

T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇANAKKALE İLİ ISPANAK ÜRETİM ALANLARINDA HIYAR MOZAİK VİRÜSÜ (Cucumber mosaic virus; CMV) ENFEKSİYONUNUN TANILANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Ali KURTOĞLU

Bitki Koruma Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇANAKKALE İLİ ISPANAK ÜRETİM ALANLARINDA HIYAR MOZAİK VİRÜSÜ (Cucumber mosaic virus; CMV) ENFEKSİYONUNUN TANILANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Ali KURTOĞLU

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: **31/01/2019**

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

ÇANAKKALE

Ali KURTOĞLU tarafından Prof. Dr. Savaş KORKMAZ yönetiminde hazırlanan ve **31/01/2019** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan **"Çanakkale İli Ispanak Üretim Alanlarında Hıyar Mozaik Virüsü (Cucumber mosaic virus; CMV) Enfeksiyonunun Tanılanması ve Karakterizasyonu"** başlıklı çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Bitki Koruma Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. Savaş KORKMAZ ……

Başkan

Prof. Dr. Figen MERT ……

Üye

Prof. Dr. Bayram ÇEVİK ……

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No :……

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

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

Ali KURTOĞLU

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanmasında ve yürütülmesinde, her türlü bilgi, deneyim ve yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Savaş KORKMAZ'a ve Yüksek lisans tezi jüri üyelerinden Sayın Prof. Dr. Figen MERT ve Prof. Dr. Bayram ÇEVİK'e yapıcı ve yönlendirici fikirleriyle katkıda bulundukları için teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın tüm aşamalarında yönlendirici ve olumlu katkılarından dolayı Arş.Gör. Ali KARANFİL'e çok teşekkür ederim. Ayrıca Tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen arkadaşlarım Tugay ÖZCAN, Semih SANCAKLI ve Volkan ULUCAK'a teşekkür ederim.

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

Ali KURTOĞLU

Çanakkale, Ocak 2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
+ ssRNA	+ single stranded RNA
°C	Santigrad derece
aa	amino asit
ark.	Arkadaşları
bç	Baz çifti
cDNA	Komplementer (Tamamlayıcı) Deoksiribo nükleikasit
CMV	Cucumber mosaic virus
CP	Coat Protein (Kılıf protein)
ELISA	Enzim Linked Immunosorbent Assay
DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich- ELISA
DDT	Dithiothreitol
dk.	Dakika
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
EtBr	Etidyum bromür
EtOH	Etil alkol
FAO	Food and Agriculture Organization
HCI	Hidroklorik asit
IC-RT-PCR	Immunocapture RT-PCR
IgG	Antibadi
KCI	Potasyum klorür
M	Molarite
mg	Miligram
$MgCI_2$	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NaCI	Sodyum klorür
NaN_3	Sodyum azide

nm	Nanometre
nt	Nükleotid
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PNPP	p-nitro-phenyl-phosphate
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribo nükleik asit
RNAse	Ribonükleaz
rpm	Dakikadaki devir sayısı
RT	Reverse Transcriptase
RT-PCR	Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SK5CMV	CMV'ye spesifik primer
SK6CMV	CMV'ye spesifik primer
sn	Saniye
Taq	Termo stabil polimeraz enzimi
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu
µl	Mikrolitre

ÖZET

ÇANAKKALE İLİ ISPANAK ÜRETİM ALANLARINDA HIYAR MOZAİK VİRÜSÜ (Cucumber mosaic virus; CMV) ENFEKSİYONUNUN TANILANMASI VE KARAKTERİZASYONU

ALİ KURTOĞLU

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

31/01/2019, 50

Önemli bir kış sebzesi olan ıspanak hemen hemen ülkemizin her bölgesinde yetiştirilmektedir. Yetiştiriciliği diğer kış sebzelerine göre kısmen daha kolay olması nedeni ile üreticiler tarafından tercih edilmektedir. Ayrıca sahip olduğu besin içeriği sayesinde de ülkemizde oldukça çok tüketilen bir sebzedir. Ülkemizde hem üreticiler hem de tüketiciler tarafından tercih edilen bu sebzenin yetiştiriciliğinde virüs hastalıkları önemli bir sorun oluşturmaktadır. Virüs hastalıkları verimde azalmalara ve ürünün pazar değerini yitirmesine sebep olabilmektedir. Hıyar mozaik virüsü (*Cucumber mosaic virus*; CMV)'de önemli viral hastalıklardan bir tanesidir. Ülkemizin farklı bölgelerinde CMV'nin varlığı ıspanak üretim alanlarında tespit edilmiş, fakat moleküler olarak karakterizasyonu gerçekleştirilmemiştir. Etmenin moleküler karakterizasyonu amacı ile, Çanakkale ili ve ilçelerinde ıspanak bitkisinin yetiştiriciliğinin yapıldığı ticari üretim alanları ve ev bahçelerinde 2016-2017 yılları üretim sezonunda arazi çalışmaları yürütülmüştür. Yapılan arazi çalışmalarında virüs ve virüs benzeri simptom gösteren ıspanak bitkilerinden 66 ıspanak örneği toplanmıştır. Toplanan örnekler CMV'nin varlığının belirlenmesi amacıyla DAS-ELISA yöntemiyle test edilmiştir. DAS-ELISA testleri sonucunda 66 örnekten 4'ü (%6) CMV ile enfekteli bulunmuştur. Enfekteli bulunan izolatlar arasından bir tanesi (CNK21) rastgele seçilerek moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda Çanakkale CMV ıspanak izolatı dünya CMV izolatları ile nükleotid düzeyinde %87−98 ve aminoasit düzeyinde ise %91−99 oranında benzerlik göstermiştir. Ayrıca gerçekleştirilen filogenetik analizler sonucunda bu izolatın altgrup IA'da yer aldığı belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Çanakkale, Ispanak, DAS-ELISA, RT-PCR, Filogenetik.

ABSTRACT

DETERMINATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF Cucumber mosaic virus (CMV) INFECTION ON SPINACH PRODUCTION FIELDS OF ÇANAKKALE PROVINCE, TURKEY

Ali KURTOĞLU

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Science and Engineering

Master of Science Thesis of Plant Protection Departmant,

Advisor : Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

31/01/2019, 50

Spinach, which is an important winter vegetable, is grown in almost every region of our country. It is preferred by producers because its cultivation is relatively easy compared to other winter vegetables. In addition, due to its nutritional content, spinach is a widely consumed vegetable in Turkey. Viral diseases present a significant problem in spinach cultivation in our country. These viral diseases can lead to reductions in yields and loss of market value. Cucumber mosaic virus (CMV) is one of these viral diseases. The presence of CMV has been found in spinach production areas in different regions of our country, but molecular characterization of these isolates has not yet been carried out. For the molecular characterization of CMV, field studies were conducted in commercial production areas and home gardens in which spinach plant cultivation was carried out in Çanakkale province and its districts during the 2016–2017 production season. In field studies, sixty-six spinach samples showing viral and viral-like symptoms were collected. The collected samples were tested by double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) for the presence of CMV. As a result of the DAS-ELISA tests, four (6%) of 66 samples were found to be infected with CMV. One isolate (CNK 21) among the CMV-infected samples was chosen randomly, and molecular characterization of CNK 21 was performed. As a result of this molecular characterization, the CNK 21 isolate showed 87%−98% and 91%−99% agreement with global CMV isolates at the nucleotide and amino acid levels, respectively. Moreover, it was determined that this isolate was included in the subgroup IA as a result of phylogenetic analyzes.

Keywords: Çanakkale, Spinach, DAS-ELISA, RT-PCR, Phylogenetic.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI iii
TEŞEKKÜR iv
SİMGELER VE KISALTMALAR v
ÖZET vii
ABSTRACT ix
ŞEKİLLER DİZİNİ xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ xiv
BÖLÜM 1
GİRİŞ 1
BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 5
2.1 Yurt Dışında Yapılan Çalışmalar 5
2.2. Yurt İçinde Yapılan Çalışmalar 9
BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM 18
3.1. Arazi Çalışması 18
3.2. DAS-ELISA Testi 18
3.2.1. Plate'in Antibadi İle Kaplanması 19
3.2.2. Bitki Örneklerinin Plate'e Yüklenmesi 19
3.2.3. Konjugat (Enzimle İşaretlenmiş Antibadi) Eklenmesi 20
3.2.4. Substrat Eklenmesi 20
3.3. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) 20
3.3.1. Total RNA İzolasyonu 21
3.3.2. RT-PCR Aşaması 21
3.3.2.1. Denatürasyon Aşaması 21
3.3.2.2. Ters Transkripsiyon Aşaması (RT) 22
3.3.2.3. PCR Aşaması (Amplifikasyon) 22
3.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi 22
3.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması 23
3.5. Kılıf Protein Geninin Dizininin Belirlenmesi 23
3.5.1. Kılıf Protein Geninin Benzerlik Analizi 24
3.6. Kılıf Protein Geninin Filogenetik Analizi 25

BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 26
4.1. Arazi Çalışmaları ve DAS-ELISA Testleri 26
4.2. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi Bulguları 30
4.3. Kılıf Protein Genlerinin Dizi Analizleri 31
4.3.1. Nükleotid Dizi Analizleri 32
4.3.2. Amino Asit Dizi Analizleri 36
4.4. Filogenetik Analizler 39
4.4.1. Nükleotid Dizilimlerine Göre Filogenetik Soy Ağaçlarının Oluşturulması 39
4.4.2. Amino Asit Dizilimlerine Göre Filogenetik Soy Ağaçlarının Oluşturulması 41
BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER 42
KAYNAKLAR 44
EKLERİ I
EK 1. DAS-ELISA Analizlerinde Kullanılan Tampon Çözeltiler II
EK 2. RT-PCR Analizleri Kapsamında Kullanılan Tampon Çözeltiler III
ÖZGEÇMİŞ IV

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Hıyar mozaik virüsünün genom yapısı (Anonim, 2018a) 2
Şekil 1.2. Hıyar mozaik virüsünün partikül yapısı (A: Renklendirilmiş partikül (Anonim, 2018b), B: Elektron mikroskop görüntüsü (Anonim, 2018c)) 3
Şekil 3.1. Ezilen örneklerin plate'a yükleme işlemi 20
Şekil 3.2. EZ Column PCR pürifikasyon kiti (BioBasic, Kanada) 23
Şekil 4.1. Örnekleme yapılan alanlar ve alınan örnek sayıları 26
Şekil 4.2. Çanakkale ili ve ilçelerinden toplanan ıspanak bitkilerinde görülen bazı virüs simptomları (A: Ispanak bitkisi yapraklarında klorotik renk değişimleri, B: Ispanak bitkisi yapraklarında görülen kıvrılma ve sararlamalar, C: Ispanak bitkisi yapraklarında kloroz simptomu, D: Ispanak bitkisi yapraklarında oluşan incelme ve sivrilmeler) 27
Şekil 4.3. ELISA testinde Hıyar mozaik virüsü ile enfekteli örneklerin bulunduğu kuyularda gözlemlenen renk değişimleri 28
Şekil 4.4. Araziden toplanan ve Hıyar mozaik virüsü (CMV) ile enfekteli olduğu DAS-ELISA testlemeleri sonucu doğrulanan ıspanak bitkisi (A), araziden toplanan DAS-ELISA testi sonucu CMV ile enfekteli bulunmayan sağlıklı ıspanak bitkisi(B) 30
Şekil 4.5. Çanakkale ili ve ilçelerinden toplanan örneklere Hıyar mozaik virüsü için uygulanmış olan RT-PCR test sonuçları (M: Marker, 100 bç; 21, 27, 32, 36: CMV ile enfekteli izolat numaraları) 31
Şekil 4.6. Çanakkale Hıyar mozaik virüsü izolatının kılıf protein geninin nt dizilimleri baz alınarak TreeView programı ile görüntülenerek oluşturulan filogenetik soy ağacı 40
Şekil 4.7. Çanakkale Hıyar mozaik virüsü izolatının kılıf protein geninin aa dizilimleri baz alınarak TreeView programı ile görüntülenerek oluşturulan filogenetik soy ağacı 41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. RT-PCR analizlerinde kullanılan primer çifti 22
Çizelge 3.2. Moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılan Türk ve Dünya izolatlarına ait gen bankası erişim numarası, orijini ve ait oldukları altgrup bilgileri 24
Çizelge 4.1. Enfeksiyon oranının örneklerin toplandığı yerlere göre dağılımı 29
Çizelge 4.2. Çanakkale Hıyar mozaik virüsü (CMV) izolatları ile seçilen CMV izolatılarının kılıf protein geninin 536 bç'lik kısmına ait çoklu nt dizi karşılaştırmaları 32
Çizelge 4.3. Çanakkale Hıyar mozaik virüsü (CMV) izolatı ile seçilen CMV izolatlarının nükleotid düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları 35
Çizelge 4.4. Çanakkale Hıyar mozaik virüsü (CMV) izolatları ile seçilen CMV izolatılarının kılıf protein geninin 536 bç'lik kısmına ait çoklu aa dizi karşılaştırmaları 36
Çizelge 4.5 Çanakkale Hıyar mozaik virüsü (CMV) izolatı ile seçilen CMV izolatlarının aminoasit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları 38

BÖLÜM 1
GİRİŞ

Ülkemizin birçok bölgesinde yetiştirilen ıspanak (*Spinacia oleracea* L.), özellikle kış aylarının vazgeçilmez bir sebzesidir. İklim isteklerinin karşılanamaması nedeniyle sadece Doğu Karadeniz bölgesinde yetiştiriciliği tam anlamı ile yapılamamaktadır. Batı ve Güney bölgelerimizde ise gerek iklim yeterliliği gerekse ulaşım koşullarının kolay olması sebebiyle yetiştiriciliği yoğun olarak yapılmaktadır. Hatta üretimde diğer kışlık sebzeler arasında ilk tercih edilenler arasındadır (Vural ve ark., 2000).

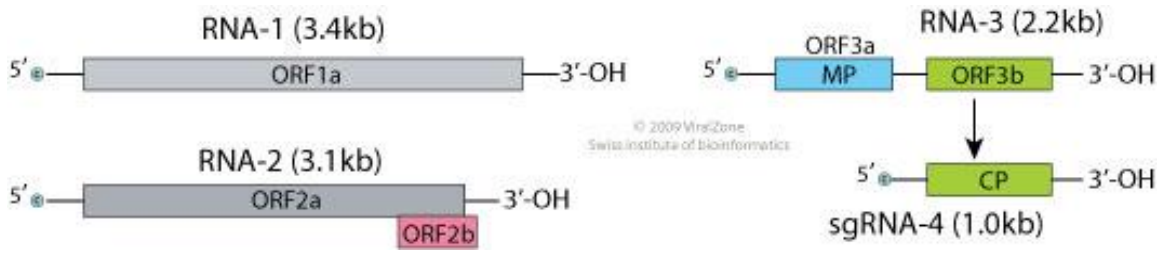
Vejetasyon süresinin kısa olmasından dolayı çoğu zaman ikinci ve üçüncü ürün olarak değerlendirilmesi de cazip olduğu için sadece ülkemizde değil dünyanın birçok ülkesinde büyük miktarlarda tarımı yapılmaktadır. Dünya ıspanak üretiminde ilk sırayı büyük bir üretim oranı ile Çin almaktadır. Çin'den sonra sıralamada Amerika Birleşik Devletleri, Japonya ve ülkemiz gelmektedir (FAO, 2013). Ülkemizde 2016 yılında ıspanak üretimi 161,510 dekar olup, 210,999 ton verim alınmıştır. İller bazında sıralayacak olursak listenin başında 32,607 ton ile İzmir bulunmaktadır, İzmir'i 25,876 ton ile Ankara, 24,056 ton ile Samsun takip etmektedir. Çanakkale'de ise 1,806 ton üretim gerçekleşmiştir. Çanakkale'de üretilen ıspanak miktarı ilk bakışta az gibi görünse de, kendine yeten bir miktar olduğu söylenebilir (TÜİK,2016).

Besin değeri yüksek olan bu sebzede birçok hastalık ve zararlı bulunmaktadır. Ispanakta günümüze kadar yapılan çalışmalarda, ekonomik zarara neden olan en önemli etmenler fungal ve viral hastalıklar olarak rapor edilmiştir. Virüs hastalıkları ıspanak üretiminde önemli bir sorun olup, bitkiye ciddi zararlar verebilmektedirler. Sebzenin pazar değerini düşürerek ciddi derecede ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Wilson, 1983).

