	Kore	AY125977	2002	<i>Malus domestica</i> cv. Fuji	764
ApMV	Kore	AF548367	2002	<i>Malus domestica</i> cv. Fuji	694
ApMV	Çek Cumhuriyeti	AY542545	2005	<i>Pyrus communis</i>	672
ApMV	Çek Cumhuriyeti	AY542543	2005	<i>Pyrus communis</i>	672
ApMV/M003	Brezilya	GQ131805	2009	<i>Malus domestica</i> cv. Fuji	672
ApMV/LV-m101	Litvanya	HQ609550	2011	<i>Malus domestica</i>	397
ApMV/LV-m804	Litvanya	HQ609546	2011	<i>Malus domestica</i>	397
ApMV	Ukrayna	FJ752493	2009	<i>Malus domestica</i>	389
ApMV	Çin	HM163158	2010	<i>Malus domestica</i>	476
ApMV	Türkiye	HM245751	2010	Fındık (<i>Corylus avellana</i>)	803
ApMV	Türkiye	GU939610	2010	<i>Malus domestica</i>	221
ApMV-G	Türkiye	JX155668	2012	<i>Malus domestica</i>	672
ApMV-F	Türkiye	JX155670	2012	<i>Malus domestica</i>	674
ApMV-M	Türkiye	JX155669	2012	<i>Malus domestica</i>	672
ApMV	Almanya	S78319	1995	<i>Malus domestica</i>	657
ApMV	Avustralya	AF473594	2002	Şerbetçiotu (<i>Humulus lupulus</i>)	642
ApMV	Avustralya	AF473591	2002	Şerbetçiotu (<i>Humulus lupulus</i>)	642

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Birçok kültür bitkisi yetiştiriciliği için Türkiye oldukça uygun ekolojik koşullara sahip olup, diğer kültür bitkilerinin yanı sıra ticari olarak önemli ölçüde meyve üretimi yapılmaktadır. Ülkemizin farklı ekolojik koşullara sahip bölgelerinde çok sayıda meyvenin üretimi yapılmakta, hemen her bölgede elma yetiştiriciliği yapılmaktadır. Dünya’da 2.89 milyon ton üretim miktarı ile üçüncü sırada yer aldığımız (Anonim, 2012) ve ülkemizde oldukça geniş alanlarda yetiştiriciliği yapılan elma; gerek beslenme anlamında gerekse ticari olarak oldukça önemli bir üründür.

Bugüne kadar elma yetiştiriciliğinde çoğu latent olmak üzere 43 virüs ve virüs benzeri hastalık etmeni tespit edilmiştir (Birişik ve ark., 2009). Bitki virüs hastalıklarının uygun yöntemlerle teşhis edilmesi ve virüslerin tanımlanması mücadelede stratejilerinin doğru belirlenmesi, kayıpların en düşük seviyeye düşürebilmesi açısından oldukça büyük bir önem arz etmektedir. Bitki virüs hastalıklarının teşhisinde PCR, Elisa, Moleküler Hibridizasyon vb. gibi birçok test yöntemi kullanılmaktadır. Özellikle moleküler çalışmalarda hangi teşhis yöntemi kullanılırsa kullanılsın teşhisteki ilk önemli adım RNA ekstraksiyonudur. Ancak uygun ve doğru şekilde yapılmış bir RNA ekstraksiyonu ile başarılı sonuçlar alınması mümkün olacaktır.

Hastalıklı bitki örneklerinin viral RNA'larını çıkarmak için çeşitli RNA ekstraksiyon yöntemleri kullanılmaktadır. Ayrıca, kaliteli RNA ekstraksiyonu için son on yıl içinde çok sayıda ticari kit piyasada yer almıştır. Ancak bitki örneklerinde bu yöntemlerin ve kitlerin dot blot moleküler hibridizasyonu ile ApMV teşhisinde etkinliğinin değerlendirilmesi için hiçbir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada dot blot moleküler hibridizasyon yöntemi ile elma örneklerinde ApMV teşhisini optimize etmek için farklı RNA hazırlama yöntemleri (ticari kit dahil) karşılaştırılmıştır. Silika yakalama RNA ekstraksiyon yöntemi toplam RNA çıkarma ve dot blot hibridizasyon tarafından ApMV tespiti için en iyi sonucu göstermiştir. Yakın bir çalışmada, çeşitli patojenlerin RT-PCR (Sipahioglu ve ark., 2007) tarafından saptamasında RNA ekstraksiyonunda silika yakalama yöntemi ile toplam RNA içinde en yoğun verdiğini göstermiştir. Loconsole ark. (2009), narenciye psorosis virüs (CPSV) ve narenciye

