

1. GİRİŞ

Cevizin anavatanı olan Türkiye, dünyanın en eski ceviz yetiştiren köklü meyvecilik kültürüne sahip ülkeler arasındadır. Dünyada şimdiye kadar *Juglandaceae* familyası *Juglans* cinsi içerisinde yer alan 21 ceviz türü bilinmektedir. Dünyanın pek çok bölgesine yayılmış olan bu türler arasında en yüksek ticari değere sahip olan ve popüler çeşitleri içeren tür *Juglans regia* L.'dir. Ülkemizde yetiştirilen cevizler bu türe dahildir. Son yıllara kadar ceviz yetiştiriciliğimiz sadece tohumla yapıldığı için mevcut ceviz popülasyonumuzun hemen hemen tamamı birbirinden farklı milyonlarca tipten oluşmaktadır (Şen 1986a ve 1986b).

Yaklaşık 4.5-5 milyon ceviz ağacı varlığı ile dünyada ceviz üretiminde önemli bir konumda olan Türkiye 2000 yılında gerçekleştirdiği 120.000 tonluk üretim ile Çin, Amerika Birleşik Devletleri ve İran'dan sonra dördüncü sırada yer almaktadır (Anonim, 2000).

Van Gölü havzası ülkemizde ceviz yetiştiriciliğinin yapıldığı önemli bölgeler arasında yer almaktadır. Havzada üretimi sınırlayıcı iklim koşulları olmasına rağmen ceviz yetiştiriciliği eskiden beri yapılmaktadır. Yetiştiricilik havzada yer alan Van Merkez, Erciş, Edremit, Gevaş, Çatak. Bitlis Merkez, Adilcevaz, Ahlat, Tatvan, Mutki ve Hizan ilçelerinde yoğunlaşmıştır. Van Gölü havzasında ceviz üretimi diğer meyvelere nazaran daha büyük çapta gerçekleştirilmektedir İller bazında ceviz ağacı varlığı ve üretim değerlendirmesinde önemli farklılıkların olduğu gözlenmektedir. 1997 yılı istatistiklerine göre Bitlis ilinde 152.321 adet Van ilinde ise 124.491 adet ceviz ağacı bulunmaktadır. Meyve veren en fazla ağaç varlığı ise Bitlis'te 119.991 adet kabuklu ceviz üretiminde 3.929 ton, Van'da ise 76.280 adet ceviz üretimi 2.110 ton'dur. Son yıllarda aşılı ceviz fidanının üretiminin karlı bir üretim kolu haline gelmesi yüzlerce kişiyi aşılı ceviz fidanı üretimine sevk etmiştir. Halbuki birkaç yıl öncesine kadar ülkemizde çöğür ağaçlarıyla bahçeler kurulurken, günümüzde aşılı fidan aranır hale gelmiştir. Ceviz meyvesinin yaş olarak tüketilmesinin yanında farklı şekillerde değerlendirilmesi ülke ekonomisine katkı sağlamaktadır. Ceviz ağacının mobilya sektöründe değerli bir kereste çeşidi olarak kabul görmesi yetiştiriciliğinin önemini daha da artırmaktadır (Akça, 2001).

Cevizde bugüne kadar tespit edilmiş iki viral etmen bulunmaktadır. Bunlardan birincisi Kiraz yaprak kıvrıcıklık virüsü (*Cherry leaf roll virus*, CLRV) diğeri ise Erik şarka virüsü (*Plum pox virus*, PPV)'dür. Önemli hastalıklara sebep olan CLRV izolatları genel olarak özellikleri bakımından birbirinden farklılıklar göstermektedirler (Nemeth, 1986). CLRV ceviz bitkisinde ceviz sarı mozayik (walnut yellow mosaic), ceviz halkalı leke (walnut ring spot), ceviz siyah çizgi (walnut black line); Erik şarka virüsü ise ceviz mozayığı (walnut mosaic) hastalıklarına sebep olmaktadır. Bu hastalıklar bitkide değişik belirtilere neden olmakta ve doğrudan veya dolaylı ekonomik kayıplara yol açmaktadır. CLRV'nin polenle taşınmasından dolayı (Mircetich ve Rowhani, 1986) çöğür ve fidan üretiminde zorluk çekildiği de bilinmektedir. Dünyada cevizdeki virüs hastalıkları üzerine bir çok araştırma yapılmış olmasına rağmen önemli ceviz yetiştiriciliği yapılan Van ve Bitlis illerinde yetiştirilen cevizlerde görülen virüs hastalıkları hakkında bugüne kadar yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Bitki virüs hastalıklarının tanısında biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır. Bu yöntemlerin virüsleri tanımlamadaki duyarlılıkları birbirinden farklılık göstermektedir. Özellikle serolojik yöntemlerden ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) virüslerin tanımlamasında sıkça kullanılmaktadır. Fakat bir çok durumda özellikle odunsu konukçularında virüsün homojen olmayan dağılımından ve sezona bağlı konsantrasyon dalgalanmalarından dolayı ELISA testi ile saptamasında sorunlar yaşanmaktadır. Bu nedenden dolayı çok düşük konsantrasyonda bile virüsleri teşhis edebilen PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) sayesinde ELISA'da yaşanan duyarlılık problemleri ortadan kalkmıştır (Torrance, 1981).

Bu çalışma da serolojik teşhis tekniklerinden ELISA testi ile hassas ve güvenilir moleküler teşhis yöntemlerinden olan PCR tekniği kombine edilerek, Van Gölü havzası cevizlerinde zararlı virüslerin belirlenmesi ve cevizlerde zararlı virüslere ait viral haritanın ortaya çıkarılarak infeksiyon oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Cevizlerde hastalığa neden olan viral etmenlerden CLRV otsu ve odunsu bitkilerden oluşan oldukça geniş bir konukçu aralığına sahiptir. CLRV Avrupa'dan Kuzey Amerika'ya ve Yeni Zelanda'ya kadar geniş bir yayılım alanı göstermektedir. Virüs aşı, tohum ve polenle yayılmaktadır. CLRV nepovirüs genusunun bir üyesi olup izometrik, iki parçalı, tek iplikli, pozitif-sense RNA molekülünden oluşmaktadır. Literatürde CLRV'nin birçok izolatının serolojik olarak farklılıklar gösterdiği bildirilmektedir (Jones, 1985).

CLRV ilk defa 1955 yılında Posnette ve Cropley tarafından İngiltere'de kirazın önemli bir hastalığı olarak tanımlanmıştır. İlk tespit edildiği tarihten sonra yapılan çalışmalarda etmen virüsün geniş bir konukçu aralığına sahip olduğu belirlenmiştir. Etmenin en önemli konukçuları arasında huş ağacı (*Betula pendula*, Roth.), mürve (Patlangıç) (*Sambucus nigra* L.), ceviz (*Juglans regia* L.) ve kiraz (*Prunus avium* L.) bulunmaktadır (Cropley, 1961).

Mircetich ve Rowhani (1986), CLRV'nin cevizde (*Juglans regia* L.) polenle taşındığını bildirmişlerdir. CLRV ile doğal olarak infekteli ceviz ağacından elde edilen 890 ceviz çöğürünün ELISA ile testlenmesi sonucunda virüsün %3-5 oranında çöğüre geçtiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada etmenin cevizlerde çeşide bağlı olarak %1-14.2 oranlarında taşındığı tespit etmişlerdir.

Savino ve ark. (1976), Güney İtalya'nın Apulia bölgesinde yaptıkları bir çalışmada ceviz yapraklarında sarı halka lekeler ile parlak sarı mozaik belirtilerini rapor etmişlerdir. Bu belirtilere sebep olan iki viral etmen tespit eden araştırmacılar etmenlerden sadece birinin özelliklerini ortaya koyabilmişlerdir. Özellikleri belirlenen etmenlerden birinin tek iplikli RNA (ssRNA)'ya sahip olduğunu ve genetik materyalinde yaklaşık 2.0×10^6 dalton olduğunu tespit etmişlerdir.

Aramburu ve ark. (1997), *J. regia* fidanlarına yapılan suni enfeksiyonların oldukça yavaş ve bazen de yanıltıcı sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. CLRV'nin *Juglans regia*'daki yayılımını araştırmak üzere yaptıkları çalışmada hastalık etmeninin cevizde bulaştırılmasında infekteli tomurcukların kullanımının oldukça etkili olduğunu bildirilmiştir.

Dünyanın farklı bölgelerinde yetiştirilen cevizlerde görülen CLRV izolatlarının birbirleri ile olan ilişkilerini araştırmaya yönelik yapılan çalışmada Zhou ve ark., (1998) İtalya, İspanya İngiltere ve Amerikan izolatlarının kılıf proteinini kodlayan genin olduğu bölgenin sadece Amerikan ve İngiliz izolatlarında %99 dolayında benzer homoloji gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

Cooper (1981), İngiltere’de yürüttüğü survey çalışmasında topladığı 118 adet ceviz bitkisinin 44’ünde CLRV virüsünü tohumda, polende ve yaprakta tespit etmiştir. Çalışmalarda cevizde tespit edilen virüs oranının Kuzey İngiltere’ye göre Güney İngiltere’de daha yaygın olduğu bildirilmiştir. Ceviz tohumları Metil bromid ile muamele edilmiş toprakta geliştiğinde gelişen tohumların % 6’sının semptomsuz olduğu gözlenmiştir.

Rowhani ve ark. (1998), CLRV ceviz izolatlarının moleküler teşhisinde elektroforez gerektirmeyen yeni bir kolorimetrik yöntem geliştirmişler ve yöntemin PCR ürünlerinin jel elektroforez analiz yöntemi kadar hassas olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar kolorimetrik PCR yönteminin, jel elektroforez analizinde ortaya çıkan kirli bant durumunu ortadan kaldıran avantajlı bir yöntem olduğunu rapor etmişlerdir.

Massalski ve Cooper (1983), Elektron mikroskobu çalışmasında huş ağacı ve ceviz ağacının polenlerinden aldığı 100 nm kalınlığındaki doku örneklerinde, yaklaşık 25 nm çapında kristalize halde, hücre duvarına yakın bölgelerde sitoplazmaya gömülü partiküller gözlemiştir. CLRV’ye ait olduğu ELISA ile tespit edilen bu partiküllerin özellikle Mayıs ayında daha yoğun gruplar oluşturduğu tespit edilmiştir.

Kölber ve ark. (1983), Macaristan’da sağlıklı damızlık ceviz ağaçların seçimi için rutin olarak yürütebilecek ideal test yönteminin ELISA olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında çok sayıda örneği CLRV’ye karşı ELISA ile testlemek üzere 20 tomurcuktan oluşan grupları kullanmışlardır.

Delbos ve ark. (1983), Fransa’da yetiştirilen cevizlerde yürüttükleri çalışmada CLRV’nin en tipik belirtilerinden olan aşı bölgesinde siyah çizgi (black line) semptomunu gözlemiştir. Bu semptomun özellikle 15-20 yaşındaki ağaçlarda ve besin elementlerince fakir topraklarda gelişen cevizlerde daha yaygın görüldüğü bildirilmiştir. Çalışmada siyah çizgi belirtisi gösteren ceviz bitkilerindeki CLRV, ELISA testi ile tespit edilmiştir. Fransız CLRV-ceviz izolatı *Prunus persica* GF 305 çöğürlerine başarıyla transfer edilmiş ve bu bitkilerde CLRV’nin sebep olduğu

cüceleşme belirtileri gözlenmiştir. Aynı çalışmada CLRV'nin *J. regia*'daki tohumla taşınma oranı % 5-20 arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Polak ve ark., (2004) yaptıkları biyolojik indeksleme çalışmasına *Chenopodium amaranticolor* bitkisinin CLRV izolatını saklamada en ideal indikatör bitki olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada aynı zamanda *Chenopodium quina* test bitkisinin CLRV izolatının saklanmasıdaki uygunluğu araştırılmış ancak bu bitkinin diğer bir nepovirüs olan *Myrobalan latent ringspot virus* (MLRSV)'ünü saklamada daha uygun olduğu bildirilmiştir.

Cevizde önemli hastalıklara sebep olan CLRV izolatları genel olarak özellikleri bakımından birbirlerinden farklılıklar göstermektedirler (Nemeth, 1986). CLRV-Walnut yellow mosaic (ceviz sarı mozaik)'e sebep olan CLRV, infekteli cevizlerin yapraklarında parlak sarı, irili ufaklı bazen bütün bir yaprağı kaplayan lekelerle sebep olmaktadır. Sararmalar bazen tek bir dal ile de sınırlı olabilmektedir. Daha küçük çaplı sarı lekelenmeler ceviz meyvesinin yeşil renkli kabuğunda görülmektedir (Savino ve ark, 1976).

CLRV-Walnut ring spot (ceviz halkalı leke) hastalığına sebep olan izolatlar ise infekteli ceviz yapraklarında klorotik lekelerle, halkalara, çizgilere sebep olmaktadır. Bazı durumlarda ise pas benzeri nekrotik lekelerde görülmektedir. Belirti ağacın tamamında görülmezken infekteli bitkilerin belli bir bölgesinde veya dalında veya birkaç yaprağında yoğunluk kazanabilmektedir. Simptomlar sadece birkaç yaprakta yoğunlaştığında bu yapraklar genellikle açık yeşil olmakta ve yaprak yüzeyinin altındaki damarlarda damar nekrozlaşması gözlenmektedir. Hastalığın ileriki dönemlerinde sürgünlerde geriye doğru ölümler gözlenmektedir (Cooper, 1980).