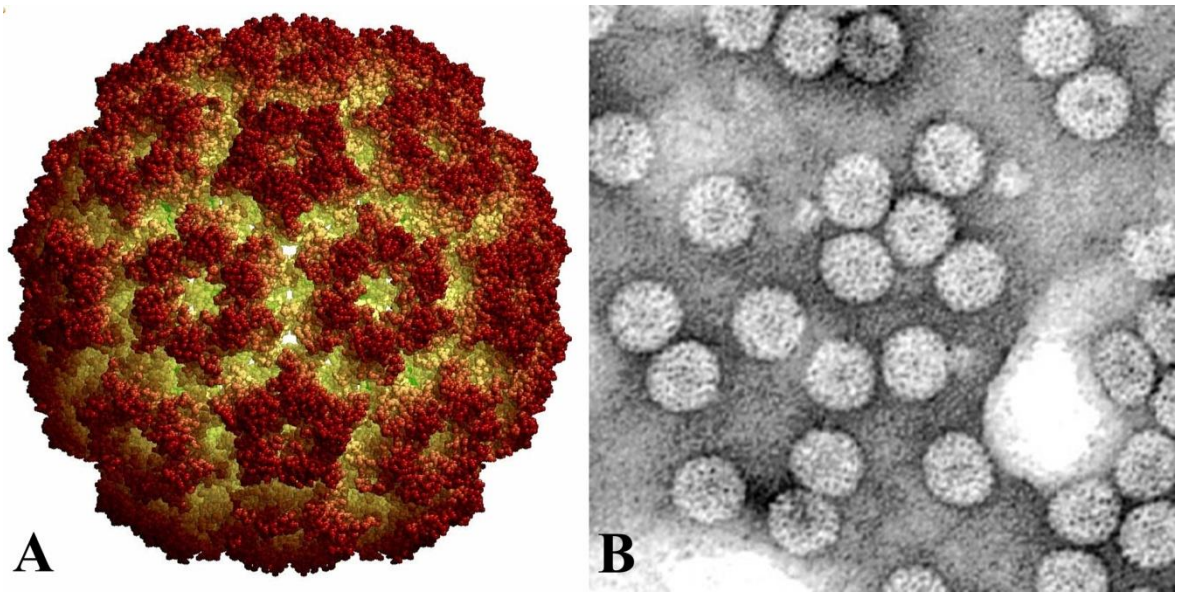
Bazı ülkelerde yapılan araştırmalar sonucunda Hıyar mozaik virüsü (*Cucumber mosaic cucumovirus*; CMV), Domates lekeli solgunluk virüsü (*Tomato spotted wilt tospovirus*; TSWV), Şeker pancarı tepe kıvırcıklığı virüsü (*Beet curly top geminivirus*; BCTV), Şeker pancarı batı sarılık virüsü (*Beet western yellow luteovirus*; BWYV), Pancar mozaik virüsü (*Beet mosaic potyvirus*; BtMV), Pancar nekrotik sarı damar virüsü (*Beet necrotic yellow vein benyvirus*; BNYVV), Marul mozaik virüsü (*Lettuce mosaic potyvirus*; LMV), Tütün mozaik virüsü (*Tobacco mosaic tobamovirus*; TMV) ve Şalgam mozaik virüsü (*Turnip mosaic potyvirus*; TuMV)'nün ıspanaklarda zarar oluşturan önemli virüsler olduğu belirtilmiştir (Tamada ve Baba, 1973; Wilson, 1983; Whitney ve Duffus, 1986; Dinant ve Lot, 1992; Correll ve ark., 1994; Parella ve ark., 2003).

Belirtilen virüsler içerisinde CMV ayrı bir öneme sahiptir. CMV birçok tarımsal ürünü enfekte eden tehlikeli virüsler arasındadır. Ispanak yanıklığı olarak bilinen hastalığa CMV sebep olmaktadır. Belirtileri genç yapraklarda hafif sararmalar (kloroz), bitki ölümleri ve büyüme noktalarının şiddetli biçimde yanmalar görünür. Enfekteli bitkilerde genellikle şekil bozuklukları, yapraklarda daralma, genç yapraklarda çoğunlukla klorotik lekeler ve şiddetli kıvrılma görülmektedir. Etmen bitkilerin büyüme noktasına zarar verebilir. Yapraklarda kenarlardan içe doğru kıvrılmalar oluşmaktadır, ayrıca hastalığın ilerleyen döneminde bitki genelde bodur kalır ve taç yaprakları tamamen yanabilir. Belirtiler sıcaklığa, gelişim dönemine, virüs streynine ve türlere göre değişiklik göstermektedir (Fulton, 1950; Kaper ve Waterworth, 1981; Yang ve ark., 1993).

Bromoviridae familyasına ait olan CMV, *Cucumovirus* cinsinin en önemli üyelerinden birisi olarak bilinmektedir. CMV'nin, ilk olarak rapor edilmesi 1934 yılında Amerika'da Price tarafından, hıyar bitkisi (*Cucumis sativus*) üzerinde yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. CMV, üç parçacıklı (+) ssRNA genomuna sahip (Şekil 1.1), yaklaşık olarak 29-30 nm çapında yuvarlak şekilli (Şekil 1.2), tek bir partikülden oluşan ve izometrik zarf içermeyen bir virüstür (Palukaitis ve Garcia-Arenal, 2003). Labaratuvar koşullarında yaşama süresi 1-10 gün olup, termal inaktivasyon noktası ise 55-70^{0}C arasında değişkenlik göstermektedir (Francki ve Habili, 1972).



Şekil 1.1. Hıyar mozaik virüsünün genom yapısı (Anonim, 2018a)



Şekil 1.2. Hıyar mozaik virüsünün partikül yapısı [A: Renklendirilmiş partikül (Anonim, 2018b), B: Elektron mikroskop görüntüsü (Anonim, 2018c)]

CMV, non-persistent olarak yaklaşık 80 kadar afid türü ile taşınabilmektedir (Palukaitis ve Garcia-Arenal, 2003). Ayrıca Japonya'da yapılan araştırmalarda bazı CMV streynleri ve konukçu bitki kombinasyonlarında yaprak biti ile semi-persistent taşınma rapor edilmiştir (Kameya-Iwaki ve ark., 2000). CMV'yi taşıyan türler arasında en yaygını *Myzus persica* ve *Aphis gossypii* türleridir (Palukaitis ve Garcia-Arenal, 2003). CMV yaprak bitleri haricinde tohumla, aşı yoluyla ve mekanik olarak sağlıklı bitkilere taşınabilmektedir. Etmen ayrıca küskütün birçok türüyle de taşınmaktadır. Bununla birlikte CMV, hastalıklı bitki artıklarında uzun süre kalabilmekte ve bu yolla sağlıklı bitkilere taşınabilmektedir. Ayrıca birçok yabancı ot CMV'ye konukçuluk yapmakta ve hastalığın yayılmasında etkili olmaktadır. Etmenin moleküler karakterizasyonu sonucunda CMV izolatlarının IB, IA ve II olmak üzere 3 alt gruba ayrıldığı görülmektedir (Roossinck, 2002).

Ülkemizde CMV ile gerçekleştirilen birçok çalışmada etmenin varlığı farklı bölgelerde ve farklı konukçular üzerinde bildirilmiştir (Gümüş ve ark., 2004; Erkan ve ark., 2013; Sertkaya, 2015; Karanfil ve ark., 2016). Bu konukçulardan bir tanesi de ıspanaktır. Ülkemizde etmenin enfeksiyonu ıspanakta bildirilmiş, fakat moleküler olarak karakterizasyonu gerçekleştirilmemiştir (Erbay, 2010; Gökdağ, 2014; Gümüş ve ark., 2014; Gökdağ ve ark., 2016; Güngör ve ark., 2017).

Bu amaçla 2016-2017 üretim yılında Çanakkale ili ve ilçelerinde ıspanakta virüs ve virüs benzeri hastalık simptomu gösteren bitkilerden örnekler alınmıştır. Alınan bu

örneklerle ıspanak alanlarında CMV'nin varlığı tespit edilerek, tesadüfi seçilen bir izolatın CP gen bölgesi moleküler olarak karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

CMV, kültür bitkilerinde verim ve kalite kaybına neden olan en önemli virüslerin arasında bulunmaktadır. CMV, *Bromoviridae* familyasında bulunmakta ve *Cucumovirüs* cinsinin en tehlikeli ve önemli virüslerindendir. CMV birçok vektör, yabancı ot, bitki artıkları ve mekanik yöntemler yoluyla sağlıklı bitkilere kolay şekilde aktarılabilmektedir (Francki ve Habili, 1972).

CMV enfekte ettiği bitkilerde simptom gösterebilmekte ya da latent olarak bulunabilmektedir. Enfekteli bitkilerde genellikle genç yapraklarda klorotik lekeler, şekil bozuklukları, yapraklarda daralmalar ve kıvrılma gibi belirtiler görülmektedir. İlerleyen dönemlerde ise bodurluk, taç yaprakların yanması gibi belirtiler gösterirken, bitkilerin ölümlerine de sebep olabilmektedir (Fulton, 1950; Kaper ve Waterworth, 1981; Yang ve ark., 1993).

Ülkemizde farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda, CMV'nin birçok kültür bitkisinde (sebzeler, meyveler ve süs bitkilerinde) varlığı saptanmış ve kayıtlara geçirilmiştir. Ayrıca birçok bitki üzerinde çalışmalar halen devam etmektedir.

2.1 Yurt Dışında Yapılan Çalışmalar

Hord ve ark. (2001), Kosta Rika'nın 5 ili ve 28 noktasında, 1996 yılında gerçekleştirdikleri çalışmalar sonucunda muz, soya fasulyesi ve kabakgil bitkilerinden örnekler toplamışlardır. Yapılan testlemeler sonucu 28 örnekleme alanının 23'ünde CMV'nün varlığı saptanmıştır. Yapılan araştırmalar sonucu ise altgrup I'ın Kosta Rika'da baskın bulunduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca CMV ile enfekteli olduğu belirlenen 113 CMV izolatından sadece bir tanesinin altgrup II'de yer aldığını belirtmişlerdir.

Ayo-john (2008), 2000 yılında gerçekleştirdiği çalışmasında Güney Nijerya'nın muz yetiştiriciliği yapılan 6 eyaletinde, muz ve muz yaprağı dokularından örnekler toplamıştır. DAS-ELISA testi ile CMV varlığını saptamak için geniş spektrumlu CMV poliklonal antibadisi kullanmıştır. Ayrıca altgrup I izolatlarını belirlemek için CMV altgrup I'e spesifik poliklonal antibadisi kullandığını belirtmiştir. Gerçekleştirilen DAS-ELISA testi sonuçlarına göre toplanan 108 örnekten 76'sının (%70,4) CMV ile enfekteli olduğunu ve bunlardan 32 tanesinin (%42,1) CMV altgrup I'de yer aldığını belirlemiştir.

Opiyo ve ark. (2010), tatlı patates üretiminde verimin azalmasına sebep olan ve üretimi sınırlayan etmenleri belirlemek amacıyla, 2009 yılında çalışmalar

gerçekleştirmişlerdir. Yürütülen bu çalışmalar kapsamında, Batı Kenya'da Nyanza ve batı illerinde tatlı patates yetiştiriciliği yapılan alanlardan 327 adet örnek toplamışlardır. Toplanan örneklerde, içlerinde CMV'nin de bulunduğu 8 farklı virüs türüne rastlamışlardır. Testlemeler sonucu tüm örneklerin %89'unun en az bir virüs ile enfekteli olarak bulunduğunu belirtmişler ve CMV ile enfekteli bitki oranını ise %5 olarak bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmanın Kenya'da tatlı patates alanlarında CMV'nin varlığını belirleyen ilk kayıt niteliğinde olduğunu belirtmişlerdir.

Arafati ve ark. (2013), 2011-2012 üretim sezonlarında, İran'da gerçekleştirdikleri çalışmada, enfeksiyon oluşturan CMV izolatlarının altgruplarının belirlenmesi için moleküler karekterizasyon çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla İsfahan, Tahran, Guilan, Horasan Razavi ve Khuzestan illerinde, domates üreticiliği yapılan alanlarda arazi çalışmaları yapmışlardır. Bu alanlardan toplamda 305 adet örnek toplamışlardır. Toplanan örnekleri DAS-ELISA yöntemi kullanarak testlemişler ve testler sonucunda 147 (%48,2) örneğin CMV ile enfekteli olduğunu bulmuşlardır. İller bazında en yüksek CMV enfeksiyon oranının Horasan Razavi (%67,4) ilinde olduğunu bildirmişlerdir. Horasan Razavi'yi enfeksiyon oranı bakımından takip eden iller ise Khuzestan (%50,6), Tahran (%48), Isfahan (%38,2) ve Guilan (%34,3) olduğunu belirtmişlerdir. Daha önceden yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda İran'da sadece IA ve II altgruplarının rapor edildiğini belirtmişlerdir. Ancak yapılan bu çalışma ile ilk defa İran'dan elde edilen bu izolatların CMV altgrup IB ile ilişkisi olduğunu ortaya koymuşlardır.

Desbiez ve ark. (2018), Azerbaycan'da 2014 Eylül ve 2015 Temmuz aylarında, yoğun sebze üreticiliği yapılan alanlarda, kabakgiller ve patlıcangiller familyasına ait bitkilerden örnekler almışlar ve iki araştırma gerçekleştirmişlerdir. Sararma, mozaik, nekroz ve yaprak kıvrılması gibi belirtiler gösteren bitkilerden alınan örnekleri, viral etmenlerin varlığını belirlemek için serolojik ve moleküler yöntemlerle testlemişlerdir. Her iki araştırmada toplanan örneklerin testleri sonucunda kabakgillerde en çok görülen virüsleri; potyvirüsler (*Zucchini yellow mosaic virus*; ZYMV, *Watermelon mosaic virus*; WMV), cucumovirüsler (*Cucumber mosaic virus*, CMV) ve polerovirüsler (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*, CABYV) olarak belirlemişlerdir. Ayrıca bu çalışma ile Patlıcan benekli cücelik virüsü (*Eggplant mottled dwarf virus*; EMDV)'de Azerbaycan'da salatalık üretim alanlarında düşük yaygınlıkta tespit edilmiştir. Patlıcangillerde en yaygın virüs olarak CMV bildirilirken, ikinci olarak ise patates Y virüsü (*Potato virus Y*; PVY)'nün geldiğini rapor etmişlerdir.

Krishnan ve ark. (2018), 2012-2014 üretim yılları arasında, Hindistan'da tüketimi

yaygın olan ve arazi koşullarında viral enfeksiyonlara eğilimi olan, yılan su kabağı ve şişe su kabağı bitkilerinde birtakım çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Hindistan'ın güneyinde yapılan bu çalışmalarda bitkilerde mozaik, beneklenme, bodurluk, kıvrılma ve kloroz gibi belirtiler gözlemlemişlerdir. Yapılan testler sonucunda virüs benzeri simptomların etki alanının üç farklı konumda %63-88 arasında değişkenlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Gerçekleştirilen DAS-ELISA testleri sonucunda, belirtilen bitkilerde CMV enfeksiyonunun varlığını belirlemişlerdir. RT-PCR testi yapılarak CMV'nin varlığı, CP geninin amplifikasyonu ile doğrulanmıştır. CP geninin sekans analizi sonucu ise de CMV alt grubu IB izolatları ile %92'nin üzerinde nükleotid düzeyinde benzerlik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca elde edilen bu izolatın filogenetik analizleri sonucunda Malezya, Japonya, Hindistan ve Çin'den elde edilen Asya CMV izolatlarından ziyade *Capsicum*'u enfekte eden İtalya'dan elde edilen izolat ile daha yakın ilişki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Mazenov ve Ulubaş Serçe (2018), Kırgızistan'ın Chui bölgesinde kabakgiller ve patlıcangiller familyasına ait bitkilerde CMV'nin moleküler ve serolojik tanılamasının yapılması amacıyla bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Chui bölgesinde farklı alanlarda virüs ve virüs benzeri simptom gösteren patates, domates, salatalık, biber ve kavun bitkilerinden toplamda 96 adet örnek toplamışlardır. Toplanan örnekleri serolojik ve moleküler yöntemler ile test etmişlerdir. DAS-ELISA testi sonucu CMV ile enfekteli örneklerin oranını %3 olarak bulurlarken, IC-RT-PCR testi sonucunda ise enfeksiyon oranını %6 olarak belirlemişlerdir. Enfekteli bulunan örnekleri salatalık (2), patates (1), kavun (1) ve biber (2) olarak belirtmişlerdir. Ayrıca yapılan çalışmalar sonucu CMV izolatlarının altgrup I'de yer aldığını bildirmişlerdir. Ek olarak CMV altgrup I'de bulunan bu izolatlar RT-PCR-RFLP ile karakterize edilmiş ve izolatların İran'daki *Raphanus sativus*'tan alınan CMV izolatı IRN-Khs1 ile nükleotid düzeyinde %99 oranında benzerlik gösterdiğini, CMV altgrup IB'de yer aldığını saptamışlardır. Araştırmacılar bu çalışma kapsamında Kırgızistan'daki ilk CMV altgrup IB'ye ait izolatlar ortaya koyduklarını belirtmişlerdir.