renklilik virüs (CVV) saptanması için üç farklı RNA ekstraksiyon yöntemini narenciye örneklerinde karşılaştırmıştır. Her iki virüsün de saptanmasında en iyi hibridizasyon sinyallerini silika yakalama yöntemi ile elde etmişlerdir. Ergün ve ark. (2013), enginarda Artichoke latent virüs (ArLV)'ünün RT-PCR ile saptanmasında 4 farklı ekstraksiyon yöntemini karşılaştırmış en etkili toplam RNA sinyallerini silika yakalama yöntemi ve ticari kit ile elde etmişlerdir. Akbaş ve Değirmenci (2010), fındıkta ApMV'nin RT-PCR ile saptanması için 5 farklı ekstraksiyon yöntemini kullanmış, en elverişli sonucu silika yakalama yöntemi ile elde etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda silika yakalama yönteminin diğer RNA ekstraksiyon yöntemlerinden daha üstün sonuçlar vermesinin bundan sonra yapılacak olan araştırmalarda göz önünde bulundurulması gereken bir husus olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada Doğu Anadolu'da Van ve Malatya illerindeki elma bahçelerinde yapılan survey ile ApMV hastalık oranının tespiti için önemli ölçüde bir tablo ortaya konulmuştur. Van ilinde yürütülen oldukça geniş kapsamlı araştırmaya rağmen survey esnasında elma ağaçlarında herhangi bir hastalık belirtisi görülmemiş ve ApMV test örneklerinin hiçbirinde ApMV etmenine rastlanılmamıştır. Malatya ili ticari meyve bahçeleri ve fidanlıklarındaki elma örneklerinde ise hastalık belirtileri gözlemlenerek, düşük düzeyde (% 9) ApMV enfeksiyonu PCR ile tespit edilmiştir. Malatya ilinde elmada ApMV varlığı daha önce de (Elibüyük ve Erdiller, 1998) bildirilmiştir. Elma'da ApMV etmeninin Malatya ilinde görülüp Van ilinde tespit edilmemesinin nedeni bilinmemektedir. Türkiye'nin diğer bölgelerinde raporlanan elma enfeksiyonu karşılaştırıldığında, Karadeniz, Akdeniz ve Marmara Bölgeleri % 29 (Dursunoğlu ve Ertunç, 2008), Güney Doğu Marmara Bölgesi % 15 (Uzunogulları ve İlbağı, 2009), Doğu Akdeniz Bölgesinde yaklaşık % 10 (Çağlayan ve ark., 2006) ve İç Anadolu Bölgesi ise % 68 (Akbaş ve İlhan, 2005) olarak tespit edilmiştir. Van ilinde görülmemesi ticari elma yetiştiriciliği için bölgede çok büyük bir avantaj olup, sağlıklı çeşitler bu durumu muhtemelen diğer ülkelerden bulaşma materyallerinin ithalatının yapılmamasına borçludur. Ancak, Malatya ilinde ApMV enfeksiyon varlığı ve diğer illerden temin edilen sertifikasız fidanların kullanımı, Van ilinde yetiştirilen elmalar için potansiyel bir tehdit oluşturmaktadır.

Van Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü verilerine göre Van ili elma üretim miktarı 7.391 ton olup sınır ticareti kapsamında elma ithalatı da yapılmaktadır.

Van ili sınır ticareti kapsamında 2014 yılında İran'dan 51.261 kg elma ithalatı gerçekleşmiştir (T. Şahinbaş, 2014, sözlü görüşme). Bu durum ilimizde elmanın ticari olarak mevcut üretim miktarının üzerinde bir pazara sahip olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışma sonucunda elma yetiştiriciliğindeki ApMV infeksiyonlarının çok düşük oranda tespit edilmesi çok büyük avantaj olarak değerlendirilmektedir.

