T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇANAKKALE İLİ EV BAHÇELERİNDE YETİŞTİRİLEN SOĞANLI SÜS BİTKİLERİNDE HIYAR MOZAİK VİRÜSÜ'NÜN SEROLOJİK VE MOLEKÜLER TEŞHİSİ

Burçin SOYLU

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: **29/01/2014**

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

ÇANAKKALE

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

BURÇİN SOYLU tarafından **Prof. Dr. SAVAŞ KORKMAZ** yönetiminde hazırlanan **"ÇANAKKALE İLİ EV BAHÇELERİNDE YETİŞTİRİLEN SOĞANLI SÜS BİTKİLERİNDE HIYAR MOZAİK VİRÜSÜ'NÜN SEROLOJİK VE MOLEKÜLER TEŞHİSİ"** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

Danışman

Doç. Dr. Figen MERT-TÜRK

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Zeliha GÖKBAYRAK

Jüri Üyesi

Sıra No :

Tez Savunma Tarihi: 29/01/2014

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Burçin SOYLU

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanmasında ve yürütülmesinde, bilgi, deneyim ve yardımlarını benden esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Savaş KORKMAZ'a çok teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans tezi jüri üyelerinden Sayın Doç. Dr. Figen MERT-TÜRK'e ve Sayın Doç. Dr. Zeliha GÖKBAYRAK'a yapıcı ve yönlendirici fikirleriyle katkıda bulundukları için teşekkürlerimi sunarım.

Arazi çalışmalarım süresince her zaman yanımda olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Ziraat Mühendisi Yiğit REGAY'a, tez çalışmamın tüm aşamalarında yönlendirici ve olumlu katkılarından dolayı Arş. Gör. H. Tuna TUZLALI'ya ve analiz çalışmalarımdaki yardımlarından dolayı Arş. Gör. Ali KARANFİL'e çok teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans çalışmalarım sırasında da maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen ve beni hep destekleyen aileme değerli anneme ve babama sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Burçin SOYLU

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Santigrad derece
A	Adenin
APS	Amonyum persülfat
ark.	Arkadaşları
*Bam*HI	Endonükleaz restriksiyon enzimi
bç	Baz çifti
bp	Base pair (baz çifti)
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Sitozin
CARNA	*Cucumber mosaic virus* associated ribonükleik asit
cDNA	Komplementer (Tamamlayıcı) deoksiribonükleik asit
CMV	*Cucumber mosaic virus* (Hıyar mozaik virüsü)
CP	Coat Protein (Kılıf protein)
da	Dekar
DAC-ELISA	Direct antigen coating-ELISA
DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich- ELISA
DDT	Dithiothreitol
DEP	Son seyreltme noktası
dH_2O	Steril su
DIBA	Dot immunobinding assay
dk.	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
dsRNA	Çift iplikli ribonükleik asit
EBIA	Electroblot Immunoassay
EcoRI	Endonükleaz restriksiyon enzimi
ELISA	Enzim Linked Immunosorbent Assay
EtBr	Etidyum bromür

EtOH	Etil alkol
F	Forward (ileri)
g	Gram
G	Guanin
HCI	Hidroklorik asit
*Hind*III	Endonükleaz restriksiyon enzimi
IC-RT-PCR	Immunocapture RT-PCR
IgG	Antibadi
ISEM	Immunosorbent electron microscopy
kb	Kilo base (kilobaz)
KCI	Potasyum klorür
kDa	Kilo dalton
M	Molarite
mg	Miligram
$MgCI_2$	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
*Mlu*I	Endonükleaz restriksiyon enzimi
mM	Milimolar
MP	Movement protein (hareket proteini)
mRNA	Messenger RNA (mesajcı RNA)
*Msp*I	Endonükleaz restriksiyon enzimi
NaCI	Sodyum klorür
NaN_3	Sodyum azid
nm	Nanometre
nt	Nükleotid
ORF	Okunabilir açık alanlar
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
pmol	Pikomol
PNPP	P-nitro-phenyl-phosphate

PVP	Polyvinylpyrrolidone
R	Reverse (geri)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonükleik asit
RNAz	Ribonükleaz
rpm	Dakikadaki devir sayısı
RT-PCR	Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
sat-RNA	Satellit RNA
SDS	Sodyum dedosil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dedosil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
SK5CMV	CMV'ye spesifik primer
SK6CMV	CMV'ye spesifik primer
sn	Saniye
sp.	Species (tür)
spp.	Türler
ssRNA	Tek iplikli ribonükleik asit
T	Timin
Taq	Termo stabil polimeraz enzimi
TAS-ELISA	Triple Antibody Sandwich- ELISA
TBS-T	Tris buffer salin-Tween 20
TEMED	Tetrametiletilendiamin
TIN	Termal inaktivasyon noktası
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UV	Ultraviyole
V	Volt
vb	Ve benzeri
WBA	Western blot analizi
µl	Mikrolitre

ÖZET

ÇANAKKALE İLİ EV BAHÇELERİNDE YETİŞTİRİLEN SOĞANLI SÜS BİTKİLERİNDE HIYAR MOZAİK VİRÜSÜ'NÜN SEROLOJİK VE MOLEKÜLER TEŞHİSİ

Burçin SOYLU

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

29/01/2014, 50

Bu çalışmada, Çanakkale ili Merkez ilçeye bağlı Kepez ve Güzelyalı beldeleri ile Karacaören köyünde soğanlı süs bitkilerinin yetiştiriciliğinin yapıldığı ev bahçelerinde 2012-2013 yıllarında bir sörvey çalışması yürütülerek Hıyar mozaik virüsü (*Cucumber mosaic virus*; CMV)'ne benzer simptom gösteren nergis, sümbül, zambak gibi soğanlı süs bitkilerinden 67 örnek toplanmıştır. Toplanan örnekler, CMV'nin varlığının belirlenmesi amacıyla DAS-ELISA yöntemiyle test edilmiştir. DAS-ELISA testleri sonucunda 67 örnekten 12'si (%18) CMV ile infekteli bulunmuştur. Belirgin olarak virüs-benzeri simptom göstermesine karşın DAS-ELISA testi sonucunda şüpheli bulunan örnekler ile negatif olarak tespit edilen örneklerden rastgele seçilen iki örnek RT-PCR analizi ile test edilmiştir. RT-PCR testleri sonucunda da bu örnekler negatif olarak bulunmuştur. DAS-ELISA testleri sonucunda pozitif olduğu bilinen bazı izolatlarla yapılan Western blot analizi sonucunda 24 kDa moleküler ağırlığa sahip bantlar elde edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Çanakkale, Hıyar Mozaik Virüsü, Soğanlı Süs Bitkileri, DAS-ELISA, RT-PCR.

ABSTRACT

SEROLOGICAL AND MOLECULAR DIAGNOSIS OF *CUCUMBER MOSAIC VIRUS* (CMV) ON BULBOUS ORNAMENTAL PLANTS GROWN AT HOME GARDENS IN ÇANAKKALE PROVINCE

Burçin SOYLU

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Plant Protection Departmant Thesis, Master of Science

Advisor: Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

29/01/2014, 50

In this study, a survey was conducted in home gardens of Kepez and Güzelyalı towns and Karacaören village connected to the central district of Çanakkale Province in ornamental bulb plants like daffodils, hyacinths and lilies that show *Cucumber mosaic virus*-like symptoms in year 2012-2013. A total of 67 samples were collected from these areas and tested by DAS-ELISA for the presence of CMV. As a result of the DAS-ELISA (18%) 12 out of 67 samples were found infected with CMV. Two randomly selected samples from the samples that show significant symptoms with negative results from DAS-ELISA test and samples that resulted suspicious in the test, are tested with RT-PCR analysis. These samples were found to be negative as the result of RT-PCR. As the result of Western blot analysis with positive isolates from DAS-ELISA tests, bands with 24 kDa molecular weight were obtained.

Keywords: Çanakkale, *Cucumber Mosaic Virus*, Ornamental Bulb Plants, DAS-ELISA, RT-PCR.

İÇERİK

Sayfa

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU....ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI....iii
TEŞEKKÜR....iv
SİMGELER VE KISALTMALAR....v
ÖZET....viii
ABSTRACT....ix
BÖLÜM 1 – GİRİŞ....1
BÖLÜM 2 – ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR....6
BÖLÜM 3 – MATERYAL VE YÖNTEM....22
3.1. Arazi Çalışması....22
3.2. DAS-ELISA Testi....22
3.3. Oligonükleotid Primerlerin Hazırlanışı....23
3.4. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)....24
3.5. Western Blot Analizi....26
BÖLÜM 4 – ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA....28
4.1. Arazi Çalışmaları Bulguları....28
4.2. DAS-ELISA Testi Bulguları....31
4.3. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi Bulguları....35
4.4. Western Blot Analizi Bulguları....39
BÖLÜM 5 – SONUÇ VE ÖNERİLER....42
KAYNAKLAR....44
Çizelgeler....I
Şekiller....II
Özgeçmiş....III

BÖLÜM 1
GİRİŞ

Günümüzde giderek artan kentleşme ve sanayileşme çabaları sonucu doğal ve kültürel varlıklarımız büyük bir hızla tahrip olmaktadır. Bu şekilde doğadan uzaklaşan insanların yeşil alan ve bitkilere duyduğu özlem artmaktadır. Günümüz insanı bu özlemi, ancak kendi yaşadığı ortam içinde yetiştirme imkânı bulabildiği canlı, renkli, kokulu, yapraklı veya çiçekli süs bitkileriyle gidermeye çalışmaktadır (Korkut ve İnan, 2002). Bundan dolayı tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de süs bitkileri yetiştiriciliği büyük önem arz etmektedir.

Süs bitkileri, ev bahçelerinde ve iç mekânlarında yer almalarının yanı sıra aynı zamanda ticari anlamda da yetiştiriciliği yapılarak, ekonomik anlamda büyük önem taşırlar. Ticari anlamda yetiştiriciliği yapılan süs bitkilerinin üretiminin kontrollü koşullarda yapılması, bu bitkileri hastalık ve zararlılara karşı ev bahçelerinde yetiştirilen süs bitkilerine göre daha sağlıklı kılmaktadır. Ancak ev bahçelerinde üretimi yapılan süs bitkilerinde ise ekonomik anlamda beklentilerin olmaması ve bununla birlikte bilinçsizce üretim yapılmasından dolayı bu bitkilerin hastalıklara ve zararlılara karşı daha açık konumda bulundukları net olarak bilinmektedir. Tüm bu hastalık ve zararlılar, ev bahçelerinde bulunan süs bitkilerinde zarar oluşturmalarının yanı sıra bu bitkileri konukçu olarak seçip, yakın çevrelerde bulunan kültür bitkileri için de ayrıca tehlike arz etmektedirler. Çanakkale ili ev bahçelerinde üretimi yapılan süs bitkilerinin başında nergis, sümbül, zambak, lale gibi soğanlı süs bitkileri yer almaktadır.

Soğanlı süs bitkileri; kokulu, gösterişli, renkli çiçeklere sahip olması bakımından kesme çiçek olarak vazolarımızda, çevre düzenlemesi olarak bahçelerimizde ve saksı bitkisi olarak evlerimizde tercih edilmektedir. Soğanlı bitkilerin büyük bir çoğunluğu, doğal yaşam alanlarında görüldüğü gibi, park ve bahçelerde de kullanılan önemli bitkisel materyallerdir. Doğada yetişen türlerin erken ilkbaharda bazen de kar ile birlikte çiçek açmaları, insanlar tarafından baharın müjdecisi olarak yorumlanmıştır. Bundan dolayı çiçek soğanları dünyada en çok sevilen çiçekler arasındadır ve her geçen gün popülerlikleri artmaktadır (Atay, 1996).

Nergis ve sümbül en çok tercih edilen soğanlı süs bitkileridir. İzmir ve çevresi özellikle Karaburun ve Mordoğan, nergis ve sümbülün orijini olan, kesme çiçek olarak yetiştirildiği yerdir (Zeybekoğlu ve ark., 2002).

Amaryllidaceae (Nergisgiller) familyası üyelerinden *Narcissus* cinsine bağlı olan nergis, gerçek soğanlı bitki grubundan olup bahar ayında çiçeklenir. Nergis; güzel çiçeklerinden dolayı süs ve peyzaj bitkisi, soğanlarının içerdiği galanthamine maddesi sebebiyle tıbbi bitki olarak ve hoş kokulu çiçeklerinden elde edilen uçucu yağ ile parfümeri ve kozmetik sektöründe yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Hanks, 2002). Sahip olduğu, kokulu ve kokusuz kültür çeşitleri, beyaz, sarı, turuncu, kırmızı, pembe ve yeşil renkleri ve değişik çiçek formları ile farklı tüketici taleplerine hitap edebilmektedir (Zeybekoğlu, 2010). Diğer kesme çiçeklere göre daha az masrafla yetiştirilmesi, diğer çiçeklerin pek bulunmadığı kış aylarında çiçek açmaları, kuraklığa ve diğer stres koşullarına daha dayanıklı oluşu gibi özellikleri nedeniyle diğer süs bitkileri arasında ayrı bir yeri bulunmaktadır. Ayrıca çiçekleri kadar soğanlarının da kazanç sağlaması, üreticiler açısından ayrı bir önem taşımaktadır (Uzmay ve ark., 2001).

Sümbül, Hyacinthaceae (Sümbülgiller) familyası üyelerinden *Hyacintus* cinsine ait erken ilkbaharda çiçek açan hoş kokulu çok yıllık soğanlı süs bitkilerimizden bir diğeridir. Ülkemizde doğal olarak bulunan bu çiçek zamanla Avrupa'ya götürülmüş, özellikle Hollandalılar birçok çeşidini geliştirmişlerdir. Sümbül çiçekleri mavi, mor, sarı, kırmızı, uçuk pembe veya beyaz renklerde olup ağır ve tatlı bir kokuları vardır. Dikildikleri yerde sürekli çoğalırlar ve yetiştiricilikleri kolaydır (Acarsoy, 2006).

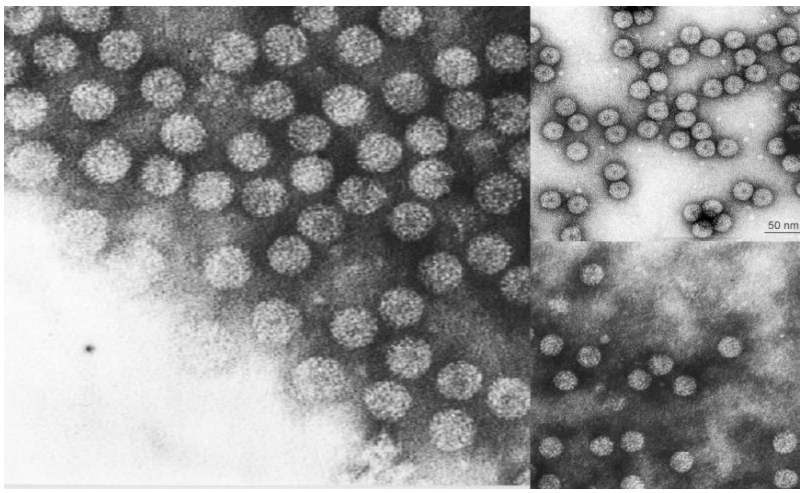
Zambakgiller (Liliaceae) familyasının *Lilium* cinsine ait zambak, soğanlı süs bitkileri içerisinde ilk çağlardan beri bilinen türlerden biridir. Bahçe ve süs bitkisi olarak kullanımının yanı sıra tıbbi amaçla da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Mimaki ve ark., 1999).

Türkiye İstatistik Kurumunun (TUİK) 2011 yılı istatistiklerine göre; Türkiye'de toplam 42.198 dekar alan kaplayan süs bitkileri alanlarının dağılışına bakıldığında toplam 13.941.000 adet nergis, 12.614.460 adet zambak, 10.107.000 adet sümbül üretimi yapılmıştır. Bölgeler bazında nergis üretim miktarı değerlendirildiğinde 7.253.000 adet ile Ege Bölgesi birinci sırayı almaktadır. 5.018.000 adet ile Batı Anadolu Bölgesi nergis üretiminde 2. sırada olup 8.117.500 adet ile de sümbül üretiminde 1. sırayı almaktadır. Zambak üretim miktarı ise 6.147.060 adet ile Ege Bölgesi'nde en çok yetiştirilmektedir. Batı Marmara Bölgesi'nde (Tekirdağ, Edirne, Kırklareli, Balıkesir, Çanakkale) toplamda 3538 da alanda süs bitkileri yetiştiriciliği yapılmaktadır. Balıkesir ve Çanakkale illerine baktığımızda 441 da alanda 67.500 adet üretim ile Balıkesir ilinde süs bitkileri ticari olarak üretilmekte iken Çanakkale ilinde süs bitkileri için ticari anlamda bir veri elde edilmemiştir.

Süs bitkileri yetiştirirken hastalık ve zararlılar yönünden bazı sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bu hastalıklar arasında viral hastalık etmenleri, mekanik olarak bulaşabilmeleri, tohumla, polenle veya vejetatif üretim materyalleriyle taşınabilmeleri ve tüm bunların yanı sıra vektör böcekler ile uzak mesafelere yayılabilmeleri gibi özelliklerinden dolayı diğer hastalık etmenlerinden ayrılırlar. Aynı zamanda bitki virüs hastalıklarının kimyasal mücadelelerinin olmaması da bu hastalıklara karşı mücadeleyi zorlaştırmaktadır.

Kültür bitkilerinde hastalık yapan virüs hastalıklarının başında Hıyar mozaik virüsü (*Cucumber mosaic virus*; CMV) gelmektedir. CMV, Tütün mozaik virüsü'nden (*Tobacco mosaic virus*; TMV*)* sonra en fazla konukçu dizisine sahip virüstür (Çağlar, 2006). CMV sebze, meyve ve süs bitkileri dâhil birçok monokotiledon ve dikotiledon olmak üzere 100'den fazla familya ve 1200 bitki türünde hastalık yapabilmektedir (Zitter ve Murphy, 2009).

Hıyar mozaik virüsü (CMV), Bromoviridae familyası içerisinde *Cucumovirus* cinsinin en önemli üyelerinden birisidir. CMV, izometrik ve zarf içermeyen, yaklaşık olarak 29-30 nm çapında yuvarlak şekilli, üç parçacıklı (+) ssRNA genomuna sahip ve tek bir partikülden oluşan bir virüstür (Palukaitis ve Garcia-Arenal, 2003). Hıyar mozaik virüsü'nün elektron mikroskobu görüntüsü Şekil 1.1'de gösterilmiştir. *Banana infectious chlorosis virus, Coleus mosaic virus, Cowpea ringspot virus, Lily ringspot virus, Pea top necrosis virus, Peanut yellow mosaic virus, Soybean stunt virus, Tomato fern leaf virus, Pea western ringspot virus* hastalık etmeni virüsün sinonimleridir (Anonim, 2013).

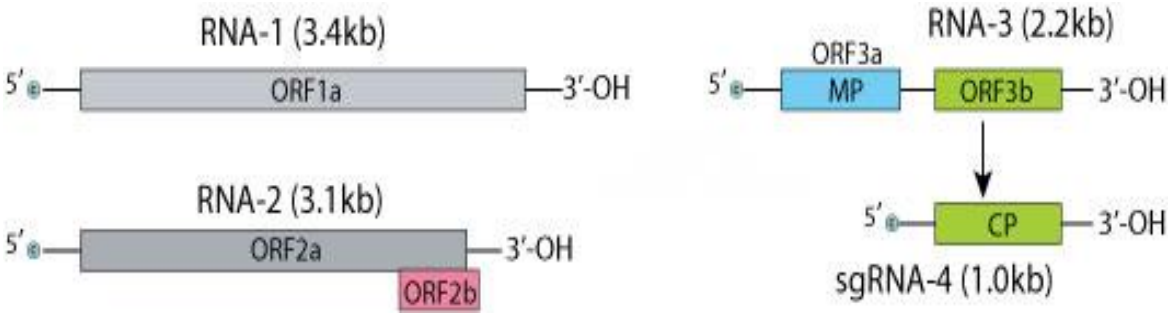


Şekil 1.1. Hıyar mozaik virüsü'nün elektron mikroskobu görüntüsü
Anonim, 2013. http://pvo.bio-mirror.cn/images/d6.jpg
Milne, 2013. http://ictvdb.bio-mirror.cn/Images/Milne/cucumsv.htm.

CMV, ilk olarak *Cucumis sativus* (hıyar) bitkisi üzerinde 1934 yılında Amerika'da Price tarafından rapor edilmiştir. Dünya'da çok yaygın bir virüstür. Termal inaktivasyon noktası 55-70°C, *in vitro*da yaşam süresi 1-10 gündür (Francki ve Habili, 1987).