Mederos ve ark. (2018), Arjantin'de Laguna Naineck, Formosa'da yürüttükleri bu çalışma kapsamında, muz bitkisinin yapraklarında şiddetli mozaik belirtiler görüldüğünü belirtmişlerdir. Topladıkları örnekler ile yapılan DAS-ELISA ve PCR testleri sonucunda bitkilerde CMV varlığının tespit edildiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar gerçekleştirdikleri çalışmalar ile CMV'yi mekanik olarak sağlıklı *Nicotiana glutinosa* bitkilerine taşımışlardır. CMV izolatının kılıf proteininin sekans analizi sonucunda altgrup IA'da bulunduğunu bildirmişlerdir. Gerçekleştirilen filogenetik analizler sonucu kendi grubu IA'ya ait izolatlar (Sırbistan, İran, Rusya, Brezilya, Amerika Birleşik Devletleri ve

Demokratik Kongo Cumhuriyeti izolatları) ile nükleotid düzeyinde %96,9–98,3 arasında benzerlik gösterdiğini saptamışlardır. Araştırmacılar bu çalışmanın Arjantin'de muz üreticiliği yapılan alanlarda CMV'nin ilk kaydı olma özelliğini gösterdiğini belirtmişlerdir.

Oreshkovikj ve ark. (2018), açık alanlarda yetiştiriciliği yapılan biber bitkisinde, PVY, Yonca mozaik virüsü (*Alfalfa mosaic virus*; AMV) ve CMV varlığını saptamak amacı ile çalışmalar yürütmüşlerdir. Toplanan örnekleri DAS-ELISA yöntemi ile belirtilen virüsleri saptamak için testlemişlerdir. Testlemeler sonucunda yoğun olarak enfeksiyon oluşturan viral etmeni CMV (%34-61) olarak belirlemişlerdir. CMV'yi 2012'de AMV'nin takip ettiğini, 2013 ve 2014'de ise PVY'nin enfeksiyon oluşturma oranı bakımından takip ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, biberlerde bulunan CMV etmeninin moleküler karakterizasyonu ve tanılanmasını gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar 18 adet CMV izolatının genetik ilişkilerini dünyanın diğer bölgelerinde bulunan izolatlar ile karşılaştırmışlar ve filogenetik çalışmalar sonucu CMV izolatlarının tamamının altgrup IA'da yer aldığını bulmuşlardır.

Radouane ve ark. (2018), Fas'ta, 2016-2017 üretim yıllarında yürüttükleri çalışmalarında, salatalık yetiştiriciliği yapılan bölgelerden özellikle El Jadida, Taroudant, Agadir, Azmour, Kenitra ve Zagoura bölgelerinde kloroz, şiddetli sararma görülen alanlardan örnekler toplamışlardır. Toplanan örnekleri ZYMV, PRSV (*Papaya ringspot virus*), CMV, WMV ve CABYV ile enfekteli olup olmadığını tespit etmek için DAS-ELISA yöntemiyle testlemişlerdir. Bunlara ek olarak ToLCNDV (*Tomato leaf curl New Delhi virüs*), MNSV (*Melon necrotic spot virüs*), CMV ve CVYV (*Cucumber vein yellowing virüs*) etmenlerinin spesifik olarak tanılanması için RT-PCR testini kullanmışlardır. DAS-ELISA testi sonucunda, toplanan 136 kabakgil bitkisi örneği (86 kabak, 50 karpuz) içinde kabak örneklerinin %79,07 oranında ve karpuz örneklerinin %60 oranında PRSV, ZYMV, CMV ve CABYV ile pozitif olduğunu bildirmişlerdir.

Uehara-Ichiki ve ark. (2018), Japonya'nın Fukushima bölgesinde ginseng (*Panax ginseng*) bitkilerinde görülen hafif bodurluk ve sararma simptomları sonucu bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar gerçekleştirdikleri çalışmalar sonucu hastalıklı yapraklardan CMV'nin izole edildiğini belirtmişlerdir. Yapılan filogenetik analizler sonucunda ise CMV izolatının altgrup IA'da yer aldığını belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar gerçekleştirilen bu çalışmanın, Japonya'da ginseng bitkisi üzerinde CMV'nin ilk kaydı olduğunu bildirmişlerdir.

Yu ve ark. (2018), geniş bir konukçu aralığına sahip olan CMV'nin, Çin'de meyve ağaçlarında kayıplara neden olduğu halde CMV'nin varlığını bildiren birkaç çalışma

olduğu belirtmişlerdir. Çin'deki Shandong eyaletinde çin çiçek elması, çin kestanesi, üzüm, kayısı ve şeftali ağaçlarından ve Heilongjiang eyaletinde ise armut ağaçlarından örnekler toplamışlardır. Araştırmacılar RT-PCR ve western blot yöntemlerini kullanarak CMV'nin varlığı saptamaya çalışmışlardır. Gerçekleştirilen bu çalışma ile Çin'deki belirtilen 6 ürünün CMV ile doğal olarak enfekteli olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, bu çalışmanın aynı zamanda Çin'in en kuzeyinde bulunan eyaleti Heilongjiang'deki CMV'nin ilk kaydı olduğunu bildirmişlerdir.

2.2. Yurt İçinde Yapılan Çalışmalar

Nogay (1986), 1981-1982 yıllarında genellikle ağustos aylarında, domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda sürgün yanıklığı görüldüğünü belirtmiştir. Bu amaçla araştırmacı, sürgün yanıklığını oluşan bitkilerde, viral etmenlerin etkisini belirlenmek amacıyla bir çalışma gerçekleştirmiştir. Keşan, Uzunköprü, İpsala ve Enez ilçelerinden toplamda 51 adet örnek toplamıştır. Yapılan serolojik testler sonucunda 51 örneğin 9'unda viral etmene rastladığını bildirmiştir. Ayrıca 9 enfekteli örneğin 4 tanesinin CMV, 3 tanesinin domates çift viruslu çizgi hastalığı (TMV + PVX) ve 2 örneğin ise de TMV ile enfekteli olduğunu belirtmiştir.

Gümüş ve ark. (2004), 2000 ve 2001 yılları arasında kabakgil bitkileri tohumu üreten veya pazarlayan şirketlerden kabak, hıyar ve kavun tohumları toplamışlar ve tohumlardaki viral hastalıkların varlığını araştırmışlardır. Araştırmacıların gerçekleştirdikleri bu çalışma kapsamında toplam 111 adet tohum örneği alınmıştır. Alınan örneklerde viral etmenlerin saptanması için DAS-ELISA testine tabi tutulduğu belirtilmiştir. ELISA testi sonucunda ulaşılan verilere göre toplanmış olan 57 hıyar tohumu örneğinden 39 tanesinin CMV ile bulaşık olduğu ve 21 örneğin ise CGMMV (*Cucumber green mottle mosaic virüs*) ile enfekteli olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar 21 örnekte ise her iki virüsün varlığı rapor etmişlerdir. Sörveyler kapsamında toplanan 27 adet kabak örneğinin ise 5 tanesinde CMV ve 2 tanesinde SqMV (*Squash mosaic virüs*) enfeksiyonu olduğunu belirlemişlerdir. Kavun örneklerinin ise 5 tanesinde CMV ve bir tanesininde TRSV ile bulaşık olduğunu saptamışlardır.

Beler ve Açıkgöz (2005), yürüttükleri çalışma kapsamında, virüsten ari zeytin fidanı üretimi yapabilmek için kullanılan üretim ekipmanlarının, virüs hastalıkları ile bulaşık olup olmadığı belirlemek amacıyla birtakım çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Bu amaç ile 2000 yılında Aydın, Bursa ve Balıkesir illerinde ve ilçelerinde Mayıs, Haziran ve Eylül aylarında toplam 220 adet genç yaprak ve uç sürgün örneği toplamışlardır. Toplanan

örnekleri SLRSV (*Strawberry latent ringspot virüs*), CLRV (*Cherry leafroll nepovirüs*) ve CMV ve ArMV (*Arabis mosaic virüs*) antiserumlarıyla DAS-ELISA testine tabi tutmuşlardır. Test sonuçlarında aranılan virüsler açısından hiçbir pozitif sonuca rastlanılmadığını belirtmişlerdir. Bu nedenden dolayı 2001 yılı mayıs ve haziran aylarında zeytin fidanlarının üretimi için çeliklerin alındığı anaçlık materyallerden toplamda 176 adet çiçek örneği almışlardır. Yine toplanan bu örnekler DAS-ELISA ile testlenmiştir. Test sonuçlarına göre 64 örnekte (%36,36) CMV, 60 örnekte (%34,09) CLRV, 69 örnekte (%39,20) SLRSV ve 47 örnekte (%26,70) ArMV bulgularına rastlanıldığını belirtmişlerdir. Ayrıca bu testler sonucunda SLRSV+CMV, SLRSV+CLRV+CMV ve SLRSV+CLRV karışık enfeksiyonlarıyla da karşılaşıldığını rapor etmişlerdir.

Tok ve Erkan (2006), Çanakkale ve Bursa illerinde şeker pancarı yetiştiriciliği yapılan alanlarda virüs hastalıklarını ve yaygınlık oranlarını belirlemek için bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla toplam 52 örnek toplamışlardır. Bodurlaşma ve bitki yapraklarında sararma, mozaik lekeler, deformasyon, kıvırcıklaşma, klorotik lezyon gibi simptomlar görülen bitkilerden örneklemeler yapmışlardır. Toplanan bu örnekler DAS-ELISA testine tabi tutulmuştur. Test sonuçlarına göre bu bölgelerde pancar sarılık virüsü (*Beet yellowness virüs*; BYV), CMV ve BtMV virüslerinin olduğunu belirlemişlerdir.

Erbay (2010), Gediz havzasında ıspanak tarımı yapılan alanlarda, ıspanak bitkilerinde viral hastalıkların varlığını saptamak amacı ile bir sörvey çalışması yapmıştır. Yapılan arazi çıkışlarında örnekleme yaparken; yapraklarda kıvrılma, mozaik, şekil bozukluğu, klorotik lekeler ve damar aralarında sararma simptomları gösteren ve göstermeyen bitkilerden toplam 91 adet örnek almıştır. Örneklerin RT-PCR testi sonucunda 42 örnekte virüs bulgularına rastlamıştır. BNYVV'nin 27, CMV'nin 8, TMV'nin 2, TuMV'nin 1 ve BWYV'nin ise 1 örnekte bulunduğunu belirtmiştir. Araştırmacı 3 örnekte ise karışık enfeksiyona rastlandığını belirtmiştir. Ayrıca bu çalışmanın ülkemiz ıspanak yetiştiriciliiği yapılan alanlarda, virüs hastalıklarının belirlenmesi için yapılan ilk çalışma özelliğini taşıdığını bildirmiştir.

Karamanlı (2007), Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde 2006-2007 yıllarında, kabak yetiştiriciliği yapılan alanlarda ZYMV ve CMV'nin serolojik, moleküler ve biyolojik olarak tanılanmasını amaçlamıştır. Bu amaçla gerçekleştirdiği arazi çıkışları sonucu örnekler toplamıştır. Topladığı örnekleri ilk olarak DAS-ELISA ile testlemiştir. Test sonuçlarına göre hastalık oranının ZYMV için %34,5 ve CMV için %8,07 olduğunu ifade etmiştir. Araştırmacı ayrıca her iki virüsün karışık enfeksiyon halinde %7,4 olarak bulunduğunu bildirmiştir.

Kaya ve Erkan (2011), gerçekleştirdiği çalışmalarında Balıkesir, Aydın, Manisa ve İzmir illerinde, kabakgil bitkileri yetiştiriciliği yapılan alanlarda, viral etmenlerin varlığını belirlemek amacıyla 278 tarladan örnekleme yapmışlardır. Yapılan arazi sörveyleri sonucunda viral hastalık simptomu gözlemlenen kavun, sakız kabağı, bal kabağı, hıyar ve karpuz bitkilerinden toplamda 618 adet örnek almışlardır. Örnek alınan bitkilerde genel olarak bodurlaşma, benekleşme, kıvrılma, mozaik, sararma, şekil bozukluğu ve yeşil aksam ölümü gibi simptomlar görüldüğünü belirtmişlerdir. Toplanan örnekleri DAS-ELISA yöntemi ile testlemişlerdir. Araştırmacılar gerçekleştirdikleri DAS-ELISA testleri sonucunda CMV ile enfekte olma oranı en yüksek bitkiyi hıyar (%29,7) olarak bulurlarken, sakız kabağında %5,2 ve kavunda ise %3,4 oranlarında CMV enfeksiyonu olduğunu rapor etmişlerdir.

Alan (2012), Doğu Akdeniz bölgesinde tarımı yapılan bazı kışlık sebzelerde (ıspanak, turp, lahana, karnabahar, marul) virüs ve virüs benzeri simpton gösteren bitkilerin, hastalıklarının belirlenmesi ve yaygınlığının araştırılması için çalışmalar yapmıştır. Gerçekleştirdiği arazi çalışmalarında toplam 1595 adet örnek toplamış ve toplanan örneklerin 595'inin en az bir virüs ile enfekteli olduğunu bildirmiştir. Araştırmacı yaptığı çalışmalar sonucunda enfeksiyon oranının %37,3 olduğunu saptamıştır. Ayrıca yapılan testler sonucunda marulda 3, ıspanakta 3 ve turpta 6 örnekte CMV enfeksiyonu olduğunu bildirmiştir.

Çuhal-Kılıç ve Yardımcı (2012), Burdur'un Çine ovasında fasulye yetiştiriciliği yapılan alanlarda, CMV'nin varlığını belirlemek için 2011 yılında bir çalışma yapmışlardır. Fasulye üretim alanlarından toplanan CMV ile enfekteli olduğu şüphelenilen yaprak örnekleri, IC-RT-PCR ve DAS-ELISA yöntemleri kullanılarak CMV'nin varlığını araştırmışlardır. Topladıkları 50 örneği DAS-ELISA testine tabi tutmuşlardır. DAS-ELISA testi sonucu pozitif çıkan veya pozitif olduğundan şüphe duyulan 12 örneği de daha kesin sonuç veren PCR yöntemi ile testlemişlerdir. ELISA testlerine göre, toplanan örneklerin 25'inde CMV enfeksiyonuna rastlamışlardır. Tüm örneklerde IC-RT-PCR yöntemi sonucu yaklaşık olarak 678 bç'lik kılıf protein genine karşılık gelen kısmına ait bant büyüklükleri elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

Erkan ve ark. (2013), kışlık sebze yetiştiriciliği yapılan alanlarda görülen viral hastalıkların belirlenmesi amacıyla, İzmir ili ve çevresinde arazi çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Meyvede bozukluk, sararma, kıvrılma, mozaik, beneklenme gibi virüs benzeri simptom gösteren lahana, soğan, marul, brokoli, brüksel lahanası, pırasa, enginar gibi kışlık sebzelerden toplam 218 adet örnek toplamışlardır. Yaptıkları testler

sonucu, topladıkları örneklerde RaMV (*Radish mosaic comovirus*) ve CMV etmenlerinin yaygın olarak bulunduğunu rapor etmişlerdir. Belirtilen etmenleri LMV, TuMV, LYSV (*Leek yellow stripe potyvirüs*), ArLV (*Artichoke latent potyvirüs*) etmenlerinin sırasıyla enfeksiyon yüzdesi bakımından izlediğini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar yaptıkları çalışma ile ülkemizde CMV'nin lahana bitkilerinde, ArLV'nün ise enginar bitkilerinde doğal enfeksiyonları konusunda ilk kez rapor edildiğini bildirmişlerdir.