Çalışmada Malatya'dan toplanan elma örneklerinde PCR ile teşhis edilen iki Türk ApMV izolatının dünya çapındaki dağılımını saptamak amacıyla CP Bölgesi nükleotid dizisi tespit ve analiz edilmiştir. Bu virüs izolatının kılıf proteinlerinin filogenetik analizi ile doğal konakçı aralığına göre gruplanmış düşünmek mümkündür. Hem de daha önce bildirilen bu izolat ile % 88 homolog dizileridir. İki Türk ApMV izolatı (JX155668 ve JX155669) Hint izolatına daha benzerdir. İki Türk APMV izolatının tam CP dizilerinin dizi analizi, her iki virüs izolatının, yakından ortak bir kaynak göstererek, genomları içinde, birbirleriyle akraba olduğunu göstermiştir. İki izolat arasında sadece % 1 nükleotid sapma tespit edilmiştir.

Filogenetik ağaç oluşturmak için tam CP genom karşılaştırma yaklaşımı kullanılmıştır. Filogenetik analiz temelinde ApMV izolatlarının nükleotid ve amino asit dizisi iki ayrı grup oluşturma eğilimi göstermiştir. Her ne kadar bazı tutarsızlıklar görülebilse de, hem nükleotid hem de amino asit ağaç topolojisinde uyuma bulunmuştur. Bootstrap değerleri lehine bu güçlü bulgular vardır. Benzer bulgular Ertunç ve ark. (2011) tarafından da tespit edilmiştir. Filogenetik analize dayalı olarak Türkiye ve Ukrayna ApMV izolatları iki ana grupta (Türkiye ve Ukrayna) görülmektedir. Aynı şekilde, Almanya'da *Prunus mahaleb*' den izole edilen ApMV kılıf proteininin amino asit dizisi ABD elma izolatlarından farklı bulunmuştur (Alrefai ve ark, 1994; Shiel ve ark., 1995). Lakshmi ve ark. (2011), yaptıkları bir çalışmada CP baz uzunluğu 223 amino asit olan ApMV Hint elma izolatının filogenetik analiz ile Çek Cumhuriyeti armut izolatına % 98 oranında, Kore ApMV izolatı (elma) ve diğer konukçu izolatlarına ise % 95 oranında benzerlik göstermiştir. Aynı şekilde Feretti ve ark. (2010), yaptıkları bir araştırmada filogenetik analiz ile ApMV Hint elma izolatının Kore izolatı ile en yüksek oranda (% 92-99) homoloji gösterdiğini diğer konakçı izolatları ile karşılaştırıldığında ise Çek armut izolatına % 92-98 bir benzerlik gösterdiğini saptamışlardır. Yapılan çalışma sonucunda yerli ApMV izolatlarının

stabilite gösterdiği ve dünyadaki diğer izolatlara yüksek düzeyde benzerlik gösterdiği ortaya konulmuştur.