CMV, alt grup I ve alt grup II olmak üzere iki ana alt gruba ayrılmaktadır. Alt grup I'de kendi içerisinde IA ve IB olarak iki bölümde sınıflandırılmaktadır (Hsu ve ark., 2000). Farklı alt gruplar içerisinde bulunan her ırk birbirinden farklı olarak biyolojik, serolojik ve genetik özelliklere sahiptirler ve bu farklılıklar virüsün doğadaki davranışlarını etkilemektedir. CMV'nin çok sayıda ırkı olup, doğada simptomları çok farklı biçimlerde gözlenebilmektedir. Ayrıca CMV, simptomların oluşumunu etkileyen satellit RNA'lar için yardımcı virüs görevi üstlenmektedir (Çağlar, 2006).

Partiküller içerisinde genomik olmayan nükleik asitler de mevcut olup genomik ve subgenomik (mRNA ya da sat-RNA) nükleik asitler birlikte paketlenmişlerdir. Partiküller doğrusal, pozitif yüklü ve tek iplikli RNA-1, RNA-2, RNA-3 ve RNA-4'ten meydana gelmiştir. En uzun segment (RNA-1) 3400 nt, ikinci uzunluktaki segment (RNA-2) 3100 nt, üçüncü segment (RNA-3) 2200 nt, dördüncü segment ise (RNA-4) 1000 nt molekül ağırlığındadır. RNA-3 üzerinde bulunan mRNA olarak isimlendirilen RNA-4 kılıf proteinini kodlamaktadır. Genomik RNA'lar tek tek paketlenmesinin yanı sıra RNA-4 ve RNA-3 birlikte paketlenirler (Lot ve Kaper, 1976). Viral genom RNA-1, RNA-2 ve tek molekülden oluşan RNA-3 ve RNA-4 olmak üzere üç farklı partikülden meydana gelmiştir. CMV'nin viral genomu Şekil 1.2'de gösterilmiştir**.** CMV'nin, bitkiyi infekte edebilmesi için partiküllerin hepsine ayrı ayrı ihtiyacı vardır.



Şekil.1.2. Hıyar mozaik virüsü genom şeması
(Anonim, 2009. http://viralzone.expasy.org/all_by_species/135.html).

RNA-1, 1a proteinini kodlamaktadır ve bu protein virüsün replikasyonunda görev almaktadır. RNA-2, 2a ve 2b proteinini kodlamaktadır ve bu protein ise RNA'ya bağlı RNA polimeraz ve viral replikasyon entegrasyonunu sağlamaktadır. RNA-3 ise hareket

proteini olan 3a proteinini ve örtü proteininin (CP) sentezinde görev alan (subgenomik RNA iplikçiğinden yalnızca örtü proteininin genini kodlar) 3b proteinini kodlamaktadır. RNA-3 aynı zamanda RNA-4'ün sentezlenmesinde de görev almaktadır (Palukaitis ve Garcia-Arenal, 2003).

Hıyar mozaik virüsü ile ilgili olan bir diğer RNA türü ise, satellit RNA olarak isimlendirilen CARNA-5'tir (Kaper ve Waterworth, 1981; Martelli ve Quacquarelli, 1988).

CMV, 33 cins içerisindeki 80 kadar yaprak biti türü ile böcek bünyesinde non-persistent taşınabilmektedir ve taşınma oranı yaprak biti türüne ve konukçu bitki çeşidine göre değişmektedir (Palukaitis ve Garcia-Arenal, 2003). Bununla birlikte, Japonya'da bazı CMV streynleri ve konukçu bitki kombinasyonlarında yaprak biti ile semi-persistent taşınma rapor edilmiştir (Kameya-Iwaki ve ark., 2000). *Myzus persica* ve *Aphis gossypii* Glov. CMV'yi taşıyan en yaygın afid türleridir ve virüsün deneysel olarak taşınmasında da yaygın olarak kullanılmaktadır (Palukaitis ve Garcia-Arenal, 2003). CMV, yaprak bitleri dışında mekanik olarak, tohumla, fungusla ve aşı yoluyla da sağlıklı bitkilere taşınmaktadır. Ayrıca CMV, hastalıklı bitki artıklarında varlığını sürdürebilmekte ve bu yolla da taşınabilmektedir. Bunların dışında birçok yabancı ot, virüse konukçuluk yapmakta ve hastalığın yayılmasında etkili olmaktadır.

CMV, süs bitkilerinin kalitesinin bozulmasında büyük bir rol oynamaktadır. Çünkü konukçularında sadece doğrudan zarar yapmaz, bunun yanında bitkiyi diğer hastalık ve zararlılara karşı uygun konukçu durumuna da getirir. Ayrıca infekteli bitkiler, virüsün yayılmasında ana kaynak olarak kabul edilmektedir (Palukaitis ve ark., 1992).

CMV, konukçuları üzerinde, etmenin streynine ve konukçuya bağlı olarak değişmekte ve çok çeşitli simptomlara neden olmakta ya da latent olarak bulunabilmektedir. Virüs yabancı otlarda simptomsuz olarak bulunmaktadır.

Bu çalışmada, Çanakkale ili Kepez beldesi, Güzelyalı beldesi ve Karacaören köyünde soğanlı süs bitkilerinin yetiştirildiği ev bahçelerinde bir arazi çalışması yürütülerek Hıyar mozaik virüsü (CMV) simptomlarına benzer simptom gösteren nergis, zambak, sümbül gibi soğanlı süs bitkilerinden örnekler alınarak bu bitkilerde var olduğu düşünülen CMV'nin, serolojik DAS-ELISA ve Western blot, moleküler RT-PCR yöntemlerinden faydalanılarak teşhisi amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Brunt (1955), İngiltere'de bulunan üç çiftlikteki nergis bitkilerinden toplamda 12 örnek toplamıştır. Bu örnekler üzerinde yapmış olduğu çalışmalarda örneklerin 7 virüs ile infekteli olduğunu bulmuştur. Bu virüslerden ikisinin başka bir çalışmada kaydedilen *Narcissus yellow stripe virus* (Nergis sarı çizgi virüsü) ve *Narcissus mosaic virus* (Nergis mozaik virüsü) olduğunu, diğer 5 virüsün ise *Cucumber mosaic virus* (Hıyar mozaik virüsü), *Tobacco rattle virus* (Tütün rattle virüsü), *Arabis mosaic virus* (Arabis mozaik virüsü), *Tomato black ring virus* (Domates siyah halka virüsü) ve *Strawberry latent ring spot virus* (Çilek durgunluk halkalı leke virüsü) olduğunu bu çalışmasında tespit etmiştir.

Türkoğlu ve Fidan (1996), Ege Bölgesi'nde ticari amaçla üretilen süs bitkilerinden krizantem, nergis, zambak ve lalelerde virüs hastalıkları üzerine bir çalışma yapmışlardır. Virüs hastalıkları belirtilerine benzer belirtiler gösteren örnekleri mekanik inokulasyon yöntemiyle *Chenopodium amaranticolor* (kazayağı) *ve Nicotiana tabacum* cv. "Samsun" (tütün) test bitkilerine inokule etmişlerdir. Bu izolatların test bitkilerinde gösterdikleri belirtilere ve fiziksel özelliklerine göre tanılama çalışmaları yapmışlardır. Ayrıca virüs izolatlarının son seyreltme (DEP) ve termal inaktivasyon noktalarını da (TIN) saptamışlardır. Mozaik belirtisi gösteren krizantemlerden elde ettikleri virüs izolatlarının Krizantem mozaik virüsü olduğunu saptamışlardır. Yapraklarda sarı-yeşil çizgiler şeklinde renk değişikliği gösteren bitkilerden elde ettikleri nergis izolatlarının Nergis mozaik virüsü olduğunu saptamışlardır. Topladıkları Hollanda lalelerinin taç yapraklarından izole ettikleri virüsün Lale kıran virüsü olduğunu teşhis etmişler ve test bitkilerinde simptom oluşumunu gözlemlemişlerdir. Yapraklarda şeritvari lekeler gösteren bitkilerden elde ettikleri zambak izolatının Zambak mozaik virüsü olduğunu bulmuşlardır. Yaptıkları mekanik inokulasyon çalışmaları sonucunda virüsün *C. amaranticolor*'da klorotik lokal leke, *Chenopodium quinoa* (ak kazayağı) test bitkisinde nekrotik lokal leke, *Nicotiana glutinosa* (tütün) test bitkisinde sistemik mozaik belirtileri oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Bu virüs izolatının DEP değerini 10^{-7} ve TIN değerini 95°C olarak bulmuşlardır. Elde edilen sonuçların Smith (1957) tarafından kaydedilen, Hıyar mozaik virüsü'nün (CMV) neden olduğu Zambak mozaik hastalığı tanımlamalarına uygunluk gösterdiğini belirtmişlerdir.

Raj ve ark. (1998), *Gladiolus psittacinus* (glayöl)'larda Hıyar mozaik virüsü'nü tespit etmek amacıyla bir araştırma yürütmüşlerdir. Bu kapsamda kullandıkları RT-PCR

yönteminin yanında mekanik inokulasyon çalışmaları, afid ile taşıma denemesi ve elektron mikroskobu çalışmalarına da yer vermişlerdir. Materyal olarak glayöllerin çiçek, yaprak, kök, gövde, soğan gibi kısımlarından örnekler alarak analiz etmişlerdir. Topladıkları örneklerde şiddetli mozaik, yapraklarda koyu yeşil çizgiler ve taç yapraklarında renk kırılmaları gözlemlemişlerdir. Yaptıkları mekanik inokulasyon çalışmaları sonucunda *Nicotiana tabacum* cv. White Burley (tütün) test bitkisinde nekrotik lokal lezyonlar; *N. rustica* (tütün) bitkisinde sistemik mozaik, kabarcıklaşma ve yaprak deformasyonları; *Lycopersicon esculentum* (domates) bitkisinde ise sistemik mozaik belirtileri tespit etmişler fakat *N.glutinosa*'da mekanik inokulasyondan 30 gün sonra bile simptom gözlemleyememişlerdir. Yaprak biti *Myzus persicae* ile yaptıkları taşıma denemesinde glayölden *N. tabacum* cv. White Burley'e virüsün non-persistent olarak %12,5 oranında taşındığını bulmuşlardır. Yapmış oldukları RT-PCR analizi ile CMV'nin RNA-3 bölgesini uygun primerler kullanarak çoğaltmışlardır ve bunun sonucunda virüsün kılıf proteini geninin (CMV-CP) 540 bç büyüklüğüne karşılık gelen bantlarını %1'lik agaroz jelde etidyum bromürün (EtBr) varlığında elektroforez ederek gözlemlemişlerdir.

Clark ve Guy (2000), Yeni Zelanda, Otaga'da virüs-benzeri simptom gösteren nergis bitkilerinde var olan virüslerin tanılanması ve virüs simptomlarıyla olan ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla bir araştırma yürütmüşlerdir. Bu çalışmada serolojik ELISA testi ve mekanik taşınma yöntemlerini kullanmışlardır. Topladıkları 136 örneği *Chenopodium amaranticolor, C. murale* (duvar kazayağı), *C. quinoa, Nicotiana benthamiana* (tütün) ve *N. tabacum* cv. White Burley test bitkilerine mekanik olarak taşımışlardır. Sonuçta Otaga şehrinin 5 semtinde yüksek oranda virüsle infekteli bitkiler bulmuşlardır. Çalışma kapsamında topladıkları nergis bitkilerinde toplam 5 farklı virüs (*Cucumber mosaic virus* (CMV), *Narcissus latent virus* (NLV), *Narcissus mosaic virus* (NMV), *Narcissus tip necrosis virus* (NTNV) ve *Narcissus yellow stripe virus* (NYSV)) tespit etmelerine rağmen daha önce Yeni Zelanda'da nergis bitkilerinde bildirilen *Tobacco rattle virus* (TRV) hastalığını bu çalışmada tespit edememişlerdir. Yüksek oranda NYSV ile infekteli nergis örneklerini hem karışık hem de tek infeksiyon halinde bulmuşlardır. Örnek aldıkları 5 bölgenin 4'ünde CMV'nin diğer virüslerle karışık infeksiyon oluşturduğunu bildirmişlerdir. Sadece CMV ile infekteli bitkilerin ya hiçbir belirti göstermediklerini ya da hafif mozaik simptomu gösterdiklerini rapor etmişlerdir. NTNV ve NYSV'yi araştırılan beş bölgenin tümünde tespit etmişlerdir. NTNV ile infekteli bitkilerin yapraklarının tek ve karışık infeksiyonu birlikte bulundurduklarını saptamışlardır. NYSV'nin bulunma oranının diğer virüslerin bulunma oranından önemli ölçüde daha yüksek olduğu sonucuna

varmışlardır.

Chen ve ark. (2001), farklı bölgelerden aldıkları süs bitkilerinden elde ettikleri CMV izolatlarının karakterizasyonunu gerçekleştirmek için bir çalışma yürütmüşlerdir. CMV izolatlarının 8 tanesini Hollanda'dan; toplam 5 zambak izolatının 2 tanesini de Tayvan'dan elde etmişlerdir. Toplam 13 CMV izolatın sekans analizini yapmak için öncelikle CMV izolatlarını tütün bitkisine mekanik inokulasyon yöntemiyle inokule etmişlerdir. Daha sonra CMV ile infektelenmiş tütün yapraklarından total RNA ekstraksiyonunu gerçekleştirerek RT-PCR analizini uygulamışlardır. RT-PCR çalışmalarının sonucunda; Hollanda'dan gelen *Alstroemeria* spp. (peru zambağı) izolatı hariç diğer 12 izolatın yaklaşık olarak 1100 nt'e karşılık gelecek şekilde bant oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Klonlama çalışmalarının sonucunda nükleotid dizilerinin karşılaştırılmasında izolatların genellikle coğrafik olarak toplandıkları bölgenin izolatları ile benzerlik gösterdiğini, 5 zambak izolatının ise farklı bölgelerden toplanmasına rağmen yüksek oranda benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bunlarla birlikte peru zambağı ve çiğdem bitkilerinden izole ettikleri CMV izolatlarının alt grup II'de; zambak, glayöl, horozibiği, hezaren çiçeği ve rüzgar çanı süs bitkilerinden izole ettikleri 8 CMV izolatının ise alt grup I sınıflaması içinde yer aldıklarını bulmuşlardır.

Navalinskiene ve Samuitiene (2001), Litvanya'da yetiştiriciliği yapılan bazı soğanlı bitkilerden virüs-benzeri simptom gösterenlerden örnekleme yapmışlardır. Bu örneklerin test edilmesinde, test bitkileri, negatif işaretleme tekniği ve elektron mikroskobu yöntemlerini kullanmışlardır. Mekanik inokulasyon çalışmalarında *Amaranthus caudatus* (amaranthus), *A. paniculatus*, *Datura stramonium* (tatula bitkisi), *N. Tabacum* L. 'Samsun', *N. rustica*, *Cucumis sativus* (hıyar), *Lycopersicon esculentum* Mill. vb. test bitkilerini kullanmışlardır. Test bitkilerinde gözlemledikleri simptomlardan elde ettikleri sonuçlara göre çiğdem, zambak, sümbül, nergis süs bitkilerinden izole ettikleri virüslerin CMV olduğunu tespit etmişlerdir. Çiğdem ve nergis bitkisindeki infeksiyonun CMV tarafından gerçekleştirildiğini serolojik olarak da teyit etmişlerdir. Elektron mikroskobu çalışmalarında CMV'ye ait 30 nm çaplı izometrik partikül yapısını gözlemlemişlerdir. Bunların yanında CMV ile birlikte 10 farklı virüsün de tanılamasını yapmışlardır. Bu virüslerin mekanik inokulasyonunda ise *Hyacinthus mosaic potyvirus* (HyaMV), *Iris mild mosaic potyvirus* (IMMV), *Lily mottle potyvirus* (LMoV), *Lily symptomless carlavirus* (LSV), *Muscari mosaic potyvirus* (MMV), *Narcissus mosaic potexvirus* (NMV), *Narcissus yellow stripe potyvirus* (NYSV), *Tobacco rattle tobravirus* (TRV), *Tomato ringspot nepovirus* (ToRSV), *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV) hastalıkları

olduklarını belirtmişlerdir.

Masuta ve ark. (2002), Japonya ve Kore'den izole ettikleri Hıyar mozaik virüsü'nün (CMV) zambak izolatlarında evrimsel karakterizasyonunu araştırmışlardır. Yürüttükleri bu çalışmada materyal olarak, farklı zambak türlerinde bağımsız olarak izole ettikleri HL-CMV *(Lilium leichtlinii* cv. Hakugin) Japonya izolatını ve Ly2-CMV *(L. longiflorum)* Kore izolatını kullanmışlardır. Mekanik inokulasyon yöntemi ile Hıyar mozaik virüsü'nü zambak bitkilerine inokule etmişlerdir. Oluşan viral infeksiyonları DAS-ELISA ya da RT-PCR yöntemiyle test etmişlerdir. Klonlama ve sekans analizi çalışmalarında kullanmak üzere virüsleri saflaştırmak için tütün bitkisinde çoğaltmışlardır. RNA-3 bölgesinin tam uzunluktaki cDNA klonlarını RT-PCR yöntemini kullanarak Japonya ve Kore izolatlarının RNA-3 bölgesinin nükleotid dizilerini belirlemişlerdir. Aynı zamanda toplamda 36 CMV izolatının 3a ve CP (kod proteini) geninin filogenetik analizlerini yapmışlardır ve 3a ve CP geni için iki izolat arasındaki evrimsel ilişkileri belirlemek amacıyla filogenetik ağaçlar oluşturup karşılaştırarak karakterize etmişlerdir. Her iki CMV izolatı için de 3a genini alt grup IB, CP genini ise alt grup IA içinde sınıflandırmışlardır. CMV'ye ait 3a ve CP geni farklı alt gruplarda oldukları için ayrı ayrı filogenetik ağaçlarını çıkararak, bu virüs izolatlarının sekans analizleri sonucunda RNA-3 bölgelerinin çok yüksek bir benzerlik (%97) gösterdiğini tespit etmişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre HL-CMV ve Ly2-CMV virüs izolatlarının zambak bitkisine iyi adapte olduğunu, fakat diğer konukçuları olan domates ve salatalık bitkilerini hastalandırma yeteneklerini kaybettikleri sonucuna varmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda, Ly2-CMV izolatının zambak türleri arasında daha geniş konukçu genişliğine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ly2-CMV izolatının Kore'de yabani zambak türlerinden elde edildiğini ve diğer yabani zambak türlerinin olduğu bölgelerde duyarlı olan konukçuları infekte edebildiğini, HL-CMV izolatının ise özel tarım koşullarında *L. zeichtlinii* cv. zambak türünde sınırlı kaldığını belirtmişlerdir. Bu çalışma sonucunda araştırmacılar; 3a ve CP geninin nükleotid sekansına göre zambak izolatlarının aynı atadan geldiklerini düşünmüşlerdir ve viral evrimde konukçu genişliğinin başlıca faktör olduğunu belirtmişlerdir.

Sığırcı (2002), biber tarımının yoğun olarak yapıldığı Gaziantep ilinin Nurdağı ve İslâhiye ilçelerinde 2001 yılında biber bitkisinde virüs-benzeri simptomlara neden olan etmenleri saptamak amacıyla bir çalışma yürütmüştür. Araziden topladığı biber örneklerini laboratuvarda biyolojik ve serolojik olarak test etmiştir. Biyolojik testleme için hastalıklı bitki örneklerini mekanik inokulasyon yöntemiyle kazayağı, ak kazayağı, hıyar ve tütün test bitkilerine aşılamıştır. Bu çalışma sonucunda CMV ile bulaşık olduğu tespit edilen

kazayağı ve ak kazayağında klorotik lokal lezyonlar ve tütünde ise sarı mozaik şeklinde simptomlar gözlemlemiştir. Daha sonra DAS-ELISA testi ile örnekleri *Pepper mild mottle virus* (PMMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), CMV, TSWV hastalıklarına karşı test etmiştir. Yapılan testler sonucunda bölgede TMV ve CMV'nin varlığını saptamış, TSWV, PMMV'yi tespit etmemiştir. Toplanan 81 örnekten 33 tanesinin bir veya daha fazla virüsle bulaşık olduğu sonucunu ortaya koymuştur. Bu örnekler içerisinden 17 örneğin TMV, 16 örneğin ise CMV ile infekteli olduğunu saptamıştır.