CLRV'nin bazı izolatları Walnut black line (ceviz siyah çizgi)'ne sebep olmaktadır. Hastalığın ilk belirtileri zayıf sürgün ucu gelişimi, yaprakların sararıp dökülmesi ve olgunlaşmadan yaprak dökümüdür. Hastalığın ileriki dönemlerinde sürgünlerde geriye doğru ölümle beraber aşılı cevizlerin anaçlarında sürgünler çıkar. Cevizlerin aşı bölgesinden bir parça kabuk dokusu kaldırıldığında aşı bölgesinde kararan iletim demetlerinden ötürü siyah renkli bir hattın aşı birliği boyunca uzandığı görülür. Bu hastalığı teşhise götüren spesifik semptomdur. Hastalığın erken dönemlerinde nispeten kısa olan bu çizgi hastalık ilerledikçe aşı bölgesini çepeçevre sarar (Mircetich ve ark., 1980).

Cevizlerdeki diğer önemli viral etmen olan Erik şarka virüsü (*Plum pox virus*, PPV) cevizlerde Ceviz mozaği (walnut mosaic) hastalığına neden olmaktadır. Hastalık etmeni olan virüsün PPV'nin ırklarından biri olduğu düşünülmektedir (Nemeth, 1986). Etmen infekteli cevizlerin yapraklarında sarı veya açık yeşil renklerde yaklaşık 1 cm çapında yaprağa nüfuz etmiş dairesel lekelerle sebep olmaktadır. Mayıs ve haziran döneminde ortaya çıkan bu belirtiler sezon boyunca yapraklarda varlığını sürdürmektedir. Hassas çeşitlerin sürgünlerinde geriye doğru ölüm belirtilerinin yanı sıra zayıf sürgün gelişimi ile yapraklarda nekrotik lekelerde görülebilmektedir (Cristoff, 1976).

PPV tek iplikli RNA genetik yapısına sahip *Potyvirus* genusuna dahil iplikli 764x20 nm boyutundadır. İki önemli ırkının (M ve D) yanı sıra son yıllarda kiraz (CH), El Amar (EA) ve Rekombinant (PPV-Rec) ırkları tespit edilmiştir. PPV, *Prunus* genusuna dahil konukçuların yapraklarında, çiçeklerinde ve meyvelerinde semptomlara sebep olmaktadır. Semptomların şiddeti infekteli bitkinin türüne, çeşidine, virüs ırkına, sezona ve bölgeye bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Klorotik ve nekrotik lekeler, bantlar ve halkalar şeklinde olan yaprak semptomları özellikle bahar aylarında daha belirgindir. Etmen meyvelerde ise klorotik leke ve halkalara, meyve deformasyonlarına sebep olmaktadır. PPV, bazı erik ve kayısı çeşitlerinin yüzeyinde sarı kahverengi tonlarda halkalar ve lekeler oluşturmaktadır (Brunt ve ark., 1999, Glasa ve ark., 2005).

PPV, 20'den fazla yaprak bitiyle non-persistent olarak taşınmakta ve infekteli üretim materyali ile kolayca yayılabilmektedir. Hastalık etmeni ayrıca tohum ve polenle de yayılmaktadır (Nemeth, 1994).

Wetzel ve ark. (1991), PPV'nin teşhis çalışmalarında PCR tekniğini kullanılmış olup, virüs'e ait genetik materyalden 243 bp uzunluğunda fragmentler elde etmişlerdir. PPV izolatlarına ait ürünleri restriksiyon endonükleaz enzimleriyle keserek analiz etmişlerdir.

Wetzel ve ark. (1992), IC-RT-PCR metodunu sert çekirdekli meyvelerde PPV virüsünün tanımlamasında PCR yöntemlerinden 250 kez daha duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca virüsün infekteli ağaçlarda düşük konsantrasyonda bulunması veya bitki dokuları içersinde düzensiz dağılması durumunda dahi IC-RT-PCR ile analiz edilen örneklerin yaklaşık %90'nının tespit edilebileceğini belirtmişlerdir.

Ülkemizde yürütülen bir çalışmada PPV'nin, Malatya yöresi dışında kalan farklı bölgelerindeki varlığının belirlenmesi için moleküler yöntemler kullanılmış ve bu amaçla badem, erik, kayısı, kiraz, nektarin, şeftali ve vişne ağaçlarından toplanan yaprak örneklerini testlenmişlerdir. Çalışmada aynı zamanda Türkiye'ye ait PPV izolatlarını karakterize etmek için RT-PCR ve RFLP (Restriction fragment length polymorphism) analizini yapılmıştır. RT-PCR/RFLP analizi ile DAS-ELISA ve DAS-ELISA sonuçlarını destekleyen sonuçlar elde edilmiştir. 52 örnekten sadece 2 adedinin PPV ile infekteli olduğu ve 2 kayısı örneğinin virüsün M ırkını içerdiği saptanmıştır (Sertkaya ve ark., 1999).

PPV'nin neden olduğu Şarka hastalığının 1915 yılında ilk kez Bulgaristan'da rastlanmıştır. Bu konuyla çalışan araştırmacılar hastalığın Bulgaristan'dan diğer ülkelere yayıldığını kabul etmişlerdir. Şarka hastalığı günümüzde tüm Avrupa ve Akdeniz ülkeleri ile Şili, ABD, Hindistan ve Kanada'ya kadar ulaşmıştır. PPV'nin sebep olduğu Şarka hastalığının ülkemizde ilk kez 1969 yılında Edirne'de eriklerde tespit edilmiştir. Bu hastalık ülkemizde Ankara, Aydın, Edirne, Balıkesir, Bilecik Bursa, Çanakkale, Doğu Akdeniz bölgesi, İstanbul İzmir, İzmit, Manisa, Sakarya, Tekirdağ ve Yalova'da bulunmaktadır. Ülkemizde en önemli kayısı yetiştiriciliği yapılan Malatya'da bu hastalık bulunmamaktadır. PPV bugüne kadar ülkemizde yapılan çalışmalar doğrultusunda kayısı, erik ve şeftalide hastalık yapmıştır (Elibüyük, 2002).

Baloğlu ve ark., (1995)'nin Doğu Akdeniz Bölgesinde PPV'ünün tespitine yönelik gerçekleştirdikleri surveyde şeftali ve erik örnekleri ELISA yöntemiyle testlenmişlerdir. Testlenen örneklerin hiçbirinde PPV tespit edilememiş ve bölgenin bu virüsten ari olduğu rapor edilmiştir.

PPV sadece *Prunus* genusuna dahil meyve ve süs bitkilerini infektelememektedir. Bunun yanı sıra *Prunus* genusu dışındaki diğer otsu ve odunsu bitkileri de infektelemektedir (Polak ve ark., 2004).

Baumgartnerova, (1997) Batı Slovakya'da gerçekleştirdiği survey çalışmalarında ceviz yapraklarında geniş alanları kaplayan lekelenmeler tespit etmiştir. Bu belirtiyi gösteren bitkilerde PPV varlığı ELISA testi ile defalarca tespit edilmiştir. Etmen virüs ceviz bitkisinden *Chenopodium foetidum*, *Nicotiana clevelandii*, *N. clevelandii*X*Nicotiana glutinosa* ve *Nicotiana bigelowii* var. *quaadrivalis* bitkilerine mekanik inokulasyon ile transfer edilmiştir. Batı Slovakya'da cevizdeki PPV varlığının

ELISA ve mekanik inokulasyon yöntemleriyle tespit edilmesine karşın enfeksiyon varlığı bağımsız laboratuvarlarca doğrulanmamıştır (Polak, 2006).

CLRV ve PPV virüslerinin teşhisleri biyolojik, serolojik ve moleküler tekniklerle yapılabilmektedir. Serolojik yöntemlerden ELISA testi basit ve kolay olmasının yanında çok sayıda örneği bir anda test edilmesine olanak sağlaması bakımından bu virüslerin teşhisinde de en çok tercih edilen tanı yöntemidir. Cambra ve ark.(1998), yaptıkları çalışmada PPV, *Apple chlorotic leaf spot*, *Prunus necrotic ring spot* ve *Apple mosaic virüs*'lerini Print-Capture PCR (PC-PCR) tekniği kullanılarak teşhis etmişlerdir. Teşhisi yapılan virüslerden Plum Pox virüsü'nün vektörü olan *Aphis gossypii*'deki varlığı da aynı yöntemle saptanmıştır.

Nemeth ve ark. (1998), PPV ve PNRSV'nin tanımlaması için Multiplex RT-PCR'ın uygulanabilirliğini konvansiyonel RT-PCR, ELISA ve odunsu indikatörler kullanarak karşılaştırmışlardır. 10 şeftali, 3 vişne ve 7 kayısı ağacının testlendiği odunsu indikatörlerle negatif testlenen tüm örnekler, Multiplex-RT-PCR ve RT-PCR ile testlendiğinde infekteli olduğu tespit edilmişlerdir. RT-PCR tekniğinin duyarlılığının ELISA testinden daha yüksek olmasına ek olarak PNRSV ve PPV'nin sebep olduğu karışık enfeksiyonların tanınmasında Multiplex-RT-PCR'ın uygulanabilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

Sertifikalı üretim materyali üretme çalışmalarında özellikle virüs ve virüs benzeri etmenler ile viroid ve fitoplazma gibi hastalık etmenlerinin uzak tutulmasının özel bir önemi vardır. Bu yüzden bu patojenlerin doğru tanımlanabilmesi için farklı aynı zamanda yeterli hassasiyete sahip yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. PCR tekniğinin hassas ve güvenilir olduğu ve özellikle sağlıklı meyve fidanı materyal üretiminde kullanılması başarıyı artırmaktadır. Meyve ağaçlarındaki tekil veya karışık enfeksiyon durumlarında virüsleri tanımlamada Multiplex ve RT-PCR yöntemlerinin kullanımının yanı sıra, farklı ekstraksiyon yöntemlerinin kullanılmasının da önemli yeri vardır. Bu sayede patojenlerin saptanmasının çok daha güvenilir ve rahat yapılabileceği bildirilmiştir (Pasquini ve ark., 1999).

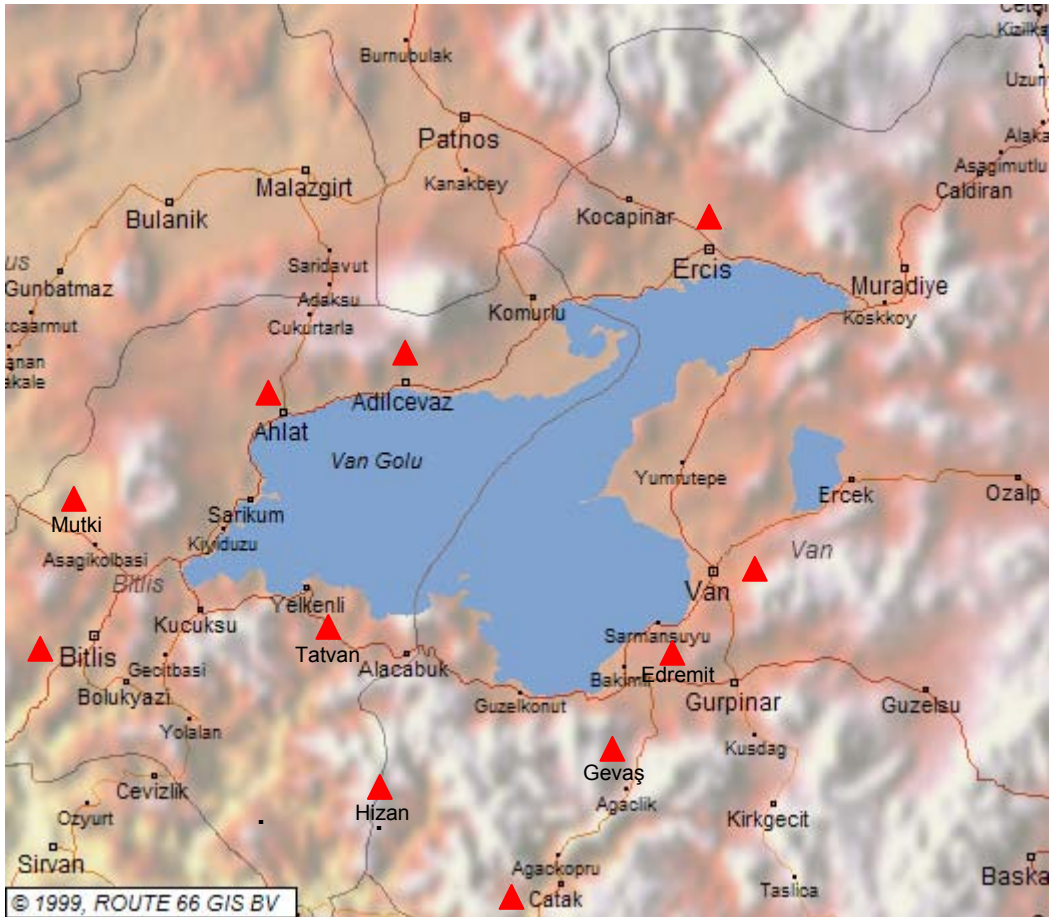
Son yıllarda moleküler tekniklerde meydana gelen gelişmelerle virüs hastalıklarının tanısı daha kolay, kesin ve güvenilir biçimde yapmak mümkün hale gelmiştir. Duyarlı ve daha güvenilir teşhis tekniği olarak bilinen PCR'in kullanılması ile birlikte ELISA testinde karşılaşılan sorunlar ortadan kalkmıştır (Saade, 1999).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan materyalin temini

Çalışmada kullanılan ceviz (*Juglans regia*) bitki örnekleri 2006 temmuz ayında yapılan surveylerde Van'ın başta Merkez ilçesi olmak üzere Erciş, Edremit, Gevaş, Çatak ilçeleri ile Bitlis ilinin Merkez ilçesi ile bu ile bağlı Adilcevaz, Ahlat, Tatvan, Hizan ve Mutki ilçelerinden temin edilmiştir (Şekil 3.1). Özellikle başta virüs benzeri belirtiler gösteren bitkiler olmak üzere ceviz ağaçlarından survey yapılan alanı temsil edecek kadar yaprak ve sürgün örneklerini polietilen torbalara konulup, etiketlenerek, buz kutusunda Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji laboratuvarına getirilerek en fazla bir hafta süreyle 4°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.1. Van Gölü havzasında survey gerçekleştirilen alanlar.