Bu çalışma, Türkiye'de ılıman iklim meyveciliğinde gelecekteki ApMV araştırmaları için bir temel sağlamıştır. Sonuçlar ile Van ilinde elma yetiştiriciliğinde ApMV enfeksiyonlarının olmadığı açıkça ortaya konmuştur. Bu nedenle, Van ve komşu illerde iç karantinaya dahil hastalık ve zararlılar listesinde (Anonim 2007) yer alan ApMV'nin girişini önlemek için çaba gösterilmelidir. Malatya ilinde ApMV bulaşan alanlarda görülme oranını kontrol altında tutmak ve diğer şehirlere yayılmasını önlemek amacıyla iyi bir iç karantina yönetimi uygulanması gerekmektedir. Bulaşmaların engellenmesi için virüsten ari ve sertifikalı üretim materyallerinin kullanılması önerilmektedir. Ayrıca bundan sonra yapılacak olan araştırmalarda ApMV'nin moleküler hibridizasyon yöntemi ile teşhisinde silika yakalama yönteminin RNA ekstraksiyonunda tercih edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akbaş, B., Değirmenci, K., 2010. Simultaneous detection of Apple mosaic virus in cultivated hazelnuts by one-tube RT-PCR, *African Journal of Biotechnology* **Vol. 9(12)**; 1753-1757.
- Akbaş, B., İlhan, D., 2005. Widespread distribution of Apple mosaic virus on apple in Turkey. *Plant Disease* 89 (9): 1010.
- Alrefai, R.H., Shiel, P.J., Domier, L.L., D'Arcy, C.J., Berger, P.H., Korban, S.S., 1994. The nucleotide sequence of apple mosaic virus coat protein gene has no similarity with other Bromoviridae coat protein genes, *Journal of General Virology*, 75: 2847–2850.
- Anonim, 2001. Apple mosaic virus (ApMV), http://www.boku.ac.at/iam/pbiotech/phytopath/v_apmv.html Plant Pathology Web Pages. Erişim Tarihi: 24.02.2009.
- Anonim, 2003. Plant viruses online. Descriptions and lists from the VIDE database. Apple Mosaic Ilarvirus. <http://image.fs.uidaho.edu/vidе/descr024.htm>, Erişim Tarihi : 20.02.2009.
- Anonim, 2007. **İç Karantinaya Tabi Bitki Hastalık ve Zararlıları Hakkında Teblięde Değişiklik Yapılmasına Dair Teblię**, Teblię No: **2007/11**, Yayımlandığı Resmi Gazete: 01.03.2007-26449.
- Anonim, 2009. Van Tarım İl Müdürlüğü, <http://www.vantarim.gov.tr/sayfa.php?p=68>, Erişim Tarihi: 24.02.2009.
- Anonim, 2012. Meyve ürünleri üretim miktarları, <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>, FAO, Erişim Tarihi: 15.01.2015.
- Baumann, G., 1972. Wichtige Viruskrankheiten des Kern-und Steinobstes. *Erkennung und Verhütung Erwebsobstbau. 14*; 175-198.
- Birişik, N., Yılmaz, M.A., Baloęlu, S., 2009. Elma yetiştiriciliğinde zararlı olan virüs ve virüs benzeri (Aşıyla Taşınan) hastalıklar ve mücadelesi *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi* 2 (1):25-33, 2009 ISSN: 1308-3945.

- Bradford, F.C., Joly, L., 1933. Infectious variegation in the apple. *Journal of Agricultural Research* **46**:901-908.
- Buzkan, N., Öztekin, V., Demir, M., Onur, D., Ilgın, M., 2006. SEKAMER kayısı koleksiyon parselindeki ağaçlarda virüs hastalıklarının saptanması ve çözüm yolları, *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, **9**(2); 121-124.
- Choi, H. S., Ryu, H. K., 2003. Rapid Screening of *Apple Mosaic Virus* in cultivated apples by RT-PCR. *Plant Pathol. Journal* **19**(3) : 159-161.
- Çağlayan, K., Serçe-Ulubaş, Ç., Gazel, M., Jelkman, W., 2006. Detection of four apple viruses by ELISA and RT-PCR assays in Turkey, *Turk Journal Agric For* **30**: 241-246.
- Çağlayan-Yıldızgördü, K., Çalı, S., 1994. Occurrence and detection of virus and virus-like diseases of plum and apricot trees in the East Mediterranean area. **9th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union** (18-24 September), Kuşadası-Aydın, Türkiye; 551-553.
- Desvignes, J.C., 1999. *Virus Diseases of Fruit Trees*. Ctifl, Paris; 86-122.
- Dursunoglu, .S., Ertunc, F., 2008. Distribution of *Apple Mosaic İlarvirus* (APMV) in Turkey. *Acta Hort. (ISHS)* 781:131-134.
- Elibüyük, O., Erdiller, G., 1998. Malatya ilinde sert çekirdeklielerde görülen virus hastalıklarının tanısı üzerinde yapılan çalışmalar. **VIII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, Bildiriler**, Ankara, 89-94.
- Ergün, M., Paylan, İ.C., Erkan, S., 2013. Enginarıda Atichoke Latent Virüs (ArLV)'ün moleküler tanısında kullanılan RNA ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması, *Ege Üniv. Zir. Fak. Dergisi*, **2013**, 50 (3):291-297.
- Ertunç, F., Canik, D., Gospodaryk, A., Budzanivska, I.G., Polischuk, V.P., 2011. Elma Mozaik İlarvirusu Türkiye ve Ukrayna İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu, *Ankara Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 17:95-104.
- Ferretti, L., Hallan, V., Rana, T., Ram, R., Dhir, S., Negi, A., Lakshmi, V., Thockchom, T., Zaidi, A. A., Barba, M., 2010. Nucleotide analysis of pome fruit virus isolates detected in apple and pear samples from Italy and India, 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, *Julius-Kühn-Archiv*, 427.