Raj ve ark. (2002), Hindistan'da 5 farklı glayöl çeşidinde soğanlarda ve yapraklarda şiddetli mozaik, yapraklarda çizgilenme ve renk kırılmaları gözlemlemişlerdir. Bu belirtilere sebep olan etmenin yaprak bitleriyle non-persistent bir şekilde taşınan CMV olduğunu yapmış oldukları serolojik ve moleküler analizlerle tespit etmişlerdir. Serolojik olarak ELISA, ISEM, WBA; moleküler olarak da RT-PCR ve Southern hibridizasyon yöntemlerini kullanmışlardır. Bu yöntemler arasında Southern hibridizasyon tekniğinin en hassas yöntem olduğunu saptamışlardır. ELISA sonuçlarına göre bir örneğin soğanı hariç sadece yaprak kısmında ve diğer 4 örneğin soğanı ve yaprağında CMV'yi tespit etmişlerdir. Ayrıca örneklerin hepsi pozitif bulunurken 3 örnekte virüs konsantrasyonunun daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Virüs partiküllerinin izolasyonu sonucu RNA'ların agaroz jelde görüntülenmesi ile yaklaşık olarak RNA-1'in 3,2 kb, RNA-2'nin 3,0 kb, RNA-3'ün 2,1 kb ve RNA-4'ün 1,0 kb büyüklüğündeki bantlarını elde etmişlerdir. Glayöllerden elde ettikleri 5 adet CMV izolatına spesifik primerler kullanarak RT-PCR analizi uygulamışlardır. RT-PCR analizi sonucunda CMV'ye ait CP geninin yaklaşık 500 bp büyüklüğünde bant oluşturduğunu gözlemlemişlerdir.

Niimi ve ark. (2003), zambak çeşitlerinde viral hastalıklara neden olan CMV, LSV, LMoV hastalıklarının varlığını RT-PCR ve ELISA yöntemlerini kullanarak araştırmışlardır. ELISA testleri sonucunda 4 (%18,2) bitkinin en az bir virüsle infekteli olduğu sonucunu bulmuşlardır. RT-PCR çalışmaları sonucunda ise; 22 bitki örneğinden 18'inin (%81,8) en az bir virüsle infekteli olduğunu, 13 izolatın sadece CMV ile infekteli olduğunu ve 1 izolatın test edilen üç virüsle birlikte karışık infeksiyon oluşturduğunu bulmuşlardır. Yaptıkları RT-PCR analizleri sonucunda CMV'ye ait 408 bç, LSV'ye ait 483 bç, LMoV'ye ait 503 bç'ne karşılık gelen bantlarını elde etmişlerdir. ELISA bulgularında saptayamadıkları virüsleri RT-PCR analizinde elde etmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda RT-PCR yönteminin ELISA yöntemine göre virüsleri tanılamada çok daha duyarlı bir yöntem olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Gutierrez-Villegas ve ark. (2004), Meksika'da ev bahçelerinde amaryllis (*Hippeastrum* spp.) soğanlı süs bitkilerinde sarı lekeli simptomlar gözlemlemişlerdir. Bu simptomların CMV ile ilişkili olup olmadığını araştırdıkları bu çalışmalarında amaryllis (nergis zambağı) bitkilerinden aldıkları örnekleri *Tobacco ring spot virus* (TRSV), CMV, TSWV, *Tobacco etch virus* (TEV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV) ve *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) hastalıklarına karşı DAS-ELISA yöntemi ile test etmişlerdir. DAS-ELISA sonuçlarına göre, topladıkları bitki örneklerinin sadece CMV ile infekteli olduklarını bulmuşlardır. Yaptıkları mekanik inokulasyon çalışmalarında *Nicotiana rustica*'da klorotik halkalarla birlikte mozaik belirtileri ve şiddetli yaprak deformasyonları; *N. glutinosa*'da mozaik ve şiddetli yaprak deformasyonları; *Vigna unguiculata* (börülce) bitkisinde ise lokal nekrotik lezyonlar gözlemlemişlerdir. Bunlarla birlikte inokulasyon yaptıkları patlıcangil ve baklagil familyalarına ait bitkilerde ise gözle görülebilir kayda değer bir simptom oluşmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacıların mekanik inokulasyon yaptıkları *N. rustica*'da ışık mikroskobu altında yaptıkları incelemelerde CMV'nin oluşturduğu kristal inclusion body'lerini gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte Cardenas (1999), CMV'nin kristalden ayrı dört farklı tipte daha inclusion body oluşturduğunu çalışmalarında bildirmişlerdir. Elektron mikroskobu çalışmalarında ise yaklaşık olarak 30 nm çaplı simetrik icosohedral partikül yapılarını gözlemlemişlerdir. Yaptıkları RT-PCR çalışmalarının sonucunda, RT-PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezde koşturulmasıyla CMV'nin CP geninin 650 bç büyüklüğüne karşılık gelen bantlarını elde etmişlerdir.

Gümüş ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada ülkemizdeki sebze yetiştiriciliği ve tohumluk üretimi için önemli olan bazı kabakgil türlerinin tohumlarında bulunan viral hastalık etmenlerinin belirlenmesini amaçlamışlardır. 2000-2001 yıllarında yürüttükleri bu çalışmada hıyar, kabak ve kavun tohum örneklerinde Hıyar yeşil benek mozaik virüsü (CGMMV), CMV, Kabak mozaik virüsü (SqMV), Kavun nekrotik leke virüsü (MNSV) ve Tütün halka leke virüsü (TRSV) hastalıklarının varlığını ELISA yöntemi ile araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda toplanan 111 adet örnekten; 57 adet hıyar tohumu örneğinde 39 adet CMV, 27 adet kabak tohumu örneğinde 5 adet CMV ve 27 adet kavun tohumu örneğinde 5 adet CMV olmak üzere 49 adet CMV ile infekteli örnek bulmuşlardır. Hıyar tohum örneklerinin 18'inin sadece CMV ile infekteli olduğunu, 21 örneğin ise CMV ve CGMMV ile karışık infeksiyon şeklinde bir arada bulunduklarını yapmış oldukları testlerle saptamışlardır. Kavun tohum örneklerinde %18,5 oranında değişik düzeylerde CMV infeksiyonu olduğunu gözlemlemişler ve yalnızca 1 örneğin (%3,7) TRSV ile

infekteli olduğu sonucunu bulmuşlardır. Elde ettikleri bulgularla yalnızca 1 tohum örneğinde CMV ve TRSV adlı virüslerin birlikte bulunduğunu göstermişlerdir.

Eryiğit (2004), 2001-2003 yıllarında Isparta yöresi domates üretim alanlarında yaptığı sörvey çalışmalarında domates bitkilerinin yapraklarında sararma, mozaik şeklinde renk açılması, kıvrılma, nekrotik lekeler, ipliksi yaprak gelişimi ve bitkilerde bodurlaşma gibi Hıyar mozaik virüsü'nün tipik simptomlarını gözlemlemiştir. Viral infeksiyon belirtisi gösteren bitkilerden toplamda 138 yaprak örneği toplamıştır. Tanılama çalışmalarında mekanik inokulasyon, DAS-ELISA testi ve virüse özgü dsRNA analizi olmak üzere üç ayrı tanı yöntemi kullanmıştır. DAS-ELISA testi sonuçlarına göre; alınan toplam 138 örnekten 56 adedinin CMV ile enfekteli olduğunu saptamıştır. Alınan örneklerin %40,57'sinde CMV infeksiyonu tespit etmiştir. CMV'nin dsRNA izolasyonu ve analizi çalışmalarında ise, sistemik infeksiyon gösteren *Nicotiana tabacum* "Xanthii", *Nicotiana tabacum* "Samsun NN" ve *Capsicum annuum* L. (biber) bitkilerinin inokulasyondan 12 gün sonra hasat edilen infekteli yaprak dokularını kullanmıştır. Virüse ait dsRNA'ları %1,2'lik agar jel ortamında 100 V'da 2,5-3 saat süreyle elektroforeze tabi tutarak, CMV'ye özgü üç RNA bandı olarak dsRNA profillerini çıkarmıştır. *Nicotiana tabacum* "Xanthii" ve *Capsicum annuum* L.'den elde edilen profillerin *Nicotiana tabacum* "Samsun NN"den elde edilen profile göre daha belirgin olduğunu gözlemlemiştir.

Terami ve ark. (2004), bir zambak çeşidi olan *Eucharis grandiflora* bitkisinde CMV'nin mozaik hastalığına neden olduğunu bildirmişlerdir ve bu çalışmalarında CMV'yi izole etmişlerdir. Mekanik inokulasyon çalışmalarında bitkinin 2 ve 3 aylık ilk gelişme dönemlerinde yapraklarda klorotik noktalar, daha sonraki gelişme dönemlerinde ise mozaik alanlar ve sarı mozaik simptomlarını gözlemlemişlerdir. Petal yaprakların inokulasyonunda ise hafif şiddette yaprak bozuklukları saptamışlardır. Virüsün konukçu genişliğinin belirlenmesinde, 11 familyaya ait 37 bitki türünü mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanmışlar, 14 bitki türünün CMV tarafından sistemik olarak infekte olabildiğini ve mozaik simptomu oluşturduklarını gözlemlemişlerdir. Yaptıkları afid ile taşıma denemelerinde CMV'yi non-persistent bir şekilde taşıyan *Myzus persicae* yaprak bitinin *E. grandiflora* ve *N.glutinosa*'ya bulaştırılması sonucu mozaik simptomların inokulasyondan sonra *E. grandiflora* bitkisinde 2 ayda; *N.glutinosa* bitkisinde aynı hafta içinde ortaya çıktığını bildirmişlerdir.

Sharma ve ark. (2005), Hindistan'da zambak yetiştirilen bölgelerden topladıkları 4 farklı zambak türü üzerinde CMV, LSV, LMoV hastalıklarının varlığını çeşitli yöntemlerle test etmişlerdir. Yapmış oldukları RT-PCR ve ELISA testlerinin sonuçlarında; zambak

çeşitlerine göre hastalık şiddetinin minimum %40,7, maksimum %83,7 oranında bulmuşlardır. Bu üç virüsün dışında zambak türlerinin birinde *Strawberry latent ring spot virus* (SLRSV) hastalığının varlığını da tespit etmişlerdir. RT-PCR çalışmalarında CMV'ye ait yaklaşık 900 bp, LSV'ye ait yaklaşık 900 bp, SLRSV'ye ait 200 bp, LMoV'ye ait yaklaşık 340 bp'e karşılık gelen istenilen bant büyüklüklerini elde etmişlerdir. Ayrıca nükleik asit dizilimi çalışmalarında CMV'nin nükleik asit benzerliğini %96-98, amino asit benzerliğini ise %93-97 oranında bulmuşlardır.

Çağlar (2006), Adana, Mersin, Hatay ve Şanlıurfa illerinde üretimi yapılan kavun, domates ve biberlerde hastalık yapan CMV izolatlarının tanılanmalarını, sınıflandırılmalarını, çoğalttıkları sat-RNA'ların varlığını ve molekül ağırlıklarını, sat-RNA'ların virüs üzerindeki etkisini araştırmıştır. Araştırmada kavundan izole ettiği CMV-K, domatesten izole ettiği CMV-D ve biberden izole ettiği CMV-B izolatlarını kullanmıştır. İzolatların biyolojik, serolojik ve moleküler karakterizasyonunu yaparak CMV izolatlarının birbirlerinden farklılıklarını saptamıştır. Arazi çalışmaları sonucunda CMV simptomu gösteren 60 adet kavun, 62 adet domates ve 35 adet biber olmak üzere toplam 157 örnek toplamıştır. Topladığı örnekleri ELISA ile test etmiş ve CMV ile infekteli oldukları belirlenen bitkilerden aldığı örnekleri test bitkilerine ve kavun, domates, biber bitkilerine mekanik inokulasyon yöntemi ile inokule etmiştir. Biyolojik bulgularda CMV-K izolatının kavun bitkilerinde yaprak deformasyonu, yaprak kıvrılması ve sistemik mozaik; tütün bitkisinde yaprak şeklinin bozulması, yaprak ayasının daralması ve uzaması, damar bantlaşması ve sistemik mozaik simptomlarını gözlemlemiştir. CMV-D izolatının domates bitkilerinde yaprak simetrisinin bozulması ve sistemik mozaik; tütün bitkisinde yaprak şeklinin bozulması, yaprak ayasının daralması ve uzaması, yaprağın kıvrılması, damar bantlaşması ve sistemik mozaik simptomlarına neden olduğunu belirtmiştir. CMV-B izolatının biber bitkilerinde yaprak kıvrılması, damar bantlaşması ve hafif mozaik simptomlarına neden olduğunu, tütün bitkisinde CMV-K ve CMV-D izolatlarına benzer şekilde sistemik mozaik simptomlarına neden olduğunu gözlemlemiştir. Yapmış olduğu RT-PCR çalışmalarında izolatların RNA-1, RNA-2, kılıf proteini ve 2a proteinini kodlayan genleri üzerindeki bazı bölgelerini çoğaltmıştır. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analizinde PCR ürünlerini *Mlu*I, *Eco*RI, *Hind* III, *Bam* HI ve *Msp* I endonükleaz restriksiyon enzimleri ile kesmiş ve agaroz jelde görüntülemiştir. Sonuç olarak her üç izolatın da biyolojik ve moleküler özellikler bakımından birbirinin aynısı olduğunu ve CMV alt gruplandırılmasında her üç izolatın da alt grup IA'ya dâhil olduğunu bulmuştur. Ayrıca CMV izolatlarını infekteli bitkilerden saflaştırarak virüs partiküllerinin

elektriksel ortamdaki hareket hızlarını kontrol etmiştir. Bunun sonucunda CMV-D ve CMV-B izolatlarının elektriksel ortamdaki hareket hızlarının aynı olduğunu, buna karşılık CMV-K izolatının diğer iki izolata göre yavaş hareket etmesi nedeniyle farklılık gösterdiğini tespit etmiştir. Bu araştırmada karakterize ettiği ve kullandığı üç izolatın 700 bp'lik sat-RNA'nın çoğalmasına yardımcı olduğunu bildirmiştir. CMV-K izolatının 700 bp'lik sat-RNA'nın yokluğunda bitkilerde hastalık oluşturamadığını ancak sat-RNA ile birlikte olduğu zaman simptoma neden olabildiği sonucunu elde etmiştir. CMV-D ve CMV-B izolatlarının sat-RNA'nın yokluğunda da bitkilerde simptomlara neden olabileceğini belirtmiştir. Araştırmacı yapmış olduğu bu çalışma ile bazı izolatların (CMV-K) mücadelesinde sat-RNA'nın kontrol altına alınması gerektiğini, bazı izolatların mücadelesinde ise (CMV-D ve CMV-B) asıl virüsün kontrol altına alınması gerektiğini sonuç olarak bildirmiştir.

Tok ve Erkan (2006), Bursa ve Çanakkale illerinin önemli şeker pancarı üretim alanlarında görülen virüs hastalıkları ve yaygınlık durumunu belirlemek amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu alanlardan 2002 ve 2003 yıllarında Çanakkale'den 23 ve Bursa'dan ise 29 örnek olmak üzere toplam 52 örnek toplamışlardır. Topladıkları şeker pancarı bitkilerinin yaprakları üzerinde mozaik, deformasyon, sararma, buruşukluk, klorotik lokal lezyonlar ile birlikte bitkilerde cüceleşme gibi virüs belirtileri gözlemlemişlerdir. Bitkilerdeki mevcut virüsleri, ELISA ve mekanik inokulasyon yöntemlerini kullanarak tespit etmişlerdir. Buna göre; Pancar sarılık virüsü (BYV), Pancar mozaik virüsü (BtMV) ve CMV'yi yaygın olarak bulmuşlardır. Örneklerin bir kısmında ise saptanan virüslerden iki veya üç tanesinin bir arada bulunarak karışık infeksiyonlar oluşturduklarını gözlemlemişlerdir. Topladıkları 52 adet yaprak örneğinin test bitkilerine mekanik inokulasyonu sonucu 8 örnekte mekanik olarak taşınabilen virüs tespit etmişlerdir. Bursa'nın Mustafakemalpaşa ilçesinde 2 örnekte CMV'ye rastlarlarken, Çanakkale'nin Biga ilçesinde CMV ile infekteli şeker pancarı örneğine rastlamamışlardır. Mustafakemalpaşa-Bursa'da 2 şeker pancarı örneğinde DAS-ELISA yöntemi ile saptadıkları CMV'nin BtMV ve BYV ile karışık infeksiyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Saptanan virüslerin şeker pancarı üretim alanlarındaki yaygınlık oranının Biga-Çanakkale'de %2,41 ve Mustafakemalpaşa-Bursa'da ise %4,02 olduğunu bulmuşlardır.

Singh ve ark. (2007), glayöllerde mozaik hastalığına neden olan *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ve CMV infeksiyonlarını virazol (ribavirin, 1-b-Dribofuranosyl-1, 2, 4-triazole-3-carboxamide) isimli kimyasalı kullanarak engellemeye çalışmışlardır. İlk

olarak glayölleri virazol içeren ortamlarda 6-8 hafta arasında kültüre alarak gözlemlemişlerdir. Bunun sonucunda yaptıkları Electroblot Immunoassay (EBIA) ve RT-PCR analizleri ile virüslerin varlığını; geliştirmiş oldukları duplex RT-PCR ile bitkilerin farklı gelişme dönemlerindeki CMV ve BYMV'nin varlığını araştırmışlardır. Sonuç olarak, virazolün her iki virüsü de etkin bir şekilde elimine ettiğini bulmuşlardır. Kontrol bitkilerinde ise 660 bp'e karşılık gelen bant büyüklüklerine ulaşmışlardır.

Zitikaite ve Samuitiene (2009), Litvanya'daki tatlı biberlerde yaptıkları çalışmada, yaprak ve meyvelerde şekil bozukluğu ve mozaik lekeler, bodurlaşma gibi simptomlar gösteren biber bitkilerinden CMV'yi izole etmişlerdir. CMV'nin teşhisini; konukçu genişliğinin belirlenmesi, mekanik inokulasyon çalışmaları ve elektron mikroskobu çalışmaları ile gerçekleştirmişlerdir. CMV'nin test bitkilerindeki varlığını RT-PCR yöntemi ile doğrulamışlardır. RT-PCR analizi ile 540 bp'lik korunmuş bir kısmı çoğaltmışlar ve daha önce belirlenmiş sekans verileri ile karşılaştırarak aynı sonuçları elde etmişlerdir.

Berniak ve ark. (2009), Polonya'da farklı bitki türleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada topladıkları 15 izolatı (4 zambak, 3 hıyar, 2 hanımeli, 1 camgüzeli, 1 yıldız çiçeği, 1 kırmızı frenk üzümü, 1 lale, 1 kabak, 1 hezaren çiçeği) 5 farklı poliklonal antibadi kullanarak DAS-ELISA yöntemi ile test etmişlerdir. Bunun sonucunda 2 poliklonal antibadi bütün örneklerin pozitif olduğu yönünde tanılama yaparken, diğer üç poliklonal antibadi ise birer örneği negatif tanılamıştır. Araştırmacılar ayrıca CMV alt grup I'i tanılayan CMV-I ve CMV alt grup II'yi tanılayan CMV-II monoklonal antibadilerini de kullanmışlardır. Moleküler RT-PCR çalışmalarında üç nükleik asit ekstraksiyon metodu (Immunocapture (IC), Silicacapture (SC) ve Total RNA izolasyonu (RN)) kullanmışlardır. Çalışma sonucunda CMV'nin kılıf protein genini içeren RNA-3 bölgesini çoğaltan CMV 1-CMV 2 primer çiftleri için 15 örnekte de 500 bp büyüklüğünde bantlar elde etmişlerdir.

Buzkan ve Yüzer (2009), Kahramanmaraş'ta yetiştirilen kırmızıbiberlerde tohumla taşınan AMV, CMV, TMV, TSWV, Domates mozaik virüsü (ToMV) ve Biber hafif benek virüsü (PMMoV) hastalıklarının varlığını belirlemek amacı ile bir çalışma yapmışlardır. Toplanan 125 farklı kırmızıbiber tohumu çimlendirilip elde edilen fidelere toplam nükleik asit izolasyonu yapmışlardır. Virüsleri tanılamak için 125 kırmızıbiber örneğine RT-PCR analizi uygulamışlardır. Analizler sonucunda kırmızıbiber tohumlarında sadece CMV infeksiyonu gözlemlemişlerdir. Bütün örnekler içerisinde CMV infeksiyonu gösteren bir biber örneğinde 513 bç büyüklüğünde bant gözlemlemişlerdir.

Berniak ve ark. (2010), doğal olarak infekteli zambak bitkilerinden elde ettikleri 4 adet CMV izolatını DAS-ELISA yöntemi ile test etmişler ve virüsün RNA-3 fragmentinin içerdiği kılıf proteini ve hareket proteini geninin sekans analizini yapmışlardır. Bu izolatları daha önceden 6 farklı bitkiden (yıldız çiçeği, hezaren çiçeği, camgüzeli, hanımeli, hıyar ve frenk üzümü) elde ettikleri 8 CMV izolatı ile karşılaştırmışlardır. Serolojik analizlerde grup düzeyinde tanılama yapabilen spesifik monoklonal antibadiler (CMV I, CMV II) kullanarak zambaktan izole ettikleri 2 CMV izolatının (Cas ve CB) alt grup IA'ya ait olduğunu bulmuşlardır. Diğer 2 CMV izolatının (P26 ve Simp2) kılıf ve hareket proteini genlerinin sekans dizilimlerinin yapılması sonucunda, CMV alt grup II'de bulunan diğer izolatlarla %98 oranında benzerlik gösterdiğini; alt grup I'deki izolatlarla ise %77 oranında benzerlik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmanın sonucunda Simp2 CMV izolatının alt grup II'nin üyesi olduğunu ELISA testleri ile de teyit etmişlerdir fakat P26 CMV izolatını spesifik monoklonal antibadilerle bu alt gruplardan hiçbirinde tespit edememişlerdir. Bu şekilde CMV-P26 izolatının alt grup düzeyinin spesifik monoklonal antibadilerle belirlenememesini, yapmış oldukları kılıf protein geni sekans analizi çalışmalarının sonucunda protein diziliminde bir mutasyon meydana gelmiş olabileceği sonucuna bağlamışlardır.