Yeşil (2013), Aksaray, Konya ve Karaman illerinde kabakgil bitkileri üreticiliği yapılan alanlarda, viral etmenlerin belirlenmesi ve enfeksiyon kaynaklarının ortaya konulması amacıyla bir çalışma gerçekleştirmiştir. Virüs simptomu gösteren toplam 652 kabakgil bitkisi örneği, 85 yabancı ot ve 92 tohum örneği almıştır. Toplanan örnekleri DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile teslemiştir. Testlerin sonuçlarına göre toplanan bitki örneklerinin %83,4'ünün, yabancı ot örneklerinin %50,6'sının ve tohum örneklerinin de %8,7'sinin SqMV, ZYMV, WMV-2 (*Watermelon mosaic Potyvirus-2*), CMV veya PRSV-W (*Papaya ringspot Potyvirus-watermelon strain*) ile enfekteli olduğunu bildirmiştir. Ayrıca bitki örneklerinde ZYMV (%51,7), WMV-2 (%45,2) ve CMV (%21,3), yabancı ot örneklerinde CMV (%36,5), WMV-2 (%22,3) ve ZYMV (%15,3) ve tohum örneklerinde ZYMV (%4,3), WMV-2 (%3,3) ve CMV (%1,1) etmenlerinin yaygın virüsler olduğunu belirtmiştir. Bununla beraber, yürütülen sörveyde kabakgil bitkilerinden alınan 17 afid örneğini RT-PCR ile testlemiştir. Bu örneklerde ise gerçekleştirilen RT-PCR analizleri sonucunda CMV, ZYMV ve WMV-2 enfeksiyonlarının bulunduğunu bildirmiştir.

Erilmez ve Erkan (2014), 2009 ve 2010 üretim yıllarında, Aydın, İzmir ve Balıkesir illerinde zeytin tarımı yapılan alanlarda, viral etmenlerin varlığını belirlemek için bir çalışma yürütmüşlerdir. Yürütülen bu çalışma boyunca toplam 375 adet örnek toplanmıştır. Toplanan zeytin örneklerinde virüs varlığını saptamak için serolojik, moleküler ve biyolojik yöntemler kullanılmıştır. RT-PCR sonucunda toplanan 375 örnekte %55,73 oranında virüs enfeksiyonu varlığı tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen serolojik yöntemler sonucunda, toplanan örneklerin %12,80'inde ArMV ve yalnız 1 örnekte ise SLRSV varlığını ulaşıldığı bildirilmiştir. RT-PCR sonuçlarına göre ise de toplanan örneklerin %22,9'unda ArMV, %10,6'sında CLRV, %9,6'sında CMV ve %9,06'sında SLRSV varlığına ulaşmışlardır. Ayrıca 4 örnekte ArMV+CLRV ve 9 örnekte ise CMV+ CLRV karışık enfeksiyonu ile karşı karşıya gelindiğini bildirmişlerdir.

Gökdağ (2014), 2013-2014 yıllarında Çanakkale ili ve ilçelerinde yaptığı arazi sörveyleri sonucu viral hastalık belirtisi gözlemlenen ıspanak bitkilerinden 45 örnek

toplamıştır. Toplanan bu örnekler labaratuvara getirilip DAS-ELISA testi uygulanmıştır. ELISA testleri sonucunda 14 örnekte CMV, 13 örnekte BNYVV ve 8 örnekte ise TuMV enfeksiyonuna rastlamıştır. Ayrıca 3 örnekte CMV+TuMV+BNYVV, 2 örnekte CMV+BNYVV ve 2 örnekte ise TuMV+CMV karışık enfeksiyon görüldüğünü belirtmiştir.

Yılmaz (2014), 2014 yılında Edirne'de, meyvesi tüketilen sebze türlerinden biber, kabak, hıyar ve domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda virüslerin varlığını tespit etmek amacıyla bir çalışma gerçekleştirmiştir. Biber, kabak, hıyar ve domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda kalite bozukluğu ve verimde kayıplara neden olan, şekil bozukluğu, nekroz, yapraklarda sararma ve mozaik belirtileri gösteren toplam 120 örnek toplanmıştır. Virüs varlığından şüphelenilerek toplanan örneklerde TSWV, ZYMV ve CMV etmenlerini belirlemek amacıyla DAS-ELISA yöntemi kullanılmıştır. Test sonuçlarına göre alınan 9 örnekte TSWV, 5 örnekte ZYMV ve 3 örnekte ise CMV varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca 5 örnekte ZYMV+CMV ve 2 örnekte TSWV+CMV karışık enfeksiyonları görülmüştür. Enfeksiyon oranlarına bakılacak olursa TSWV'nün oranı %7,5, ZYMV %4,17 oranında ve CMV'nün oranı %2,50 olarak belirlenmiştir. Elde edilen karışık enfeksiyonların oranları ise de CMV+ZYMV için %4,16 ve TSWV+CMV için ise de %1,7 olarak bildirilmiştir.

Karakurt (2015), 2014 yılında İstanbul'da karpuz tarımı yapılan bölgelerde yaşanan verim kaybının sebebini belirlemek için yürüttüğü çalışmada, toplam 344 adet karpuz yaprağı örneği toplamıştır. Karpuz yetiştiriciliği yapılan alanlarda, yapraklarda mozaik, nekroz, şekil bozukluğu ve sararma belirtileri görülmesinden dolayı DAS-ELISA testine gerek duyulmuştur. Yapılan testlemeler sonucunda 344 adet örneğin 13'ünde CMV, 20'sinde ZYMV bulunduğu belirlenmiş ve 2 örnekte CMV+ZYMV karışık enfeksiyon olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu enfekte etme oranlarına bakılacak olursa ZYMV %6,9 oranında ve CMV %4,3 oranında enfeksiyon gösterdiği bildirilmiştir.

Sarı (2015), Samsun ilinde yazlık sebze yetiştiriciliği yapılan alanlarda, enfeksiyon oluşturan CMV'nin altgrup'larının belirlek amacıyla bir çalışma gerçekleştirmiştir. Bu çalışma kapsamında hıyar, kavun, biber, domates ve karpuz bitkilerinden toplam 661 adet yaprak örneği toplamıştır. Toplanan bu örnekler DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiştir. Testlemeler sonucunda 2012 yılında toplanan örneklerin %31,1'inin, 2013 yılında toplananların ise %18,67'sinin CMV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. 2013 yılındaki CMV izolatlarının %27,8'i altgrup I olarak ayrılmıştır. Ancak örneklerin büyük bir kısmının (%67,6) altgrubu serolojik olarak belirlenememiştir. Sadece 2 örneğin (%1,85)

Altgrup II ve 3 örneğin (%2,78) hem CMV Altgrup I hem de altgrup II ile karışık enfekteli olduğu belirlenmiştir.

Sertkaya (2015), Hatay ilinde gerçekleştirdiği çalışmada, marul ve ıspanak bitkilerinde kırışıklık, halkalı leke, mozaik, gevrekleşme, damar açılması, bodurluk ve ölüm gibi simptomlar görüldüğünü belirtmiştir. Yapılan arazi çalışmaları sonucunda 53 marul ve 18 ıspanak örneği toplanmıştır. Toplanan bu örnekler serolojik ve biyolojik olarak testlenmiştir. Testler sonucunda ise CMV, AMV, LMV, MİLBVV (*Miraflori Lettuce big vein virüs*), TRSV (*Tobacco ring spot virüs*), TSWV ve TMV bulgularına ulaşılmıştır. Yapılan testler sonucu 53 adet marul örneğinde LMV (%47,1), MiLBVV (%11,3), TSWV (%5,6) ve CMV (%3,7) etmenleri saptanırken, 18 ıspanak örneğinde ise CMV (%16,6), LMV(%11,1) ve TSWV (%11,1) etmenlerinin bulundukları saptanmıştır. Ayrıca bu çalışma ile Hatay ilinde ıspanak tarımı yapılan alanlarda LMV ve TSWV enfeksiyonunun varlığı ilk kez kayıtlara geçirilmiştir.

Şevik ve Balkaya (2015), 2013-2014 yıllarında Bolu, Samsun ve Sinop illerinde bal kabağı popülasyonlarına ait tohum örneklerinde, tohum kaynaklı virüsleri tespit etmek için bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Toplanan tohum örnekleri ZYMV, CGMMV, CMV, TRSV ve SqMV etmenlerinin varlığını belirlemek için DAS-ELISA metodu ile testlenmiştir. DAS-ELISA sonuçlarına göre tohum örneklerinde sadece CMV ve ZYMV varlığına rastlanılmıştır. Ayrıca toplanan bal kabağı tohum örneklerinde enfeksiyon oranı CMV (%4,1) ve ZYMV (%12,5) olarak belirlenmiştir. Toplanan bal kabağı tohum örneklerinde CGMMV, SqMV ve TRSV etmenlerinin varlığına ise ulaşılamamıştır. Bu çalışma sonucunda ilk defa Karadeniz bölgesinde bal kabağı popülasyonlarından alınan tohum örneklerinde tohum kaynaklı virüslerin bulunma durumları ve tanılamaları gerçekleştirilmiştir.

Uzunoğulları ve Gümüş (2015), 2013 yılı Haziran ve Temmuz aylarında Marmara bölgesinde bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu çalışma kapsamında hıyar, kabak, domates, glayöl ve biber bitkilerinde enfeksiyona neden olan CMV'nin tespiti amaçlanmıştır. Bu bitkilerden, 6 ilde toplam 235 örnek toplanmıştır. Toplanan örnekler serolojik yöntemler ile testlenmiştir. Toplanan domates örneklerinden %87'si, biber örneklerinden %69'u, glayöl örneklerinden %69'u, salatalık örneklerinden %58'i ve kabak örneklerinden %75'inde CMV etmeni varlığı saptanmıştır. Ayrıca yapılan bu çalışma ülkemizde glayöl bitkilerinde CMV varlığını tespit etme anlamında ilk olma özelliğini taşımaktadır.

Çat ve ark. (2016), Antalya ili ve ilçelerinde, örtü altı kabak ve hıyar yetiştiriciliği yapılan alanlarda CMV, ZYMV, SqMV ve PRSV varlığını belirlemek ve etmenlerin

yaygınlığını ortaya koymak amacıyla bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Örtü altı kabak ve hıyar yetiştiriciliği yapılan alanlardan toplanan ve viral etmenle bulaşık olduğu şüphesi gösteren 455 adet yaprak ve meyve örneği toplanmıştır. Toplanan örneklerde virüs varlığını tespit etmek amacıyla DAS-ELISA yöntemi kullanılmıştır. Testleme sonucunda toplanan 455 örneğin 346 (%76)'sında bir ve daha fazla viral enfeksiyona rastlanmıştır. DAS-ELISA testi sonucunda virüs varlığı saptanan bitkilerden elde edilen dokular mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılmıştır. İndikatör bitkiler üzerinde simptom gösterme süresinin 15-30 günde gerçekleştiği belirlenmiştir.

Karanfil ve ark. (2016), 2012-2015 yılları arasında Çanakkale ili ve ilçelerinde soğanlı süs bitkileri grubuna giren nergis, sümbül ve zambak bitkilerinde CMV varlığını araştırmak için çalışmalar yürütmüşlerdir. Gerçekleştirilen arazi sörveyleri sonucunda viral hastalık belirtisi gözlemlenen toplam 128 adet örnek toplamışlardır. Toplanan örnekleri DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile testlemişlerdir. Yapılan testlemeler sonucu toplanan 128 örnekten 29'unda (%22,65) CMV varlığına rastlanıldığını bildirmişlerdir. Ayrıca CMV ile enfekteli olduğu belirlenen örneklerde hafif mozaik belirtiler ve damarlarda renk açılması simptomlarının yaygın olarak görüldüğünü belirtmişlerdir.

Zelyüt (2016), Ankara'da yoğun miktarda marul yetiştiriciliği yapılan alanlarda (Ayaş, Çubuk, Nallıhan, Beypazarı ve Merkez ilçelerinde) TSWV, LBVV (*Lettuce big vein virüs*), CMV, LMV ve MiLBVV etmenlerinin varlığının belirlemek amacıyla sörveyler düzenlemiştir. Yapılan arazi çıkışları sonucunda toplamda 324 örnek toplanmış ve toplanan örneklerin DAS-ELISA ile belirtilen virüslerin varlığı açısından testlendiği belirtilmiştir. Gerçekleştirilen DAS-ELISA testleri sonucu 39 örnekte MiLBVV, 25 örnekte LMV ve 6 örnekte LBVV etmenlerinin varlığına rastlanıldığı bildirirken, CMV ve TSWV ile enfekteli bitki bulunmadığı belirtilmiştir.

Geyik (2017), Yalova ve Bursa illerinde domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda, üretimin azalması ve kalite kaybı oluşması sonucu viral etmenlerin varlığını saptamak amacıyla çalışmalar gerçekleştirmiştir. Yapılan arazi çıkışlarında yapraklarda sararma, şekil bozukluğu, mozaik ve nekroz belirtisi gösteren bitkilerden toplam 94 adet örnek almıştır. Alınan örneklerde ToMV (*Tomato mosaic virüs*), TSWV ve CMV etmenlerini belirlemek için DAS-ELISA testi kullanılmıştır. Toplanan 94 örneğin testlenmesi sonucunda 21 örnekte %22,34 oranında ToMV, 19 örnekte %20,21 oranında CMV ve 2 örnekte %2,13 oranında TSWV enfeksiyonuna rastlanıldığını bildirmiştir.

Güngör ve ark. (2017), Samsun ilinde, ıspanak yetiştiriciliği yapılan alanlarda, enfeksiyon oluşturan virüsleri ve yayılışlarını tespit etmek amacıyla bir çalışma

düzenlemişlerdir. Çalışma kapsamında Bafra ve Çarşamba ilçelerine bağlı köylerde Kasım 2014–Ocak 2015 tarihleri arasında arazi çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Yapılan arazi çalışmalarında, yapraklarında mozaik, kıvrılma bükülme, cüceleşme ve klorotik lezyon belirtisi gösteren ıspanak bitkilerinden 100 adet örnek toplandığını bildirmişlerdir. Toplanan örnekler labaratuvara getirelerek DAS-ELISA testi ile testlenmişlerdir. Testlemeler sonucunda ise örneklerin %8'inin CMV ve %3'ünün TuMV ile enfekteli olduğunu belirlemişlerdir.

Koç ve Fidan (2017), gerçekleştirdikleri çalışmalarında küçük kelebek veya Mersin yapraklı süt otu olarak bilinen *Polygala myrtifolia* bitkisinde, yaz aylarında bitkilerin yapraklarında, düzensiz sarımsı ve sistemik mozaik izler görüldüğünü belirtmişlerdir. Bitkide görülen bu virüs benzeri simptomlara sebep olan etmeni belirlemek amacıyla örnekler toplamışlardır. Toplanan örnekleri DAS-ELISA testi kullanarak testlemişlerdir. Gerçekleştirilen DAS-ELISA testleri sonucunda ise toplanan örneklerin %13,1 (8 adet) oranında CMV ile enfekteli olduğunu bildirmişlerdir.

Sertkaya ve Yılmaz (2017), Hatay'ın Samandağ ilçesinde, 2009-2010 yıllarında, organik domates üretimi yapılan alanlarda, seralarda beyaz sinek ile taşındığı bilinen TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virüs*) ve ToMoV (*Tomato mottle virüs*) ile diğer önemli virüs hastalıklarının varlığını saptamak için çalışmalar yapmışlardır. Çalışma yapılan seralardaki domateslerde yoğun virüs simptomları görüldüğünü belirtmişlerdir. Ayrıca toplanan örneklerde CMV, PVY, ToMV, TSWV, AMV, PVX, ToRSV (*Tomato ring spot virüs*) ve PLRV (*Potato leafroll virüs*) etmenlerinin varlığını belirlemek amacıyla DAS-ELISA testi kullanılarak araştırıldığını bildirmişlerdir. Seralardan toplanan 214 adet örneğin %22,4'ünün TYLCV ile enfekteli olduğu saptamışlardır. Seralarda yetiştirilen simptomlu organik domateslerin DAS-ELISA ile testlenmesi sonucunda PVY (%7), CMV (%3,7), TSWV (%1,4), PLRV (%0,9) ve AMV (%0,4) oranında belirtilen virüsler ile enfekteli olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca PVY+TYLCV ve PLRV+PVY karışık enfeksiyonlara rastlanıldığınıda bildirmişlerdir.