- Foissac, X., Savalle-Dumas, L., Gentit, P., Dulucq, M.J., Candresse, T., 2001. Polyvale detection of Fruit tree Tricho, Capillo and Faveaviruses by Nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulturae*, 357:52-59.
- Garger, S. J., Turpen, T., Carrington, J.C., Morris, T. J., Dodds, J.A., Jordan, R.L., Grill., L.K. 1983. Rapid detection of plant RNA viruses by dot blot hybridization. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1: 21-25.
- Howell, W. E., Parish, C. L., Mink, G. I., 1991. In: Jones, A. L., Aldwinckle, H. S., (Eds.). Compendium of apple and pear diseases. *The American Phytopathological Society*, St. Paul, MN, p. 77.
- Kutluk-Yılmaz, N.D., Yanar, Y., Kadioğlu, İ., Yanar, D., 2005. Tokat İli elma bahçelerinde *Apple Mosaic Virus* (ApMV)'ün yayılış durumunun belirlenmesi *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20(3):12-15.
- Laemmli, U.K., 1970. Clavage of structural proteins during the assemble of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lakshmi, V., Hallan, V., Ram, R., Ahmed, N., A, A, Zaidi., A, Varma., 2011. Diversity of Apple Mosaic Virus isolates in India based on coat protein and movement protein genes, *Indian Journal Virology* 2011 Jun 22;22(1):44-9.
- Loconsole, G., Fatone, M.T., Savino, V., 2009. Specific digoxigenin-labelled riboprobes for detection of *Citrus Psorosis Virus* and *Citrus Variegation Virus* by molecular hybridization, *Journal of Plant Pathology*, 91 (2), 311-319.
- Maule, A.J., Hull, R., Donson, J. 1983. The application of spot hybridization to the detection of DNA and RNA viruses in plant tissues. *Journal of Virological Methods*, 6: 215-224.
- Meijneke, R. A. C., Posnette, A. F., Schuch, K., 1963. The Economic Importance of Virus *Diseases of Apples and Pears. Virüs Diseases of apples and pears, 1-4*, Edit. A. F. Posnette. Commonwealth Agricultural Bureaux Farnham Royal Bucks, England.
- Mink, G.I., 1989. Apple chlorotic leaf spot. In: Virus and Viruslike Diseases of Pome Fruits and Simulating Noninfectious Disorders. (Ed. P.R. Fridlund), *Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics Washington State University*. Pullman, W.A., pp. 34-39.

- Owens, R.A., Diener, T.O. 1981. Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. *Science*, **213**: 670-672.
- Pallas, V., Sanchez-Navarro, J. A., Mas P., Cañizares M. C., Aparicio F., Marcos J., F., 1998. Molecular diagnostic techniques and their potential role in stone fruit certification schemes In Di Terlizzi B. (ed.), Myrta A. (ed.), Savino V. *Stone fruit viruses and certification in the Mediterranean countries: problems and prospects* Bari : CIHEAM-IAMB, 232 p. (Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches ; n. 19).
- Pallas, V., Torres A., Myrta A., Gomez G., 2003. *Validation of the 'tissue printing' technique for detecting stone fruit viroids*. In Myrta A, Di Terlizzi B, Savino V ed. Virus and virus-like diseases of stone fruits with particular reference to the Mediterranean region. Bari, CI HEA M-IA MB. Pp. **11** 3–11 7: 44 ref. Summaries. (**Options Méditerranéennes**: Série B. Etudes et Recherches; n. 45.).
- Petrzik, K., 2005. Capsid protein sequence gene analysis of Apple mosaic virus infecting pears. *European Journal of Plant Pathology* **111**:355–360.
- Petrzik, K., Lenz, O., 2002. Remarkable variability of apple mosaic virus capsid protein gene after nucleotide position 141. *Archives of Virology* **147**: 1275-1285.
- Polak, Z., Zieglerova, J., 1997. Spontaneous occurrence of apple mosaic virus in some forest and ornamental woody species. In: Proc., *XIVth Slovak and Czech Plant Protection Conference*, Nitra 1997, 87-88.
- Sambrook, J., Fritsch E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: *A laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York.
- Shiel, P.J., Alrefai, R.H., Domier, L.L., Korban, S.S., Berger, P.H., 1995. The complete nucleotide sequence of apple mosaic virus RNA-3, *Archives Of Virology*, **140**: 1247–1256.
- Sipahioğlu, H. M., Demir, S., Polat, B., Usta, M., Akköprü, A., 2004. Van ve civarında yetiştiriciliği yapılan sert çekirdekli meyve ağaçlarında tespit edilen viral ve fungal hastalık etmenleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi* , 2004, 14(2): 133-139.