Mahmoud (2011), 2008 yılında bazı süs bitkilerinde CMV'nin varlığını tespit etmek amacıyla bir çalışma yürütmüştür. Yaptığı sörveylerin sonucunda 6 bitki türünden (*Pelargonium* spp., *Strelitzia reginae, Ocimum basilicum, Silene armeria, Vinca rosea* ve *Gladiolus* spp.) toplamda 90 adet bitki örneği toplamıştır. Toplamış olduğu bu örnekleri DAS-ELISA yöntemi ile test etmiştir. DAS-ELISA testi sonucunda *Vinca rosea, Ocimum basilicum* ve *Pelargonium* spp. bitkilerinden aldığı örneklerin hepsinin %100 CMV ile infekteli olduğunu bulmuştur. Glayöl bitkisinden aldığı örneklerde CMV infeksiyonu bulamamıştır. Sonuçları teyit etmek için yapmış olduğu Western Blot analizi ile *Pelargonium* spp. ve *O. basilicum*'dan izole ettiği CMV izolatlarına ait kılıf protein genlerinin moleküler ağırlıklarını tespit edememiş, *V. rosea'*ya ait kılıf protein genlerinin moleküler ağırlıklarının zayıf reaksiyon gösterdiğini bildirmiştir. Ayrıca diğer bütün örneklerde CMV izolatlarına ait CP genlerinin moleküler ağırlığını Western blot analizi ile tespit etmiştir.

Alan (2012), 2007-2010 yılları arasında Doğu Akdeniz Bölgesi'nde (Adana, Mersin, Hatay, Osmaniye ve Kahramanmaraş illeri ve çevresinde) yetiştirilen bazı kışlık sebzelerde (marul, ıspanak, lahana, karnabahar, turp) mevcut virüs hastalıklarının saptanması ve infeksiyon oranlarının belirlenmesi amacıyla bir çalışma yürütmüştür.

Yapılan sörveylerde simptomatolojik olarak, CMV, TSWV, *Turnip mosaic virus* (TuMV), *Lettuce mosaic virus* (LMV), *Miraflori lettuce big vein virus* (MiLBVV), *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), *Radish mosaic virus* (RaMV), *Beet western yellow virus* (BWYV), *Beet curly top virus* (BCTV), *Beet mosaic virus* (BtMV), *Lettuce big vein virus* (LBVV) ve *Lettuce infection yellow virus* (LIYV) hastalıkları ile infekteli olduğundan şüphelendiği 808 marul, 330 lahana, 137 karnabahar, 225 ıspanak, 65 turp bitkisinden toplam 1595 örnek toplamıştır. Bu örneklerdeki viral etmenleri, öncelikle ELISA ve/veya RT-PCR ve PCR çalışmaları ile saptamış ve biyolojik ve moleküler yöntemler kullanarak karakterize etmiştir. Dizi analizi sonuçlarını değerlendirerek elde ettiği virüs izolatlarının dünyadaki diğer izolatlar ile karşılaştırmasını yaparak benzerlik oranlarını ortaya koymuştur. Yapmış olduğu ELISA testleri sonucunda; 808 marul bitkisinden 380 bitkide (%47) MiLBVV, 82 bitkide (%10,1) LMV, 3 bitkide (%0,37) TSWV, 3 bitkide (%0,37) CMV ve 3 bitkide (%0,37) BWYV; 255 ıspanak bitkisinden 90 bitkide (%35,2) BWYV ve 3 bitkide (%1,17) CMV; 330 lahana bitkisinden 10 bitkinin (%3) TuMV; 65 turp bitkisinden 11 bitkinin (%16,9) BWYV, 6 bitkinin (%9,2) CMV ve 3 bitkinin (%4,6) TuMV; 137 karnabahar bitkisinden ise, 1 bitkinin (%0,7) CaMV ile infekteli olduğunu saptamıştır. Araştırmacı RaMV infeksiyonuna ise, test edilen örneklerin hiçbirinde rastlamamıştır. Toplam 1565 örnek içerisinde 26 örnekte (22 marul, 4 turp) %1,46 oranında karışık infeksiyon saptamıştır. 21 marul bitkisinde %2,59 oranında MiLBVV+LMV ve 1 marul bitkisinde %0,12 oranında MiLBVV+CMV karışık infeksiyonlarına karşılık, 1 turp bitkisinde %1,53 oranında CMV+BWYV ve 3 turp bitkisinde %4,6 oranında TuMV+BWYV karışık infeksiyon oluşturduğunu belirtmiştir. RT-PCR çalışmaları sonucunda, LBVV 296 bç, MiLBVV 469 bç, LMV 800 bç, TuMV 615 bç, BWYV 250 bç, CMV 650 bç, TSWV 276 bç; PCR çalışmaları sonucunda ise, CaMV 383 bç büyüklüğünde bantlar elde etmiştir. RT-PCR ile saptamış olduğu, TSWV, LMV, MiLBVV, BWYV, TuMV, LBVV, CMV ve PCR ile saptamış olduğu CaMV'nin dizi belirleme ve filogenetik çalışmaları sonucunu dünyadaki diğer izolatlarla karşılaştırmış ve bu izolatlarla olan benzerlik oranlarını belirlemiştir. Buna göre, kullandığı CMV izolatının, Güney Kore, Japonya, Çin izolatları ile %44 oranında benzerlik gösterdiğini tespit etmiştir.

Mazidah ve ark. (2012), Malezya'da yapraklarda mozaik ve şekil bozuklukları, çiçeklerde renk kırılması ve deformasyon gözlemlediği *Catharanthus roseus* (pervane çiçeği) bitkisinden örnekler toplamışlardır. Topladıkları 100 bitki örneğini CMV, TMV, TSWV ve INSV hastalıklarına karşı DAS-ELISA yöntemi ile test etmişlerdir. Hafif mozaik simptomu gösteren 2 bitki örneğinin CMV ile infekteli olduğunu, 25 bitki

örneğinin TMV ile infekteli olduğunu bulmuşlardır ve 73 bitki örneğinin ise bu virüslere karşı tüm testlerde negatif çıktığını belirtmişlerdir. Negatif işaretleme elektron mikroskobu tekniği ile CMV'nin yaklaşık olarak 28,5 nm büyüklüğünde ve küresel şekildeki partikül yapısını gözlemlemişlerdir. Yapmış oldukları RT-PCR çalışmaları sonucunda; CMV'ye ait istenilen 1000 bp büyüklüğüne karşılık gelen bantlarını elde etmişlerdir. CMV'nin kılıf protein geninin sekans analizinin yapılmasıyla Hindistan'daki başka bir CMV izolatı ile %100 benzerlik gösterdiği sonucunu bulmuşlardır.

Megahed ve ark. (2012), hıyar tarımı yapılan alanlardan doğal olarak CMV ile infektelenmiş bitkilerin yapraklarından örnekler alarak DAS-ELISA yöntemi ile poliklonal antibadiler kullanarak Hıyar mozaik virüsü'nün satellit Mısır streyninin varlığını tespit etmişlerdir. Bu ırkın (st-CMV-EG) 6 bitki familyasında yayılan geniş bir konukçu dizisine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Virüsün 70ºC'de inaktive olduğunu, son sulandırma noktasının 10^{-4} ve *invitro* da yaşam süresinin 4 gün olduğunu tespit etmişlerdir. Hıyar yapraklarında CMV'nin şekilsiz ve kristalize olmuş inclusion body'lerini ışık mikroskobunda Bromophenol blue ve Mercuric chloride kullanarak gözlemlemişlerdir. 100 g infekteli yaprakta 1,43 mg saf virüs elde edilebildiğini bildirmişlerdir. Elektron mikroskobu çalışmalarında CMV'nin 28 nm büyüklüğündeki küresel şekilli partikül yapısını gözlemlemişlerdir. RT-PCR çalışmalarında virüsün kılıf proteini genine ait 582 bp büyüklüğündeki bantlarını elde etmişlerdir.

Tian ve ark. (2012), CMV'nin alt grup I ve alt grup II izolatlarının 5 farklı afid türü tarafından taşınması ile ilgili bu çalışmalarında *Myzus persicae, Aphis gossypii, Lipaphis erysimi, Aphis craccivora* ve *Megoura viciae* afid türlerini laboratuvar ve arazi denemelerinde kullanmışlardır. CMV alt grup I NX ve alt grup II AG izolatlarını tütün bitkisinden elde etmişlerdir. CMV izolatlarının alt grup I ve alt grup II olarak sınıflandırılmasını spesifik antibadiler kullanarak DAS-ELISA testi ile ayırt etmişlerdir. *M. persicae* ve *A. gossypii* ile etkili bir şekilde taşındığını bildirmişlerdir. CMV alt grup izolatlarının diğer üç afit türü ile taşınımında kayda değer bir veri elde edememişlerdir.

Kılıç ve Yardımcı (2012), Burdur'da fasulye yetiştirilen alanlarda yaptıkları gözlemler sırasında bitkilerde mozaik, kloroz, damar bantlaşmaları, damar çekilmesi, damarlarda renk açılmaları, bitki boyunda kısalma, yapraklarda deformasyon gibi hastalık belirtileri gözlemlemişlerdir. Virüsten şüphelendikleri 50 yaprak örneğini öncelikle DAS-ELISA testi ile test etmişlerdir. DAS-ELISA testi sonucunda; topladıkları 50 örnekten 25'ini (%50) CMV ile infekteli olarak bulmuşlardır. ELISA bulgularını teyit etmek amacıyla pozitif olarak belirledikleri ya da pozitif olduğundan şüphe ettikleri 12

örneğe total RNA izolasyonu yapmadan spesifik antiserumlarla immunolojik olarak IC-RT-PCR analizini uygulamışlardır. Çoğalttıkları RT-PCR ürünlerini %1'lik agaroz jel içerisinde elektroforez ederek 12 örneğin tamamında 678 bp'lik büyüklükte bantlar elde etmişlerdir.

Elbeshehy ve Sallam (2012), Mısır'da çeşitli bahçelerde ve seralarda yetişen hıyar bitkilerinde sistemik mozaik, kabarma, meyve deformasyonu ve bitkide bodur büyüme simptomları gözlemlemişlerdir. Bu belirtilere sebep olan CMV'nin biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemlerle tanısını yapmışlardır. Yaptıkları mekanik inokulasyon çalışmalarında hıyar bitkisinin inokulasyondan 8 gün sonra sistemik mozaik belirtileri verdiğini belirtmişlerdir ve diğer konukçu bitkilerde; kazayağında nekrotik halkalı leke, börülcede klorotik halkalı leke, kabakta mozaik oluşumu, sakız kabağında klorotik lekeler, biberde mozaik ve yaprak deformasyonu, fasulyede mozaik ve kabartıların meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Serolojik bir yöntem olan DAS-ELISA testinde CMV'ye spesifik antiserumla birlikte WMV ve SqMV'nün de antiserumlarını kullanmışlardır. Fakat test ettikleri bitkilerde sadece CMV'ye spesifik antiserumlar ile pozitif reaksiyon elde etmişlerdir. İnfekteli hıyar bitkilerinde CMV kılıf protein geninin tespiti için RT-PCR analizini kullanmışlardır. RT-PCR sonucunda 422 bp büyüklüğünde bant elde etmişlerdir. Protein analizi çalışmalarında 3 farklı marker kullanarak yaptıkları SDS-PAGE analizinin sonucuna göre infekteli 4 farklı hıyar çeşidinde 25-70 kDa arasında molekül ağırlığına sahip proteinler olduğunu belirtmişlerdir. Bu 4 farklı çeşitten yüzde (%) protein miktarının yüksek olduğu iki çeşidin CMV infeksiyonuna daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan sekans ve filogenetik analizler sonucunda CMV Mısır izolatının CMV Yeni Zelanda izolatı ile %95 oranında benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Brito ve ark. (2012), CMV'nin birçok bitkide tohum yoluyla taşındığını, *Canna indica* (kana çiçeği) bitkisinde de tohum yoluyla taşınıp taşınmadığını araştırdıkları bir çalışma yürütmüşlerdir. Bunun için infekteli bitkilerden 254 adet tohum toplamışlardır ve steril plastik kaplar içine ayrı ayrı ekmişlerdir. Sera koşulları altında bir ay boyunca değerlendirmeler yapmışlardır. Viral belirti gösteren yeni bitkilerden elde ettikleri virüs özsuyunu sağlıklı börülce bitkilerine mekanik olarak aşılamışlardır. Aşılanmış börülce bitkilerinde mozaik, yaprak deformasyonu, büyüme geriliği, lokal nekrotik lezyonlar gibi tipik CMV belirtilerini gözlemlemişlerdir. Ekimden on iki gün sonra 254 adet tohum örneğinden 117 adet tohumun (%46) çimlendiğini, çimlenen tohumların da 27 tanesinin (%23) birincil yapraklarda oluşturduğu tipik viral belirtileri gözlemlemişlerdir. Simptom gösteren yeni bitkilerde CMV varlığını belirlemek için RT-PCR analizi yapmışlardır.

RT-PCR analizi sonucunda viral DNA parçalarının 500 bp büyüklüğünde bant verdiği sonucunu elde etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda, CMV'nin *Canna indica* bitkisinden doğrudan tohum yoluyla taşındığını bulmuşlardır. Tohumla taşınmanın önemli olduğunu ve tohumların virüsün doğada hayatta kalma olasılığını arttırdığını belirtmişlerdir.

Koolivand ve ark. (2012), İran'da çeşitli bitkilerden (domates, biber, hıyar, kabak ve dulavrat otu) elde ettikleri 208 CMV izolatının serolojik ve moleküler yöntemlerle teşhisini yapmışlardır. Serolojik olarak DIBA, DAS-ELISA, DAC-ELISA, TAS-ELISA; moleküler olarak da RT-PCR ve RFLP analizlerini uygulamışlardır. Öncelikle 208 bitki örneğini DIBA testi ile test etmişlerdir. DIBA testi sonucu 208 örnekten 57'sinin pozitif sonuç verdiğini tespit etmişlerdir. DIBA testinde pozitif sonuç veren 57 örneğe CMV'nin antiserumu kullanılarak yapılan DAS-ELISA testi sonucunda 57 örnekten 33'ünün pozitif sonuç verdiğini bulmuşlardır. Çalışmalarında serolojik DIBA testinin ELISA testine göre daha hızlı ve güvenilir sonuç verdiğini belirtmişlerdir. ELISA'da pozitif bulunan 57 örnekten 40'ının RT-PCR sonucu pozitif reaksiyon verdiğini tespit etmişlerdir. Buna göre PCR ürünlerinin %1,2'lik agaroz jelde koşturulmasıyla CMV kılıf proteinine ait 675 bp büyüklüğünde oluşan bantlarını görüntülemişlerdir. *Msp*I restriksiyon enzimini kullanarak yapmış oldukları RFLP analizinde %1,8 agaroz jelde 450 bp ve 220 bp büyüklüğünde cDNA profillerini görüntülemişlerdir. Ayrıca bir domates ve bir dulavrat otu olmak üzere iki izolatta ek olarak 300 bp ve 100 bp büyüklüğünde bantlar elde etmişlerdir. Bu beklenmedik bantların karışık infeksiyon göstergesi olabileceğini bildirmişlerdir. Yapmış oldukları analizler sonucu bütün CMV izolatlarının CMV alt grup I'e ait olduğunu tespit etmişlerdir.

Saidi ve Safaeizadeh (2012), 2010 yılında İran Varamin Bölgesi'nde *Canna indica* çiçekli süs bitkisinin ticari olarak yetiştiriciliğinin yapıldığı seralarda ve bahçelerde bir sörvey çalışması yürütmüşlerdir. Mozaik ve nekrotik simptomlar gözlemledikleri 37 yaprak örneğini 6 farklı virüs (CMV, TSWV, ToRSV, *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) ve *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)) antikoru kullanarak yaptıkları DAS-ELISA testi sonucunda örneklerin sadece CMV için pozitif reaksiyon verdiğini tespit etmişlerdir. İnfeksiyon oranını %8,1 olarak bulmuşlardır. DAS-ELISA testi sonucu buldukları üç pozitif örneği RT-PCR analizi ile de test ederek CMV'nin kılıf protein genini içeren RNA-3 bölgesinin yaklaşık 540 bp büyüklüğe sahip bant dizilimlerini görüntülemişlerdir.

Zavareh ve ark. (2013), İran'ın Varamin Bölgesi'nde ticari olarak yetiştiriciliği yapılan *Anthurium* spp. (flamingo çiçeği) süs bitkisinin Simba ve Calore isimli iki farklı

çeşidinden 80'er adet örnek toplamışlardır. Yapmış oldukları ELISA testleri sonucunda Simba çeşidinde 44 örneğin (%55), Calore çeşidinde ise 56 örneğin (%70) CMV ile infekteli olduğunu bulmuşlardır. CMV'ye spesifik primerler kullanarak yaptıkları RT-PCR analizlerinde elde ettikleri ürünleri agaroz jelde koşturarak virüsün CP genine ait 540 bp büyüklüğündeki bant dizilimlerini elde etmişlerdir. Biyolojik, serolojik ve moleküler analizlerin sonucunda örnek aldıkları çeşitlerin CMV'nin farklı streynleri ile infekteli olduğunu tespit etmişlerdir. CMV-Iran-V (*Anthurium* sp. cv. Simba, *Anthurium* sp. cv. Calore) izolatının sekans analizinin yapılması ile Gen Bankasında bulunan diğer CMV izolatları ile sadece %7 oranında nükleotit farklılığı olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Duarte ve ark. (2013), Brezilya'nın Sao Paulo eyaletinin farklı bölgelerinde bir arazi çalışması yürütmüşlerdir. Virüs-benzeri simptom gösteren süs bitkilerini tütün gibi indikatör bitkilere inokule ederek yaptıkları mekanik inokulasyon çalışmaları sonucunda tütün bitkisinde zambak izolatı hariç diğer bütün izolatlarda mozaik simptomu oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Süs bitkilerinde CMV'nin; mozaik ve yapraklarda bozulma, bitkide bodurluk, çiçeklerde renk açılmaları ve çiçek kusurluluğu simptomlarına neden olduğunu bidirmişlerdir. CMV alt grup I ve alt grup II'ye spesifik antiserum kullanarak yaptıkları DAS-ELISA testinde örneklerin sadece CMV alt grup I antiserumuna pozitif reaksiyon verdiğini tespit etmişlerdir. CMV ile infekteli süs bitkilerinden elde ettikleri total RNA ekstraksiyonunu kullanarak yaptıkları RT-PCR analizinde 657 bp'lik ürün elde etmişlerdir. Daha sonrasında klonlama ve sekans dizi analizi çalışmaları yapmışlardır. Gen Bankası veritabanlarında mevcut dünyadaki diğer izolatların kılıf protein geninin nükleotid dizilimlerini kullanarak, topladıkları CMV süs bitkisi izolatlarının filogenetik soyağacını çıkarmışlardır. Simptom gözlemledikleri 7 farklı süs bitkisinden elde ettikleri CMV kılıf proteini dizileri ile Gen Bankasında mevcut diğer benzer dizileri karşılaştırdıklarında akrabalık ilişkilerinin bulunduğunu saptamışlardır. Brezilya CMV izolatlarının kılıf proteini genlerinin nükleotid dizilimlerinin yüksek bir oranda (%96-98) sekans benzerliğini ortaya koymuşlardır. İzolatları, diğer dünya izolatları ile karşılaştırdıklarında %90-96 arasında benzerlik bulmuşlardır. Brezilya'dan topladıkları 6 CMV izolatını (*Salvia splendens, Catharanthus roseus, Nematanthus nervosus, Impatiens walleriana, Eucharis grandiflora* ve *Commelina* sp.) tek bir monofiletik grup altında toplamışlardır. Brezilya'dan topladıkları CMV *Lilium* sp. (zambak) izolatının ise bu grubun dışında kalarak Polonya ve Tayvan'dan gelen CMV zambak izolatları ile aynı ortak ataya sahip olduklarını bildirmişlerdir.

BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Arazi Çalışması

Arazi çalışması 2012-2013 yıllarında Çanakkale ili Merkez ilçeye bağlı Kepez beldesi, Güzelyalı beldesi ve Karacaören köyü soğanlı süs bitkilerinin yetiştiriciliğinin yapıldığı ev bahçelerinde yürütülmüştür. Üretim sezonu süresince ev bahçelerinde yetiştirilen nergis, sümbül ve zambak soğanlı süs bitkileri görsel olarak incelenmiş ve CMV simptomlarına benzer simptom gösteren bitkilerden örnekler alınmıştır. Örnekleme yapılan alanların seçimi tamamen tesadüfî olarak yapılmıştır. Yapılan arazi çıkışları sonucunda 67 bitki örneği toplanmıştır. Toplanan örnekler soğuk zincirde muhafaza edilerek laboratuvara getirilmiş ve test edilene kadar buzdolabında bekletilmiştir.

3.2. DAS-ELISA Testi

Hıyar mozaik virüsü'nün serolojik bir yöntem olan DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) testi ile tanılanmasında Bioreba (İsviçre) firmasından sağlanan ELISA komple kiti ve 96 çukur içeren Microtiter plate'ler kullanılmıştır. Toplanan örnekler DAS-ELISA ile test edilmiştir. ELISA testi üretici firmanın önerileri doğrultusunda Clark ve Adams (1977)'ın belirttiği yöntem temel alınarak yapılmıştır. Bu bağlamda 4 aşamadan oluşan ELISA testinde ilk adımda plate virüse spesifik antibadi ile kaplanmıştır. Her bir çukura, önceden hazırlanmış kaplama solüsyonu (50 mM karbonat-bikarbonat buffer pH: 9.6, %0,02 NaN_3) alınarak içine 1:1000 oranında sulandırılan virüse özgü antibadi eklenmiştir. Bu karışımdan 200 µl alınarak plate'e ekleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra plate 34°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra artık maddelerin temizlenmesi için plate'e 4'er dakika arayla 3 kez yıkama (10 mM fosfat buffer pH: 7.4, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, %0,05 Tween 20) işlemi yapılmıştır. İkinci adımda ise arazi çalışmaları süresince ve sonrasında laboratuvarda toplanan örnekler havan ve havaneli yardımı ile ekstraksiyon solüsyonu (20 mM Tris buffer pH: 7.4, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, %2 PVP, %0,05 mM Tween 20 ve %0,02 NaN_3) kullanılarak ezilmiştir. Ezilen örnekler tüplere alınmış ve plate'lere yükleme işlemi tamamlanmıştır. Her bir örnek için kontrol amaçlı iki çukur kullanılmış ve çukurlara örneklerden 200'er µl ilave edilmiştir. Örnek yükleme işlemi gerçekleştirildikten sonra plate'e pozitif ve negatif kontrol konulmuş ve buzdolabında

+4°C'de bir gece süreyle inkübe edilmiştir.

Bir sonraki adımda ise gece boyunca 4°C'de bekletilen örneklerle kaplı plate çıkarılarak 4'er dakika ara ile 3 kez yıkanmıştır. Konjugat solüsyonu (20 mM Tris buffer pH: 7.4, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, %2 PVP, %0,05 Tween 20, %0,2 BSA ve %0,02 NaN_3) 1:10 oranında sulandırılıp 1:1000 oranında konjugat IgG eklenerek plate'lere yükleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu plate 34°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Son adımda, inkübasyon işleminin tamamlanmasının ardından plate 4'er dakika ara ile 3 kez yıkanmıştır daha sonra substrat solüsyonu (1 M dietanolamin pH: 9.8, %0,02 NaN_3) 1:5 oranında sulandırılıp içerisine her bir plate için bir adet olmak üzere pNPP tablet (p-nitro-fenil-fosfat) (Bioreba, İsviçre) eklenmiştir. Hazırlanan substrat çözeltisi plate'e yüklenmiş ve oda sıcaklığında 30-60 dk bekletilmiştir. Daha sonra plate MEDISPEC ESR 200 ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda okuma işlemine tabi tutulmuştur. Negatif kontrolün 2 katı ve üzerinde olan örnekler infekteli olarak değerlendirilmiştir.

3.3. Oligonükleotid Primerlerin Hazırlanışı

Bu çalışma kapsamında yapılacak RT-PCR analizlerinde kullanılmak üzere bir primer çifti tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler CMV kılıf protein geninin 638 bp'lik bölgesini içeren SK5CMV CP-F 5'-ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC-3' ve SK6CMV CP-R 5'-GAT GTG GGA ATG CGT TGG TGC-3' adı ve dizisine sahip spesifik primerlerdir (Çizelge 3.1). Tasarlanan primerler, primer sentezi konusunda faaliyet gösteren bir ticari firma (Iontek) tarafından sentezlenmiştir. Kullanılan primerler denemelerden önce tüplerinin üzerlerinde belirtilen oranlarda su ilave edilerek seyreltilip -20°C'de muhafaza edilmişlerdir.

Çizelge 3.1. Tasarlanan primer dizileri

Kod	Primer Dizisi	Sense	Spesifik Geni	Kaynak
SK5CMV	5'ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC 3'	Forward (ileri)	CP (638 bp)	-
SK6CMV	5'GAT GTG GGA ATG CGT TGG TGC 3'	Reverse (geri)		

3.4. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

RT-PCR yöntemi, 1985 yılında Kary Mullis ve arkadaşları tarafından geliştirilen, DAS-ELISA'dan daha hassas ve spesifik, hedef DNA'nın tüp içerisinde sentetik olarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir (Kılıç, 2010).

RT-PCR çalışmalarında; tipik CMV simptomu göstermesine karşın DAS-ELISA testleri sonucunda negatif çıkan ancak pozitife yakın absorbans değeri veren şüpheli örneklerin tamamı ve negatif örneklerden rastgele seçilen iki tanesinin CMV ile infekteli olup olmadığı araştırılmıştır. RT-PCR çalışmalarında pozitif kontrol olarak DAS-ELISA testinde yüksek absorbans değeri veren iki pozitif örnek kullanılmıştır.

RT-PCR analizinde kullanılan kitler TaKaRa (Japonya) firmasından temin edilmiş ve firmanın önerileri doğrultusunda kullanılmıştır. RT-PCR yönteminin gerçekleştirilmesi için öncelikle total RNA izolasyonu işlemi gerçekleştirilmiş, daha sonra ise kılıf protein genlerinin çoğaltılması yapılmıştır.

RNA izolasyonunda Qiagen (Almanya) firmasına ait RNeasy izolasyon kiti kullanılmıştır. RNA izolasyonu, üretici firmanın önerilerine göre gerçekleştirilmiştir. İzolasyon öncesi RNA konsantrasyonunu arttırmak amacı ile RPE solüsyonuna 20 µl 2M dithiothreitol (DDT), yıkama aşamasında kullanılan RPE solüsyonuna ise 4 hacim %96'lık (44 ml) EtOH eklenmiştir. İzolasyonda, öncelikle havan içerisinde 20 mg doku örneği ezilmiş ve üzerine guanidine thiocyanate içeren RLT bufferdan 600 µl konulup 1,5 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldıktan sonra maksimum hızda 3 dk. santrifüj edilip, elde edilen sıvı kısım (süpernatant) yeni eppendorf tüplere aktarılmıştır. Daha sonra üzerlerine 500 µl %70'lik EtOH konulmuştur. Elde edilen toplam hacmin 700 µl'si Spin Column'a aktarılmış ve 20 sn. 10000 rpm'de santrifüj edildikten sonra altta kalan kısım uzaklaştırılmıştır. Ardından Spin Column'a EtOH içeren RW 1 yıkama solüsyonundan 700 µl eklendikten sonra 20 sn. 10000 rpm'de santrifüj edilmiş ve altta kalan kısım uzaklaştırıldıktan sonra Spin Column'a 500 µl RPE yıkama solüsyonu eklenip 20 sn. 10000 rpm'de santrifüj edildikten sonra alt kısmı uzaklaştırılmış ve aynı işlem bir kez daha tekrar edilmiştir. Daha sonra Spin Column yeni 1,5 ml'lik eppendorf tüplere aktarılmış ve membranın kurutulması için maksimum hızda 1 dk. santrifüj edilmiş ve son olarak üzerlerine saf su eklenerek 1 dk. 10000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

Kılıf protein genlerinin çoğaltılması işlemi, iki aşamalı olarak ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi (RT-PCR) ile yapılmıştır. RNA izolasyonu sonucunda elde edilen RNA'lardan Random primer ve Power Script reverse transkriptaz enzimi kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezlenmiştir. Daha sonra sentezlenen

cDNA'lardan CMV kılıf protein genine spesifik SK5CMV ve SK6CMV primerleri kullanılarak kılıf protein geni çoğaltılmıştır.

Bu amaçla etiketlenen mikro PCR tüplerine, örneklere ait total RNA'lar 5 µl olacak şekilde konulmuştur. Daha sonra firmasının önerileri doğrultusunda 1µl 10mM dNTP, 20 pmol random primerden 1µl ve 3µl steril su eklenerek denatürasyon karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım, örnek RNA'ları eklenmiş PCR tüplerine 5'er µl olarak eklenmiştir. Daha sonra denatürasyon işlemi için bu PCR tüpleri PCR cihazında (Thermal Cycle) 65°C'de 5 dk. tutulmuş ve bu işlemin hemen ardından buza alınmıştır. Denatürasyon işlemi ile RNA virüslerinin bağlarının birbirinden ayrılması sağlanmıştır.

Bu aşamada denatüre edilmiş RNA'lara 4 µl 5X Prime Script buffer, 0,5 µl RNA_z inhibitör, Reverse Transkriptaz tampon solüsyonundan (50 mM Tris HCl pH: 8.3, 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$) 0,5 µl, 20 pmol Random primerden 1µl, 1 µl 10mM dNTP ve 3 µl steril sudan oluşan RT karışımı hazırlanarak 10'ar µl olacak şekilde eklenmiştir. Daha sonra örneklere Thermal Cycle'da 30°C'de 10 dakika, 42°C'de 45 dakika, 70°C'de 15 dakika ve daha sonra da 4°C'de sürekli olarak kalacak şekilde programlanarak cDNA sentezi yapılmıştır ve bu işlemin hemen ardından örnekler buza alınmıştır.

Daha sonra sentezlenen cDNA'lardan CMV kılıf protein genine spesifik SK5CMV ve SK6CMV primerleri kullanılarak kılıf protein geni çoğaltılmıştır. Bu amaçla her bir örnek için; 2,5 µl 10x PCR Buffer (50 mM KCI, 10 mM Tris HCl 25°C pH: 9.0, %1 Triton X-100), 1 µl 10 mM dNTP, 0,5 µl SK5CMV CP-F 5'-ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC-3' ve 0,5 µl SK6CMV CP-R 5'-GAT GTG GGA ATG CGT TGG TGC-3' CMV kılıf protein geninin bir kısmına spesifik primerleri, 0,25 µl Taq polimeraz enzimi, 15,25 µl steril su ve elde edilen cDNA'lardan da 5'er µl kullanılarak toplam hacim 25 µl olacak şekilde PCR karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan PCR karışımı 94°C'de 3 dk., 40 defa tekrarlanan 94°C'de 30 sn., 55°C'de 30 sn., 72°C'de 45 sn., 72°C'de 5 dk. olan ve daha sonra da 4°C'de bekleyecek şekilde programlanan Thermal Cycle'a konularak kılıf protein genlerinin çoğaltılması işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR aşaması bittikten sonra tüpler hemen buza alınmıştır. Elde edilen PCR ürünleri 100-1000 bp DNA büyüklük markörleriyle birlikte %1 agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle 100 V'ta 45 dk. ayrıştırılıp etidyum bromür ile boyandıktan sonra UV ışık altında jel görüntüleme cihazında (MAJOR SCIENCE UVDI) CMV'nin kılıf proteinine ait bantlar fotoğraflanmıştır.

3.5. Western Blot Analizi

Çalışma kapsamında kullanılan bir başka serolojik yöntem ise Western blot yöntemidir. Bu yöntem ilk kez Renart ve ark. (1979) ve Towbin ve ark. (1979) tarafından tanımlanmıştır (Krebs ve ark., 2006). Yöntem kapsamında öncelikle örneklerin ezilmesi işlemi tamamlanmıştır. Ezilen örnekler eppendorf tüpler içine konulup buz kabı içerisinde bekletilmiş ve ardından elektroforez işlemi için jel hazırlanmıştır. Elektroforez aşamasından sonra sırasıyla blotlama ve bloklama işlemleri yapılmıştır. Son aşamada, özgül antikorla kaplama işlemi yapılmış ve ardından nitroselüloz membrana aktarılan proteinlerin görüntülenmesi ile yöntem sonuçlandırılmıştır.

Western Blot analizi çalışmalarının ana materyalini CMV ile infekteli bitkilerin yaprak dokuları oluşturmuştur. Her bir izolat için 100 mg doku örneği alınıp, havan ve havaneli yardımıyla ezilmiştir. Ezilen bu örnekler eppendorf tüpler içerisine konulup, buz içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra her bir örnek üzerine 100 µl Western ekstraksiyon bufferından (0,5 M Tris, %20 Gliserol, %1 DDT, %6 SDS ve %0,002 Bromophenol blue) eklenmiş ve örnekler vortekslenmiştir. Elde edilen karışım 95ºC'de 5 dk. kaynatıldıktan hemen sonra buz içine alınmış ve tekrar vortekslenip düşük hızda santrifüj edilmiştir. Örnekler elektroforez aşamasına kadar buz kabı içerisinde bekletilmiştir.

Örnekleri yüklemek üzere separating (ayırma) jeli ve stacking (yükleme) jeli olmak üzere iki farklı jel hazırlanmıştır. Öncelikle seperating jel hazırlanmış ve polimerize olması beklendikten sonra stacking jel hazırlanıp sisteme yüklenmiştir.

Seperating jel hazırlanmasında (%12'lik SDS Jel); 1400 µl Akrilamid monomer solüsyonu, 1200 µl dH_2O, 900 µl 4X Gel running buffer (1,5 M Tris-Cl pH: 8.8), 40 µl %10'luk Sodyum Dedosil Sülfat (SDS), 18 µl Amonyum Persülfat (APS) ve 2 µl TEMED kullanılmıştır.

Hazırlanan solüsyon jel aparatına eklenmiş ve jelin üst kısmında kalan boşluğa saf su eklenmiş ve daha sonra jelin polimerize olması için bir süre beklenmiştir. Jel polimerize olduktan sonra stacking jel hazırlanmıştır.

Stacking jel hazırlanmasında; 500 µl 4X Stacking gel buffer (0,5 M Tris-Cl pH: 6.8), 1200 µl dH_2O, 280 µl Akrilamid monomer solution, 10 µl APS ve 2 µl TEMED kullanılmıştır.

Separating jelin hazırlanması için eklenen su döküldükten sonra kurutma kağıdı yardımı ile jel kurulanmıştır. Ardından hazırlanan stacking jel, separating jel üzerine dökülüp polimerize olması için 20-30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra jel aparatı elektroforez setine yerleştirilmiştir.

Elektroforez aşamasında; önceden hazırlanan her bir örnekten 10 µl, boya maddesinden ise 1 µl alınıp karıştırılmıştır. Markerdan ise 5 µl alınıp elektroforez sistemine yüklenmiştir. Tankın içi Tank buffer (0,025 M Tris pH: 3.0, 0,192 M Glisin, %1 SDS) ile doldurulmuştur ve 100 Voltta 1,5 saat elektroforez yapılmıştır.

Elektroforez işlemi bittikten sonra blotlama aşamasını gerçekleştirmek üzere, stacking jel çıkarılıp separating jelden ayrılmıştır. Ardından jel ilk olarak transfer buffer içine, daha sonra da jel nitroselüloz membrana aktarılmıştır. Aktarma işlemi sırasında öncelikle; jel boyutunda nitroselüloz membran kesilmiş, alt kısımda bulunan pad'in üzerine filtre kağıdı konulmuş ve onun üzerine de jel yerleştirilmiştir. Pad ve filtre kağıtları yerleştirilmeden önce transfer buffer solüsyonu ile ıslatılmıştır. Jelin üzerine de nitroselüloz membran ve tekrardan filtre kağıdı ile pad konulup jel holder kaset kapatılmıştır. Kapatılan jel holder kasetin beyaz kısmı tankın kırmızı yüzeyine, siyah kısmı da siyah yüzeye gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Tankın içerisi transfer buffer ile tamamen doldurulmuştur. 30 Voltta 90 miliamperde tüm gece elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

Bloklama işlemini gerçekleştirmek üzere, elektroforez işleminden sonra nitroselüloz membran çıkarılmıştır. Membran TBS buffer içerisine alınıp bir çalkalayıcıda 3 dk. süre ile çalkalanmıştır. Daha sonra bloklama solüsyonu hazırlanmıştır. Bu solüsyonun hazırlanması için 0,6 g süt tozu, 0,2 g albümin tartılıp TBS buffer içerisine alınmıştır. Membran bloklama solüsyonu içerisinde 45 dk. süre ile çalkalanmıştır. Bloking yapılan şerit membranlar, 3 kez Tris buffer salin-Tween 20 (TBS-T) ile 3'er dakika ara ile yıkanmıştır. Daha sonra membran virüse özgü konjugat antibadisi ile kaplanıp 1 saat inkübe edilmiştir. Membran 3 defa TTBS ile 5 dakika ara ile yıkanmıştır.

Son olarak proteinlerin görüntülenmesi aşamasında ise, 200 ml saf su içerisinde, substrat maddesinin (BCIP-NBT) (Sigma, ABD) eritilmesi ve sonrasında bu karışımın membrana karıştırılması ile tamamlanmış ve ardından renk oluşumu gözlenmiştir.

BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Arazi Çalışmaları Bulguları

Çalışma kapsamında yürütülen arazi çalışmaları soğanlı süs bitkileri yetiştiriciliğinin yapıldığı Çanakkale ili Merkez ilçeye bağlı Kepez beldesi, Güzelyalı beldesi ve Karacaören köyü ev bahçelerinde 2012 ve 2013 üretim sezonlarında yapılmıştır. Üretim sezonları süresince soğanlı süs bitkisi üretimi yapılan ev bahçeleri tesadüfi olarak seçilmiş ve arazi çıkışları gerçekleştirilmiştir. Bitkiler görsel olarak incelenmiş ve genel olarak virüs-benzeri simptom gösteren soğanlı süs bitkilerinden yaprak örnekleri alınmıştır. Arazi çıkışları sonucunda 2012 yılında 25, 2013 yılında ise 42 olmak üzere toplam 67 örnek toplanmıştır. Örneklerin toplandığı alanların dağılımı Çizelge 4.1'de verilmiştir. Her iki üretim sezonu sonucunda yapılan sörveylerde en fazla örnekleme Çanakkale ili Merkez ilçeye bağlı Kepez beldesinden yapılmış ve toplam 54 örnek toplanmıştır.

Çizelge 4.1. Çanakkale ili ev bahçeleri soğanlı süs bitkileri üretim alanlarından elde edilen Hıyar mozaik virüsü izolatlarının dağılımı

İzolatların Toplandığı Yer	Toplanan Örnek Sayısı (2012)	Toplanan Örnek Sayısı (2013)	Toplam
Kepez	25	29	54
Güzelyalı	0	9	9
Karacaören	0	4	4
TOPLAM	**25**	**42**	**67**

Yapılan sörveyler süresince toplanan örneklerde tipik olarak mozaik, yapraklarda çizgilenme, damar açılmaları, şerit şeklinde sarı, açık yeşil, koyu yeşil çizgiler, lokal nekrotik lezyonlar, şekil bozuklukları ve yapraklarda damar boyunca sararma, bodurluk simptomları görülmüştür. Arazi çalışmaları sonucu toplanan bazı bitki örneklerinde gözlemlenen belirtiler Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Arazi çalışmaları sonucu toplanan bazı bitki örneklerinde gözlenen belirtiler (a, b, c, d, e, f: sümbül bitkisinde mozaik, lokal nekrotik lezyonlar, açık, koyu yeşil lekeler, yapraklarda damar boyunca sararma, şekil bozuklukları, yapraklarda kıvrılma, damar açılmaları, g, h: zambak bitkisinde mozaik şeklinde renk açılmaları, şekil bozuklukları, i, j, k, l: nergis bitkisinde yapraklarda kıvrılma, şekil bozuklukları, sarı, açık, koyu yeşil çizgiler, mozaik simptomu).

Hıyar mozaik virüsü, konukçularında, virüsün streynlerine, konukçu ve çevre koşullarına bağlı olarak değişmekle birlikte yapraklarda sararma, mozaik şeklinde renk açılmaları, yaprak deformasyonları, nekrotik lezyonlar, şekil bozuklukları ve bodurlaşma gibi sistemik simptomlara neden olur. Bazen de latent olarak bulunup infekteli bitkilerde özellikle yabancı otlarda belirti oluşturmadan uzun yıllar canlılığını koruyabilir.