Çizelge 3.1 Van Gölü havzasında survey yapılan iller, gezilen bahçe ve alınan örnek sayıları

İller	İlçeler	Bahçe sayısı	Örnek sayısı
VAN	Merkez	14	45
	Erciş	13	53
	Edremit	11	39
	Gevaş	17	62
	Çatak	14	67
BİTLİS	Merkez	12	73
	Adilcevaz	17	160
	Ahlat	15	128
	Tatvan	14	89
	Hizan	12	71
	Mutki	12	83
	Toplam	151	870

3.1.2. Çalışmada kullanılan indikatör bitkiler

Cevizde saptanan CLRV izolatlarının moleküler karakterizasyonu yapmak aynı zamanda izolatların devamlılığını sağlamak amacıyla CLRV'nin indikatörleri olan *Chenopodium quinoa* ve *C. amaranticolor* kullanılmıştır. Virüs izolatını saklamak için kullanılan bu bitkiler Yüzüncü Yıl Üniversitesi (YYÜ) Bitki Koruma Bölümü'nde mevcut tohumlardan yetiştirilmiş ve mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. YYÜ Bitki Koruma Bölümünde mevcut tohumlarından yetiştirilen ve 4-6 yapraklı dönemlerinde mekanik inokulasyonda kullanılan indikatör bitkiler a) *C. amaranticolor* b) *C. quinoa*.

3.1.3 Serolojik çalışmalar

CLRV ve PPV izolatlarını Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) ile belirlenmesinde kullanılan antiserumlar Bioreba AG (Switzerland) firmasında temin edilmiştir. ELISA test sonuçları Stat Fax 2100 (Awareness Technology, USA) marka ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyu kullanılarak değerlendirilmiştir. ELISA tekniğinde kullanılan kimyasalların isimleri ve hazırlanışı Ek 1’de verilmiştir. Antiserumlar ve hazırlanan tamponlar çalışma süresince buzdolabında saklanmıştır. Hazırlanan tampon çözeltiler buzdolabında en fazla iki ay süre ile saklanmışlardır.

3.1.4. Toplam nükleik asit (TNA) ekstraksiyon çalışmaları

Toplam nükleik asit ekstraksiyon çalışmalarında, survey esnasında toplanan bitki yaprakları kullanılmıştır. Elde edilen TNA’lar -20 °C’de derin dondurucuda saklanmışlardır. Total nükleik asit çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve tampon çözeltilerin hazırlanışı Ek 2’de verilmiştir.

3.1.5. Polimeraz zincir reaksiyon (PCR) çalışmaları

Komplemanter DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirmek amacıyla Fermentas firmasından satın alınan reverz transkriptaz (RT) enzimi kullanılmıştır. TNA ekstraksiyonu sonucunda elde edilen hedef nükleik asitlerin çoğaltılması için gerekli olan ısıya dayanıklı *Taq* DNA polimeraz enzimi, 10X PCR tamponu, 10 mM MgCl₂ Fermentas (Vilnius, LITHUANIA) firmalarından temin edilmiştir. CLRV genomu üzerinde 431 bp uzunluğundaki fragmentlerin oluşumunu sağlayan genom spesifik primer çifti Thermo Hybaid (Thermo Bio Sciences GmbH, Germany) firmasından temin edilmiştir. Nükleik asitin çoğaltımında ya Eppendorf Mastercycler yada ThermoHybaid PX2 marka PCR cihazı kullanılmıştır.

3.1.6. Polyacrylamide (PAGE) ve agaroz jel elektroforez çalışmaları

Virüs izolatının genetik materyalinin bir bölümü PCR ile çoğaltıldıktan sonra elde edilen DNA ürünleri PAGE elektroforez işleminde BIO-RAD firmasına ait dikey

elektroforez tankında yada aynı firmadan temin edilen yatay elektroforez tankında (Mini wide sub cell GT) koşulmuştur.

3.1.7. PCR ürünlerinin baz dizi analizi ve filogenetik analiz

Dizi analizi direk olarak PCR sonrası elde edilen DNA fragmentlerine uygulanmıştır. Dizileme işlemi Ortadoğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ), moleküler biyoloji laboratuvarına yaptırılmıştır. Filogenetik analiz Geneious programı ile yapılmıştır. DNA dizisi belli olan izolatların Gen Bankası (GeneBank)'na ait NCBI web sitesine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) girişi yapılmıştır.

3.1.8. Western blot analizi

Van Gölü havzasındaki ceviz ağaçlarında tespit edilen CLRV'ne ait kılıf protein karakterizasyonunu belirlemek amacıyla Western blot analizi yapılmıştır. Western Blot analizinde kullanılan antibody Dr. Rowhani (*College of Agriculture and Environment Sciences, Department of Plant Pathology, University of California, Davis 95616 CA, USA*)'den, protein markır Fermantes (Vilnius, LITHUANIA), Whatman fitre kağıdı, nitroselüloz membran OSMONICS (USA) BCIP/NBT tabletleri SIGMA (Katalog no: B0274-25TAB/N-5514) dikey elektroforez tankı BIO-RAD (USA), Semi Dry Blotlama Cihazı CBS&SIENTIFIC CO. (GB) firmasından temin edilmiştir.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Serolojik test çalışmaları

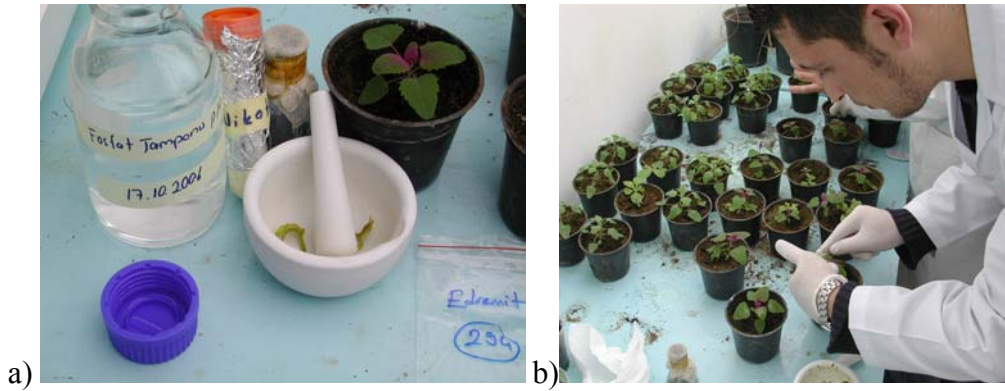
Serolojik test çalışmalarında CLRV ve PPV virüslerini teşhis etmek amacıyla DAS-ELISA yönteminden faydalanılmıştır. Çalışmada BIOREBA firmasından temin edilen antiserumlar kullanılmıştır. DAS-ELISA testinin uygulanması temelde Clark ve Adams (1997)'a göre iki tekerrürlü olarak satın alınan firmanın bildirdiği şekilde yapılmıştır. Buna göre kaplama tamponu (Ek 1) ile firmanın bildirdiği konsantrasyona göre sulandırılmış antiserum Microtiter ELISA plate'nin her bir çukuruna 100 µl konmuş ve daha sonra nem içeren kutu içerisinde 30°C'de 4 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyondan sonra, çukurlar boşaltılmış ve yıkama tamponu 1X PBS Tween'le taşacak şekilde çukurlar doldurulmuştur. Yıkama tampon çözeltisi hızlı bir şekilde plakadan boşaltılmıştır. Yıkama işlemi 3 dakika aralıklarla üç kere tekrarlanmıştır. Yıkamadan sonra ELISA plaka ters çevrilerek tezgah üzerindeki kağıt havlu üzerine çukurların kuruması için hızlıca vurularak kurutulmuştur. Örnekler temiz bir havan içerisinde ekstraksiyon tampon çözeltisi içerisinde 1:10 (w/v) ezilerek alt alta gelecek şekilde her çift çukura 100 µl konmuş ve plakaların üzeri yapışkan plastik film ile kapatılıp nem içeren kutu içerisinde 4°C'de buzdolabında bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra plaka çukurları arası karışma olmayacak şekilde çevrilmek sureti ile boşaltılmıştır. Plakalar yıkama tamponu ile taşacak şekilde doldurulmuş ve hemen tekrar boşaltılmıştır. İki kez yapılan yıkamadan sonra plaka tekrar 3 dakika aralıklarla üç kez daha yıkanmıştır. Bu işlemlerden sonra ELISA plakası ters çevrilerek tezgah üzerindeki kağıt havlu üzerine çukurların kuruması için hızlıca vurularak kurutulmuştur. Enzimle işaretli antikor (konjugat) firmanın bildirdiği konsantrasyona konjugat tamponu ile sulandırılmış ve plakanın her bir çukuruna 100'er µl konmuştur. Daha sonra plaka 30°C'de 4 saat süreyle bir nem kutusu içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra plaka tekrar boşaltılarak iki defa yıkama tamponu ile çukurlar taşacak şekilde doldurulmuş sonrasında hızla boşaltılmıştır. Yıkama işlemi iki kez 3 dakika aralıklarla tekrar edilmiştir. Daha sonra plaka çukurlarının kuruması için plaka tezgah üzerindeki kağıt havlu üzerine hızlıca vurularak kurutulmuştur.

Yeni hazırlanmış substrat tamponundan (Ek 1) (1 mg/ml *p*-nitrophenyl phosphate) her bir çukura 100 µl konmuş ve 60-120 dk süreyle bir nem kutusu

içerisinde veya karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, gerekli olduğu durumlarda reaksiyonu durdurmak için her bir çukura 50µl 3M NaOH ilave edilmiştir. Sonuçlar görsel olarak ve aynı zamanda Stat Fax 2100 (Awareness Technology Inc,USA) marka ELISA Okuyucusun’ da 405 nm dalga boyu kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.2. Mekanik inokulasyon çalışmaları

Virüs kaynağı oluşturmak için yapılan mekanik inokulasyon çalışmasında infekteli *J. regia* L.’nin yaprakları % 2.5 nikotin (Sigma, N 3876) içeren 0.5 M’lık potasyum fosfat tamponu içerisinde ezilmiş ve otsu indikatörlerden *C. quina* ve *C. amaranticolor* 4-6 yapraklı dönemde Myrta ve ark. (1996)’nın bildirdiği yöntemine göre yapılmıştır (Şekil 3.3). Virüs partiküllerinin indikatör bitkilere bulaşmalarını kolaylaştırmak amacıyla inokulasyondan önce otsu indikatör bitkilerin yaprakları karborandum tozu ile pudralanmıştır. Daha sonra elle mekanik inokulasyonlar gerçekleştirilmiştir. Mekanik inokulasyonda kullanılan ve insan sağlığına zararlı olan kimyasallardan korunmak amacı ile laboratuvar eldiveni kullanılmıştır.



Şekil 3.3. a) Mekanik inokulasyonda kullanılan %2.5’luk nikotin solüsyonu, karborandum tozu ve fosfat tampon çözeltisi b) mekanik inokulasyon çalışması.

İnokule edilen bitkilerin yaprakları inokulasyondan sonra fosfat tamponu ve nikotinden ileri gelebilecek yanmalara karşı su ile yıkanmıştır. Virüs bulaştırılan otsu indikatör bitkiler simptom gelişimi için 24 °C sıcaklık ve % 60-70 orantılı nem de 4.000 lüks aydınlatma koşulları altında iklim odasında saklanmış ve periyodik olarak gözlemlenmiştir. Mekanik inokulasyonda kullanılan otsu bitkiler 1:1:1 oranında toprak,

kum ve torftan oluşan karışım içeren fide yastıklarında çimlendirilmiş daha sonra küçük saksılara şaşırtılmışlardır.

3.2.3. Moleküler test çalışmaları

Moleküler test yöntemlerinden revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) DAS-ELISA testinde şüpheli sonuçlar alındığı durumlarda viral infeksiyonların varlıklarını daha hassas araştırılmasında kullanılmıştır. RT-PCR yöntemi ayrıca mekanik inokulasyon sonrası virüsün taşındığı ve simptomatik indikatör bitkilerdeki varlığının doğrulanmasında kullanılmıştır.