- Sipahioğlu, H.M., Ocak, M., Usta, M., 2007. Comparison of three conventional extraction methods for the detection of plant virus/viroid RNAs from heat dried high-phenolic host leaves: *Asian Journal of Plant Sciences*, **6 (1)**: 102-107.
- Şahinbaş, T., 2014. Sözlü görüşme, görüşme tarihi: 30.12.2014. Adres; Van Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü.
- Yılmaz, M. A., Balođlu, S., Özaslan, M., 1995. Bitki Virüs Hastalıkları. *Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Ders Kitabı* No: 128, 200s., Adana.
- Zeki, C., (1991). *Elma Bahçelerinde Entegre Mücadele Teknik Talimatı*. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Ankara, **81s.**
- Uzunoğulları, N., İlbağı, H., 2009. Güneydođu Marmara Bölgesi'nde yumuşak çekirdekli meyvelerde Apple Mosaic İlarvirus (ApMV)'un saptanması *Bahçe*, **38 (2)** : 9-14.

EKLER

Ek 1. Total RNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

1.1. Grinding buffer (ekstraksiyon tampon çözeltisi)

50 ml hacimde hazırlanacak olan çözelti için aşağıda miktarları verilen kimyasallar steril su içerisinde çözdürülür ve kullanım süresince 4 °C'de saklanır.

- Guanidine Thiocyanate 4M 23.64gr/50ml
- NaOAc (pH 5.2) 0.2M 1.36 gr/50 ml
- EDTA 25mM 0.465 gr/50 ml
- KOAc 1.0 M 4.9 gr/ 50 ml
- PVP-40 %2.5 wt/vol 1.25 gr/50ml
- %1 2-ME (Mercaptoethanol)*

*= Mercapto ethanol ekstraksiyon esnasında eklenmelidir.

1.2. NaI (sodyum iyodid) solüsyonu

40 ml steril saf su içerisinde aşağıda belirtilen miktardaki kimyasallar çözdürülerek saf su ile 50 ml'ye tamamlanır. Otoklav ile steril edilir. Çalışma süresince 4 °C'de saklanır.

- Na₂SO₃ 0.75 gr
- NaI (Sigma S8379) 36 gr

1.3. Washing buffer (yıkama tampon çözeltisi)

Aşağıda belirtilen bileşimler eklendikten (EtOH dışındakiler) sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlanır. Daha sonra % 50 oranında Ethanol içerecek şekilde yani 100 ml saf ethanol eklenerek 200 ml'ye tamamlanır. Ethanol eklemeyen önce otoklav ile sterilize edilir ve 4 °C'de saklanır.

- Tris-HCl, pH 7.5(1M) 10.0 mM
- EDTA (5M) 0.5 mM
- NaCl (0.5 M) 50.0 mM
- EtOH % 50

1.4. Silika süspansiyonunun hazırlanması (pH: 2.0)

Bir mezür kabındaki 500 ml saf su içersine 60 gr silika (Sigma % 12 S5631) konularak ve karıştırılır 24 saat beklenir. 470 ml üst sıvı atılır (üst sıvının % 90'ı) ve 500 ml'ye tamamlanır iyice karıştırılır. 5 saat bekletilir ve 440 ml üst sıvı (üst sıvının % 85'i) atılarak geriye kalan 60 ml bulamaç HCl ile pH'ı 2.0 ayarlanır. Otoklav edilir ve ışıktan etkilenmemesi için alimünyum folyo ile sarılarak oda sıcaklığında saklanır.