Benzer çalışmalarda Adhab ve Al-Ani (2011) tarafından yakın zamanda yapılan bir araştırmada fidanlıklar ve özel bahçelerden topladıkları *Hippeastrum* sp. Herb. (nergis zambağı) bitkisinde yapmış oldukları gözlemlerde açık yeşilden sarıya doğru renk veren mozaik simptomları gözlemlemişlerdir. Bu belirtilerin bitkide yaprakları soyulmuş bir görüntü oluşturduğunu bildirmişlerdir. Süs bitkilerinde yapılan bir başka çalışmada ise Chen ve Yang (2006), Tayvan'da yapmış oldukları bir çalışmada Anavatanı Brezilya olan dünyada geniş yayılım gösteren *Allamanda carthatica* L. (Altın trompet) bitkisinde şiddetli mozaik, yapraklarda buruşukluk ve bozulma simptomları gözlemlemişlerdir. Çalışmaları kapsamında yapmış oldukları mekanik inokulasyonlar sonucunda *Chenopodium amaranticolor*'da lokal lezyon, *N. tabacum* cv. *Van Hicks*'de lokal halkalı leke ve sistemik mozaik belirtileri gözlemleyerek yeni çıkan üst yapraklarda şiddetli mozaik belirtileri gösterdiğini bildirmişlerdir. Türkoğlu ve Fidan (1996), süs bitkilerinde yaptıkları bir çalışmada şerit şeklinde çizgisel simptomlar gösteren zambak bitkilerinden elde ettikleri virüsün test bitkilerine mekanik inokulasyonu sonucu *C. amaranticolor*'da klorotik lokal leke, *Chenopodium quinoa*'da nekrotik lokal leke, *Nicotiana glutinosa*'da sistemik mozaik belirtilerine CMV'nin neden olduğunu bildirmişlerdir.

Raj ve ark. (1998), şiddetli mozaik, yapraklarda koyu yeşil çizgiler ve taç yapraklarında renk kırılmaları gibi CMV simptomu gözlemledikleri glayöllerde yürüttükleri çalışma kapsamında yaptıkları mekanik inokulasyonlar sonucunda *Nicotiana tabacum* cv. White Burley'de nekrotik lokal lezyonlar; *N. rustica*'da sistemik mozaik, kabarcıklaşma ve yaprak deformasyonları; *Lycopersicon esculentum* (domates) bitkisinde ise sistemik mozaik belirtileri gözlemlemişlerdir.

Çağlar (2006), CMV'nin kavun bitkilerinde yaprak deformasyonu, yaprak kıvrılması ve sistemik mozaik; domates bitkilerinde yaprak simetrisinin bozulması ve sistemik mozaik; biber bitkilerinde yaprak kıvrılması, damar bantlaşması ve hafif mozaik simptomlarına neden olduğunu gözlemlemiştir.

Dheepa ve Paranjothi (2010), CMV ile infekteli muz bitkilerinden elde ettikleri virüsü mekanik yöntemlerle ve afid ile taşıma çalışmaları ile teşhis etmişlerdir. Çalışmaları kapsamında yapmış oldukları mekanik inokulasyon çalışmalarında *Nicotiana glutinosa*,

Chenopodium quinoa ve *Vigna mungo* indikatör bitkilerine karborandum tozu kullanarak elde ettikleri virüsü aşılamışlardır. Mekanik inokulasyon çalışmaları sonucunda tütün bitkisinde inokulasyondan 3 ay sonra CMV simptomlarının oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Virüs inokule edilmiş bitkilerde şiddetli mozaik ve yaprak deformasyonu gözlemlemişlerdir.

Gerek ülkemizde ve gerekse de diğer ülkelerde yapılan çalışmalara bakıldığında arazi çalışmaları kapsamında CMV ile şüpheli olarak toplanan hem soğanlı süs bitkilerinde hem de diğer kültür bitkilerinde gözlemlenen belirtilerin genel olarak benzer olduğu bununla birlikte bu belirtilerin, konukçu bitki, virüsün streyni, çevre koşulları vb. etmenler nedeniyle farklılık gösterebileceği söylenebilinir.

4.2. DAS-ELISA Testi Bulguları

Çanakkale ili Merkez ilçeye bağlı Kepez beldesi, Güzelyalı beldesi ve Karacaören köyü ev bahçelerinde 2012 ve 2013 yıllarında yapılan arazi çıkışları sonucunda toplanan 32'si nergis, 25'i sümbül, 10'u zambak olmak üzere toplam 67 örnek DAS-ELISA ile test edilmiştir. Testler sonucunda 2012 yılı üretim sezonunda toplanan 25 örnekten 1'i, 2013 yılı üretim sezonunda toplanan 42 örnekten ise 11'i CMV ile infekteli bulunmuştur. Arazi çıkışı sonucunda toplanan 67 bitki örneğinden 12'sinde CMV tespit edilmiştir. Toplanan örneklerde ortalama infeksiyon oranı %18 olarak gerçekleşmiştir. İnfeksiyon oranının izolatların toplandığı yerlere ve çalışmada kullanılan bitki türlerine göre dağılımı Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. İnfeksiyon oranının izolatların toplandığı yerlere göre dağılımı

İzolatların Toplandığı Yer	**İnfekteli Örnek /Toplam Örnek**	**% İnfeksiyon Oranı**
Kepez	8/54	15
Güzelyalı	3/9	33
Karacaören	1/4	25
Toplam	**12/67**	**18**

İnfeksiyon oranlarının hesaplanmasında toplam örnek sayısını oluşturan örneklerin tamamını, arazi çıkışları sonucunda toplanan ve CMV ile infekteli olduğu düşünülen örnekler oluşturmaktadır. Her iki üretim sezonu süresince toplanan örneklere uygulanan

DAS-ELISA testinin bulguları sonucunda Güzelyalı beldesinden toplanan 9 örneğin 3'ü infekteli olarak bulunmuştur. Kepez beldesinden ise toplam 54 örnek toplanmıştır ve toplanan 54 örnekten 8'i infekteli olarak bulunmuştur. Karacaören köyünden ise 4 örnek toplanmış ve 1'inin infekteli olduğu tespit edilmiştir. En yüksek infeksiyon oranı Güzelyalı beldesinde (%33) bulunurken, bunu Karacaören köyü %25 ve Kepez beldesi %15 infeksiyon oranlarıyla izlemektedir.

Çizelge 4.3. İnfeksiyon oranının çalışmada kullanılan bitki türlerine göre dağılımı

Çalışmada kullanılan bitki türleri	**İnfekteli Örnek /Toplam Örnek**	**% İnfeksiyon Oranı**
Nergis	4/32	12,5
Sümbül	6/25	24
Zambak	2/10	20
Toplam	**12/67**	**18**

DAS-ELISA bulguları sonucunda toplanan 32 nergis örneği içerisinden 4'ü (%12,5), 25 sümbül örneği içerisinden 6'sı (%24) CMV ile infekteli bulunurken toplanan 10 zambak örneğinden 2'sinin (%20) CMV ile infekteli olduğu bulunmuştur.

Arazi çalışmaları boyunca toplanan örneklerin hepsi DAS-ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Bu bağlamda elde edilen veriler Çizelge 4.4'de gösterilmiştir. DAS-ELISA testleri sonucunda test edilen 67 örnekten 12'si pozitif olarak bulunurken; absorbans değeri pozitife yakın olan 5 örnek şüpheli olarak tespit edilmiştir. Diğer 50 örnek ise negatif olarak belirlenmiştir. Pozitif sonuç veren 12 örneğin 4'ü nergis, 6'sı sümbül ve 2'si zambak bitkisidir.

Çizelge 4.4. DAS-ELISA sonuçları

İzolat No	Bitki Türü	İzolatların Toplandığı Yer	DAS-ELISA Sonuçları*
1	Nergis	Kepez	-
2	Nergis	Kepez	-
3	Nergis	Kepez	-
4	Zambak	Kepez	-
5	Nergis	Kepez	-
6	Sümbül	Kepez	-
7	Sümbül	Kepez	-
8	Sümbül	Kepez	+
9	Nergis	Kepez	-
10	Nergis	Kepez	-
11	Sümbül	Kepez	-
12	Zambak	Kepez	-
13	Nergis	Kepez	+
14	Zambak	Kepez	-
15	Zambak	Kepez	-
16	Sümbül	Kepez	-
17	Sümbül	Kepez	-
18	Nergis	Kepez	-
19	Nergis	Kepez	-
20	Sümbül	Kepez	-
21	Nergis	Kepez	-
22	Nergis	Kepez	-
23	Nergis	Kepez	-
24	Sümbül	Kepez	?
25	Nergis	Kepez	-
26	Sümbül	Karacaören	-
27	Sümbül	Kepez	-
28	Sümbül	Kepez	-
29	Sümbül	Kepez	+
30	Sümbül	Kepez	-
31	Zambak	Karacaören	?
32	Sümbül	Güzelyalı	-
33	Zambak	Karacaören	-
34	Zambak	Güzelyalı	+
35	Nergis	Güzelyalı	-
36	Sümbül	Kepez	+
37	Sümbül	Kepez	+
38	Sümbül	Karacaören	+
39	Sümbül	Kepez	+
40	Nergis	Güzelyalı	+
41	Nergis	Güzelyalı	+
42	Zambak	Kepez	-
43	Sümbül	Kepez	-
44	Sümbül	Kepez	-
45	Sümbül	Kepez	-

46	Sümbül	Kepez	-
47	Sümbül	Kepez	-
48	Nergis	Kepez	-
49	Nergis	Kepez	-
50	Nergis	Kepez	-
51	Nergis	Kepez	-
52	Nergis	Güzelyalı	-
53	Nergis	Güzelyalı	-
54	Nergis	Güzelyalı	-
55	Nergis	Kepez	-
56	Zambak	Kepez	+
57	Nergis	Kepez	?
58	Nergis	Kepez	-
59	Nergis	Kepez	-
60	Nergis	Kepez	?
61	Nergis	Kepez	-
62	Nergis	Kepez	+
63	Sümbül	Kepez	?
64	Nergis	Kepez	-
65	Zambak	Kepez	-
66	Nergis	Kepez	-
67	Sümbül	Güzelyalı	-

* ? : şüpheli, + : pozitif, - : negatif.

ELISA testi verilerine dayanarak oluşturulan infekteli bitki sayılarının veya infeksiyon oranlarının hesaplanmasında konukçu bitki aralığının genişliği, bitki türü, viral etmenin virulensliği, sörvey yöntemi ve sörvey yapılan alanın genişliği vb. birçok faktör sonuçların değişen oranlarda çıkmasına etken olabilmektedir. CMV'nin DAS-ELISA testi ile belirlenmesi üzerine yapılmış benzer çalışmalarda Pearson ve ark. (2009), Yeni Zelanda'da soğanlı süs bitkilerinde virüslerin tanılanmasına yönelik yaptıkları çalışmada DAS-ELISA bulguları sonucunda topladıkları 6 peru zambağı izolatından 1 tanesinde (%16), 8 yıldız çiçeği izolatından 1 tanesinde (12,5), 2 ak yıldız izolatından 1 tanesinde (%50) ve 23 lale izolatından 3 tanesinde (%13) CMV infeksiyonu tespit etmişlerdir. Niimi ve ark. (2003), soğanlı süs bitkilerinden bazı zambak çeşitlerinde yapmış oldukları bir çalışmada DAS-ELISA bulguları sonucunda; topladıkları 22 zambak örneğinden 1'inin (%5) sadece CMV ile infekteli olduğunu, 1'inin de CMV ve LSV ile karışık infeksiyon oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Toplamda 22 zambak bitkisinde 2 örneğin CMV ile infekteli olduğu sonucuna ulaşmışlar ve CMV infeksiyon oranını %9 olarak bulmuşlardır. Gutierrez-Villegas ve ark. (2004), Meksika'da ev bahçelerinde CMV simptomlarına benzer simptom gösteren soğanlı süs bitkilerinde bir çalışma yürütmüşlerdir. Topladıkları nergis zambağı örneklerini DAS-ELISA testi ile CMV, TRSV, TEV, AMV, TSWV ve INSV

hastalıklarına karşı test etmişlerdir. Yapmış oldukları DAS-ELISA testi bulguları sonucunda topladıkları nergis zambağı örneklerinin sadece CMV ile infekteli olduklarını bulmuşlardır. Benzer bir başka çalışmada Navalinskiene ve Samuitiene (2001), Litvanya'da virüs-benzeri simptom gösteren soğanlı bitkilerden çiğdem ve nergis bitkisindeki infeksiyonun CMV tarafından gerçekleştirildiğini mekanik inokulasyon çalışmaları ve serolojik testlerle tespit etmişlerdir. Bu bölgedeki soğanlı süs bitkilerinde daha önceleri CMV'nin yaygınlık gösterdiğini fakat sonra bu durumun değişip ToRSV ve TSWV gibi diğer virüslerin süs bitkilerinde infeksiyon oluşturduğunu, karışık infeksiyonların da meydana gelebildiğini bildirmişlerdir. Clark ve Guy (2000), Yeni Zelanda'da nergis bitkilerinde yaptıkları serolojik DAS-ELISA testi bulguları sonucunda topladıkları nergis bitkilerinde CMV'nin hem tek başına hastalık oluşturduğunu hem de NLV, NMV, NTNV ve NYSV hastalıkları ile karışık infeksiyon meydana getirdiğini tespit etmişlerdir. Sadece CMV ile infekteli bitkilerin ya hafif mozaik simptomu gösterdiğini ya da hiçbir belirti göstermediğini bildirmişlerdir.

Konuyla ilgili yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada, Saidi ve Safaeizadeh (2012), İran'da sörvey çalışmaları sırasında mozaik simptomu gözlemledikleri tesbih çiçeği süs bitkisinde yaptıkları DAS-ELISA testi bulguları sonucunda topladıkları 37 örnekten 3'ünün (%8,1) sadece CMV ile infekteli olduğu sonucunu bulmuşlardır.

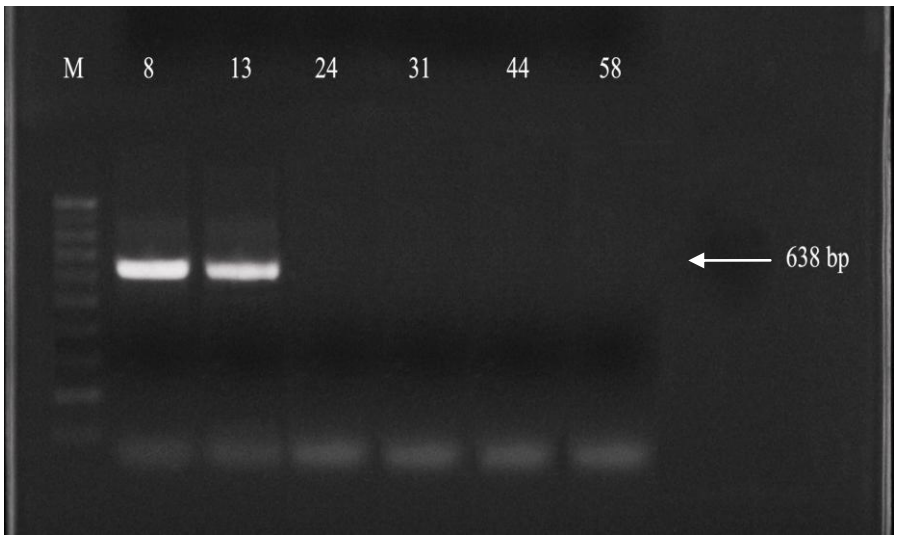
4.3. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi Bulguları

Moleküler bir yöntem olan RT-PCR yöntemi, DAS-ELISA yöntemine göre daha duyarlı bir yöntemdir. Araştırıcıların yaptıkları RT-PCR çalışmaları öncesi uyguladıkları total RNA izolasyon yöntemleri, çalışma niteliğine göre farklılıklar gösterebilmektedir. Bu çalışmada RNA izolasyonunda Qiagen (Almanya) firmasına ait RNeasy izolasyon kiti kullanılmış ve total RNA izolasyonu başarı ile sonuçlanmıştır.

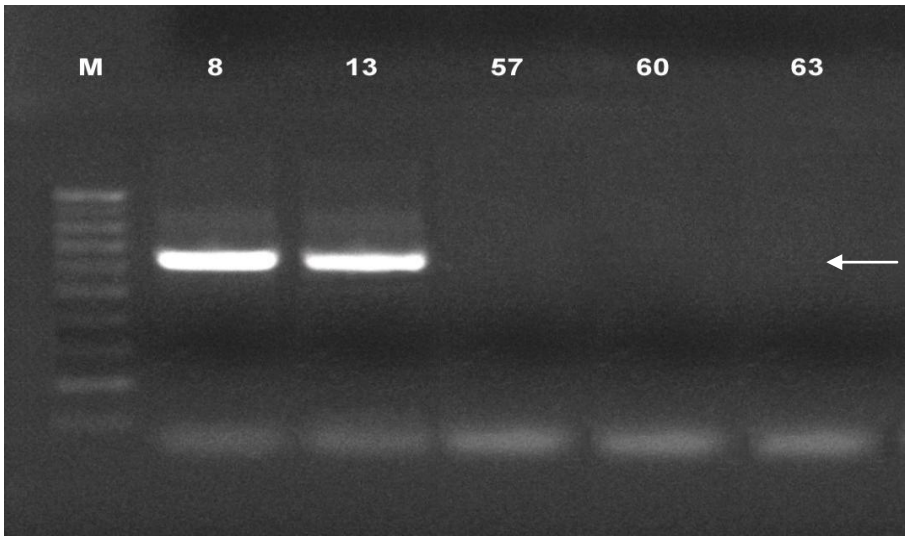
RT-PCR analizi DAS-ELISA analizine göre daha duyarlı bir yöntem olduğu için DAS-ELISA testinde negatif ya da şüpheli olarak çıkan örneklerin bir kısmına RT-PCR ile tekrar analizi yapılmıştır. Bu bağlamda çalışma kapsamında 2012 ve 2013 üretim sezonları içerisinde Çanakkale ili Merkez ilçeye bağlı Kepez beldesi, Güzelyalı beldesi ve Karacaören köyü ev bahçelerinden toplanan örneklerden belirgin olarak CMV simptomu göstermesine karşın DAS-ELISA testleri sonucunda şüpheli olarak bulunan örneklerin tamamına ve negatif olarak bulunan örneklerden tesadüfen seçilen iki tanesine moleküler bir yöntem olan RT-PCR analizi uygulanmıştır. RT-PCR çalışmalarında kılıf protein

geninin bir kısmına spesifik olan ve yaklaşık 638 bp büyüklüğünde korunmuş bir bölgeyi çoğaltan SK5CMV ve SK6CMV primerleri kullanılmıştır. DAS-ELISA testi sonucunda rastgele seçilen ve pozitif olduğu bilinen 2 örnek RT-PCR çalışmaları kapsamında kontrol örnekleri olarak kullanılmıştır. Şüpheli olarak bulunan örneklerin tamamı ve negatif olarak bulunan örnekler içerisinden rastgele seçilen iki örnek RT-PCR yöntemi ile test edilmiştir. Kontrol amaçlı kullanılan örneklerde yaklaşık 638 bp büyüklüğünde bantlar gözlenmiştir. DAS-ELISA testleri sonucunda şüpheli ya da negatif olarak bulunan örneklerde RT-PCR analizi sonucunda bant oluşumu gözlenmemiştir. RT-PCR için kullanılan 8 ve 13 numaralı örnekler, DAS-ELISA testi sonucunda pozitif olduğu bilinen örneklerden rastgele seçilmiştir. 8 ve 13 numaralı örnekler beklenildiği üzere yaklaşık 638 bp büyüklüğünde bantlar oluşturmuştur. 24, 31, 57, 60, 63 numaralı örnekler DAS-ELISA testi sonucunda şüpheli olarak bulunan örnekler olup, 44 ve 58 numaralı örnekler DAS-ELISA testi sonucunda negatif olarak bulunan örneklerden rastgele seçilmiştir.

DAS-ELISA testi sonucuna göre pozitif olarak tespit edilen CMV izolatları RT-PCR sonucunda belirgin bantlar oluştururken; şüpheli ya da negatif örneklerde beklenildiği üzere bant oluşumu gözlenmemiştir. CMV izolatlarına ait RT-PCR sonuçları Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. RT-PCR analizi sonuçları. M: Marker (100-1000 bp) 8: Sümbül ve 13: Nergis, CMV ile infekteli izolatlar, (638 bp). 58: Nergis, 24, 44: Sümbül, 31: Zambak, CMV ile infekteli olmayan izolatlar.



Şekil 4.3. RT-PCR analizi sonuçları. M: Marker (100-1000 bp) 8: Sümbül ve 13: Nergis, CMV ile infekteli izolatlar, (638 bp). 57, 60: Nergis, 63: Sümbül, CMV ile infekteli olmayan izolatlar.