3.2.3.1. Toplam nükleik asit (TNA) ekstraksiyonu

Toplam nükleik asit ekstraksiyonu Foissac ve ark., (2001)'inin bildirdiği yöntemle yapılmıştır. Bu yöntemle göre 100 mg yaprak örneği, %1 mercapto-ethanol içeren tampon çözelti (Ek 2) varlığında steril havanda homojenize edilmiştir. Elde edilen ekstraksiyondan 500 µl steril eppendorf tüplerine aktarılmış ve tüplere 100µl %10'luk Lauryl sarkosine eklenmiştir. Tüpler kuru blok ısıtıcıda 70 °C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra 5 dakika buzda inkübe edilmiştir. Tüpler daha sonra 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra üst sıvıdan 300 µl alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. Tüplere 150 µl EtOH, 300 µl 6M NaI, 50 µl silika süspansiyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra tüpler 6.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üst sıvı atılmış tüpün içinde kalan silika partiküllerinin yıkanması için 500 µl yıkama tampon çözeltisi (Ek 2) eklenmiş ve 6.000 rpm'de santrifüj edilerek iki yıkama daha gerçekleştirilmiştir. Yıkamadan sonra silika partikülleri içeren tüplere 150 µl RNase'dan arı steril su eklenmiştir. Daha sonra tüpler kuru blok ısıtıcıda 70 °C'de 4 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlemin ardından tüpler 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiş üst kısmında kalan sıvıdan 140 µl alınarak yeni tüplere aktarılmış ve RT-PCR testinde kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.3.2. Reverzs transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR)

3.2.3.2.1. Komplementer DNA'nın (cDNA) sentezi

PCR testinde kullanılacak total nükleik asit içersindeki viral RNA'ya cDNA sentezi Fermentas firmasından temin edilen RT enzimi kullanılarak firmanın belirttiği prosedüre uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre steril bir PCR tüpü içersine 8 µl nükleaz-free su, 1 µl 2 pmol/µl spesifik revers primer, 2 µl total nükleik asit ve 1 µl 10 mM dNTP karışımı eklenmiştir. Daha sonra tüpler hafifçe köpürtülmeden karıştırılmıştır. Tüpler kuru blok ısıtıcıda 65 °C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra her birine 4 µl 5X First Standart Buffer (RT enzimi ile beraber verilmektedir) ve 1 µl Ribonuclease inhibitör eklenmiştir. Tüp içersindeki karışım tekrar karıştırıldıktan sonra 2 dakika süre ile 42 °C'de inkübe edilmiş ve içersine 1 µl RT eklenerek tekrar karıştırılmıştır. PCR tüpleri PCR cihazına yerleştirilerek 42 °C'de 50 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tüplerin içersindeki RT enzimini inaktivite etmek için tüpler 15 dakika 70°C'de kurublok ısıtıcıda inkübe edilmiştir. Elde edilen cDNA ürünleri PCR işleminde kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR işlemi Usta ve ark., (2005)'e göre 50 µl hacimde yapılmıştır. PCR testinde CLRV virüsünü teşhis etmede kullanılan spesifik primerlere ait DNA baz dizisi ile PCR sonrası beklenen DNA fragmenti uzunlukları ve genetik materyali çoğaltmada uygulanan sıcaklık aralıkları (Çizelge 3.2)'de verilmiştir. Buna göre steril bir PCR tüpüne 5 µl 10X PCR tamponu (200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 3 µl 25mM MgCl₂, 1 µl dNTP (10 mM), 1 µl primer 1 (100 pmol/ul), 1 µl primer 2 (100 pmol/ul), 0.4 µl *Tag* DNA polimeraz enzimi (5 ünite/µl), 2 µl cDNA ve 36.6 µl RNase ari su konulmuştur. Tüp içersindeki PCR bileşenleri köpürtülmeden dikkatlice karıştırıldıktan sonra PCR cihazına yerleştirilmiştir. PCR cihazı Grieco ve ark. (2000)'nın bildirdiği sıcaklık aralıklarına programlanmış ve çalıştırılmıştır. PCR sonrası elde edilen ürünler elektroforez edilinceye kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.2. CLRV'nin PCR ile teşhisinde kullanılan primerler ve bu primerlere ait baz dizilimleri

Virus	Primer	Çoğaltılan DNA uzunluğu (bp)	Referans	Standart PCR Döngüsü
				94°C /2dk , 40 X
CLRV	CLRV 5'-TTGGCGACCGTGTAACGGCA -3' CLRV 5'-GTCGGAAGATTACGTAAAAGG -3'	431	Grieco ve ark, (2000)	(94°C/15s, 50°C/30s, 68°C/1 dak)

3.2.3.2.3. %5'lik denatüre edici olmayan (non denaturing) polyacrylamide jel (PAGE)'in hazırlanması

Genom spesifik primerler ile çoğaltılan DNA ürünleri %5'lik denatüre edici olmayan (non denaturing) poliakrilamid jel (PAGE)'de elektroforez yapılarak analiz edilmişlerdir. PAGE jeli Laemmli (1970)'ye göre aşağıda verilen oranlar kullanılarak hazırlanmıştır. Buna göre:

- %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

Yukarıdaki miktarlardan oluşan karışım (Ek 4) dikey elektroforez tankının iki cam levha arasına döküldükten sonra tarak dikkatlice yerleştirilmiş ve 30 dakika süre ile oda sıcaklığında polimerasyon için bekletilmiştir. Katılan jelden tarak dikkatlice alındıktan sonra ilk çukura 2µl DNA markırı 3µl 6X yükleme tamponu ve 3µl RNase ari su ile köpürtülmeden karıştırılarak yerleştirilmiştir. PCR ürünü DNA ise 10µl hacimde alınarak 5µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jelin kalan çukurlarına yüklenmiştir. Dikey elektroforez tankı güç kaynağına bağlanarak 120 Voltta 60 dk süre ile elektroforez edilmiştir.

3.2.3.2.4. %1.5'luk Agaroz jelin hazırlanması

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 oluşturmayaacak 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 jel'i 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.

3.2.3.3. PCR ürünlerinin analizi

PCR sonrası elde edilen ürünler %5'lik polyacrylamide (PAGE) veya %1.5'lik agaroz jel üzerinde analiz 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. Her iki durumda da jel ethidium bromide (EtBr) ile boyanarak DNA görünür hale getirilmiştir (Sambrook ve ark., 1998). Boyama sonrası jel, SYNGENE (Synoptics Ltd., Cambridge, GB) marka jel görüntüleme ve analiz sistemine yerleştirilerek resmi görüntülenmiştir.

3.2.3.4. PCR ürünlerinin baz dizi analizleri

CLRV izolatlarının kılıf proteini bölgelerine ait PCR ürünlerinin baz dizi analizi ticari olarak, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yaptırılmıştır.

3.2.4. Western blot analizi

3.2.4.1. İki parçalı (discontinuous) denatüre edici (denaturing) sodyum dodesil sülfat-polyacrylamide (SDS-PAGE) jelinin hazırlanması

CLRV Van Gölü Havzası ceviz izolatına ait kılıf protein karakterizasyonu Laemmli (1970)'in bildirdiği iki parçalı discontinuous SDS-PAGE yöntemi ile yapılmıştır. Jel iki parçadan oluşmuştur; a) ayırma (stacking) jeli, b) yığma (separating) jeli. %13'lük ayırma jeli (Ek 4) dikey elektroforez tankının iki camdan oluşan plakaları arasına döküldükten sonra 30 dakika polimerizasyon için oda sıcaklığında inkübe

edilmiştir. Altta kalacak bu jelin üst kısmının düz olması için jel döküldükten hemen sonra bütanol ile doldurulmuş ve jelin alt kısmının düz olması sağlanmıştır. Jel katılaştıktan sonra bütanol kurutma kağıdı ile alınmış ve %5'lik hazırlanan yığma (stacking) jeli (Ek 4) solüsyonu ayırma jelinin üzerine dökülmüştür. Yığma jeli döküldükten hemen sonra tarak yerleştirilmiş ve 30 dk süre ile jelin katılaşması için oda sıcaklığında bekletilmiştir. Jel katılaştıktan sonra iki cam plaka arasındaki tarak dikkatlice uzaklaştırılmış ve çukurların oluşması sağlanmıştır. Cam plaklar arasındaki iki parçalı jel sistemi dikey elektroforez tankına yerleştirilmiş ve TBE tamponu (10X TBE buffer (pH 8.3), 121.1 gr Tris, 51.3 Boric asit 890 mM, 8.7 gr EDTA 20 mM) eklenmiştir. 0.5 gram CLRV ile infekteli *C. amaranticolor* yaprak örneği 1-1.5 ml ekstraksiyon tampon çözeltisi (0.05 M Tris pH 7.8, 0.01 M MgSO₄, % 0.02 3,3'-iminobispropylamine, 0.5 M üre ve 0.01 M 2-mercaptoethanol) veya aynı miktardaki Laemmli tamponu (Çizelge 3.3) varlığında ekstrakte edildikten sonra 10.000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üstte kalan sıvı eşit hacimdeki 2X kuvvetindeki Laemmli tamponu ile karıştırılmış ve 5 dk süre ile kuru blok ısıtıcıda 95⁰C'de inkübe edilerek protein denatürasyonu sağlanmıştır. Denatüre edilen protein solüsyonunun 10 µl'si iki parçalı SDS-PAGE jeline yüklenmiştir (Laemmli, 1970). Örneklerle beraber önceden boyanmış protein standartı (Fermantas, SM0661) firmanın bildirdiği prosedüre göre hazırlanmış ve jelin ilk yada son çukuruna yüklenmiştir. Jel önce 80 V elektrik akımında 35 dk sonrasında ise 120 V elektrik akımında iki saat koşulmuştur.

Çizelge 3.3. Laemmli yükleme tampon çözeltisinin hazırlanması

Laemmli Yükleme Tampon Çözeltisi 35 ml	
M Tris-HCl, pH 6.8	5 ml
% 20 SDS	10 ml
Mercaptoethanol	5 ml
Metahanol içinde 0.2M bromophenol blue	5 ml
Glycerol	10 ml

3.2.4.2 Kılıf proteinin nitroselüloz membrana transferi

CLRV Van Gölü Havzası izolatlarının kılıf proteinleri Western blot yöntemi ile analiz edilmiştir. Yukarıda anlatılan elektroforez sonrası ayırma jeli yığma jelinden

ayırılmış kenarı birinci örneği gösterecek biçimde küçük bir parça kesilerek işaretlenmiştir. Jel'in boyutlarından az büyük kesilmiş iki adet 3MM filtre kağıdı ile nitoselüloz membran elektrik akımı ile aktarma (blotlama) için hazırlanmıştır. Filtre kağıtları kullanılmadan önce destile su ile membran ise geçirgenliği arttırmak için birkaç dakika süre ile metanol içeren transfer tamponu ile ıslatılmıştır. Filtre kağıdı ile jel kullanımdan hemen önce hazırlanmış 300ml 1M Tris Glycine-SDS pH 8.3 tamponunda 30 dk inkübe edildikten sonra, önce filtre kağıdı Semi Dry Blotlama Cihazının platin anoduna yerleştirilmiş ve üzerine sırasıyla membran, jel ve filtre kağıdı yerleştirilerek cihaz kapatılmıştır. Filtre kağıdının her cm^2 'sine 5.5 mA 10-15 V elektrik akımı uygulanmıştır. Yaklaşık 1 saat elektroblotlama işleminden sonra membran %3 yağsız süttozu içeren bloklama solüsyonuna daldırılarak 37°C 'de 1 saat süre ile inkübe edilmiştir. On ml bloklama solüsyonunda uygun sulandırma oranında hazırlanan antibody solüsyonu plastik bir film ile mühürlenerek 4°C 'de bir gece inkübe edilmiştir. Membran daha sonra çalkalayıcı platform üzerinde 5dk süre ile 3 defa PBS-Tween (pH, 7.5) ile yıkanmıştır. Konjugat 20 ml bloklama solüsyonunda uygun oranda sulandırıldıktan sonra membran plastik film ile mühürlenerek 37°C de 2 saat süreyle muamele edilmiştir. 1X kuvvetindeki PBS-Tween (pH 7.5) ile 5' dk süre ile iki defa yıkandıktan sonra membran, 20 ml destile suda çözündürülen iki adet SIGMA FAST™ ve BCIP/NBT tabletlerinin oluşturduğu (N,N-Dimethylformamid/ Steril saf su) solüsyona daldırılmış ve membrandaki mor bantlar görülünceye kadar boyama işlemine devam edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için membran bu solüsyondan alınarak destile suya daldırılmıştır (Dallot ve ark., 1998; Sipahioğlu, 1999).

3.2.4.3. CLRV izolatlarının kılıf protein büyüklüğünün saptanması

Kılıf proteinin moleküler büyüklüğünü hesaplamada, standart proteinlerin Log_{10} 'a göre elde edilecek kalibrasyon eğrisinin, CLRV izolatlarına ait kılıf proteinin SDS-PAGE jelinde alacağı mesafe için elde edilecek eğrinin kıyaslanması ile tahmin edilmiştir (Anonim, 1995). Bu amaçla ticari 10-200 kDa'luk protein standartlarından yararlanılmıştır. Protein referans standart üretici firmanın önerdiği doğrultuda hazırlanarak kullanılmıştır.

Moleküler ağırlık hesaplanırken CLRV'ye ait kılıf protein bir markır eşliğinde SDS-PAGE'de koşulmuştur. Jel daha sonra Western blot analizine tabi tutulmuş ve jeldeki bantlar blotlama ile PVDF membranına aktarılmıştır. Aktarım sonrası moleküler

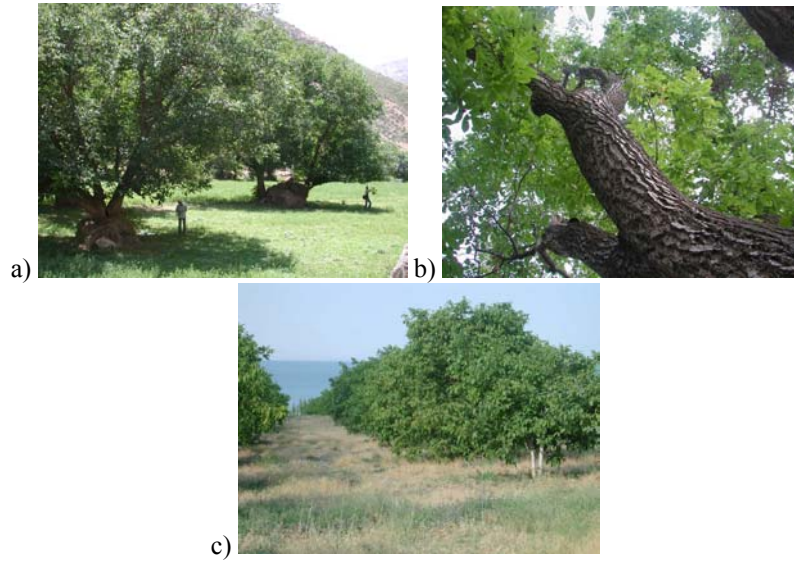
markırdaki her bir bandın membranın en üst noktasına olan uzaklığı (a) cm cinsinden ölçülmüştür. Sonra başlangıç noktasının en öndeki banda olan uzaklığı (b) cm cinsinden ölçülmüştür. Relatif uzaklık (R_m) $R_m = a/b$ hesaplanarak (örneğin $2/5 = 0.4 \text{ cm} = 40 \text{ mm}$) milimetrik kağıt üzerinde X eksenine kaydedilmiştir. Moleküler markırdaki bantların sayısı kadar ölçümler yapılmış ve elde edilen uzunluklar X eksenine kaydedilmiştir. Markıra ait her bir bant büyüklüğünün logaritması alınarak (ör. 250, 150 120, 100. logaritmaları) Y eksenine işlenmiştir. X ve Y eksenini üzerindeki noktalar birleştirilerek bir eğri oluşturulmuş ve molekül ağırlığı belirlenecek bandın relatif göç (migration) değeri milimetrik kağıt üzerinde işaretlenmiş ve bu değerin X eksenindeki yeri işaretlenmiştir. Kalibrasyon eğrisinde bilinmeyen proteinin Y eksenindeki karşılığı tespit edilerek anti logu alınarak protein büyüklüğü yaklaşık olarak tespit edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Arazi gözlemleri

Kiraz yaprak kıvrıcıklık (*Cherry leaf roll virus*, CLRV) ile Erik şarka virüs (*Plum pox virus*, PPV) hastalıklarının belirtilerini gözlemek ve şüpheli bitkileri belirlemek amacı ile 2006 yılının Temmuz ayında Van ve Bitlis illerinin merkez ilçeleri ile bu illere bağlı ceviz yetiştirilen ilçelerinde surveyler gerçekleştirilmiştir.