Ek2. Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1. 50X TAE koşum tamponu stok solüsyon

Aşağıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre suda çözdürüldükten sonra otoklavda steril edilerek oda sıcaklığında saklanır.

- Tris-bace ($C_4H_{11}NO_3$) pH 8.0 242 gr
- Glacial Acetic acid (CH_3COOH) 57.1 gr
- 0.5 M EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) 100 ml

2.2. 1X TAE koşum tamponunun hazırlanması

50X TAE stok solüsyondan 10 ml alınarak steril saf su ile 500 ml'ye tamamlanarak kullanılır.

Ek 3. Klonlama Çalışmasında Kullanılan Besi Ortamlarının ve Kompetan Bakteri Hücrelerinin Hazırlanması

3.1. Sıvı LB ortamı toplam 1 litre (competent hücreler için)

4x250 ml erlenler icinde NaCl icermeyen ortam hazırlanır. Elektroporasyon işleminde ortamda tuz olacağından buraya eklenmiyor. Eklenirse elektroporation da tuz iyonu konsantrasyonu fazlalaşacağından kıvılcım oluşabilir ve buda bakteriler açısından sakıncalıdır.

- 10 g Bacto tryptone (Fisher BioReagents BP1421 500g)
- 5 g Bacto yeast

3.2. Katı LB ortamı 1 litre

- 10 g Bacto tryptone
- 5 g Bacto yeast extract
- 5 g NaCl

3.3. Kompetan bakteri hücrelerinin hazırlanması.

a) -80 °C'deki *Escherichia coli* bakterisinin JM109 ırkı Laura Bertani (LB) ortamına ekilir. Bakteri 37 °C' de bir gece inkübe edildikten sonra gelişen kolonilerden steril kürdan yardımı ile tek koloni seçilerek ve 10 ml sıvı LB besisi ortamına ekim yapılır.

b) Bakteriyi 10 ml' lik sıvı LB ortamında bir gece 250 rpm' de 37 °C'de çoğaltılır.

c) Elde edilen saf klon bakteri ertesi gün 1 litre sıvı LB ortamına ekilir ve 250 rpm' de 37 °C' de çoğalmaya bırakılır. Optik bakteri yoğunluğu (OD) 0.6–0.9 aralığında oluncaya kadar (spektrofotometrede düzenli ölçümler yapılarak) bakteri çoğaltımına devam edilir.

d) Bu aralığa ulaştığında bakteriyi 30dk süre ile buza daldırarak üreme durdurulur.

e) Bakteri süspansiyonu falkon tüplerde dengelendikten sonra 6.000 rpm de 15 dk santrifüj edilir. Supernatantı atılarak ve pelleti buzda bekletilen steril soğuk su ile yeniden süspanse edilir.

f) Tüpler 6.000 rpm' de 15 dk santrifüj edilir. Çökeltiyi 5–10 ml soğuk su ile resuspanse edilir. Tüpleri dengeleyerek 6.000 rpm' de tekrar santrifuj edilir. Santrifüj sonrası üst sıvı atılır.

g) Tüplere 20 ml %10 lük soğuk glycerol ile resuspanse edildikten sonra 6.000 rpm' de 15 dk santrifüj edilerek üst sıvı atılır. Pellet halindeki bakteri yaklaşık 2-3 ml %10'luk glycerol ile sulandırılır. Elde edilen süspansiyon 100'er mikrolitrelik sıvılar halinde 0.5ml'lik tüplere taksim edilerek -80 °C 'de saklanır.

Ek 4. Dot Blot Hibridizasyon Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

4.1. Denaturasyon solüsyonu

EDTA (0.5 M)	5 mM	10 µl / 1 ml
NaOH (2 M)	100 mM	50 µl / 1 ml
Distilled sterile water		940 µl / 1 ml

4.2. SSC 20X

NaCl	3M	175.32 g / 1 l
Na-Citrate pH7.0	0.3M	88.23 g / 1 l

Otoklav edilir.