Korkmaz ve ark. (2018), Tokat ilinde kabakgil bitkileri (hıyar, kabak, kavun, karpuz) yetiştiriciliği yapılan alanlarda kalite düşüklüğü ve verim kaybına neden olan virüslerin varlığını saptamak için çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Örnek toplamak için çıkılan alanlarda, bitki genelinde gelişme geriliği, bodurlaşma ve rozetleşme ayrıca yapraklarda kabarcıklaşma, iplikleşme ve mozaik belirtiler olmakla beraber meyvede şekil bozukluğu görülen toplamda 571 adet örnek toplamışlardır. Toplanan örneklerin hangi virüs ile enfekteli olduğunu bulmak için DAS-ELISA testi ile testlemişlerdir. Yapılan testler

sonucunda toplanan 571 örneğin %37'sinin WMV, %12'sinin ZYMV, %11'inin CMV, %3,4'ünün PRSV ve %0,2'sinin SqMV ile enfekteli olduğunu bildirmişlerdir.

BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar temel olarak 4 etapta yürütülmüştür. Öncelikle Çanakkale ili ve ilçeleri ıspanak tarımı yapılan ticari üretim alanlarına ve küçük ev bahçelerine arazi sörveyleri gerçekleştirilerek, virüs ve virüs benzeri simptom gözlemlenen ıspanak bitkilerinden örnekler alınmıştır. Toplanan örnekler viral hastalıkları tespit etmek için laboratuvara getirilmiştir. Bir sonraki aşamada ise toplanan örneklerde CMV'nin varlığını tespit etmek için serolojik bir yöntem olan DAS-ELISA ile testlemeler gerçekleştirilmiştir. DAS-ELISA testleri sonucunda CMV ile enfekteli olduğu belirlenen örnekler moleküler analizlerin yapılması için silika jel içinde +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Yürütülen çalışmanın üçüncü aşamasında ise CMV ile enfekteli olduğu bulunan örneklerden, total nükleik asit izolasyonu yapılarak RT-PCR ile CMV'nin kılıf protein genleri amplifiye edilmiştir. Son etapta ise elde edilen RT-PCR ürünleri purifiye edilerek, sekanslanmıştır. Elde edilen sekans verileri kullanılarak, dünya CMV izolatları ile göstermiş olduğu benzerlik ve filogenetik ilişkiler araştırılmıştır.

3.1. Arazi Çalışması

Arazi çalışması 2016-2017 yıllarında Çanakkale ili ve ilçelerinde ıspanak tarımı yapılan alanlarda ve ev bahçelerinde yürütülmüştür. Üretim sezonu boyunca ıspanak bitkileri görsel olarak incelenmiş, virüs ve virüs benzeri simptom gözlemlenen bitkilerden örnekleme yapılmıştır. Örneklerin alındığı alanların seçimi tesadüfi olarak yapılmıştır. Her bir üretim alanından örnek alınmasına özen gösterilmiştir. Ayrıca arazilerde örnekleme işlemi gerçekleştirilirken, aynı üretim alanında birden fazla bitkide CMV simptomu ve benzer belirtiler gözlemlenmesi durumunda en fazla 3 bitkiden örnek alınmıştır. Yapılan arazi çıkışları sonucunda 66 virüs ve virüs benzeri simptom gösteren bitki örneği toplanmıştır. Toplanan örnekler soğuk zincirde saklanarak laboratuvara getirilmiş ve test edilene kadar buzdolabında bekletilmiştir.

3.2. DAS-ELISA Testi

Yürütülen arazi çalışmaları sonucunda virüs ve virüs benzeri hastalık ile enfekteli olduğundan şüphelenilerek toplanan örneklerdeki CMV'nin varlığı DAS-ELISA testi ile Clark ve Adams (1977)'ın belirttiği yöntem esas alınarak kitlerin sağlandığı firmanın (Bioreba, İsviçre) önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar MEDISPEC ESR

200 ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda okuma işlemine tabi tutularak elde edilen absorbans değerlerine göre belirlenmiştir. Absorbans değerlerine göre negatif kontrolün iki katı ve üzerindeki değerlere sahip olan örnekler CMV ile enfekteli olarak kabul edilmiştir. Ayrıca DAS-ELISA yöntemi sonucunda CMV enfeksiyonu açısından pozitif bulunan örnekler silika jel içinde +4 °C'de moleküler analizlerin gerçekleştirilmesi için muhafaza edilmiştir. Gerçekleştirilen DAS-ELISA testleri 4 aşamada gerçekleştirilmiş olup, aşağıda testin nasıl yapıldığı anlatılmıştır.

3.2.1. Plate'in Antibadi İle Kaplanması

ELISA testinde ilk olarak plate CMV'ye spesifik antibadi ile kaplanmıştır. Her bir çukura, önceden hazırlanmış kaplama solüsyonu (50 mM carbonate-bicarbonate buffer pH: 9.6, %0,02 NaN_3) alınarak içine 1:1000 oranında sulandırılan, IgG antibadi konulmuştur. Bu karışımdan 200 µl alınarak plate'e ekleme işlemi yapılmıştır. Daha sonra inkübatör içerisine koyulan plate 34 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra artık maddelerin temizlenmesi için plate'ler 4'er dk arayla 3 kez olmak üzere yıkama buffer'ı (10 mM fosfat buffer pH: 7.4, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, %0,05 Tween 20) ile yıkanmıştır.

3.2.2. Bitki Örneklerinin Plate'e Yüklenmesi

Gerçekleştirilen arazi çıkışları sonucunda toplanan örnekler havan ve havan eli 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, numaralandırılmış 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 CMV'ye spesifik pozitif ve negatif kontrol konulmuş ve virüs proteinlerinin antibadi ile bağlanmasını sağlamak amacıyla buzdolabında +4 °C'de bir gece süreyle bekletilmiştir. Bu işlemin ardından +4 °C'de bekletilen örneklerle kaplı plate çıkartılarak 4'er dk ara ile 3 kez olmak üzere yıkama buffer'ı ile yıkanmıştır.



Şekil 3.1. Ezilen örneklerin plate'a yükleme işlemi

3.2.3. Konjugat (Enzimle İşaretlenmiş Antibadi) Eklenmesi

Konjugat solüsyonu firmanın önerileri doğrultusunda (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, CMV'ye spesifik konjugat IgG 1:1000 oranında eklenerek plate'lere yükleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu plate 34 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübe işlemi sonrasında plate 4'er dk ara ile 3 kez olmak üzere yıkanmıştır.

3.2.4. Substrat Eklenmesi

Bu işlem için tablet substrat kullanılmıştır. Substrat solüsyonu (1 M diethanolamine pH: 9.8, %0,02 NaN_3) 1:5 oranında sulandırılıp içerisine bir plate için bir adet olmak üzere pNPP tablet (p-nitro-phenyl-phosphate) (Bioreba, İsviçre) eklenerek hazırlanmıştır. Hazırlanan substrat çözeltisi plate'e yüklenmiş ve oda sıcaklığında 30-60 dk aralığında bekletilmiştir. Bekletilen plate'de CMV ile enfekteli olan örneklerde sararmalar görülmüştür. Daha sonra plate CMV'nin kesin olarak saptanması amacıyla, MEDISPEC ESR 200 ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda okunma işlemi gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrolün iki katı ve üzerinde değer gösteren örnekler enfekteli olarak nitelendirilmiştir.

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

RT-PCR çalışmaları; DAS-ELISA testleri sonucunda CMV ile enfekteli olduğu belirlenen 4 örnek üzerinden yürütülmüştür. Bu çalışma kapsamında RT-PCR analizinin uygulanmasındaki amaç, örneklerdeki CMV enfeksiyonunun belirlenmesi değil DAS-ELISA testleri sonucu CMV ile enfekteli olduğu belirlenen örneklerdeki CMV'nin CP genlerinin sekanslama aşaması için amplifikasyonunun sağlanmasını oluşturmaktadır.

Bu amaçla ilk olarak CMV ile enfekteli olduğu tespit edilen örneklerden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen total RNA'lar kullanılarak, RT-PCR ile CMV CP genlerinin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. RT-PCR analizinde Fermentas (Litvanya) firmasından temin edilen kitler kullanılmış ve firmanın önerileri doğrultusunda 3 temel aşamada gerçekleştirilmiştir. Total RNA izolasyonu ve RT-PCR analizleri aşağıda anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonunda Qiagen (Almanya) firmasına ait hazır total RNA ekstrasyon kiti kullanılmıştır ve işlem süresince kiti üreten firmanın önerileri doğrultusunda hareket edilmiştir.

Bu aşamada öncelikle havan içerisine 20 mg örnek dokusu, 12 ml DDT ve 600 ml RLT buffer ilave edilerek ezme işlemi gerçekleştirilmiştir. Ezilmiş olan örnekler 1.5 ml'lik eppendorf tüplere alınmış ve en fazla 3 dk santrifüj yapılmıştır. Bu işlem sonucunda elde edilen supernatant yeni eppendorf tüplere aktarılmış ve eşit hacimde %70'lik EtOH ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra elde edilen bu karışımın 700 µl'si "spin column" denilen kolonlara aktarılmış ve 20 sn boyunca 10.000 rpm'de santrifüj işlemi yapılarak spin kolonun alt kısmında toplanan sıvı dökülmüştür. Spin kolona 700 µl RW1 yıkama buffer'ı ilave edilmiş ve yine 20 sn boyunca 10.000 rpm'de santrifüj edilerek aynı şekilde spin kolonun alt kısmında toplanan sıvı uzaklaştırılmıştır. Aynı şekilde yeniden spin kolona 500 µl RPE Yıkama buffer'ı ilave edilmiş ve 20 sn 10.000 rpm'de santrifüj işlemi yapılarak kolonun altında toplanan sıvı uzaklaştırılmıştır. Son aşamada spin kolonun altına 1.5 ml'lik yeni eppendorf tüpleri yerleştirilmiş ve spin kolona 40 µl RNase içermeyen steril saf su ilave edilmiştir ve 1 dk boyunca 10.000 rpm santrifüj edilmiştir. Eppendorf tüplerininde toplanan sıvı kısım total RNA'yı oluşturmuştur. Elde edilen total RNA'lar -80 ^{o}C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edilmiştir.

3.3.2. RT-PCR Aşaması

3.3.2.1. Denatürasyon Aşaması

Denatürasyon işleminin yapılmasının amacı virüslerin bağlarının birbirlerinden ayrılmasını sağlamaktır. Denatürasyon işlemi için gerekli olan mikro PCR tüplerine öncelikle etiketleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Örneklere ait 5 µl total RNA, 3 µl steril su, 1 µl random primer ve 1 µl dNTP'den oluşan 10 µl denatürasyon karışımı etiketlenen PCR tüplerinde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu karışım thermal cycler'de 65 ^{o}C'de 5 dk

bekletilmiş ve denatürasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin hemen sonrasında örnekler 2 dk boyunca buzda bekletilerek denatürasyon aşaması gerçekleşmiştir.

3.3.2.2. Ters Transkripsiyon Aşaması (RT)

Bu bölümde denatüre edilen RNA'lardan cDNA'ların sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçtan dolayı 10 µl denatürasyon karışımına RNase inhibitör'den 0.5 µl, 10 mM dNTP karışımından 1 µl, 3µl steril su, 4 µl 5X Prime Script Buffer (50 mM Tris HCl pH:8.3, 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$), Prime Script Reverse Transcriptase 0.5 µl ve random primer'den 1 µl ilave edilerek RT karışım hazırlanmıştır. PCR makinası 70 ^{o}C'de 15 dk, 42 ^{o}C'de 45 dk, 30 ^{o}C'de 10 dk ve +4 ^{o}C'de sonsuz şekilde bekleyecek durumda hazırlanmıştır ve cDNA'ların sentezlenmesi gerçekleştirilmiştir.

3.3.2.3. PCR Aşaması (Amplifikasyon)

PCR karışımı cDNA'ların sentezlenmesi amacıyla hazırlanmıştır. Oluşturulan bu karışımda 1 µl 10 mM dNTP karışımından, 0.5 µl SK CMV5 ve SK CMV6 primer çiftlerinin her birinden, 10X PCR Buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris HCl 25 ^{o}C pH: 9.0, %1 Triton X-100)'dan 2.5 µl, 15.25 µl steril su ve 0.25 µl Taq polimeraz enzimi bulunmaktadır (Çizelge 3.1). Etiketlenen PCR tüplerine cDNA 5 µl ve hazırlanan PCR karışımı eklenmiş ve oluşan karışım 94 ^{o}C'de 3 dk, 40 defa tekrarlanan 94 ^{o}C'de 30 sn, 55 ^{o}C'de 30 sn ve 72 ^{o}C'de 30 sn, 72 ^{o}C'de 5 dk daha sonra da 4 ^{o}C'de sonsuz şekilde bekleyecek biçimde programlanan PCR makinesine konulmuş ve CMV CP genlerinin çoğaltılması gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. RT-PCR analizlerinde kullanılan primer çifti

Kod	**Primer Dizini**	**Sense**	**Spesifik Geni**
SK CMV5	ATGGACAAATCTGAATCAACC	Forward (İleri)	CP (638 bç)
SK CMV6	GATGTGGGAATGCGTTGGTGC	Reverse (Geri)	

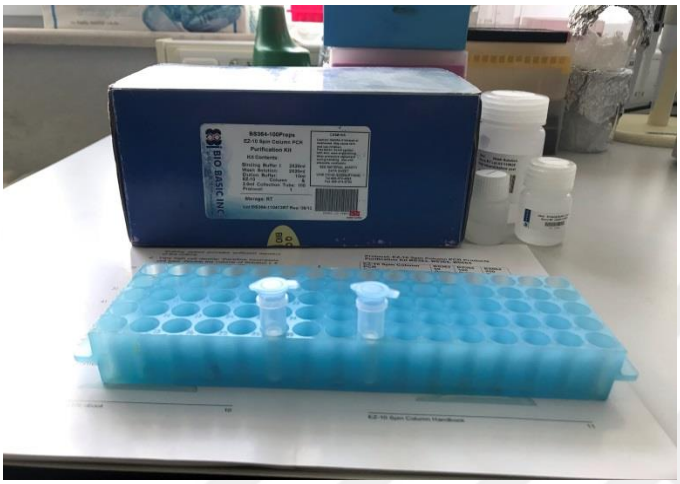
3.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilmiş olan RT-PCR ürünleri 100-1000 bç DNA büyüklük markörleriyle birlikte 100 voltta ve %1 agaroz jelinde, 45 dk ayrıştırılmış ve ethidyum bromür ile boyanmıştır. Daha sonra CMV CP genine ait 638 bç'ne karşılık gelen bantlar Major Science UVDI jel görüntüleme cihazında fotoğraflanmıştır. Çoğaltılan CMV CP genlerinden bir tanesi rastgele seçilerek (CNK21), sekans dizilimlerinin belirlenmesi amacı

ile saflaştırılma işlemine tabi tutulmuştur.

3.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

EZ Column PCR pürifikasyon kiti (BioBasic, Kanada) kullanılarak üretici firmanın önerileri dikkate alınarak, çoğaltılan CMV CP geninin RT-PCR ürünleri'nin saflaştırma işlemi uygulanmıştır.



Şekil 3.2. EZ Column PCR pürifikasyon kiti (BioBasic, Kanada)

Bu amaçla 20 µl RT-PCR ürününe 60 µl Binding I buffer eklenmiş ve tamamı EZ kolona aktarılarak 2 dk boyuna oda sıcaklığında bekletilmiştir. Geçen sürenin arkasından 2 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Kolonun alt kısmı boşaltılmış, 500 µl yıkama solüsyonu eklenmiş ve 2 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Yapılan bu işlem yeniden yapılarak 500 µl yıkama solüsyonu eklenmiş ve 2 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Alt kısım boşaltılmıştır. Kolon yeniden 10.000 rpm'de 1 dk boş santrifüj edilerek tamamen kurutulması amaçlanmıştır. EZ kolonun altına örnek numaraları yazılmış 1.5 ml eppendorf tüpler konulmuş ve kolonun içerisine 25 µl elution solüsyon ilave edilmiş ve 2 dk oda sıcaklığında bekletilmiş, daha sonra 2 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Effendorf tüplerinde toplanan son ürünler saflaştırılan RT-PCR ürünleridir ve kullanılma zamanına kadar -20 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir.

3.5. Kılıf Protein Geninin Dizininin Belirlenmesi

Çanakkale ili ıspanak yetiştiriciliği yapılan bölgelerinden elde edilen CMV izolatına ait sekans dizilimleri Refgen biyoteknoloji (Ankara) firmasından hizmet alımı yolu ile gerçekleştirilmiştir. Sekanslama aşaması SK5 ve SK6 CMV CP genine spesifik primer çifti

ile çift yönlü olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sekans verileri CLC Main Workbench V.8.0.1 programında birleştirilmiştir.