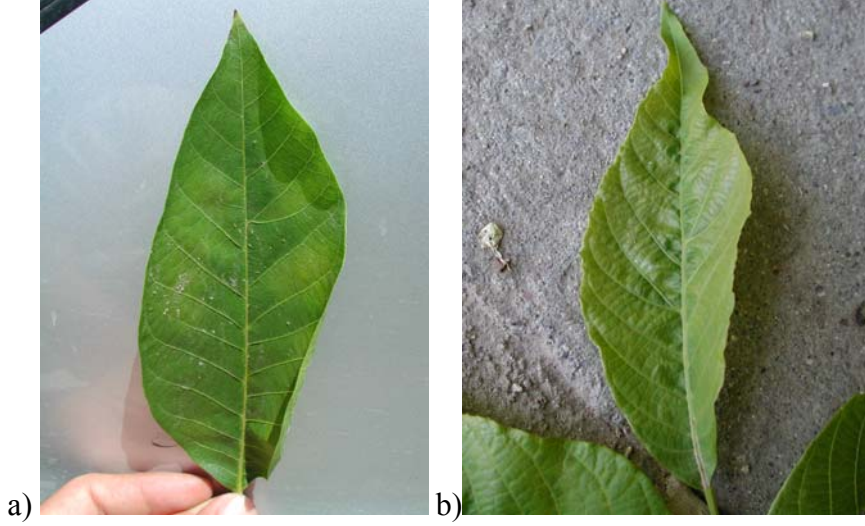
Van Gölü havzasında ceviz yetiştiriciliğinin geleneksel bir yapıda olduğu ve bölgedeki ceviz bahçelerinin tohumdan üretilen, çeşit özelliği taşımayan çok yıllık ağaçlardan oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.1). Havzada enderde olsa özellikle bodur çeşitlerden oluşan kapama bahçelere de rastlanmıştır. Van Gölü havzasındaki ceviz bahçelerinin çoğunluğunun yaşlı ağaçlardan oluşmasından ötürü survey yapılan bahçeler genellikle 20 veya bu yaştan daha büyük bahçelerden oluşmuştur. Bölgeden toplanan örneklerle ilişkin bilgiler Çizelge 3.1’de verilmiştir. Surveylerde 151 ticari bahçe, gezilerek yaklaşık 10.000’den fazla ceviz ağacı bireysel olarak incelenmiştir.



Şekil 4.1. Van Gölü havzasındaki ceviz bahçeleri genellikle yaşlı plantasyonlardan oluşmakta (a ve b) ancak son yıllarda aşıllı çeşitlerden (c) oluşan fidanlar ile de yetiştiricilik yapılmaktadır.

Yapılan geniş çaplı simptomatolojik gözlemler sonucunda ceviz ağaçlarında ender olarak virüs benzeri semptomlara rastlanmıştır (Şekil 4.2). Survey çalışmalarında

kimi lokasyonlarda ceviz yapraklarında açık ve koyu yeşil renklerden oluşan lekelenmeler gözlemlenmiştir (Şekil 4.2 a ve b). Ancak bu belirtilerin sistemik olmadıkları ve ağacın bazı yaprakları ile sınırlı kaldığı kaydedilmiştir.



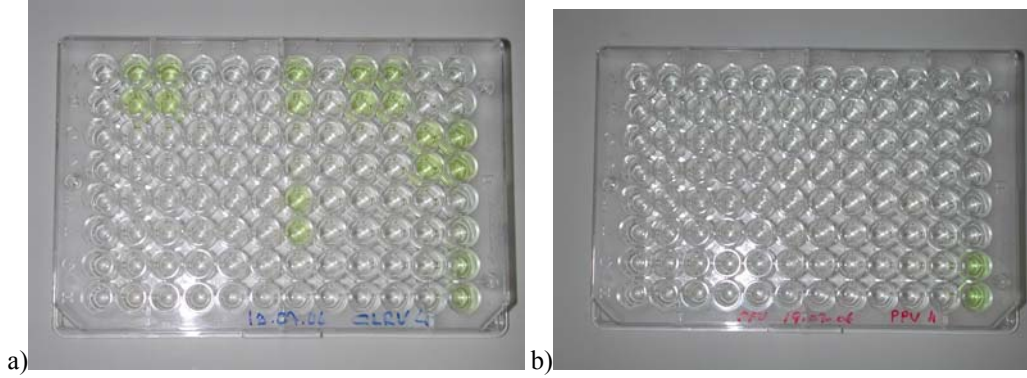
Şekil 4.2. Ceviz yapraklarında gözlemlenen açık veya koyu yeşil renklerden oluşan lekelenmeler (a ve b).

4.2. Serolojik testlere ait bulgular

Van Gölü havzasındaki ceviz ağaçlarından alınan yaprak örneklerinde muhtemel CLRV ve PPV virüs infeksiyonlarının DAS-ELISA yöntemi ile araştırılmasında virüs spesifik antiserumlar kullanılmıştır. Bölgeden toplanan 870 ceviz örneğinin hiçbirinde PPV infeksiyonuna rastlanmazken 112'sinde CLRV infeksiyonuna rastlanmıştır. Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere havzada yetiştiriciliği yapılan cevizlerde CLRV infeksiyonu %12.9 olarak tespit edilmiştir. Havzada en yüksek infeksiyon oranı % 48.4 ile Van'ın Gevaş ilçesinde en düşük infeksiyon oranı ise %3 ile aynı ile bağlı Çatak ilçesinde tespit edilmiştir. CLRV survey gerçekleştirilen tüm lokasyonlarda tespit edilmiştir.

ELISA testleri birkaç pozitif kaynak kullanılarak yürütüldü. Bu nedenle pozitif kontrollerin absorbans değerleri 405 nm de kullanılan örneğine bağlı olarak 0.1178 ile 2.988 arasında değişti. Negatif örnekler ise 0.69 ile 0.244 arasında absorbans değerleri verdi. Genel olarak bütün ELISA testlerinden şüpheye mahal vermeyecek net sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.3). Ancak çok az sayıda ki örnekte şüpheli sonuçlar elde

edilmiştir. CLRV'nin araştırılmasında, ELISA okuyucusunda 105 adet bitki örneğinden yüksek absorbans değerli pozitif reaksiyonlar elde edilirken, 7 adet bitkide sonuçlar şüpheli olarak belirlenmiştir. ELISA testinde şüpheli olarak belirlenen örneklerle daha sonra RT-PCR testi uygulanmıştır. Van Gölü havzasındaki cevizlerde viral enfeksiyon tespit edilen lokasyonlar ile enfekteli bitki sayıları ve bu lokasyonlarda tespit edilen enfeksiyon oranları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.



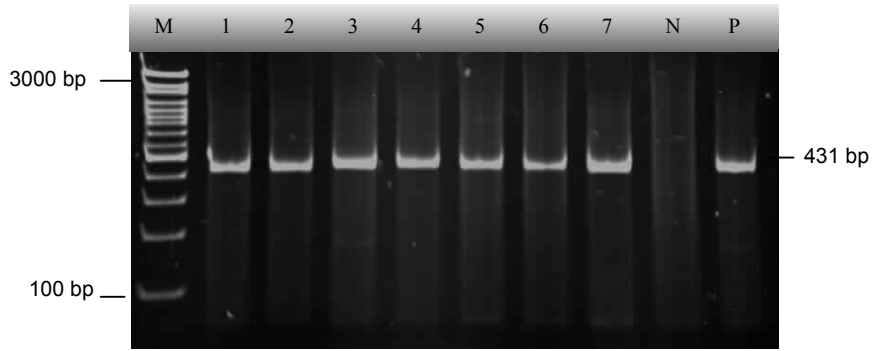
Şekil 4.3. CLRV ve PPV virüslerinin DAS-ELISA ile araştırılmasında pozitif örnekler oldukça yüksek absorbans değerleri vermiştir. Pozitif ve negatif örnekler arasındaki ayrım görsel olarak net ve kolayca yapılabilmektedir (a ve b).

Çizelge 4.1. Survey yapılan yerler, alınan örnek sayısı ve CLRV ile PPV enfeksiyon oranları

Örnek alınan iller	Örnek alınan ilçeler	Örnek sayısı	İnfekteli Bitki Sayısı Enfeksiyon Oranları			
			CLRV	PPV	%CLRV	%PPV
VAN	Merkez	45	2	-	4.5	-
	Erciş	53	3	-	3.7	-
	Edremit	39	5	-	12.3	-
	Gevaş	62	30	-	48.4	-
	Çatak	67	2	-	3.0	-
BİTLİS	Merkez	73	7	-	9.6	-
	Adilcevaz	160	22	-	13.8	-
	Ahlat	128	14	-	10.9	-
	Tatvan	89	14	-	15.7	-
	Hizan	71	4	-	5.6	-
	Mutki	83	9	-	10.8	-
Toplam		870	112	-	12.9	-

4.3. Moleküler test çalışmalarına ait bulgular

ELISA testi sonucunda şüpheli bulunan 7 adet bitki örneğine RT-PCR testi uygulanmıştır. Grieco ve ark., (2000)'nın önerdiği primer seti ile gerçekleştirilen RT-PCR testi sonucunda 431 bp uzunluğunda DNA fragmentleri elde edilmiştir. DNA ürünlerinin koşulduğu PAGE jeli EtBr ile boyandıktan sonra DAS-ELISA ile şüpheli olarak tanımlanan yedi örneğin tamamının CLRV ile infekteli olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. DAS-ELISA testinde şüpheli sonuç veren yedi ceviz örneğine uygulanan RT-PCR testi sonucunda örneklerin tamamının pozitif olduğu tespit edilmiştir. M: Marker 1-7: PCR sonrası %5'lik PAGE ile analiz edilen şüpheli ceviz örnekleri, N: negatif kontrol ve P: pozitif kontrol.

4.4. CLRV izolatlarının ceviz çöğürlerinde saklanması

CLRV-Edremit, Adilcevaz, Çatak, Ahlat ve Gevaş izolatlarının biyolojik ve moleküler karakterizasyonu gerçekleştirebilmek ve izolatların devamını sağlamak amacı her bir CLRV izolatı önceden CLRV'den ari oldukları PCR ile belirlenen ceviz çöğürlerine chip-budding yöntemiyle aşılanmışlardır. İnfekteli kalemlerden, bisturi yardımıyla yaklaşık 1.5-2 cm uzunluğunda hem kabuk hem odun dokusu içeren parça alınmış ve sağlıklı bitkide aynı büyüklükte açılan alana yerleştirilip plastik film ile sarılarak (chip-budding) aşılama yapılmıştır (Yürektürk, 1985) (Şekil 4.5).

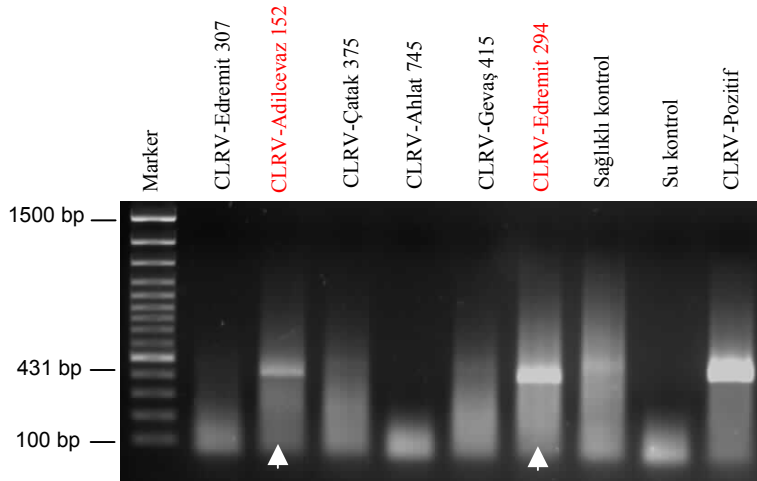
Chip-budding yöntemi ile ceviz çöğürlerine CLRV'nin Edremit, Adilcevaz, Ahlat, Gevaş ve Çatak izolatları aşılanmıştır. Aşılamadan sonra bitkiler dış ortam sıcaklığı ile aynı sıcaklığa sahip tül serada koruma altına alınmışlardır. Farklı

lokasyonlardan temin edilen CLRV izolatlarının devamlılığı ceviz çöğürleri kullanılarak yapılmaya çalışılmıştır.