RT-PCR çalışmalarında yapılan tüm modifikasyonlar araştırmacıların çalışma amaçlarına göre farklılıklar gösterebilmekte ve bu nedenle de farklı büyüklükte bantlar elde edilebilmektedir (Kundakçı, 2013).

Benzer çalışmalarda Alan (2012) tarafından yakın zamanda yapılan bir araştırmada, RT-PCR çalışmalarının sonucunda CMV'nin Osmaniye'den alınan turp izolatları (CMV-T1, CMV-T2), Adana'dan alınan ıspanak izolatı (CMV-I) ve marul izolatına (CMV-M) ait 650 baz çiftine karşılık gelen bantlarını gözlemlemiştir. Bunlara benzer başka bir çalışmada; Fidan (2010)'a göre, sarımsak bitkisinde yapılan moleküler RT-PCR analizi sonucunda 650 bp'lik bölge çoğaltılarak CMV'nin sarımsaktaki varlığını tanılamıştır. Konuyla ilgili bir başka çalışmada ise Duarte ve ark. (2013), Brezilya'da aralarında zambak soğanlı süs bitkilerinin de bulunduğu 7 farklı süs bitkisinde CMV'nin varlığını çeşitli yöntemlerle araştırmışlardır. Yaptıkları RT-PCR analizinde 657 bp büyüklüğünde bantlar elde etmişlerdir. Koolivand ve ark. (2012)'na göre, domates, biber, hıyar, kabak ve dulavrat otu bitkilerinde yapmış oldukları RT-PCR analizi ile test ettikleri 57 örnekten 40 tanesinin CMV ile infekteli olduğunu tespit etmişler ve CMV'nin kılıf protein geninin 675 bp büyüklüğünde bant oluşturduğunu bulmuşlardır.

Zavareh ve ark. (2013) tarafından yakın zamanda yapılan bir araştırmada, İran'da bazı süs bitkilerinde CMV'nin varlığını belirlemek amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Flamingo çiçeği süs bitkisinin iki farklı çeşidinden elde ettikleri CMV izolatlarını moleküler bir yöntem olan RT-PCR analizi ile test etmişlerdir. Spesifik primerler

kullanarak yaptıkları RT-PCR analizleri sonucunda virüsün CP genine ait 540 bp büyüklüğünde bantlar elde etmişlerdir.

Raj ve ark. (2002), Hindistan'da şiddetli mozaik, yapraklarda çizgilenme ve renk kırılmaları simptomları gözlemledikleri 5 farklı glayöl çeşidinden örnekler toplamışlardır. Bu belirtilere sebep olan etmenin, yaptıkları analizler sonucunda CMV olduğunu tespit etmişlerdir. Glayöllerden elde ettikleri 5 adet CMV izolatına spesifik primerler kullanarak yaptıkları RT-PCR analizi sonucunda virüse ait CP geninin yaklaşık 500 bp büyüklüğünde bant oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Niimi ve ark. (2003), birbirinden farklı 3 zambak çeşidinde CMV'nin varlığını tespit etmek için yaptıkları RT-PCR çalışmaları sonucunda topladıkları 22 bitki örneğinden 13'ünün sadece CMV ile infekteli olduğunu bulmuşlar ve CMV'ye ait 408 bp büyüklüğünde bantlar elde etmişlerdir.

Mazidah ve ark. (2012), Malezya'da yapraklarda mozaik ve şekil bozuklukları, çiçeklerde renk kırılması ve deformasyon gözlemlediği *Catharanthus roseus* süs bitkisinden 100 örnek toplamışlardır. DAS-ELISA bulguları sonucunda 2 örneğin CMV ile infekteli olduğu sonucunu bulmuşlardır. Yapmış oldukları RT-PCR çalışmaları sonucunda da; CMV'ye ait istenilen 1000 bp büyüklüğüne karşılık gelen bantları elde etmişlerdir.

Sharma ve ark. (2005), Hindistan'da dört farklı zambak türü üzerinde CMV'nin varlığını çeşitli yöntemlerle test etmişlerdir. Yapmış oldukları RT-PCR çalışmaları sonucunda CMV'ye ait yaklaşık 900 bp'e karşılık gelen istenilen bant büyüklüklerini elde etmişlerdir.

Chen ve ark. (2001), süs bitkilerinden elde ettikleri 13 CMV izolatını test ettikleri RT-PCR çalışmalarının sonucunda 12 CMV izolatının yaklaşık 1100 nt büyüklüğünde bant oluşturduğunu bildirmişlerdir.

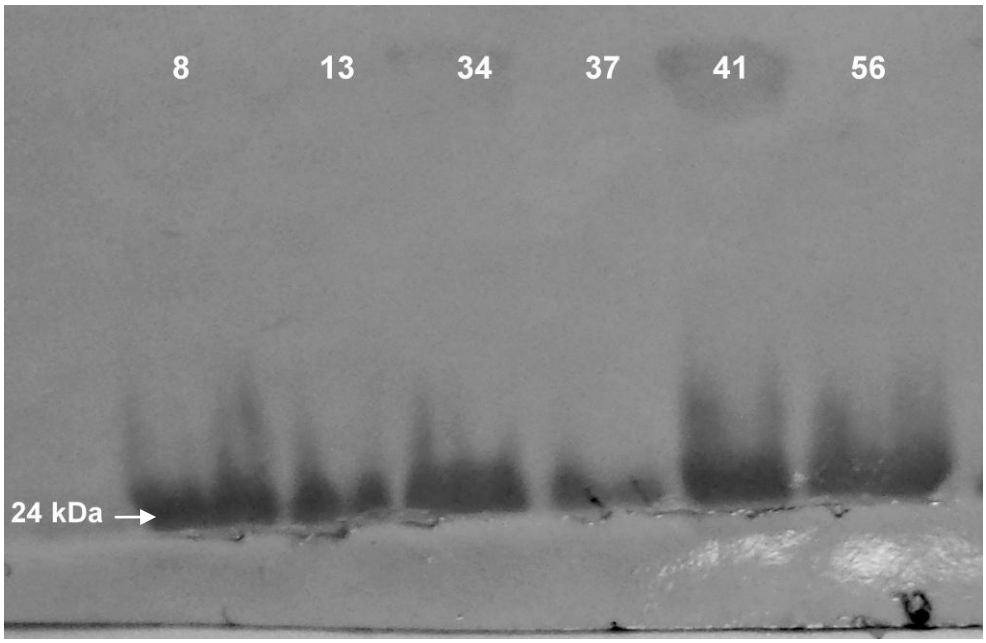
Verma ve ark. (2006), Hindistan, Palampur'da serada yetiştirilen süs bitkisi sardunyalarında, mozaik, beneklenme ve bodurluk gibi simptomlar gözlemlemişlerdir. Bu belirtilere bir viral hastalığın sebep olduğunu düşünerek bitkiden virüsü izole edip afid taşınımı denemeleri, ELISA testleri, DNA-RNA hibridizasyonu ve RT-PCR testleri uygulayarak bu virüsün CMV olduğunu tespit etmişlerdir. Yapmış oldukları RT-PCR çalışmalarında CMV'ye ait yaklaşık olarak 940 bp büyüklüğünde bant elde etmişlerdir.

Abdullahi ve ark. (2001)'nın börülcede CMV'nin tohumla taşınmasını araştırdıkları bir çalışmada, yaptıkları RT-PCR analizi sonucunda 920 bp büyüklüğünde bantlar elde etmişlerdir.

Lunello ve ark. (2005), yaptıkları bir sörvey çalışmasında topladıkları örnekleri önce DAS-ELISA yöntemi ile test etmişlerdir. Daha sonrada virüs hastalıklarının teşhisinde daha duyarlı yöntemler geliştirmeye çalışmışlardır. Bahsedilen yöntemlerin, infekteli bitkilerden elde edilen virüsün konsantrasyonu düşük olduğu durumlarda bile iyi bir şekilde çalıştığını tespit etmişlerdir. DAS-ELISA testi sonucunda negatif ya da şüpheli çıkan örneklere RT-nested-PCR analizini uygulamışlardır. DAS-ELISA testinden sonra yaptıkları RT-nested-PCR'ın 10^2 kez daha duyarlı bir yöntem olduğunu tespit etmişlerdir. Buna paralel olarak yaptıkları IC-RT-PCR'ın ise, DAS-ELISA testinden 10^4 kez daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. DAS-ELISA analizinde negatif ya da şüpheli olarak buldukları örneklerin RT-nested-PCR ve IC-RT-PCR ile tekrar analizlerini yaptıklarında bazılarının pozitif çıktığını ve hastalıklı bitki sayısında yüksek oranda artışlar olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma kapsamında yaptıkları DAS-ELISA testi ile negatif ya da şüpheli olarak buldukları örneklerin, RT-PCR tekrar analizlerinde de bu örneklere ait pozitif sonuç elde etmemişlerdir. Topladıkları tipik CMV benzeri simptom gösteren bu bitkilerin negatif sonuç vermesinin, bitkilerin test edilen bölgelerinde virüs konsantrasyonunun düşük olmasından ya da başka virüs ya da virüsler tarafından infekteli olabileceğinden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

4.4. Western Blot Analizi Bulguları

Western blot analizi çalışmalarında DAS-ELISA testlerinde de kullanılan poliklonal antibadiler kullanılmıştır. DAS-ELISA ve RT-PCR testleri sonuçlarında infekteli olduğu belirlenen 8 ve 13 numaralı CMV örnekleri ile DAS-ELISA testi sonucunda infekteli olduğu belirlenen ve rastgele seçilen 34, 37, 41 ve 56 numaralı CMV örnekleri kullanılarak Western blot analizi yapılmıştır. Analiz çalışmaları sonucunda test edilen tüm örneklerde CMV kılıf proteinine ait yaklaşık 24 kDa ağırlığında proteinler elde edilmiştir. CMV izolatlarına yapılan Western blot analizi sonucunda oluşan bantlar Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Western blot analizi sonuçları. 8, 37: Sümbül, 13, 41: Nergis, 34, 56: Zambak, CMV ile infekteli izolatlar (24 kDa).

CMV'nin kılıf protein genlerinin ağırlıklarının belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında beklenildiği üzere yapılan bu çalışma ile çok yakın sonuçların alındığı gözlenebilmektedir. Srivastava ve Raj (2008), Hindistan'da tütün bitkisinde CMV alt grup IB üyelerine karşı kod protein geni aracılığıyla transgenik dayanıklılık oluşturma çalışmalarını yürütmüşlerdir. CMV'ye ait antiserum kullanarak yapmış oldukları Western blot analizi sonucunda Çanakkale izolatlarında elde edilen sonuca benzer bir şekilde test ettikleri bütün bitkilerde CMV'nin 24 kDa ağırlığında kılıf protein geni kodladığını tespit etmişlerdir. Bu bulguları destekleyen başka bir çalışmada ise Quemada ve ark. (1991), CMV'nin C ırkına (alt grup I) ait CP genini plazmid vektörler aracılığıyla tütün bitkilerine transfer ettikleri çalışmalarında RNA ve protein analizi için sırasıyla Northern ve Western blot analizini uygulamışlardır. Yaptıkları Northern blot analizi sonucunda transgenik bitkiden izole ettikleri CMV-C CP'nin yaklaşık 1400 nükleotit mRNA içerdiğini ve yaptıkları Western blot analizi sonucunda CMV-C ırkının CP'nin moleküler ağırlığının 24 kDa olduğunu saptamışlardır. Srivastava ve ark. (1992), Hindistan'da kloroz, damar yakınlarında klorotik nokta, yapraklarda nekroz ve büyüme geriliği simptomlarını gözlemlediği en önemli krizantem hibrit türü olan *Chrysanthemum* x *morifolium*'da yaptıkları SDS-PAGE analizi sonucu kılıf proteini alt biriminin yaklaşık 24,5 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğunu belirtmişlerdir. Habili ve Francki (1974), ilk defa krizantem bitkisinde rapor edilen *Cucumovirus* cinsi üyesi *Tomato aspermy virus*

(TAV)'nin ve aynı cins içerisinde yer alan *Cucumber mosaic virus* (CMV)'nin bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerini karşılaştırmak amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Yaptıkları SDS-PAGE analizi sonucunda bu iki virüsün CP geninin yaklaşık olarak 24,5 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu iki virüsün proteinlerinin amino asit bileşimlerinin benzer olduğunu buna karşın protein alt birimlerinin molekül ağırlıklarının farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. TAV ve CMV'nin protein alt birimlerinin molekül ağırlıklarını sırasıyla 26,1 ve 26,3 kDa olarak hesaplamışlardır. Bu iki virüsün serolojik olarak da birbirinden farklı olduğunu belirtmişlerdir.

Wang ve ark. (2002), kabakgillerde (kabak ve kavun) hastalık yapan *Cucumovirus* cinsi üyesi CMV'nin iki ırkı (alt grup IA ve II) ile *Potyvirus* cinsi üyelerinden ZYMV ve WMV arasındaki sinerjistik etkileşimi inceleyen bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu virüslerin kılıf protein ağırlıklarını belirlemek için öncelikle SDS-PAGE yolu ile proteinleri fraksiyonlarına ayırmışlar ve daha sonrasında CMV'ye özgü antiserum kullanarak Western blot analizi yapmışlardır. Western blot analizi çalışmaları sonucunda CMV'nin alt grup IA ırkına ait kılıf protein geninin ağırlığını 25-32,5 kDa arasında, CMV'nin alt grup II ırkına ait kılıf protein geninin ağırlığını yaklaşık 25 kDa ağırlığında bulmuşlardır. ZYMV'nin ise 32,5 kDa büyüklüğünde kılıf protein geni ağırlığını belirlemişlerdir.

Madhubala ve ark. (2005), Hindistan'da vanilya bitkisinde mozaik simptomları, yapraklarda bozulma ve bitkide büyüme geriliğine sebep olan CMV'nin nükleotid dizi özelliklerini karakterize ettikleri bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma kapsamında mekanik inokulasyon testleri ve konukçu genişliği belirlenmesi, elektron mikroskobu çalışmaları, DAS-ELISA testi, Western blot analizi, RT-PCR analizi, klonlama ve sekans analizi çalışmaları yapmışlardır. Yapmış oldukları Western blot analizi çalışmaları sonucunda vanilya bitkisinden saflaştırdıkları virüse özgü örtü CP geninin moleküler ağırlığını 25 kDa olarak saptamışlardır. Yakın zamanda yapılan bir başka araştırmada ise El-Borollosy ve Waziri (2013), Mısır'da marul bitkisinden izole ettikleri CMV'nin tanısı ve moleküler karakterizasyonu için yapmış oldukları SDS-PAGE analizi sonucunda CMV'nin yaklaşık 25 kDa ağırlığında kılıf protein genlerine sahip olduğunu bulmuşlardır. Chalam (1982)'a göre, yapmış olduğu konukçu genişliği çalışmaları, afid ile taşıma denemeleri, elektron mikroskobu ve serolojik çalışmaların sonucunda doğal olarak infekteli *Cicer arietinum* (nohut) bitkilerinde mekanik olarak taşınabilen CMV ve *Bean yellow mosaic virus* (Fasulye sarı mozaik virüsü; BYMV) hastalıklarını tespit etmiştir. Yaptığı poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) sonucunda CMV'nin CP geninin moleküler ağırlığını 25 kDa olarak belirlemiştir.

BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında soğanlı süs bitkilerinin yetiştiriciliğinin yapıldığı Çanakkale ili ev bahçelerinden elde edilen CMV izolatlarının serolojik ve/veya moleküler yöntemlerle tanılanması amaçlanmıştır. Süs bitkilerinin yetiştiriciliğinin yapıldığı ev bahçelerinde CMV simptomlarına benzer simptom gösteren soğanlı süs bitkilerinden örnekler alınarak öncelikle DAS-ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Şüpheli ya da negatif olarak bulunan bazı örneklere RT-PCR analizi uygulanmıştır.

Elde edilen CMV izolatları Çanakkale ili Merkez ilçeye bağlı Kepez beldesi, Güzelyalı beldesi, Karacaören köyü ev bahçelerinde soğanlı süs bitkilerinin yetiştiriciliğinin yapıldığı farklı bahçelerden toplanmıştır. Yapılan sörveyler sonucunda CMV'ye benzer simptom gösteren ve CMV ile infekteli olduğu ya da şüpheli olduğu düşünülen toplam 67 adet yaprak örneği toplanmıştır. Örnekleme yapılırken bahçe seçimleri rastgele yapılmış ve karakteristik olarak CMV simptomu gösteren ve CMV ile şüpheli olduğu düşünülen bitkilerden yaprak örnekleri alınmıştır. Yapılan sörveylerde genel olarak CMV'nin tipik simptomu olan, mozaik, yapraklarda çizgilenme, damar açılmaları, şerit şeklinde sarı, açık-koyu yeşil çizgiler, nekrotik lezyonlar, şekil bozuklukları, büyüme geriliği ve kloroz simptomları gözlenmiştir.

DAS-ELISA testi bulguları sonuçlarında 2012 yılı üretim sezonunda toplanan 25 örnekten 1'i (%4), 2013 yılı üretim sezonunda toplanan 42 örnekten ise 11'i (%26,2) toplamda 67 bitki örneğinin 12'si CMV ile infekteli olarak bulunmuştur. Yapılan sörveylerde soğanlı süs bitkilerinde CMV infeksiyon oranı %18 olarak tespit edilmiştir. İnfeksiyon oranının izolatların toplandığı yerlere göre dağılımında en yüksek oran Güzelyalı beldesinde %33 gözlenirken, bu oran Karacaören köyünde %25, Kepez beldesinde ise %15 olarak belirlenmiştir.

Çanakkale ili ev bahçelerinden toplanan 4'ü nergis, 4'ü sümbül ve 1'i zambak olmak üzere toplam 9 CMV izolatına moleküler bir yöntem olan RT-PCR analizi yapılmıştır. RT-PCR çalışmalarında, kılıf protein (CP) geninin bir kısmına spesifik olan ve yaklaşık olarak 638 bp büyüklüğünde korunmuş bir bölgeyi çoğaltan primerler kullanılmıştır. RT-PCR analizi için kullanılan 8, 13, 24, 31, 44, 57, 58, 60 ve 63 numaralı izolatlardan 8 ve 13 numaralı izolatlar DAS-ELISA testi sonucu pozitif olduğu bilinen örneklerden, diğer 7 izolat ise DAS-ELISA testi sonucunda şüpheli ya da negatif olarak tespit edilen

örneklerden oluşmuştur. Pozitif olduğu bilinen izolatlar beklenildiği üzere yaklaşık 638 bp büyüklüğünde net bantlar oluşturmuştur. DAS-ELISA testi ile şüpheli ya da negatif olarak tespit edilen örneklerde ise beklenildiği üzere bant oluşumu gözlenmemiştir. DAS-ELISA ve RT-PCR testi sonuçlarında infekteli olduğu bilinen 8 ve 13 numaralı CMV örnekleri ile DAS-ELISA testi sonucunda infekteli olduğu belirlenen ve rastgele seçilen 34, 37, 41 ve 56 numaralı CMV örnekleri kullanılarak yapılan Western blot analizi çalışmaları sonucunda test edilen tüm örneklerde CMV kılıf protein genine ait yaklaşık 24 kDa ağırlığında proteinler elde edilmiştir.

Çalışma kapsamında yapılan analizler sonucunda, CMV benzeri belirtiler gösteren örneklerin bazıları CMV ile infekteli bulunurken, bazılarının tipik virüs simptomu göstermesine rağmen negatif olarak bulunması bu örneklerin CMV dışında başka virüslerle infekteli olabileceğini düşündürmektedir.

Bitki virüs hastalıkları ciddi ürün ve kalite kayıplarına neden olmakta ve hastalık görüldükten sonra mücadele yapmak mümkün olamamaktadır. Virüs hastalıkları ile doğrudan bir kimyasal mücadele yöntemi olmadığı için bitkiye virüs bulaşmadan önce artık bitkilerin temizlenmesi, dayanıklı çeşit geliştirme, vektör böceklerle mücadele gibi koruyucu önlemler alınarak hastalığın yayılması büyük ölçüde önlenebilir. Bitki virüs hastalıklarının kontrolünde erken tanı ve teşhis yapmak son derece önem arz etmektedir. Çünkü virüs hastalıkları ile mücadele yapmak için öncelikle virüsün tanılanması gerekir. Hıyar mozaik virüsü ekonomik önemi olan, birçok sebzede, meyvede hastalık yapabildiği gibi yabancı otlar ve süs bitkileri de dâhil olmak üzere çok geniş bir konukçu dizisine sahiptir. Hıyar mozaik virüsü latent olarak yabancı otlarda da yaşamını devam ettirebildiği için virüsün yayılmasını önleyecek tüm tedbirlerin alınmasına özen gösterilmeli bunun yanı sıra ileriye yönelik dayanıklılık çalışmalarına katkı sağlamak amacı ile bilimsel çalışmaların tüm hızıyla devam ettirilmesi gerekmektedir.