3.5.1. Kılıf Protein Geninin Benzerlik Analizi

Elde edilen sekans verisi kullanılarak CNK21 izolatının dünya CMV izolatları ile göstermiş olduğu benzerlik ve filogenetik ilişkiler araştırılmıştır. Gerçekleştirilen bu analizler hem nükleotid (nt) hemde amino asit (aa) düzeyinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak gen bankasında veri tabanlarında araştırmalar yapılmış ve dünyanın farklı bölgelerinden elde edilen CMV izolatlarına ait CP geninin aa ve nt dizilerine ulaşılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılan Türk ve Dünya İzolatlarına ait gen bankası erişim numarası, orijini ve ait oldukları altgrup bilgileri

Genbankası Erişim Numarası	Orjin	Altgrup
CNK21	Türkiye	IA
LC066422	Japonya	IA
LC066458	Japonya	IA
HM065509	Sırbistan	IA
AJ829771	İspanya	IA
AF316362	Güney Kore	IA
KM527391	Çin	IB
HQ829827	Çin	IB
LC003524	Güney Kore	IB
JX993914	Çin	IB
FN552543	Tayland	II
AJ829779	İspanya	II
EF153734	Hindistan	II
JX101617	Kolombiya	II

Bu diziler ve CNK21 CMV izolatına ait sekans dizileri CLC Main Work Bench V.8.0.1 programında bulunan Clustal W programı kullanılarak hem nt hem de aa düzeyinde dizilenmiştir. Gerçekleştirilen bu dizilemeler ile CNK21 CMV izolatının dünya izolatlarıyla göstermiş oldukları benzerliklerinin yüzde olarak değeri belirlenmiştir. Ayrıca Vector NTI V.11.5 programı kullanılarak diziler renki formatta da elde edilmiştir.

3.6. Kılıf Protein Geninin Filogenetik Analizi

CLC Main Work Bench V.8.0.1 programında Clustal W programı kullanılarak dizilenen sekans verileri kullanılarak filogenetik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çoklu dizi verileri kullanılarak, Neighbor-Joining yöntemi ve Kiamura iki parametre alogaritması uygulanarak filogenetik soyağacı MEGA7 programında oluşturulmuştur (kumar ve ark., 2016). Meydana gelen soyağacının istatistiki olarak doğruluğunu ortaya koymak için 1000 tekerrürlü boostrap analizi uygulanmıştır. Filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde oluşturulan soyağacının doğruluğunu arttırmak için CMV ile aynı familya ve cins içinde bulunan *Peanut stunt virus* (PSV, genbankası erişim numarası:U15730) dış grup olarak kullanılmıştır.

BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Arazi Çalışmaları ve DAS-ELISA Testleri

Çalışma kapsamında yürütülen arazi çalışmaları ıspanak bitkisi yetiştiriciliğinin yapıldığı Çanakkale il, ilçeleri ve köylerinde 2016-2017 yılları üretim sezonunda yapılmıştır. Üretim sezonu süresince ıspanak bitkisi yetiştiriciliği yapılan ticari üretim alanlarına ve ev bahçelerine tesadüfi olarak arazi sörveyleri gerçekleştirilmiştir. Bitkiler görsel olarak incelenmiş ve CMV simptomlarına benzer simptom gösteren ıspanak bitkilerinden yaprak örnekleri alınmıştır. Arazi çıkışları sonucunda toplam 66 örnek toplanmıştır. Örneklerin toplandığı alanların dağılımı Şekil 4.1'de verilmiştir. Araştırma boyunca yapılan arazi çıkışlarında en fazla örnekleme Ayvacık ilçesi ve köylerinde yapılmış olup toplam 25 örnek toplanmıştır.

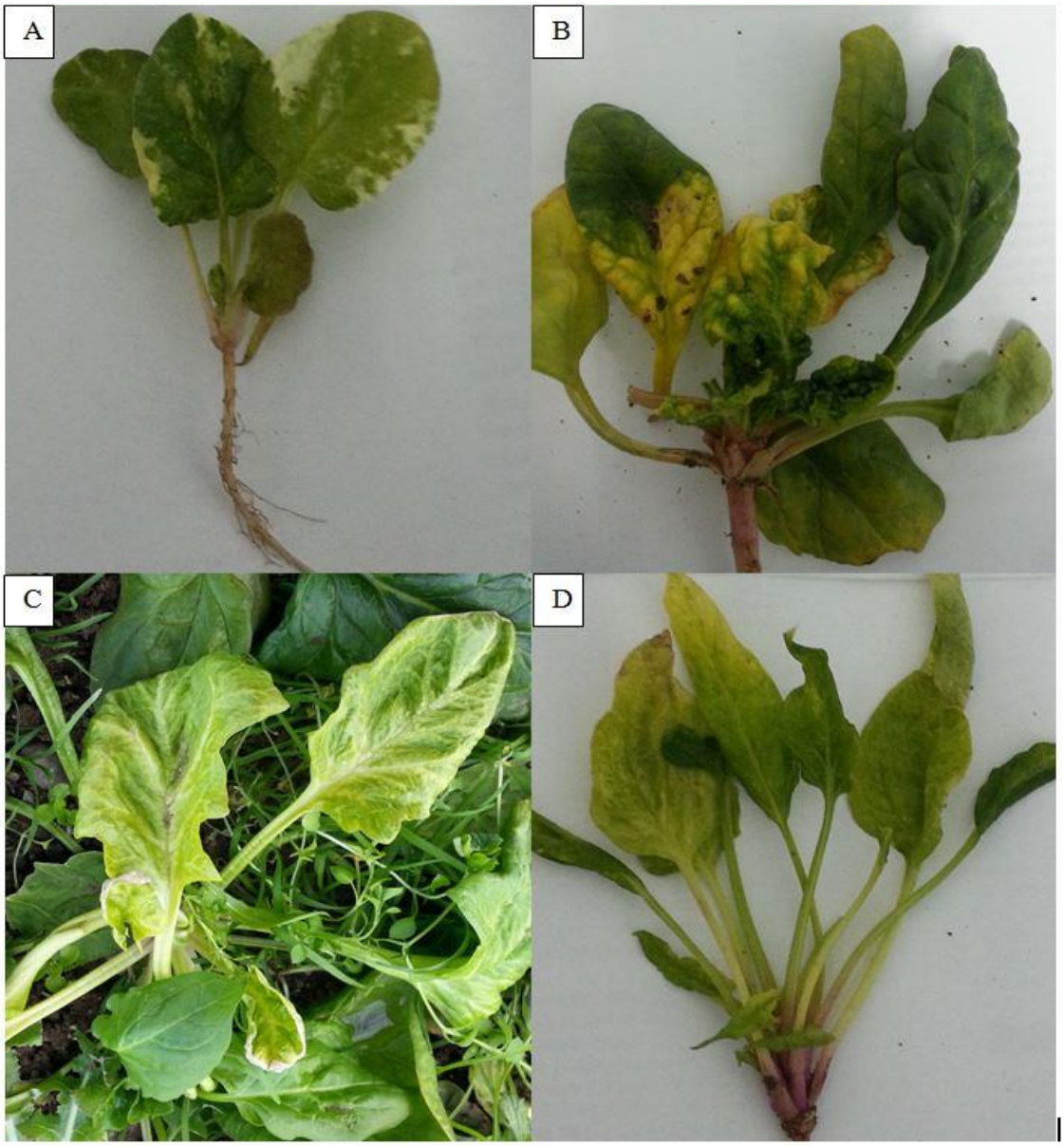


Şekil 4.1. Örnekleme yapılan alanlar ve alınan örnek sayıları

Yapılan arazi çalışmaları kapsamında diğer ilçelerden toplanan örnek sayıları ise Çanakkale il merkezinden 10, Lapseki'den 8, Biga'dan 6 ve Ezine'den 17 olarak gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen arazi çalışmaları kapsamında çok fazla sayıda ve geniş alanlara arazi çıkışları yapılmış ve birçok ıspanak tarlası yerinde gözlemlenmiştir. Örnek toplanmayan Çan, Bayramiç ve Eceabat ilçelerinde de 2016-2017 üretim sezonunda arazi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ancak bu ilçelerde ıspanak yetiştiriciliğinin sınırlı olması ve gezilen arazilerde virüs ve virüs benzeri simptomların görülmemesi nedeniyle

örnekleme yapılamamıştır. Bu bağlamda gerçekleştirilen arazi çıkışları ile toplanan örnek sayıları karşılaştırıldığında toplanan örnek sayısı göreceli olarak az gözükmektedir.

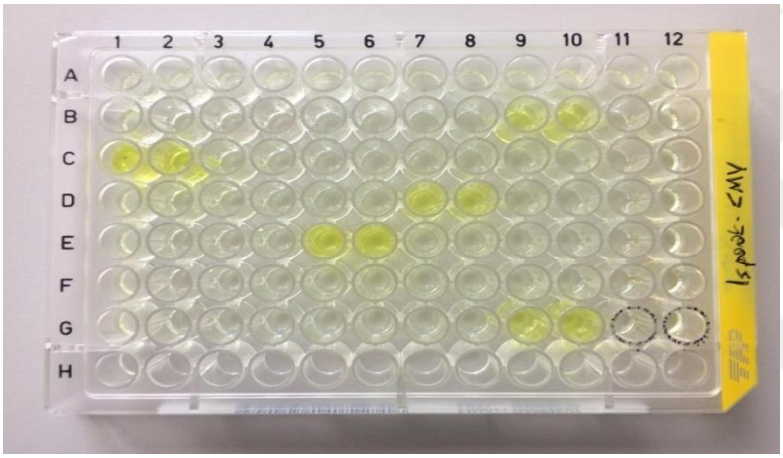
Arazi çalışmaları esnasında oldukça çeşitli ve tipik virüs ve virüs benzeri simptom gösteren bitkilere rastlanılmıştır (Şekil 4.2). Bu simptomlardan bazıları; şekil bozuklukları, mozaik, lokal nekrotik lezyonlar, yapraklarda çizgilenme, şerit şeklinde sarı, açık yeşil, koyu yeşil çizgiler, damar açılmaları, yapraklarda damar boyunca sararma ve bodurluk simptomları olarak görülmüştür.



Şekil 4.2. Çanakkale ili ve ilçelerinden toplanan ıspanak bitkilerinde görülen bazı virüs simptomları (A: Ispanak bitkisi yapraklarında klorotik renk değişimleri, B: Ispanak bitkisi yapraklarında görülen kıvrılma ve sararlamalar, C: Ispanak bitkisi yapraklarında kloroz simptomu, D: Ispanak bitkisi yapraklarında oluşan incelme ve sivrilmeler)

Erbay (2010), Gediz havzasında gerçekleştiridiği çalışmasında ıspanak üretim alanlarında farklı virüs simptomlarına rastladığını bildirmiştir. Gökdağ (2014), ise Çanakkale ili ve ilçelerindeki ıspanak üretim alanlarında yapmış olduğu bir çalışmada benzer simptomlu bitkilerin olduğunu belirtmiştir. Bu bağlamda ıspanak üretim alanlarında farklı virüs benzeri simptomların olduğu bu çalışma kapsamında da doğrulanmıştır.

Örneklerin testlenmesi DAS-ELISA testleri ile gerçekleştirilmiştir. Testler sonucunda ELISA plate çukurlarında gözle görülebilir düzeyde yoğun sararmalar meydana gelmiştir (Şekil 4.3). Renk değişimi oluşan çukurlardaki örneklerin CMV ile enfekteli olduğunu ve CMV'nin enfekteli bitkilerde yüksek konsantrasyon seviyelerine ulaştığını göstermektedir.



Şekil 4.3. ELISA testinde Hıyar mozaik virüsü ile enfekteli örneklerin bulunduğu kuyularda gözlemlenen renk değişimleri

Yapılan DAS-ELISA testleri sonucunda toplanan 66 örnekten 4'ü CMV ile enfekteli bulunmuştur. Toplanan örneklerde ortalama enfeksiyon oranı %6 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).

Gerçekleştirilen DAS-ELISA testleri sonucunda Ayvacık'dan toplanan 25 örneğin 1'i, Lapseki'den toplanan 8 örneğin 2'si ve Biga'dan toplanan 6 örneğin 1'i CMV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Çanakkale Merkez ve Ezine'den toplanan örneklerde ise CMV enfeksiyonu tespit edilmemiştir. İlçeler bazında gerçekleştirilen enfeksiyon oranlarının hesaplanması sonucunda ise en yüksek enfeksiyon oranı %25 ile Lapseki'den bulunmuştur. Diğer ilçelerdeki enfeksiyon oranları ise Biga'da %17 ve Ayvacık'da %6 olarak hesaplanmıştır. Ancak unutulmamalıdır ki, hesaplanan bu enfeksiyon oranları toplanan örneklerdeki CMV enfeksiyon oranını temsil etmektedir.

Çizelge 4.1. Enfeksiyon oranının örneklerin toplandığı yerlere göre dağılımı

Örnekleme Yapılan Çanakkale İlçeleri	Enfekteli Örnek Sayısı/ Toplam Örnek Sayısı	Enfeksiyon Oranı (%)
Merkez	0/10	-
Ayvacık	1/25	4
Ezine	0/17	-
Biga	1/6	17
Lapseki	2/8	25
Toplam	**4/66**	**6**

Yürütülen bu çalışma kapsamında toplanan örneklerin tümünün virüs ve virüs benzeri simptom göstermesine karşın DAS-ELISA testi sonucunda 4 örnek CMV ile enfekteli bulunmuş ve enfeksiyon oranı %6 olarak belirlenmiştir. Yunanistan'da gerçekleştirilen benzer bir çalışmada ıspanak üretim alanlarında virüs hastalıklarının belirlenmesini amaçlayan Fotopoulos ve ark. (2011), topladıkları örneklere yaptıkları testler sonucunda, örneklerin %7'sinin CMV ile enfekteli olduğunu bildirmişlerdir. Ülkemizde yürütülen bir çalışmada ise Sertkaya (2015), Hatay ilinde ıspanak ve marul bitkilerinde simptomlar görmesi sonucu arazi çalışmaları gerçekleştirmiş ve toplam 53 marul ve 18 ıspanak örneği toplamıştır. Yapılan testler sonucu ıspanak örneklerinde CMV'nin varlığını %16,6 olarak saptamıştır. Benzer bir şekilde ülkemizde gerçekleştirilen başka bir çalışmada Güngör ve ark. (2017), Samsun ilinde ıspanak yetiştiriciliği yapılan alanlarda enfeksiyon oluşturan virüsleri belirlemeyi amaçlamışlardır. Bu çalışma kapsamında 100 bitki örneği toplamışlar ve yapılan çalışmalar sonucu örneklerin %8'ini CMV ile enfekteli bulmuşlardır. Yapılan bu çalışmalarda enfeksiyon oranlarının birbirinden farklı çıkmasının sebebi, örnekleme yapılan bölgelerin farklı olması, bölgedeki virüs vektörlerinin varlığı ve örnekleme yönteminin farklı olmasından dolayı açıklanabilir. Nitekim, gerçekleştirilen çalışmaların bazılarında TuMV (*Turnip mosaic virus*), TMV (*Tobacco mosaic virus*) ve BNYVV (*Beet necrotic yellow vein virus*) enfeksiyonları ülkemiz ıspanak üretim alanlarında tespit edilmiştir (Erbay, 2010; Gökdağ, 2014).

Gerçekleştirilen DAS-ELISA testleri sonucu CMV ile enfekteli olduğu tespit edilen örneklerde yoğun kıvrılmalar ve şekil bozuklukları simptomları görülmüştür (Şekil 4.4). Erbay (2010), Gediz havzasında gerçekleştirdiği çalışmalar sonucu ıspanaklarda CMV enfeksiyonu bulunduğunu bildirerek, CMV ile enfekteli ıspanak bitkilerinin yapraklarında şekil bozuklukları, daralma ve klorotik lekeler görüldüğünü belirtmiştir. Yine ülkemizde

gerçekleştirilen bir çalışmada, ıspanak bitkilerinde CMV enfeksiyonunun bitkilerin yapraklarında yoğun kıvrılmalara neden olduğu bildirilmiştir (Gökdağ, 2014). Güngör ve ark. (2017), yaptıkları çalışmalar sonucu CMV'nin bitki bünyesinde olması durumunda genç yapraklarda tepe kıvırcıklığı, mozaik, kloroz ve bodurluk gibi simtomlara neden olduğunu belirlemişlerdir. Gerçekleştirilen çalışmalarda CMV'nin varlığı kesinleştikten sonra gözlemlenen simptomlar yukarıdaki gibi bildirilmiştir. Bu çalışma sonucunda da aynı simptomlar görülmesi nedeniyle çalışmalardan elde edilen simptomatolojik bulgular birbirine benzerlik göstermektedir.