4.3. Bloklama stok solüsyonu

%10 Blocking reagent (w/v) Buffer 1 içinde çözündürülür, otoklav edilir ve 4°C'de saklanır. 400ml hazırlamak için 40 gr Bloklama reagent buffer1 içerisinde çözündürülür.

4.4. %10 SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)

50g SDS'in üzeri 500 ml steril suyla tamamlanır.

4.5. Ön hibridizasyon tamponu (prehybridization solution) (taze hazırlanır)

Formamide (son konsantrasyon %50)	10 ml / 20 ml
SSC(20X)	6 ml / 20 ml
Blocking solution	4 ml / 20 ml
NaLS 10%	200 µl / 20 ml
SDS 10%	40 µl / 20 ml

4.6. Yıkama tamponu 1 (washing buffer 1) (taze hazırlanır)

SSC 20X	100 ml / 1 l
SDS 10%	10 ml / 1 l
Distilled Sterile water	890 ml / 1 l

4.7. Yıkama tamponu 2 (washing buffer 2)

SSC 20X		5 ml / 1 l
SDS 10%		10 ml / 1 l
Distilled Sterile water		985 ml / 1 l

4.8. Kimyasal ışımda kullanılan tamponlar**4.8.1. Tampon 1 10X (Buffer 1 10X) (pH: 7.5)**

Maleic acid	1 M	58 g / 500 ml
NaCl	1,5 M	43.85 g / 500 ml

pH NaOH pelletleri ile ayarlanır ve otoklav edilir. pH 7.0'den küçük ise maleic asit çözünmez.

4.8.2. Tampon 2 (Buffer 2) (Blocking buffer)

Buffer 1 10X		25 ml / 250 ml
Steril su		200 ml / 250 ml
Blocking stock solution	1%	25 ml / 250 ml

4.8.3. Tampon 3 (Buffer 3)

Tris-HCl (pH 9.5)	100 mM	7.88 gr/500ml
NaCl	100 mM	2.92gr/500ml
MgCl ₂	50 mM	0,476/500ml

Tris-HCl nin pH'sı 9.5 e ayarlanır daha sonra NaCl ve MgCl₂ ilave edilir, steril su ile 500 ml ye tamamlanır, otoklav edilerek kullanılır.

4.8.4. Yıkama tamponu (washing buffer)

Buffer 1 10X		50 ml / 500ml
Steril destile su		450 ml / 500ml
Tween-20	0.3%	1.5 ml /500ml

4.8.5. Substrat

CDPD star 1:100 oranında Tampon 3 (buffer 3) içerisinde sulandırılır (10 µl substrat 1 ml buffer3'e karıştırılır).

ÖZ GEÇMİŞ

Van ilinde 1980 yılında dünyaya geldi. İlköğrenimini Van'da 1986-1994 yıllarında tamamladı. Orta öğrenimini ise *Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Siirt Ev Ekonomisi Meslek Lisesinde* 1998 yılında tamamlayarak *Ev Ekonomisi Teknisyeni* unvanı aldı. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Eskişehir İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğüne 2000 yılında açıktan atanarak Teknisyen olarak göreve başladı. 2003 yılında kendi isteği ile Van İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğüne naklen ataması yapılarak görevine burada devam etti. 2002-2004 yılları arasında *Anadolu Üniversitesi Tarım Ön Lisans Programını* tamamlayarak *Tarım Teknikeri* unvanı aldı. 2004-2008 yılları arasında *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü*'nden mezun olarak *Ziraat Mühendisi* unvanı aldı. Çalışma hayatının Laboratuvarlarda geçen ilk 10 yılında; *Gıda ve Yem Analizleri* konusunda görev yaptıktan sonra 2010 yılında kendi isteği ile Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Van İl Müdürlüğü'ne naklen atanarak Gıda ve Yem Şubesi'nde *Mühendis (Gıda Denetçisi)* olarak göreve başladı. TMMOB Van Ziraat Mühendisleri Odası'nda Yönetim Kurulu Üye'si olarak 1 yıl süreyle (2010-2011) görev yaptı. *Gıda Denetçisi* olarak çalıştığı Gıda ve Yem Şubesi'nde Aralık 2014'den itibaren Şube Müdürü (vekaleten) olarak görev yapmaktadır.