Şekil 4.5. CLRV'nin Edremit, Adilcevaz, Ahlat, Gevaş ve Çatak izolatlarının aşılандığı ve izolatların saklandığı ceviz çöğürlerinden birisi.

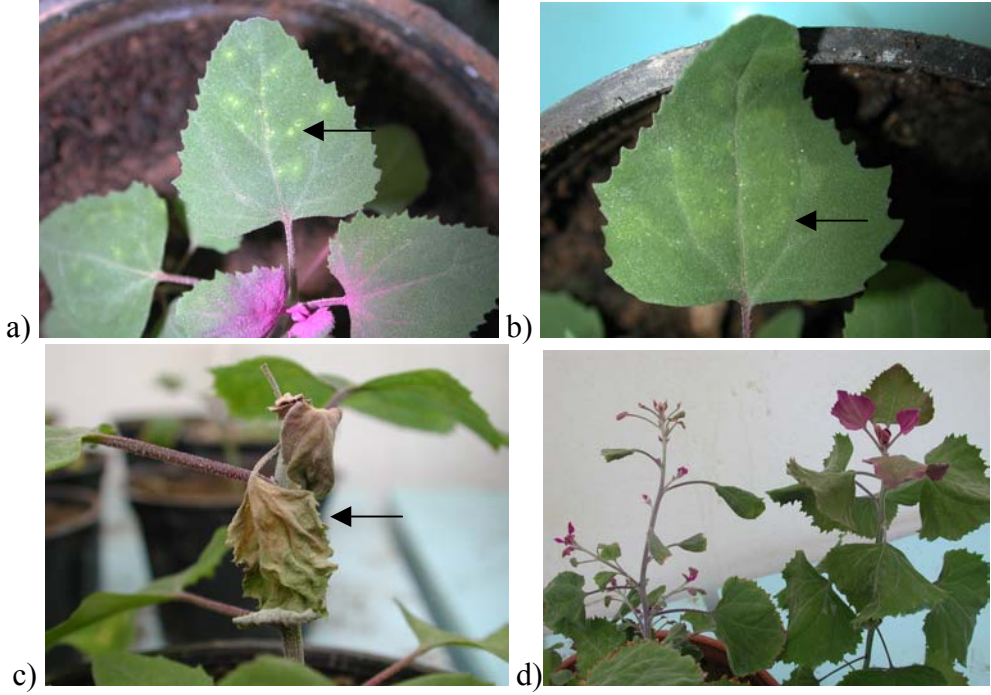
Temmuz 2006'da CLRV içermeyen ceviz çöğürlerine gerçekleştirilen aşılama iki ay sonra uygulanan RT-PCR testi sonrasında CLRV'nin Adilcevaz ve Edremit izolatlarının pozitif reaksiyon verdikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.6). Bu çalışmayı izleyen daha sonraki PCR testlerinde Edremit izolatlarından birinin daha ceviz çöğürüne aktarıldığı konfirme edilmiştir. Adil cevaz izolatının bulaştırıldığı ceviz çöğürü ise hem infeksiyon ve hem de sert geçen kış koşullarının etkisi ile aşılama 6-7 ay sonra ölmüştür.



Şekil 4.6. Ceviz çöğürlerine aşılanan farklı CLRV izolatlarına aşılama iki ay sonra uygulanan RT-PCR testi sonucu. PCR sonrasında Edremit ve Adilcevaz (kırmızı ile gösterilen) izolatlarının ceviz çöğürlerinde sistemik olarak yayıldıkları ve teşhis edilebilir sınırlara ulaştıkları %1.5'lik agaroz jelde görülmüştür.

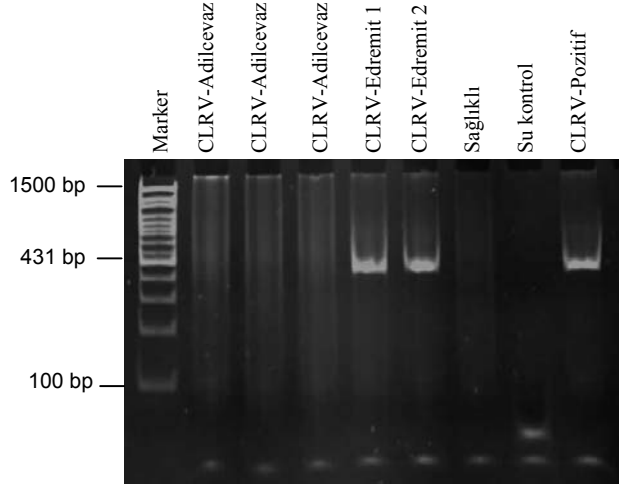
4.5. Mekanik inokulasyon çalışmalarına ait bulgular

Edremit ve Adilcevaz izolatlarının moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmek için mekanik inokulasyon ile virüsün otsu indikatörleri arasında yer alan *Chenopodium quinoa* ve *C. amaranticolor* bitkilerine transfer çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Mekanik inokulasyon çalışmaları ile sadece CLRV-Edremit izolatı *C. amaranticolor*'a aktarılabilmektedir. Bir hafta içerisinde gelişen klorotik yaprak leke belirtilerini (Şekil 4.7 a ve b) inokulasyondan on gün sonra uç nekrozu simptomsu izlemiştir (Şekil 4.7 c ve d). CLRV-Adilcevaz izolatının inokule edildiği otsu indikatörlerden sadece *C. quinoa*'da klorotik belirtiler gözlemlense de belirtili gösteren bitkiler RT-PCR yöntemi ile testlendiklerinde negatif sonuç vermişlerdir.



Şekil 4.7. a ve b) CLRV-Edremit-1 izolatının *C. amaranticolor* bitkisinde inokulasyondan bir hafta sonra önceleri lokal sonraları genişleyerek oluşturduğu klorotik yaprak lekeleri, c) infeksiyondan on gün sonra gelişen uç nekrozu simptomsu, d) inokulasyondan dört ay sonra infekteli bitkide oluşan küçük yapraklılık simptomsu (solda), sağlıklı bitki sağda.

CLRV-Edremit izolatı *C. amarnticolor*'da önceleri lokal (Şekil 4.7a) sonraları ise genişleyerek klorotik yaprak lekelerine dönüşen (Şekil 4.7b) belirtilere neden olmuştur. Belirti gösteren CLRV-Edremit izolatı ile bulaşık *C. amarnticolor* bitkilerine uygulanan RT-PCR sonucunda pozitif reaksiyon elde edilmiştir (Şekil 4.8). Belirti gösteren her iki indikatör bitkiden de 431 bp uzunluğunda DNA fragmentleri elde edilmiştir.



Şekil 4.8. CLRV-Edremit izolatlarının mekanik inokulasyon ile bulaştırıldığı otsulardan *C. amarnticolor* bitkilerindeki varlığı RT-PCR testi ile belirlenmiştir. PCR testi sonrasında elde edilen DNA fragmentleri %5'lik PAGE'de ethidium bromide ile boyanarak gözlemlenmiştir.

4.6. PCR ürünlerinin baz dizi analizlerine ait bulgular

PCR sonrası elde edilen DNA fragmentinin baz dizi analizi gerçekleştirilmiş ve iki izolata ait bilgiler aşağıda (Çizelge 4.2. ve 4.3.) verilmiştir. DNA dizisi belli olan izolatların Gen Bankası (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)'na ait NCBI web sitesine baz dizilerinin girişi yapılmıştır. Kaydedilen baz dizilerine ait ulaşım numaraları (accession numbers) EF182751 ve EF182755'dir.

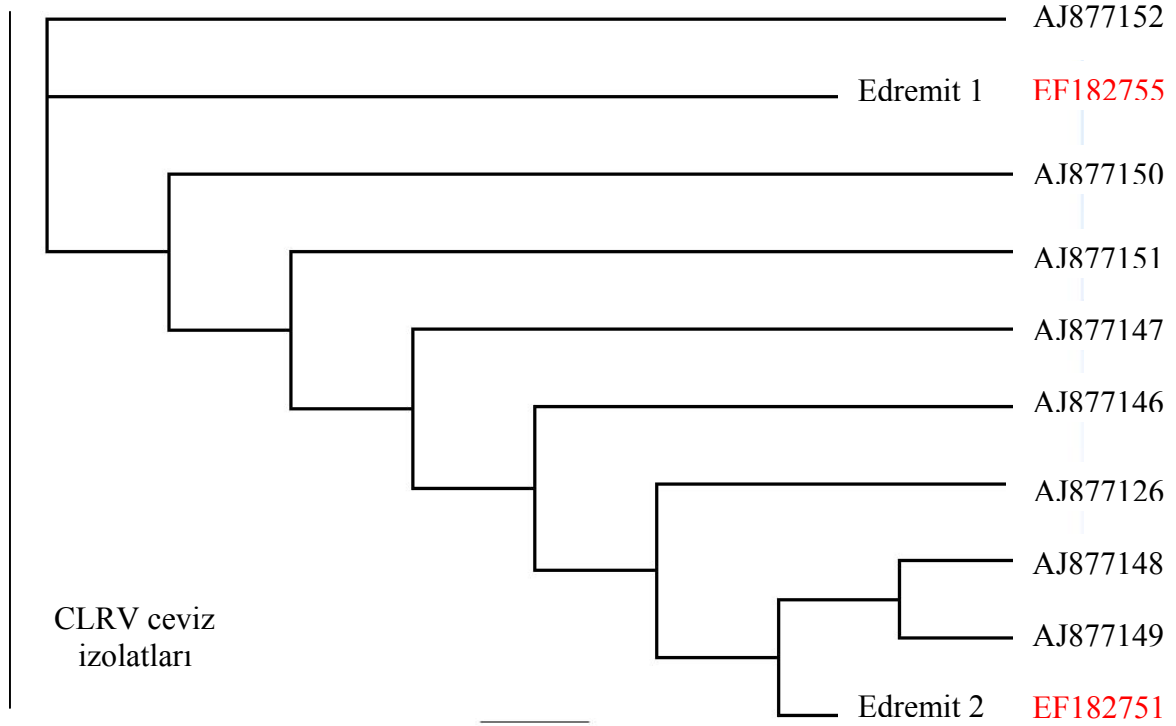
Çizelge 4.2. CLRV Edremit-1 izolatının kılıf proteini bölgelerine ait PCR ürünlerinin baz dizisi

Baz uzunluğu (bp)	Baz dizisi
1	gtaagtanat ttanttcatt tttataaaac ctaaaactctg cctgagctnc gacactcata
61	caataagcga attttgaaac actaacgggg caacaaagta tcgcngaaac aaccccctag
121	cnaacgctac ctaccgacat aaccccctaa attccttgggc ttaaaattca aagtcacagg
181	tgtgttacca gcacacctgg ctcatataacc aagcaagata gaggaccatc acatggatgg
241	cagtagatac tcgttaacta naactcatgg agcccttggc tgtagcattc ttaatactac
301	taagaccggt cgcattggtac tgattgcagt cagccaccca gtgtcaccgt aacactgttg
361	ccgttc

Çizelge 4.3. CLRV Edremit-2 izolatının kılıf proteini bölgelerine ait PCR ürünlerinin baz dizisi

Baz uzunluğu (bp)	Baz dizisi
1	cngtggtcgg tgnctggtgg gctncctgca tcagtaccat gcgaccggtc ttagtagtat
61	taagaatgct acagccaagg gctccatgag ttctagttaa cgagtatcta ctgccatcca
121	tgtgatggtc ctctatcttg cttggtatat gagccagggtg tgctgagtaa cacacctgtg
181	actttgaatt ttaagcccaa gaatttaggg ggttatgtgg gtaggtagcg ttggctaggg
241	ggttgtttcg cgatattggt gccccgtagg tgtttcaaaa ttgcgttatt gtatgagtgt
301	cggactcagg cagtgttttag gttttatttc tttgaattaa attttacttt aagttttcct
361	tttacgaa

Edremit CLRV izolatlarının moleküler düzeydeki benzerliği veya farklılığı Dünya Gen Bankasındaki CLRV ceviz izolatları (Çizelge 4.4.) ile karşılaştırılmıştır. Moleküler farklılık CLRV genomik RNA'sının 3'- ucunda kodlama yapmayan (non-coding) bölgesinde yer alan 361 bp uzunluğundaki diziler karşılaştırılarak araştırılmıştır. Genomik bölge analizleri sonucunda CLRV-Edremit 1 izolatı karşılaştırma yapılan Gen Bankasına kayıtlı diğer CLRV izolatları ile çok yüksek düzeyde moleküler farklılık gösterdiği (%43-46) tespit edilmiştir. CLRV Edremit 2 izolatı ise Edremit 1 izolatının aksine karşılaştırma yapılan izolatlar ile yüksek düzeyde benzerlik (%93-98) göstermiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. CLR Edremit ceviz izolatlarının dünyada tespit edilmiş diğer ceviz izolatları ile moleküler açıdan benzerliğini gösteren filogenetik ağaç.