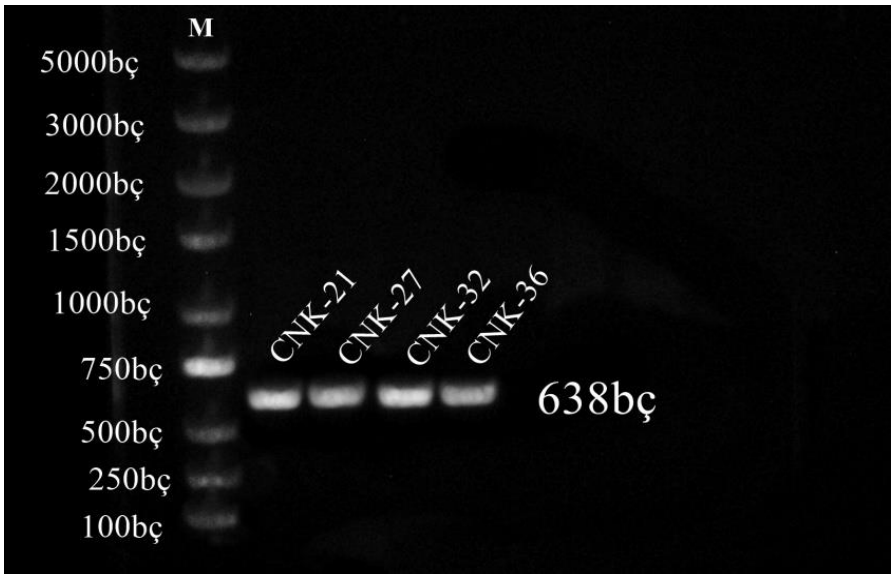


Şekil 4.4. Araziden toplanan ve Hıyar mozaik virüsü (CMV) ile enfekteli olduğu DAS-ELISA testlemeleri sonucu doğrulanan ıspanak bitkisi (A), araziden toplanan DAS-ELISA testi sonucu CMV ile enfekteli bulunmayan sağlıklı ıspanak bitkisi (B)

4.2. 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 total RNA izolasyonu başarı ile sonuçlanmıştır.

DAS-ELISA testi sonucuna göre CMV ile enfekteli olarak tespit edilen örneklere RT-PCR analizi uygulanmış ve CMV CP genine karşılık gelen 638 bç uzunluğunda bant oluşumu gözlenmiştir. CMV izolatlarına ait RT-PCR sonuçları Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5. Çanakkale ili ve ilçelerinden toplanan örneklere Hıyar mozaik virüsü için uygulanmış olan RT-PCR test sonuçları (M: Marker, 100 bç; 21, 27, 32, 36: CMV ile enfekteli izolat numaraları)

Ülkemizde yapılan bir çalışmada Çuhal-Kılıç ve Yardımcı (2012), Burdur'un Çine ovasında fasulye yetiştiriciliği yapılan arazilerde CMV'nin varlığını tespit etmek amacıyla 50 adet örnek toplamışlardır. Yapılan DAS-ELISA testi sonucu 12 örnekte CMV varlığına rastlamışlardır. Pozitif veya pozitif olduğundan şüphelenilen örneklere RT-PCR testi uygulamışlardır. RT-PCR sonucunda CP genine karşılık gelen kısmına ait 678 bç'lik bantlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bizim gerçekleştirdiğimiz çalışmada da RT-PCR testleri DAS-ELISA testlerini takiben gerçekleştirilmiştir. Bu sayede hem DAS-ELISA testi bulguları doğrulanmış hem de CMV enfeksiyonlarının tanılanmasında RT-PCR testinin başarı ile uygulandığı sonucuna ulaşılmıştır. Yine ülkemizde gerçekleştirilen bir çalışmada Soylu (2014), Çanakkale ilinde soğanlı süs bitkilerinin yetiştiriciliği yapılan alanlarda CMV'nin tespitini amaçlamıştır. Yapılan DAS-ELISA testi sonucu toplanan örneklerin CMV ile enfekteli olduğunu bildirmiştir. RT-PCR testi sonucunda CMV'nin CP genine ait 638 bç büyüklüğe karşılık gelen bantları elde edilmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışmada da RT-PCR testleri sorunsuz ve başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir. Bu bağlamda yapılan çalışmalar birbirine paralellik göstermektedir.

4.3. Kılıf Protein Genlerinin Dizi Analizleri

Hizmet alımı yolu ile sekanslanması gerçekleştirilen CMV izolatına ait çift yönlü sekans verileri birleştirilerek istenilen 638 bç büyüklüğünde sekans dizilimleri elde

edilmiştir. Ayrıca dünya CMV izolatlarının CP genlerinin nt dizilimleri incelenmiş ve yapılan dizilemeler sonucu seçilen izolatların ortalama sekans uzunluklarının 536 bç büyüklüğünde boşluksuz (aralıksız) olarak elde edilebildiği görülmüştür. Bu yüzden gerçekleştirilen çoklu nt dizi karşılaştırmalarında CP geninin 536 bç'lik bölgesi kullanılmıştır. Benzer şekilde aa düzeyinde gerçekleştirilen çoklu dizi karşılaştırmalarında da bu bölgeye göre nt'lerin aa'lere çevirilmesi yapılarak kullanılmıştır.

4.3.1. Nükleotid Dizi Analizleri

CNK21 ıspanak izolatının nt düzeyinde dünya izolatları ile göstermiş olduğu benzerlik oranlarının belirlenmesi amacı ile çoklu dizi karşılaştırmaları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.2). Çizelge 4.2 incelendiğinde aynı pozisyonda benzer nt'lere sahip izolatların o pozisyon için aynı renkte olduğu, farklılık göstermesi durumunda ise farklı renkle simgelendiği görülmektedir.

Çizelge 4.2. Çanakkale Hıyar mozaik virüsü (CMV) izolatları ile seçilen CMV izolatılarının kılıf protein geninin 536 bç'lik kısmına ait çoklu nt dizi karşılaştırmaları

```
                  1                                                  50
 AF316362     (1) TCCTCCCGGATGCTAACTTTAGAGTCTTGTCGCAGCAGCTTTCGCGACTT
 AJ829779     (1) TCCTCCCGGATGCTAACTTTAGAGTCTTGTCGCAGCAGCTTTCGCGACTT
 EF153734     (1) TCCTCCCGGATGCTAACTTTAGAGTCTTGTCGCAGCAGCTTTCGCGACTT
 JX101617     (1) TCCTCCCGGATGCTAACTTTAGAGTCTTGTCGCAGCAGCTTTCGCGACTT
 FN552543     (1) TCCTCTCGGATGCTACCTTTAGAGTCCTGTCGCAGCAGCTTTCGCGACTT
 HQ829827     (1) TCCTCCCGGATGCCAACTTTAGAGTCTTGTCGCAGCAACTTTCGCGACTT
 JX993914     (1) TCCTCCCGGATGCCAACTTTAGAGTCCTGTCGCAGCAACTTTCGCGACTT
 LC003524     (1) TCCTCTCGGATGCCACCTTCAGAGTCCTGTCGCAGCAACTTTCGCGACTT
 KM527391     (1) TCCTCCCGGATGCCAACTTTAGAGTCTTGTCGCAGCAACTTTCGCGACTT
 AJ829771     (1) TCCTCCCGGATGCTAACTTTAGAGTCCTGTCGCAGCAGCTTTCGCGACTT
 HM065509     (1) TCCTCCCGGATGCTAACTTTAGAGTCTTGTCGCAGCAGCTTTCGCGACTT
    CNK21     (1) TCCTCCCGGATGCCAACTTTAGGGTCTTGTCGCAGCAGCTTTCGCGACTT
 LC066422     (1) TCCTCCCGGATGCCAACTTTAAGGTCTTGTCGCAGCAGCTTTCGCGACTC
 LC066458     (1) TCCTCCCGGATGCTAACTTTAGAGTCTTGTCGCAGCAGCTTTCGCGACTT
Consensus     (1) TCCTCCCGGATGCTAACTTTAGAGTCTTGTCGCAGCAGCTTTCGCGACTT
                  51                                                 100
 AF316362    (51) AACAAGACGTTAGCAGCTGGTCGTCCAACTATTAACCACCCAACCTTTGT
 AJ829779    (51) AATAAGACGTTAGCAGCTGGTCGTCCAACTATTAACCACCCAACCTTTGT
 EF153734    (51) AACAAGACGTTAGCAGCTGGTCGTCCAACTATTAACCACCCAACCTTTGT
 JX101617    (51) AACAAGACGTTAGCAGCTGGTCGTCCAACTATTAACCACCCAACCTTTGT
 FN552543    (51) AATAAGACGTTAGCAGCTGGTCGTCCAACTATTAACCACCCAACCTTTGT
 HQ829827    (51) AATAAGACGTTGGCAGCTGGTCGTCCTACCATTAACCACCCAACCTTTGT
 JX993914    (51) AATAAGACGTTGGCAGCTGGTCGTCCTACTATTAACCACCCAACCTTTGT
 LC003524    (51) AATAAGACGTTGGCAGCTGGTCGTCCTACCATTAACCACCCAACCTTTGT
 KM527391    (51) AACAAGACGTTGGCAGCTGGTCGTCCTACCATTAACCACCCAACCTTTGT
 AJ829771    (51) AATAAGACGTTAGCAGCTGGTCGTCCAACTATTAACCACCCAACCTTTGT
 HM065509    (51) AATAAGACGTTAGCAGCTGGTCGTCCAACTATTAACCACCCAACCTTTGT
    CNK21    (51) AATAAGACGTTGGCAGCTGGTCGTCCAACCATTAACCACCCAACCTTTGT
 LC066422    (51) AATAAGACGTTGGCAGCTGGTCGTCCAACCATTAACCACCCAACCTTTGT
 LC066458    (51) AATAAGACGTTAGCAGCTGGTCGTCCAACTATTAACCACCCAACCTTTGT
Consensus    (51) AATAAGACGTTAGCAGCTGGTCGTCCAACTATTAACCACCCAACCTTTGT
```

Çizelge 4.2'nin devamı

```
                  101                                                 150
AF316362   (101) AGGGAGTGAGCGTTGTAAACCTGGATACACGTTCACATCTATTACCCTAA
AJ829779   (101) GGGTAGTGAACGCTGTAAACCTGGGTACACGTTCACATCTATTACCCTGA
EF153734   (101) GGGTAGTGAACGCTGTAAACCTGGGTACACGTTCACATCTATTACCCTGA
JX101617   (101) GGGTAGTGAACGCTGTAAACCTGGGTACACGTTCACATCTATTACCCTGA
FN552543   (101) GGGTAGTGAACGCTGTAAACCTGGATACACGTTCACGTCTATTACCCTTA
HQ829827   (101) AGGGAGTGAACGTTGTAAACCTGGGTACACGTTCACATCTATTACCCTGA
JX993914   (101) GGGGAGTGAACGTTGTAAACCTGGGTACACGTTCTCATCTATTACCCTGA
LC003524   (101) GGGGAGTGAACGTTGTAAACCTGGGTACACGTTCTCATCTATTACCCTGA
KM527391   (101) GGGGAGTGAACGTTGTAAACCTGGGTACACGTTCACATCTATTACCCTGA
AJ829771   (101) AGGGAGTGAACGCTGTAGACCTGGGTACACGTTCACATCTATTACCCTAA
HM065509   (101) AGGGAGTGAACGCTGTAGACCTGGGTACACGTTCACATCTATTACCCTAA
   CNK21   (101) AGGGAGTGAACGCTGTAGACCTGGGTATACGTTCACATCTATTACCCTAA
LC066422   (101) AGGGAGTGAACGCTGTAAACCTGGGTATACGTTCACATCTATTACCCTAA
LC066458   (101) AGGGAGTGAACGCTGTAGACCTGGGTACACGTTCACATCTATTACCCTAA
Consensus  (101) GGGGAGTGAACGCTGTAAACCTGGGTACACGTTCACATCTATTACCCTGA
                  151                                                 200
AF316362   (151) AGCCACCAAAAATAGACCGCGGGTCTTATTATGGTAAAAGGTTGTTATTA
AJ829779   (151) AGCCGCCAAAAATAGACCGCGGGTCTTATTATGGTAAAAGGTTGTTGCTA
EF153734   (151) AGCCGCCGAAAATAGACCGCGGGTCTTATTATGGTAAAAGGTTGTTGCTA
JX101617   (151) AGCCGCCGAAAATAGACCGCGGGTCTTATTATGGTAAAAGGTTGTTGCTA
FN552543   (151) AGCCACCGAAAATAGACCGTGGGTCTTATTATGGTAAAAGGTTGTTGCTA
HQ829827   (151) AACCACCGAAAATAGACCGCGGGTCTTATTATGGTAAAAGGTTGTTATTA
JX993914   (151) AGCCACCGAAAATAGACCGCGGGTCTTATTATGGTAAAAGGTTGTTACTA
LC003524   (151) AGCCACCAAAAATAGACCGCGGGTCTTATTATGGTAAAAGGTTGTTATTA
KM527391   (151) AGCCACCGAAAATAGACCGTGGGTCTTATTATGGTAAAAGGTTGTTACTA
AJ829771   (151) AGCCACCAAAAATAGACCGTGGGTCTTATTACGGTAAAAGGTTGTTACTA
HM065509   (151) AGCCACCAAAAATAGACCGTGGGTCTTATTACGGTAAAAGGTTGTTATTA
   CNK21   (151) AGCCACCAAAAATAGACCGTGGGTCTTATTACGGTAAAAGGTTGTTATTA
LC066422   (151) AGCCACCAAAAATAGACCGCGGGTCTTATTACGGTAAAAGGTTGTTATTA
LC066458   (151) AGCCACCAAAAATAGACCGTGGGTCTTATTACGGTAAAAGGTTGTTATTA
Consensus  (151) AGCCACCAAAAATAGACCGCGGGTCTTATTATGGTAAAAGGTTGTTATTA
                  201                                                 250
AF316362   (201) CCTGATTCAGTCACGGAATATGATAAGAAACTTGTTTCGCGCATTCAAAT
AJ829779   (201) CCTGATCCAGTCACGGAGTTCGATAAGAAGCTTGTTTCGCGCATTCAAAT
EF153734   (201) CCTGATTCAGTCACGGAGTTCGATAAGAAGCTTGTTTCGCGCATTCAAAT
JX101617   (201) CCTGATTCAGTCACGGAGTTCGATAAGAAGCTTGTTTCGCGCATCCAAAT
FN552543   (201) CCTGATTCAGTCACGGAGTTCGATAAGAAGCTTGTTTCGCGCATTCAAAT
HQ829827   (201) CCTGATTCAGTCACGGAATTCGATAAGAAGCTTGTTTCGCGCATTCAGAT
JX993914   (201) CCTGATTCAGTCACGGAATTCGATAAGAAGCTTGTTTCGCGCATTCAAAT
LC003524   (201) CCTGATTCAGTCACGGAATTCGATAAGAAGCTTGTTTCGCGCATTCAAAT
KM527391   (201) CCTGATTCAGTCACGGAATTCGATAAGAAGCTTGTTTCGCGCATTCAAAT
AJ829771   (201) CCTGATTCAGTCACAGAATATGATAAGAAGCTTGTTTCGCGCATTCAAAT
HM065509   (201) CCTGATTCAGTCACGGAATATGATAAGAAGCTTGTTTCGCGCATTCAAAT
   CNK21   (201) CCTGATTCAGTCACGGAATATGATAAGAAGCTTGTTTCGCGCATTCAAAT
LC066422   (201) CCTGATTCAGTCACGGAATATGATAAGAAGCTTGTTTCGCGCATTCAAAT
LC066458   (201) CCTGATTCAGTCACGGAATATGATAAGAAGCTTGTTTCGCGCATTCAAAT
Consensus  (201) CCTGATTCAGTCACGGAATTCGATAAGAAGCTTGTTTCGCGCATTCAAAT
                  251                                                 300
AF316362   (251) TCGAGTTAATCCTTTGCCGAAATTTGATTCTACCGTGTGGGTGACAGTCC
AJ829779   (251) TCGAGTTAATCCTTTGCCGAAATTTGATTCTACCGTGTGGGTGACAGTCC
EF153734   (251) TCGAGTTAATCCTTTGCCGAAATTTGATTCTACCGTGTGGGTGACAGTCC
JX101617   (251) TCGAGTTAATCCTTTGCCGAAATTTGATTCTACCGTGTGGGTGACAGTCC
FN552543   (251) TCGAGTCAATCCTTTGCCGAAATTTGATTCTACCGTGTGGGTGACAGTCC
HQ829827   (251) TCGAGTTAATCCTTTGCCGAAATTTGATTCTACCGTGTGGGTGACAGTCC
JX993914   (251) TCGAGTTAATCCTTTGCCGAAATTTGATTCTACCGTGTGGGTGACGGTCC
LC003524   (251) TCGAGTTAATCCTTTGCCGAAATTTGATTCTACCGTGTGGGTGACAGTCC
KM527391   (251) TCGAGTTAATCCTTTGCCGAAATTTGATTCTACCGTGTGGGTGACAGTCC
```