Daha sonraları yapılacak olan çalışmalara öncülük edeceği düşünülen bu çalışma ile Çanakkale ili Merkez ilçeye bağlı Kepez beldesi, Güzelyalı beldesi ve Karacaören köyü ev bahçelerinde soğanlı süs bitkilerinde Hıyar mozaik virüsü'nün varlığı serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

Abdullahi I., Ikotun T., Winter S., Thottappilly G. ve Atiri G. I., 2001. Investigation on Seed Transmission of Cucumber Mosaic Virus in Cowpea. *African Crop Science Journal*, 9 (4): 677–684.

Acarsoy N., 2006. Bazı Soğanlı Süs Bitkilerinin Saksı Bitkisi Olarak Değerlendirilmesi Üzerine Araştırmalar. (Yüksek Lisans Tezi). Ege Üniversitesi, İzmir.

Adhab M. A. ve Al-Ani R. A., 2011. Amaryllis and Shrimp Plant are Secondary Hosts of Cucumber Mosaic Cucumovirus (CMV) in Iraq. *Agric. Biol. J. N. Am*., 2 (5): 872–875.

Alan B., 2012. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Yetiştirilen Bazı Kışlık Sebzelerde Hastalık Yapan Virüslerin Tanılanması ve Karakterizasyonu. (Doktora Tezi). Çukurova Üniversitesi, Adana.

Anonim, 2009. ViralZone. *Swiss Institute of Bioinformatics*, Erişim Tarihi: 19.05.2013, http://viralzone.expasy.org/all_by_species/135.html.

Anonim, 2011. Türkiye İstatistik Kurumu (TUİK), Erişim Tarihi: 21.04.2013, http://www.tuik.gov.tr/Veri bilgi.

Anonim, 2013. *Plant Viruses Online*, Erişim Tarihi: 17.01.2014, http://pvo.bio-mirror.cn/images/d6.jpg.

Anonim, 2013. *Plant Viruses Online*, Erişim Tarihi: 27.12.2013, http://pvo.bio-mirror.cn/descr267.htm.

Atay S., 1996. Soğanlı Bitkiler, Türkiye'den İhracatı Yapılan Türlerin Tanıtım ve Üretim Rehberi. *Doğal Hayatı Koruma Derneği*, İstanbul.

Berniak H., Kamińska M. ve Malinowski T., 2010. Cucumber Mosaic Virus Groups IA and II are Represented Among Isolates from Naturally Infected Lilies. *Eur J. Plant Pathol*., 127: 305–309.

Berniak H., Malinowski T. ve Kamińska M., 2009. Comparison of ELISA and RT-PCR Assays for Detection and Identification of Cucumber Mosaic Virus (CMV) Isolates Infecting Horticultural Crops in Poland. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 17 (2): 5–20.

Brito M., Garrido M. J., Mejías A. ve Marys E., 2012. Transmisión Del Virus Del Mosaico Del Pepino Por Semilla de Capacho (Canna indica). *Fitopatol. Venez*., 25 (1): 24–26.

Bruntt A. A., 1955. The Occurrence of Cucumber Mosaic Virus and Four Nematode Transmitted Viruses in British Narcissus crops. *Plant Pathology*. 157–160.

Buzkan N. ve Yüzer D., 2009. Kahramanmaraş Kırmızı Biberlerinde Tohumla Taşınan Virüslerin Moleküler Tanısı. *Alatarım*, 8 (1): 1–7.

Cardenas S. E., 1999. Diagnostico de Virus Mediante Inclusiones Virales, Microscopia Electronica y Rango de Hospedantes. *Colegio de Postgraduados*, Montecillo, Mexico. 147.

Chalam T.V., 1982. Identification and Characterization of Cucumber Mosaic and Bean Yellow Mosaic Viruses Affecting Chickpea (Cicer arietinum L.) in India. (Doktora Tezi). Andhra Pradesh Agricultural University Rajendranagar, Hyderabad.

Chen Y. K. ve Yang C. C., 2006. Characterization of An Isolate of Cucumber Mosaic Virus Associated with Allamanda Mosaic. *Plant Pathology Bulletin*, 15: 77–82.

Chen Y. K., Derks A. F. L. M., Langeveld S., Goldbach R. ve Prins M., 2001. High Sequence Conservation Among Cucumber Mosaic Virus Isolates from Lily. *Archives of Virology*, 146: 1631–1636.

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

Clark V. R. ve Guy P. L., 2000. Five Viruses in Narcissus spp. from New Zealand. *Australasian Plant Pathology*, 29 (4): 227–229.

Çağlar B. K., 2006. Hıyar Mozaik Virüsü (CMV)'nün Kavun (CMV-K), Domates (CMV-D), Biber (CMV-B) İzolatlarının Biyolojik, Serolojik, Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu ve Satellit-RNA'lerin Virüs Üzerindeki Etkisi. (Doktora Tezi). Çukurova Üniversitesi, Adana.

Dheepa R. ve Paranjothi S., 2010. Transmission of Cucumber Mosaic Virus (CMV) Infecting Banana by Aphid and Mechanical Methods. *Emir. J. Food Agric*., 22 (2): 117–129.

Duarte L. M. L., Rivas E. B., Harakava R., Veauvy M. C. D. ve Alexandre M. A. V., 2013. Genealogy of Cucumber Mosaic Virus Isolated from Ornamental Species. *American Journal of Plant Sciences*, 4: 1081–1087.

Elbeshehy E. K. F. ve Sallam A. A. A., 2012. Partial Characterization of an Isolate of Cucumber Mosaic Virus from Ismailia Governorate. *International Journal of Virology*, 8 (1): 90–97.

El-Borollosy A. M. ve. Waziri H. M. A., 2013. Molecular Characterization of A Cucumber Mosaic Cucumovirus Isolated from Lettuce in Egypt. *Annals of Agricultural Science*, 58 (1): 105–109.

Eryiğit H., 2004. Isparta Yöresindeki Domates Kültürlerinde Enfeksiyon Oluşturan Viral Etmenin Tanılanmasına Yönelik Çalışmalar. (Yüksek Lisans Tezi). Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.

Fidan H., 2010. Sarımsak, Soğan ve Pırasadaki Virüs Hastalıklarının Saptanması ve Taşköprü 56 Sarımsak Tipinin En Yaygın Virüse Karşı Reaksiyonunun Belirlenmesi. (Doktora Tezi). Çukurova Üniversitesi, Adana.

Francki R. I. B. ve Habili N., 1987. 'Cucumber Mosaic Virus' Viruses of Plants (Edited by A. Brunt, K. Crabtree, M. Dallwitz, A. Gibbs ve L. Watson). University Press, Cambridge. 477–482.

Gutierrez-Villegas C., Ruiz-Medrano R., Pledra-Ibarra E. ve De La Torre-Almaraz R., 2004. Characterization of A Cucumber Mosaic Virus (CMV) Strain Associated With Yellow Mottle Symptoms of Amaryllis (Hippeastrum x hybridum Leopoldii) in Mexico. *Agrociencia mayo-junio*, 38 (3): 343–354.

Gümüş M., Erkan S. ve Tok S., 2004. Bazı Kabakgil Türlerinin Tohumlarındaki Viral Etmenlerin Saptanması Üzerinde Araştırmalar. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 41 (1): 49–56.

Habili N. ve Francki R. I. B., 1974. Comparative Studies on Tomato Aspermy and Cucumber Mosaic Viruses. I. Physical and Chemical Properties. *Virology*, 57: 392–401.

Hanks G. R., 2002. Commercial Production of Narcissus Bulb. Narcissus and Daffodil. Taylor & Francis Ltd., London. 53–131.

Hsu H. T., Barzuna L., Hsu Y. H., Bliss W. ve Perry K. L., 2000. Identification and Subgrouping of Cucumber Mosaic Virus With Mouse Monoclonal Antibodies. *Phytopathology*, 90: 615–620.

Kameya-Iwaki M., Murakami K., Ito S., Hanada K. ve Tanaka S., 2000. Semipersistency of Myzus persicae Transmission of Cucumoviruses Systemically Infecting Leguminous Plants. *Journal of General Plant Pathology*, Tokyo, 66 (1): 64–67.

Kaper J. M. ve Waterworth H. E., 1981. Cucumoviruses, In Handbook of Plant Virus Infectious and Comparative Diagnosis. *Biomedical, North Holland*. 258–332.

Kılıç H. Ç. ve Yardımcı N., 2012. Burdur Çine Ovası Fasulye Alanlarında Hıyar Mozaik Virüsü. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi,* 3 (2): 12–15.

Kılıç H. Ç., 2010. Göller Bölgesi'ndeki Şeker Pancarı Üretim Alanlarında Rhizomania Hastalığının Belirlenmesi Üzerine Araştırmalar. (Doktora Tezi). Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.

Koolivand D., Bashir N. S. ve Mozafari J., 2012. Serological and Molecular Detection of Newly Isolated Cucumber Mosaic Virus Variants from Iran. *International Journal of Agriculture: Research and Review*, 2 (S): 933–941.

Korkut A. B. ve İnan İ. H., 2002. *Saksılı Süs Bitkileri* (2.Baskı). Hasad Yayıncılık, İstanbul. 197.

Krebs B., Kohlmannsperger V., Nölting S., Schmalzbauer R. ve Kretzschmar H. A., 2006. A Method to Perform Western Blots of Microscopic Areas of Histological Sections**.** *J. Histochem. Cytochem.*, 54 (5): 559**–**565.

Kundakçı E., 2013. Çanakkale İlinde Elma Mozaik Virüsü (Apple Mosaic Virus; ApMV) İzolatlarının Tanılanması ve Karakterizasyonu. (Yüksek Lisans Tezi). Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale.

Lot H. ve Kaper J. M., 1976. Further Studies on The RNA Component Distributon Among The Nucleoproteins of Cucumber Mosaic Virus. *Virology*, 74: 223–226.

Lunello P., Ducasse D. ve Conci V., 2005. Improved PCR Detection of Potyviruses in Allium Species. *European J. Plant Pathology*, 112: 371–378.

Madhubala R., Bhadramurthy V., Bhat A. I., Hareesh P. S., Retheesh S. T. ve Bhai R. S., 2005. Occurrence of Cucumber Mosaic Virus on Vanilla (Vanilla planifolia Andrews) in India. *J.Biosci*., 30 (3): 339–350.

Mahmoud S. Y. M., 2011. Detection of Cucumber Mosaic Virus in Some Ornamental Plants and Elimination of Nonspecific ELISA Reactions. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44 (14): 1410–1424.

Martelli G. P. ve Quacquarelli A., 1988. The Present Status of Tomato and Pepper Viruses. *ACTA Horticulture*, 127: 39–64.

Masuta C., Seshimo Y., Mukohara M., Jung H.J., Ueda S., Ryu K.H. ve Choi J.K., 2002. Evolutionary Characterization of Two Lily Isolates of Cucumber mosaic virus Isolated in Japan and Korea. *J. Gen. Plant Pathol*, 68: 163–168.

Mazidah M., Yusoff K., Habibuddin H., Tan Y. H. ve Lau W. H., 2012. Characterization of Cucumber Mosaic Virus (CMV) Causing Mosaic Symptom on Catharanthus roseus (L.) G. Don in Malaysia. *Pertanika J. Trop. Agrie. Sei*., 35 (1): 41–53.

Megahed A. A., El-Dougdoug Kh. A., Othman B. A., Lashin S. M., İbrahim M. A. ve Sofy A. R., 2012. A New Egyptian Satellite Strain of Cucumber Mosaic Cucumovirus. *International Journal of Virology*, 8 (3): 240–257.

Milne R. G., 2013. Cucumber Mosaic Virus. Istituto di Fitovirologia Applicata, Torino, Italy, http://ictvdb.bio-mirror.cn/Images/Milne/cucumsv.htm.

Mimaki Y., Satou T., Kuroda M., Sashida Y. ve Hatakeyama Y., 1999. Steroidal Saponins from the Bulbs of Lilium candidum. *Phytochemistry*, 51 (4): 567–573.

Navalinskiene M. ve Samuitiene M., 2001. Viruses Affecting Some Bulb and Corm Flower Crops. *Biologija*, (4): 40–42.

Niimi Y., Han D. S., Mori S. ve Kobayashi H., 2003. Detection of Cucumber Mosaic Virus, Lily Symptomless Virus and Lily Mottle Virus in Lilium species by RT-PCR Technique. *Scientia Horticulturae*, 97: 57–63.

Palukaitis P. ve Garcia-Arenal F., 2003. Cucumber mosaic virus. AAB. *Descriptions of Plant Viruses*. 400.

Palukaitis P., Roossinck M. J., Dietzgen R. G. ve Francki R.I.B., 1992. Cucumber Mosaic Virus. in Advances in Virus Research, K. Maramorosch, F. A. Murphy and A. J. Shatkin, eds (San Diego, CA: Academic Press). 281–348.

Pearson M. N., Cohen D., Cowell S. J., Jones D., Blouin A., Lebas B. S. M., Shiller J. B. ve Clover G. R. G., 2009. A Survey of Viruses of Flower Bulbs in New Zealand. *Australasian Plant Pathology*, 38: 305–309.

Quemada H. D., Gonsalves D. ve Slightom J. L., 1991. Expression of Coat Protein Gene from Cucumber Mosaic Virus Strain C in Tobacco: Protection Against Infections by CMV Strains Transmitted Mechanically or By Aphids. *Phytopathology*, 81: 794–802.

Raj S. K., Saxena S., Halan V. ve Singh B.P., 1998. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for Direct Detection of Cucumber Mosaic Virus (CMV) in Gladiolus. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 44 (1): 89–95.

Raj S. K., Srivastava A., Chandra G. ve Singh B. P., 2002. Characterization of Cucumber Mosaic Virus Isolate Infecting Gladiolus Cultivars and Comparative Evaluation of Serological and Molecular Methods for Sensitive Diagnosis. *Current Science*, 83 (9): 1132–1137.

Renart J., Reiser J. ve Stark G. R., 1979. Transfer of Proteins from Gels to Diazobenzyloxymethyl-paper and Detection With Antisera: A Method for Studying Antibody Specificity and Antigen Structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76 (7): 3116–3120.

Saidi A. ve Safaeizadeh M., 2012. First Report of Cucumber Mosaic Virus on Canna indica in Iran. *Australasian Plant Dis.*, 7: 119–121.

Sharma A., Mahinghara B. K., Singh A. K., Kulshrestha S., Raikhy G., Singh L., Verma N., Hallan V., Ram R. ve Zaidi A. A., 2005. Identification, Detection and Frequency of Lily Viruses in Northern India. *Scientia Horticulturae*, 106: 213–227.

Sığırcı Z., 2002. Gaziantep İlinde Yetiştirilen Biberlere Zarar Veren Virüslerin DAS-ELISA Yöntemiyle Saptanması. (Yüksek Lisans Tezi). Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep.

Singh B. R., Dubey V. K ve Aminuddin, 2007. Inhibition of Mosaic Disease of Gladiolus Caused by Bean Yellow Mosaic and Cucumber Mosaic Viruses by Virazole. *Scientia Horticulturae*, 114: 54–58.

Smith K.M., 1957. A Text Book of Plant Virus Diseases. *J. and A. Churchill Ltd. 104. Gloucester place WI London* 652.

Srivastava A. ve Raj S. K., 2008. Coat Protein-Mediated Resistance Against an Indian Isolate of the Cucumber Mosaic Virus Subgroup IB in Nicotiana benthamiana. *J. Biosci.*, 33 (2).

Srivastava K. M., Raj S. K. ve Singh B. P., 1992. Properties of A Cucumber Mosaic Virus Strain Naturally Infecting Chrysanthemum in India. *Plant Disease*, 76: 474–477.

Terami F., Fukumoto F. ve Hanada K., 2004. Cucumber Mosaic Virus Isolated from Amazon lily (Eucharis grandiflora). *Journal of General Plant Pathology*, 70: 192–193.

Tian Z., Liu W., Luo C., Li Y. ve Liu T., 2012. Transmission Comparisons of Cucumber Mosaic Virus Subgroup I and II Isolates by Different Aphid Species. *Journal of Phytopathology*, 160: 299–303.

Tok S. ve Erkan S., 2006. Bursa ve Çanakkale İllerinde Bazı Yörelerde Yetiştirilen Şeker Pancarı Bitkilerindeki Virüs Hastalıklarının Saptanması. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Dergisi*, 43 (1): 45–53.

Towbin H., Staehelin T. ve Gordon J., 1979. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76 (9): 4350-4354.

Türkoğlu T. ve Fidan Ü., 1996. Ege Bölgesinde Krizantem, Nergis, Zambak ve Lalelerde Görülen Virüs Hastalıklarının Tanıtılması. *Bitki Koruma Bülteni*, 36 (1-2): 73–78.

Uzmay A., Durmaz S. ve Örümlü A. E., 2001. Mordoğan'da Nergis (Narcissus poeticus) Yetiştiriciliği Sorunları Üzerine Bir Araştırma. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 38 (1): 39–46.

Verma N., Mahinghara B. K., Ram R. ve Zaidi A. A., 2006. Coat Protein Sequence Shows That Cucumber Mosaic Virus Isolate from Geraniums (Pelargonium spp.) Belongs to Subgroup II. *J. Biosci*., 31 (1): 47–54.

Wang Y., Gaba V., Yang J., Palukaitis P., ve Gal-On A., 2002. Characterization of Synergy Between Cucumber Mosaic Virus and Potyviruses in Cucurbit Hosts. *Phytopathology*, 92 (1): 51–58.

Zavareh N., Maleki M. ve Ghotbi T., 2013. Serological and Molecular Detection of Cucumber Mosaic Virus from Two Main Commercial Anthurium Cultivars in Iran. *Annals of Biological Research,* 4 (4): 120–125.

Zeybekoğlu E., 2010. Türkiye'de Kültürü Yapılan ve Doğal Yayılış Gösteren Nergislerin (Narcissus) Araştırılması, Kültüre Alınması, Bazı Morfolojik ve Biyolojik Özelliklerinin İncelenmesi. (Doktora Tezi). Ege Üniversitesi, İzmir.

Zeybekoğlu E., Özzambak E., Pınarbaşı P. ve Yemenici F., 2002. Farklı Zamanlarda Uyandırılan Bir Yıllık Nergislerde Erkencilik Verim ve Kalite Özellikleri. *II Ulusal Süs Bitkileri Kongresi*, Antalya. 229–233.

Zitikaite I. ve Samuitiene M., 2009. Detection and Characterization of Cucumber Mosaic Virus Isolated from Sweet Peppers. *Scientific Works of The Lithuanian Institute of Horticulture and Lithunian Universty of Agriculture*, Sodininkyste Ir Darzininkyste, 28 (3).

Zitter T. A. ve Murphy J. F., 2009. Cucumber Mosaic. *The Plant Health Instructor,* http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/Cucumbermosaic.aspx.

ÇİZELGELER **Sayfa No**

Çizelge 3.1. Tasarlanan primer dizileri.....23
Çizelge 4.1. Çanakkale ili ev bahçeleri soğanlı süs bitkileri üretim alanlarından elde edilen Hıyar mozaik virüsü izolatlarının dağılımı.....28
Çizelge 4.2. İnfeksiyon oranının izolatların toplandığı yerlere göre dağılımı.....31
Çizelge 4.3. İnfeksiyon oranının çalışmada kullanılan bitki türlerine göre dağılımı 32
Çizelge 4.4. DAS-ELISA sonuçları..... 33

ŞEKİLLER **Sayfa No**

Şekil 1.1. Hıyar mozaik virüsü'nün elektron mikroskobu görüntüsü 3
Şekil 1.2. Hıyar mozaik virüsü genom şeması.....4
Şekil 4.1. Arazi çalışmaları sonucu toplanan bazı bitki örneklerinde gözlenen belirtiler.....29
Şekil 4.2. RT-PCR analizi sonuçları. M: Marker (100-1000 bp) 8: Sümbül ve 13: Nergis, CMV ile infekteli izolatlar, (638 bp). 58: Nergis, 24, 44: Sümbül, 31: Zambak, CMV ile infekteli olmayan izolatlar 36
Şekil 4.3. RT-PCR analizi sonuçları. M: Marker (100-1000 bp) 8: Sümbül ve 13: Nergis, CMV ile infekteli izolatlar, (638 bp). 57, 60: Nergis, 63: Sümbül, CMV ile infekteli olmayan izolatlar.....37
Şekil 4.4. Western blot analizi sonuçları. 8, 37: Sümbül, 13, 41: Nergis, 34, 56: Zambak, CMV ile infekteli izolatlar (24 kDa).....40

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Burçin SOYLU

Doğum Yeri: Lüleburgaz / KIRKLARELİ

Doğum Tarihi: 01.01.1989

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: ÇOMÜ Fen Bilimleri Ens. Bitki Koruma Anabilim Dalı (devam ediyor)

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

İLETİŞİM

E-posta Adresi: burcin-soylu@hotmail.com