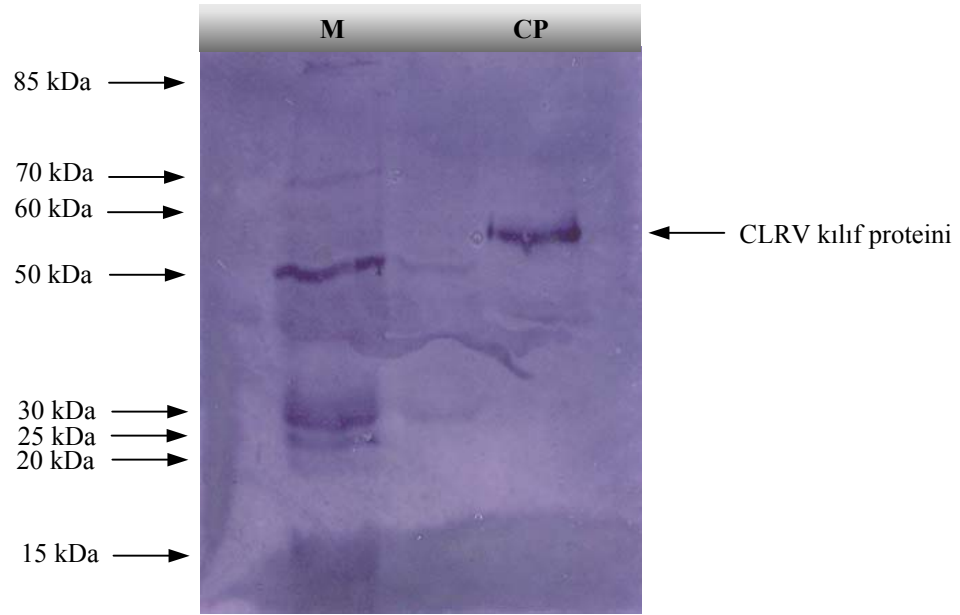
Çizelge 4.4. CLR Edremit ceviz izolatlarının karşılaştırıldığı dünyanın farklı bölgelerinde tespit edilerek Gen Bankasına kayıtlı CLR virus izolatları

Virüs	Ulaşım Numarası	İzolatin kaynağı	Tespit edildiği konukçu	Sekans bölgesi	Literatür
CLR	AJ877126	İngiltere	Ceviz	CP*	Rebenstrof ve ark., 2006
CLR	AJ877146	Almanya	Ceviz	CP	Rebenstrof ve ark., 2006
CLR	AJ877147	Fransa	Ceviz	CP	Rebenstrof ve ark., 2006
CLR	AJ877148	İngiltere	Ceviz	CP	Rebenstrof ve ark., 2006
CLR	AJ877149	İngiltere	Ceviz	CP	Rebenstrof ve ark., 2006
CLR	AJ877150	Macaristan	Ceviz	CP	Rebenstrof ve ark., 2006
CLR	AJ877151	Fransa	Ceviz	CP	Rebenstrof ve ark., 2006
CLR	AJ877152	Slovakya	Ceviz	CP	Rebenstrof ve ark., 2006
CLR	EF788151	Türkiye	Ceviz	CP	Bu tez
CLR	EF788155	Türkiye	Ceviz	CP	Bu tez

*=Kılıf proteini (coat protein)

4.7. Western blot analizine ait bulgular

CLRV'ye karşı üretilen ve Dr. Rowhani'den temin edilen poliklonal antiserum CLRV Edremit izolatının kılıf proteinini tanımlamıştır. Otsu konukçu *Cheneopodium amaranticolor* bitkisinden ekstrakte edilen viral proteini tanımlamada kullanılan birinci antikor yapılan western blot çalışmalarında 1:5000 oranında sulandırılmıştır.



Şekil. 4.10. CLRV'ye spesifik antikor ile Edremit ceviz izolatlarının kılıf proteini büyüklüğü Western blot tekniği ile PVDF membran kullanılarak gösterilmiş ve aynı zamanda etmenin teşhisi gerçekleştirilmiştir. M: Moleküler marker, CP: CLRV'ye ait kılıf protein.

CLRV Edremit izolatına ait kılıf proteininin SDS-PAGE jelinde göstermiş olduğu mobiliteye dayanarak kılıf proteini büyüklüğü 52.4 kDa olarak tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Ceviz genel olarak birçok hastalık ve zararlı için iyi bir konukçudur. Van gölü havzasında yetiştiriciliği tohumdan veya aşılı fidan ile yapılan ceviz ağaçlarında viral hastalıklar ile bu hastalıkların yaygınlık oranları serolojik teşhis tekniklerinden ELISA testi ile hızlı, güvenilir ve hassas moleküler teşhis yöntemlerinden olan PCR tekniği kombine edilerek araştırılmıştır.

Survey çalışmaları esnasında bölgedeki yetiştiricilik yapılan 151 bahçe gezilmiş, yaklaşık 10.000 civarında ağaç bireysel olarak incelenmiştir. Bölgede ceviz yetiştiriciliğinin geleneksel yapıda olduğu tespit edilmiş olup ceviz plantasyonlarının çok yıllık ceviz ağaçlarından oluştuğu gözlenmiştir. CLRV ve PPV'nin belirtilerini gözlemek ve örnek toplamak için gerçekleştirilen survey çalışmalarında ceviz yapraklarında açık ve koyu yeşil renklerden oluşan lekelenmeler gözlemlenmiştir. Cooper, (1981) İngiltere'de yürüttüğü survey çalışmalarında ceviz yapraklarının ayalarında geniş alanlara nüfuz etmiş lekelenmeler tespit etmiştir.

ELISA testi ile araştırılan iki viral etmenden CLRV, Bitlis Merkez, Adilcevaz, Ahlat, Tatvan, Hizan, Mutki ile Van Merkez, Erciş, Edremit, Gevaş, Çatak ilçelerinde yetiştirilen ceviz ağaçlarından toplanan 870 örnekten 112'sinde tespit edilmiştir. Virüs survey gerçekleştirilen tüm lokasyonlarda tespit edilmiştir. Ancak PPV enfeksiyonuna, ELISA ile testlenen hiçbir örnekte rastlanmamıştır. ELISA testinde şüpheli sonuç veren yedi adet bitki örneğine uygulanan RT-PCR sonucunda örneklerin tamamının infekteli olduğu belirlenmiştir. CLRV Van Gölü havzasının önemli ceviz yetiştiricilik ili olan Bitlis'te %11.6 oranında tespit edilirken, bu oran Van ili için %15.8 olarak tespit edilmiştir. Van Gölü havzasındaki cevizlerde CLRV'den ileri gelen enfeksiyon oranı %12.9 olarak belirlenmiştir. Havzada en yüksek enfeksiyon %48.4 oranı ile Van'ın Gevaş ilçesinde, en düşük enfeksiyon oranı ise %3 ile aynı ile bağlı Çatak ilçesinde tespit edilmiştir. Cooper, (1981) İngiltere'de yetiştiriciliği yapılan cevizlerde gerçekleştirdiği survey çalışmasında cevizlerin %37 oranında CLRV ile infekteli olduğunu tespit etmiştir. Hastalık etmeninin güney İngiltere'de kuzeye oranla daha yaygın olduğunu bildirmiştir. Van Gölü havzasında tespit edilen ortalama %12.9 oranındaki enfeksiyon oranı ile kıyaslandığında CLRV enfeksiyonunun İngiltere'de daha yaygın olduğu görülmektedir. Cevizlerde PPV enfeksiyonunun bulunmaması havzadaki ceviz yetiştiriciliği açısından sevindirici bir durumdur. Ülkemizde diğer ceviz

yetiştiricilik alanlarındaki viral hastalıklar ile ilgili bildirilmiş herhangi bir çalışma bulunmadığından Van Gölü havzasındaki viral enfeksiyon oranıyla karşılaştırılması henüz mümkün olmamaktadır. Bölgede viral enfeksiyonun düşük oranda olması yetiştiriciliği yapılan ceviz plantasyonunun yaşlı ağaçlardan oluşu ve yeni fidan üretiminde bu ağaçlardan geleneksel olarak elde edilen tohumlardan yapılması olarak gösterilebilir. Bölgede bu virüslerin yayılımını engellemek için dış kaynaklardan tohum, aşı kalemi ve fidan girişinin iç karantina kurallarına uyarak gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca CLRV ile infekteli bitkilerden tohumla üretim yerine sağlıklı bitkilerden üretim yapılması virüsün farklı yerlere kolayca taşınmasının büyük ölçüde azalacağı düşünülmektedir.

Mekanik inokulasyon çalışmalarında Edremit, Gevaş, Çatak, Adilcevaz ve Ahlat izolatları virüsünün devamlılığını sağlamak ve karakterizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla otsu indikatörlere inokule edilmişlerdir. Mekanik inokulasyon çalışmalarında Edremit'ten alınan izolatlardan ikisinin *Chenopodium amaranticolor* bitkisine aktarılabilmektedir. Enfeksiyonun varlığı ELISA ve RT-PCR teknikleri ile doğrulanmıştır. İnfekteli bitkilerde klorotik lekelenmeler, uç nekrozları ve küçük yapraklılık belirtileri gözlenmiştir. Mekanik inokulasyonda kullanılan izolatlardan hiçbirisi *Cheonopodium quinoa* bitkisine aktarılamamıştır. Cevizde saptanan CLRV izolatlarını saklama bakımından *C. amaranticolor* bitkisinin, *C. quinoa* bitkisine göre daha iyi olduğu belirlenmiştir. Polak ve ark., (2004) bir nepovirüs olan CLRV'yi saklamada *C. amaranticolor* bitkisinin ideal bir konukçu olduğunu bildirmiştir.

C. amaranticolor bitkilerine aktarılan Edremit izolatlarının PCR sonrası elde edilen DNA fragmentinin baz dizi analizi gerçekleştirilmiş ve her iki izolata ait DNA baz dizileri Gen Bankasının resmi web sitesine kaydedilmiştir. Kaydedilen baz dizilerine ait ulaşım numaraları (accession numbers) EF182751 ve EF182755 olarak alınmıştır. CLRV Edremit izolatlarının moleküler benzerliği Gen Bankasına kayıtlı diğer izolatları ile karşılaştırılmış genomik bölge analizleri sonucunda CLRV-Edremit 1 izolatu karşılaştırma yapılan CLRV izolatları ile çok yüksek düzeyde moleküler farklılık gösterdiği (%43-46) tespit edilmiştir. CLRV Edremit 2 izolatu ise karşılaştırma yapılan izolatlar ile yüksek düzeyde benzerlik (%93-98) göstermiştir. Rebenstrof ve ark., (2006) dünyanın farklı bölgelerinden temin ettikleri CLRV izolatlarının moleküler ve serolojik farklılıklarını araştırmışlardır. Araştırmacılar çalışmada kullandıkları bütün ceviz

izolatlarının hem moleküler hem de filogenetik anlamda homejenite gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

CLRV spesifik tavşanda üretilmiş birinci antikor uygulaması ve onu takipeden üniversal anti-rabit antikorunun uygulandığı Western blot analizi çalışmaları sonucunda CLRV Edremit izolatlarına ait kılıf protein büyüklüğü 52.4 kDa olarak tespit edilmiştir.

Van Gölü havzasında ceviz yetiştiriciliğinin çok eskiden beri yapılıyor olması ve üreticiye önemli kazançlar sağlaması gün geçtikçe ceviz yetiştiricilik alanlarının artmasına ve büyük kapama bahçelerin kurulmasına sebep olmaktadır. Bölgenin PPV ile hiç infekteli olmayışı, ayrıca diğer ülkeler ile kıyaslandığında çok yüksek olmayan CLRV ile bulaşıklılık oranı üretim açısından sevindirici bir durumdur. Yeni tesis edilecek bahçelerde sağlıklı bitkilerden elde edilen fidanların kullanımı uzun vadede ülke ekonomisine yararlı olacaktır. Bu açıdan bölgede fidan üretimi veya kullanılacak diğer bitkisel materyallerin sağlıklı bitkilerden elde edilmesi bu çalışmada tespit edilen enfeksiyon oranının daha da düşmesine sebep olacaktır. Özellikle virüsün en uzak yerlere tohum, polen ve aşı materyali ile yayıldığı göz önünde bulundurulursa iç karantina kurallarına sıkıca uyulması ve fidan üretiminin sertifika programları çerçevesinde yapılması tavsiye edilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Adams, A.N., Guise, C.M., Crossley, S.J., 1999. Plum pox virus detection in dormant plum trees by PCR and ELISA. *Plant Pathology*, **48** (2):240-244
- Akça, Y. 2001. Ceviz yetiştiriciliği, Arı Ofset matbaası. **7-23**:356
- Anonymous, 1995. Introduction to some electrophoresis procedures used in plant virology. Istituto Agronomico Mediterranea Valenzano-Bari, Italia. *Quaderno No:4*.
- Anonymous, 2000. Production Year Book, *FAO*.
- Aramburu, J., Ninot, A. and Aletà, N. 1997. Translocation of *Cherry Leaf Roll Virus* (CLRV) In *Juglans Regia*. *Acta. Horticulturae*, **442**:393-398
- Baloğlu, S., Özaslan, M., Posluoğlu, N. ve Yılmaz,, M.A., 1995. *Adana ve Tarsus bölgesinde4 yetiştiriciliği yapılan erik ve şeftali ağaçlarında erik şarka virüsünün ELISA testiyle aranması*. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 342-344
- Baumgartnerova, H. 1997. Walnut-a new host of sharka virus. Proceedings of the central European meeting 96 on plum pox, pp.**104-106**. Budapest (HU).
- Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz,M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) 1999. *Plum Pox Potyvirus. In: Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 16'th January, 1997*.
- Cambra, M., A., Asensio, M., Esteban, O., Gorris, M.T., Candresse, T., ve D., Boscia, 1998. Detection and typing of Prunus viruses in plant tissues and in vectors by print and spot capture PCR, Heminested PCR. *Acta. Horticulturae*, **472**:257-263
- Clarck, M.F., Adams, A.N., 1997. Characteristics of microplate method of enzyme – linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J.gen. virology* **34**:475-483
- Cooper, J. I., 1980. Cherry leaf roll virus in *Juglans regia* in the United Kingdom. *Forestry* **53**: 41-50.

- Cooper, J.I. 1981. The Prevalence of Cherry Leaf Roll Virus In *Juglans regia* In The United Kingdom. *Acta. Horticulturae*, **94**:139-146
- Cristoff, A. 1976. Mozaica po orecha. Gradinarska i Lozarska nauka. 12:2: **50-55**.
- Cropley, R. 1961. Cherry leaf roll virus. Ann. Appl. Biol. **49**:524-529
- Dallot, S., Labonne, G., Boeglin, M., ve T. Candresse, 1998. Peculiar plum pox potyvirus D-populations are epidemic in peach trees. Proc. 17th Int. Symp. On Fruit Tree Virus Diseases. Ed. A. Hadidi, *Acta. Horticulturae*. **472**, 355-364.
- Delbos, R., Kerlan, C., Dunez, J., Lansac, M., Dosba, F. and Germain., E. 1983. Virus infection of walnuts in France. *Acta. Horticulturae*, **130**:123-132
- Elibüyük İ.Ö. 2002. Sert çekirdekli meyve üretiminde Plum pox potyvirus'unun önemi ve özellikleri. Workshop *on detection of Stone Fruit Viruses by Molecular Techniques*, 30 Eylül-4 Ekim, 2002, Ankara, Sayfa **38-51**, 2002.
- Foissac, X., Savalle-Dumas, L., Gentit, P., Dulucq, M.J., Candresse, T., 2000. Polyvalent 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
- Glasa, M. and Candresse, T. 2005. Note concerning the reference to walnut as a natural host of PPV. *OEPP/EPPO Bulletin* **36**:225-226
- Grieco, F., Alkowni, R., Saponari, M., Savino, V. and Martelli, G.P. 2000. Molecular detection of olive viruses. Bulletin *OEPP/EPPO Bulletin*. **30**: 469-473.
- Jones, A.T. 1985. Cherry leaf rool virus. *AAB descriptions of plant viruses no.306*, Association of applied biologists. Wellesbourne Warwick. UK.
- Kölber, M., Nemeth, M. and Szentiyanyi, P. 1983. Routine testing english walnut mother treesand group testing of seeds by ELISA for detection of cherry leaf roll virus infection. *Acta. Horticulturae*, **130**:161-172
- Kölber, M., Németh, M., Krizbai, L., Szemes, M., Kiss-Tóth, E., Dorgai, L. and Kálmán, M. 1998. Detectability of Prunus Necrotic Ringspot and Plum Pox Viruses by RT-PCR, Multiplex RT-PCR, ELISA and Indexing on Woody Indicators. *Acta Horticulturae*. **472**:243-248

- Laemmli, U.K., 1970. Clavage of structural proteins during the assemble of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Massalski, P.R. and Cooper, J.I. 1983. The association of cherry leaf roll virus with birch and walnut pollen., **130**:291-292
- Mircetich S.M., DeZoeten, G.A., Lauritis, J.A., 1980. Etiology and natural spread of black line diseases of English walnut trees. *Acta. Phytopathology. Acad. Sci. Hung.* **437**: 77-87.
- Mircetich, S.M. and Rowhani, A. 1986. Role Of Infected Pollen In Horizontal Transmission of Cherry Leaf Roll Virus, The Causal Agent of Walnut Blackline Disease. *Acta. Horticulturae* **193**:125-126
- Myrta, A., Di Terlizzi, B., Digiario M. ve Savino,, V., 1996. Viruses of stone fruits in Albania. Bulletin *OEPP/EPPO Bulletin*, **26**, 141-146
- Nemeth, M., 1986. *Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees*. Akademia Kiado, Budapest 841 s.
- Nemeth, M., 1994. History and importance of Plum pox in stone fruit production. Bulletin *OEPP/EPPO Buletin* **24**:525-536.
- Nemeth, M., Kölber, M., Krizbai, L., Szemes, M., Kiss-Toth, E., Dorgai, L., Kalman, M., 1998. Detectability of prunus necrotic ringspot and plum pox viruses by RT-PCR, *mutiplex RT-PCR* ELISA and indexing on woody indicators. *Acta. Horticulturae* **472**:243-247
- Pasguini, G., Faggioli., F., Barba., 1999. Sample preparations and RT-PCR assays for large scale detection of fruit tree viruses covered by certification standars, *Petria*, **9**:157.162
- Polak J., Chaloupka M., Jokes M. 2004. Biological and serological procedures to detect three nepoviruses in fruit trees. *Plant Protect. Sci.*, **40**:121-127
- Polak, J. 2006. Hosts and symptoms of plum pox virus:woody species other tran fruit and ornamental species of Prunus. Bulletin *OEPP/EPPO Bulletin* **36**:225-226

- Rowhani, A., Biardi, L., Routh, G., Daubert, S.D. and Golino, D.A. 1998. Development of a sensitive colometric-PCR assay for detection viruses in woody plants. *Plant pathology plant disease*/January 1998
- Saade, M., 1999. *Simultaneous detection of ilarviruses affecting stone fruit by molecular approaches. Master of Sciences* (Collection master of Science). 183 Istituto agronomico mediterraneo di Bari, Italy
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Savino, V., Quacquarelli, A. Galitelli, D. Piazzola, P., and G.P. Maretelli, 1976. Occurrence of two sap transmissible viruses in walnut. Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtschaft. *Berlin-Dahlem* 170: 23-27.
- Sertkaya, G., Ulubaş Ç., Çağlayan K., 2003. Detection and characterization of plum pox potyvirus by DAS-ELISA and RT-PCR/RFLP analysis in Turkey. *Türk. Journal Agric forest*, 27:213-220
- Sipahioğlu, H.M. 1999. *Sanitary Status of Stone Fruits in East Anatolia (Turkey) and Characterization of a Turkish Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV) Isolate Master of Science*. Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari/Italy, Collection Master of Science no:182
- Şen, S.M., 1986a. Ceviz Yetiştiriciliği, Eser Matbaası, *Samsun*.
- Şen, S.M., 1986b. *Ceviz hasadında etherlerin kullanılması. Türkiye I. Yaprak Gübreleri ve Bitki Hormonları Semineri*. A.Ü.Z.F. Antalya, 124-132.
- Torrance, L., 1981. Use of forced buds to extend the period of serological testing in survey fruit tree viruses. *Plant Pathology*, 30:213-216
- Usta M, Sipahioğlu HM, Polat B. 2005. Studies on Parameters Influencing the Performance of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) in Detecting Prunus Necrotic Ringpot Virus (PNRSV), *Phytopathologia Mediterranea*, 44:189-194.
- Yürektürk M., 1984. Marmara Bölgesinde yetiştirilen sert çekirdekli meyvelerde görülen Erik Şarka Virüsü çalışmaları. Atatürk Bahçe Bitkileri Araştırma Enstitüsü, p.37.

- Wetzel, T. Candrasse, G., Ravalandro, M., Dunez, J., 1991. A polmerase chain reaction assay adapted to Plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, **33**:355-365
- Wetzel, T. ,Candrasse, T., Macquaire, G., Ravalonandro, M., Dunez, J., 1992. A highly sensitive immonocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection.*Journal of Virological Methods*, **39**:27-37.
- Zhou, Y., Civerolo, E.L. and Melvin, J.A. 1998. Comparative Nucleotide Sequences of The Coat Protein-Encoding Region of The Genomes of Cherry Leafroll Virus Strains Infecting Walnut. *Acta. Horticulturae*. **472**:321-332

Ek 1

ELISA Testinde Kullanılan Tamponlar Çözeltiler

1. Phosphate Buffered Salina (PBS), pH:7.4 (Fosfat tampon çözeltisi)

• NaCl	8.0 gr
• KH ₂ PO ₄	0.2 gr
• Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	2.9 gr
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	2.3 gr
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1.44 gr
Na ₂ HPO ₄ (Susuz)	1.15 gr
• KCl	0.2 gr
• NaN ₃	0.2 gr

Yukarıda miktarı verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilerek pH 7.4'e ayarlanmış çözelti 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

2. Coating buffer pH 9.6 (Kaplama tampon çözeltisi)

• Na ₂ CO ₃	1.59 gr
• NaHCO ₃	2.93 gr
• NaN ₃	0.2 gr

Yukarıda miktarları belirtilen kimyasallar 1 litre saf su içerisinde eritilip pH 9.6'ya ayarlanarak kullanım süresince 4 °C'de saklanmıştır.

3. Washing buffer (Yıkama tampon çözeltisi)

1 litre fosfat tampon çözeltisi (PBS) içersine 0.5 ml Tween-20 ilave edilerek yıkama tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Kullanım süresince 4 °C'de saklanmıştır.

4. Sample Extraction Buffer (Örnek ekstraksiyon tampon çözeltisi)

1 litre yıkama tampon çözeltisi içersine 20 gr Polyvinylpyrrolidone (PVP-40) ilave edilerek hazırlanmış 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

5. Enzyme Conjugate Buffer (Konjugat tampon çözeltisi)

1 litre örnek tampon çözeltisi içersine 2 gr ovalbumin ilave edilerek hazırlanmıştır.

6 Substrat Buffer pH 9.8 (Substrat Tampon Çözeltisi)

97 ml Diethanolamine 800 ml saf su içine ilave edildikten sonra, 0.2 gr NaN₃ ilave edilmiş ve pH'sı 9.8'e ayarlanarak saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

Ek 2

Total RNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. Grinding Buffer (Ekstraksiyon tampon çözeltisi)

• Guanidine Thiocyanate	4M	23.64 gr/50 ml
• 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.

50 ml hacimde hazırlanacak olan çözelti için yukarıda miktarları verilen kimyasallar steril su içersinde çözündürülür ve kullanım süresince çözündürülür ve kullanım süresince 4 °C’de saklanır.

2. NaI (Sodyum iyodid) solüsyonu

0.75 gr Na₂SO₃ çözeltisi 40 ml steril saf su içerisinde çözündürüldükten sonra 36 gr NaI eklenir ve solüsyon 50 ml’ye saf su ile tamamlanır. Otoklavda steril edildikten sonra ışıktan etkilenmemesi için alimünyum folya sarılır ve 4 °C’de saklanır.

3. Washing Buffer (Yıkama tampon çözeltisi)

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

Yukarıda konsantrasyonları yazılı kimyasallardan 100 µl Tris-HCl’den, 100 µl NaCl’den , 10 µl EDTA’dan alınır 5 ml streil saf suda karıştırılır daha sonra 5 ml ethanol eklenerek 4 °C’de saklanır.

4. Silika süspansiyonunun hazırlanması (pH: 2.0)

500 ml saf su içerisinde 60 gr silica eklenerek iyice karıştırılır ve 24 saat beklenerek silika partiküllerinin dibe çökmesi beklenir. Daha sonra üst sıvı atılarak tekrar 500 ml olacak miktarda steril saf su eklenir ve iyice karıştırılır. 5 saat oda sıcaklığında bekletilir ve 440 ml üstte kalan sıvı atılır geriye kalan 60 ml silika süspansiyonu alınır pH’sı 2.0 ayarlanarak otoklavda steril edilir ve ışıktan etkilenmemesi için alimünyum folya ile sarılarak oda sıcaklığında saklanır.

Ek 3

Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. 50X TAE Koşum Tamponu Stok Solüsyon

- 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

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

2. 1X TAE Koşum Tamponunun Hazırlanması

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

Ek.4

Western Blot Analizinde Kullanılan Jel Konsantrasyonlarının Hazırlanması

1.%13'lük Ayırma Jeli (10 ml)

• %30 Acrylamide/Bisacrylamide*	4.3 ml
• Tris (pH 8.7) 1.5 M	2.5 ml
• Destile su (Vakum altında gazdan arındırılmış)	3.1 ml
• %10 SDS	0.1 ml
• %10 Ammonium persulfate	120 µl
• TEMED	12 µl

3. %5'lik Yığma Jeli (10 ml)

• %30 Acrylamide/Bisacrylamide*	1.7 ml
• Tris (pH 8.7) 1.5 M	2.5 ml
• Destile su (Vakum altında gazdan arındırılmış)	5.7 ml
• %10 SDS	0.1 ml
• %10 Ammonium persulfate	120 µl
• TEMED	12 µl

*= % 30'luk Acrylamide/Bisacrylamide hazırlanışında 29.2 gr acrylamide, 0.8gr bisacrylamide 100 ml steril saf suda çözündürülerek hazırlanır.

Ek 5

Western Blot Analizi

Protein büyüklüğüne göre protein moleküllerini ayırmada etkin biçimde kullanılacak ayırma jeli konsantrasyonları

<u>Acrylamide Yüzdesi (Ayırma Jeli %)</u>	<u>Transfer edilen büyüklük (kD)</u>
5-7	29-150 kD
8-10	14-66 kD
13-15	<36 kD
18-20	<20 kD

Farklı oranlarda PAGE jeli hazırlayabilmek için ihtiyaç duyulan jel bileşenleri

<u>Jel Yüzdesi</u>	<u>H₂O (ml)</u>	<u>%30 Acrylamide/ Bisacrylamide (ml)</u>	<u>Jel Buffer (ml)</u>	<u>%10 w/v SDS</u>
%4	6.1	1.3	2.5	0.1
%5	5.7	1.7	2.5	0.1
%6	5.4	2.0	2.5	0.1
%7	5.1	2.3	2.5	0.1
%8	4.7	2.7	2.5	0.1
%9	4.4	3.0	2.5	0.1
%10	4.1	3.3	2.5	0.1
%11	3.7	3.7	2.5	0.1
%12	3.4	4.0	2.5	0.1
%13	3.1	4.3	2.5	0.1
%14	2.7	4.7	2.5	0.1
%15	2.4	5.0	2.5	0.1
%16	2.1	5.3	2.5	0.1
%17	1.7	5.7	2.5	0.1

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Van’da doğdu. İlköğretimini Van’da tamamladı. Lise öğrenimini Van Ziraat Meslek Lisesinde bitirdi. 2000 yılında Tarım ve Köyişleri Bakanlığı’nda Ziraat Teknisyeni olarak göreve başladı. Aynı yıl Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bitkisel Üretim bölümüne girdi ve 2004 yılında Bitki Koruma bölümünden Fakülte birincisi olarak mezun oldu. 2004 yılının Eylül ayında aynı bölümde yüksek lisans tez çalışmasına başladı. Halen Tarım Bakanlığı İl kontrol Laboratuvarında Ziraat Mühendisi olarak görev yapmaktadır.