Çizelge 4.2'nin devamı

```
 AJ829771   (251) TCGAGTTAATCCTTTGCCGAAATTTGATTCTACCGTGTGGGTGACAGTCC
 HM065509   (251) TCGAGTTAATCCTTTGCCGAAATTTGATTCTACCGTGTGGGTGACAGTCC
    CNK21   (251) TCGAGTTAACCCTTTGCCGAAATTCGATTCTACCGTGTGGGTTACAGTCC
 LC066422   (251) TCGAGTTAACCCTTTGCCGAAATTCGATTCTACCGTGTGGGTTACAGTCC
 LC066458   (251) TCGAGTTAATCCTTTGCCGAAATTTGATTCTACCGTGTGGGTAACAGTCC
Consensus   (251) TCGAGTTAATCCTTTGCCGAAATTTGATTCTACCGTGTGGGTGACAGTCC
                  301                                             350
 AF316362   (301) GTAAAGTTCCTGCCTCCTCGGACTTATCCGTTGCCGCCATCTCTGCTATG
 AJ829779   (301) GTAAAGTTCCTGCCTCCTCGGACTTATCCGTTGCCGCTATCTCTGCTATG
 EF153734   (301) GTAAAGTTCCTGCCTCCTCGGACTTATCCGTTGCCGCTATCTCTGCTATG
 JX101617   (301) GTAAAGTTCCTGCCTCCTCGGACTTATCCGTTACCGCTATCTCTGCTATG
 FN552543   (301) GGAAAGTTCCTGCCTCCTCGGACTTATCCGTTGCCGCTATCTCTGCTATG
 HQ829827   (301) GTAAAGTTCCTGCCTCCTCGGACCTATCCGTCGCCGCCATCTCTGCTATG
 JX993914   (301) GTAAAGTTCCTGCCTCCTCGGACCTGTCCGTTGCCGCCATCTCTGCTATG
 LC003524   (301) GTAAAGTTCCTGCCTCCTCGGACTTGTCCGTCGCCGCCATTTCTGCTATG
 KM527391   (301) GTAAAGTTCCTGCCTCCTCGGACTTGTCCGTCGCCGCCATCTCTGCTATG
 AJ829771   (301) GTAAAGTTCCTGCCTCCTCGGACTTATCCGTTGCCGCCATCTCTGCTATG
 HM065509   (301) GTAAAGTTCCTGCCTCCTCGGACTTATCCGTTGCCGCCATCTCTGCTATG
    CNK21   (301) GTAAAGTTCCTGCCTCCTCGGACTTATCCGTTGCCGCCATCTCTGCTATG
 LC066422   (301) GTAAAGTTCCTGCCTCCTCGGACTTATCCGTTGCCGCCATCTCTGCTATG
 LC066458   (301) GTAAAGTTCCTGCCTCCTCGGACTTATCCGTCGCCGCCATCTCTGCTATG
Consensus   (301) GTAAAGTTCCTGCCTCCTCGGACTTATCCGTTGCCGCCATCTCTGCTATG
                  351                                             400
 AF316362   (351) TTTGCGGACGGAGCCTCACCGGTACTGGTTTATCAGTATGCTGCATCTGG
 AJ829779   (351) TTTGCGGACGGAGCCTCACCGGTACTGGTTTATCAGTATGCTGCATCCGG
 EF153734   (351) TTTGCGGACGGAGCCTCACCGGTACTGGTTTATCAGTATGCTGCATCCGG
 JX101617   (351) TTTGCGGACGGAGCCTCACCGGTACTGGTTTATCAGTATGCTGCATCCGG
 FN552543   (351) TTTGCGGACGGAGCCTCACCGGTACTGGTGTATCAGTATGCCGCATCCGG
 HQ829827   (351) TTTGCGGACGGAGCCTCACCGGTACTGGTTTATCAGTATGCTGCATCCGG
 JX993914   (351) TTTGCGGACGGAGCCTCACCGGTACTGGTTTATCAGTATGCTGCATCCGG
 LC003524   (351) TTTGCGGACGGAGCCTCACCGGTACTGGTCTATCAGTATGCTGCATCCGG
 KM527391   (351) TTTGCGGACGGAGCCTCACCGGTACTGGTTTATCAGTATGCTGCATCCGG
 AJ829771   (351) TTCGCGGACGGAGCCTCACCGGTACTGGTTTATCAGTATGCCGCATCTGG
 HM065509   (351) TTTGCGGACGGAGCCTCACCGGTACTGGTTTATCAGTATGCCGCATCTGG
    CNK21   (351) TTTGCGGACGGAGCCTCACCGGTCCTGGTTTATCAGTATGCTGCATCTGG
 LC066422   (351) TTTGCGGACGGAGCCTCACCGGTCCTGGTTTATCAGTATGCTGCATCTGG
 LC066458   (351) TTTGCGGACGGAGCCTCACCGGTTCTGGTTTATCAGTATGCCGCATCTGG
Consensus   (351) TTTGCGGACGGAGCCTCACCGGTACTGGTTTATCAGTATGCTGCATCCGG
                  401                                             450
 AF316362   (401) AGTCCAAGCTAACAACAAATTGTTGTATGATCTTTCGGCGATGCGCGCTG
 AJ829779   (401) CGTTCAAGCCAACAACAAATTGTTGTACGATCTTTCGGCGATGCGCGCTG
 EF153734   (401) CGTTCAAGCCAACAACAAATTGTTGTACGATCTTTCGGCGATGCGCGCTG
 JX101617   (401) CGTTCAAGCCAACAACAAATTGTTGTACGATCTTTCGGCGATGCGCGCTG
 FN552543   (401) CGTTCAAGCCAACAACAAATTGTTGTATGATCTTTCAGCGATGCGTGCTG
 HQ829827   (401) AGTCCAAGCCAACAATAAACTGTTGTATGATCTTTCGGCGATGCGCGCTG
 JX993914   (401) AGTCCAAGCCAACAATAAATTGTTGTATGATCTTTCGGCGATGCGCGCTG
 LC003524   (401) AGTCCAAGCCAACAACAAATTGTTGTATGATCTTTCGGCGATGCGCGCTG
 KM527391   (401) AGTCCAAGCCAACAATAAATTGTTGTATGATCTTTCGGCGATGCGCGCTG
 AJ829771   (401) AGTCCAAGCCAACAACAAACTGTTGTATGATCTTTCGGCGATGCGCGCTG
 HM065509   (401) AGTCCAAGCCAACAACAAACTGTTGTATGATCTTTCGGCGATGCGCGCTG
    CNK21   (401) AGTCCAAGCTAACAACAAACTGTTGTATGATCTTTCGGCGATGCGCGCTG
 LC066422   (401) AGTCCAAGCTAACAACAAACTGTTGTATGATCTTTCGGCGATGCGCGCTG
 LC066458   (401) AGTCCAAGCTAACAACAAACTGTTGTATGATCTTTCGGCGATGCGCGCTG
Consensus   (401) AGTCCAAGCCAACAACAAATTGTTGTATGATCTTTCGGCGATGCGCGCTG
                  451                                             500
 AF316362   (451) ATATAGGCGACATGAGAAAGTACGCCGTCCTCGTGTATTCAAAAGACGAT
 AJ829779   (451) ATATTGGCGACATGAGAAAGTACGCCGTCCTCGTGTATTCAAAAGACGAT
 EF153734   (451) ATATTGGCGACATGAGAAAGTACGCCGTCCTCGTGTATTCAAAAGACGAT
```

Çizelge 4.2'nin devamı

```
 JX101617   (451) ATATTGGCGACATGAGAAAGTACGCCGTCCTCGTGTATTCAAAAGACGAT
 FN552543   (451) ATATCGGTGACATGAGAAAGTACGCCGTCCTCGTGTATTCAAAAGACGAT
 HQ829827   (451) ATATTGGCGACATGCGCAAGTACGCCGTTCTCGTGTATTCAAAAGACGAT
 JX993914   (451) ATATTGGCGACATGCGAAAGTACGCCGTTCTCGTGTATTCAAAAGACGAT
 LC003524   (451) ATATTGGCGACATGCGAAAGTACGCCGTACTCGTGTATTCAAAAGACGAT
 KM527391   (451) ATATTGGTGACATGAGGAAGTACGCCGTACTCGTGTATTCAAAAGACGAT
 AJ829771   (451) ATATAGGTGACATGAGAAAGTACGCCGTCCTCGTGTATTCAAAAGACGAT
 HM065509   (451) ATATAGGTGACATGAGAAAGTACGCCGTCCTCGTGTATTCAAAAGACGAT
    CNK21   (451) ATATAGGTGACATGAGAAAGTACGCCGTCCTCGTGTATTCAAAAGACGAT
 LC066422   (451) ATATAGGTGACATGAGAAAGTACGCCGTCCTCGTGTATTCAAAAGACGAT
 LC066458   (451) ATATAGGTGACATGAGAAAGTACGCCGTCCTCGTGTATTCAAAAGACGAT
Consensus   (451) ATATTGGTGACATGAGAAAGTACGCCGTCCTCGTGTATTCAAAAGACGAT
                  501                                           536
 AF316362   (501) GCGCTCGAGACGGACGAGTTGGTACTTCATGTTGAC
 AJ829779   (501) GCGCTCGAGACGGACGAGTTGGTACTTCATGTTGAC
 EF153734   (501) GCGCTCGAGACGGACGAGTTGGTACTTCATGTTGAC
 JX101617   (501) GCGCTCGAGACGGACGAGTTGGTACTTCATGTTGAC
 FN552543   (501) GCGCTCGAGACGGACGAGCTGGTACTTCATGTCGAC
 HQ829827   (501) GCACTCGAGACGGATGAGCTAGTACTTCATGTCGAC
 JX993914   (501) GCTCTCGAGACGGATGAGTTGGTACTTCATGTTGAC
 LC003524   (501) GCACTCGAGACGGATGAGCTAGTACTTCATGTCGAC
 KM527391   (501) GCACTCGAGACGGACGAGTTAGTACTCCATGTCGAC
 AJ829771   (501) GCGCTCGAGACGGACGAGCTAGTACTTCATGTTGAC
 HM065509   (501) GCGCTCGAGACGGACGAGCTAGTACTTCATGTTGAC
    CNK21   (501) GCGCTCGAGACAGACGAGCTAGTACTTCATGTTGAC
 LC066422   (501) GCGCTCGAGACAGACGAGCTAGTACTTCATGTTGAC
 LC066458   (501) GCGCTCGAGACAGACGAGCTGGTACTTCATGTTGAC
Consensus   (501) GCGCTCGAGACGGACGAGCTGGTACTTCATGTTGAC
```

Gerçekleştirilen çoklu nt dizi karşılaştırmaları sonucu CNK21 izolatının, seçilen CMV izolatları ile göstermiş olduğu benzerlik oranları belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Çanakkale Hıyar mozaik virüsü (CMV) izolatı ile seçilen CMV izolatlarının nükleotid düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları

		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**
HM065509	1	*	99	99	97	96	97	96	96	89	95	95	94	94	94
AJ829771	2	99	*	98	96	96	96	95	95	88	94	94	94	94	94
LC066458	3	99	98	*	97	96	96	95	95	88	94	94	93	94	94
CNK21	4	97	96	97	*	98	95	93	93	87	94	94	93	93	92
LC066422	5	96	96	96	98	*	95	93	93	86	94	94	93	93	92
AF316362	6	97	96	96	95	95	*	96	95	89	94	94	94	95	93
EF153734	7	96	95	95	93	93	96	*	99	93	94	96	94	96	96
AJ829779	8	96	95	95	93	93	95	99	*	92	94	95	94	96	96
JX101617	9	89	88	88	87	86	89	93	92	*	88	89	87	89	89
HQ829827	10	95	94	94	94	94	94	94	94	88	*	97	97	97	93
KM527391	11	95	94	94	94	94	94	96	95	89	97	*	97	97	94
LC003524	12	94	94	93	93	93	94	94	94	87	97	97	*	97	94
JX993914	13	94	94	94	93	93	95	96	96	89	97	97	97	*	94
FN552543	14	94	94	94	92	92	93	96	96	89	93	94	94	94	*

Yapılan karşılaştırmalar sonucunda Çanakkale CMV izolatı ile seçilen CMV izolatları arasında %87-98 aralığında benzerlik olduğu saptanmıştır. CNK21 izolatı CP genleri nt dizilimleri açısından en fazla benzerliği %98 oranında LC066422 erişim numaralı Japonya izolatı ile gösterirken, en az benzerliği ise %87 oranında JX101617 erişim numaralı Kolombiya izolatı ile göstermiştir.

Dubey ve ark. (2010), Hindistan'da gerçekleştirdikleri çalışmalar sonucu glayöllerde enfeksiyon oluşturan CMV'nin moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucu elde ettikleri izolatlarının, nükleotid dizilimlerine göre diğer dünya CMV izolatları ile %80−98 benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Ülkemizde gerçekleştirilen benzer bir çalışmada ise Karanfil ve Korkmaz (2017), Çanakkale ilinde fasülye ve börülce yetiştirilen alanlarda CMV enfeksiyonunun moleküler karakterizasyonu amacı ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında, börülce CMV izolatının nt dizilimlerine göre %70-99 benzerlik gösterdiğini bildirilmişlerdir. Bu bağlamda konu hakkında gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar birbirleri ile uyumlu olarak gözükmektedir.

4.3.2. Amino Asit Dizi Analizleri

CNK21 ıspanak izolatının aa düzeyinde seçilen CMV izolatları ile göstermiş olduğu benzerlik oranlarının belirlenmesi amacı ile çoklu dizi karşılaştırmaları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.4). Çizelge 4.4'ün incelenmesi durumunda aynı pozisyonda benzer aa'lara sahip izolatların, o pozisyon için aynı renkte olduğu, farklılık göstermesi durumunda ise farklı renkle simgelendiği görülmektedir.

Çizelge 4.4. Çanakkale Hıyar mozaik virüsü (CMV) izolatları ile seçilen CMV izolatılarının kılıf protein geninin 536 bç'lik kısmına ait çoklu aa dizi karşılaştırmaları

```
                  1                                                  50
AF316362     (1)  LPDANFRVLSQQLSRLNKTLAAGRPTINHPTFVGSERCKPGYTFTSITLK
AJ829771     (1)  LPDANFRVLSQQLSRLNKTLAAGRPTINHPTFVGSERCRPGYTFTSITLK
   CNK21     (1)  LPDANFRVLSQQLSRLNKTLAAGRPTINHPTFVGSERCRPGYTFTSITLK
HM065509     (1)  LPDANFRVLSQQLSRLNKTLAAGRPTINHPTFVGSERCRPGYTFTSITLK
LC066458     (1)  LPDANFRVLSQQLSRLNKTLAAGRPTINHPTFVGSERCRPGYTFTSITLK
LC066422     (1)  LPDANFKVLSQQLSRLNKTLAAGRPTINHPTFVGSERCKPGYTFTSITLK
AJ829779     (1)  LPDANFRVLSQQLSRLNKTLAAGRPTINHPTFVGSERCKPGYTFTSITLK
EF153734     (1)  LPDANFRVLSQQLSRLNKTLAAGRPTINHPTFVGSERCKPGYTFTSITLK
FN552543     (1)  LSDATFRVLSQQLSRLNKTLAAGRPTINHPTFVGSERCKPGYTFTSITLK
LC003524     (1)  LSDATFRVLSQQLSRLNKTLAAGRPTINHPTFVGSERCKPGYTFSSITLK
JX993914     (1)  LPDANFRVLSQQLSRLNKTLAAGRPTINHPTFVGSERCKPGYTFSSITLK
HQ829827     (1)  LPDANFRVLSQQLSRLNKTLAAGRPTINHPTFVGSERCKPGYTFTSITLK
JX101617     (1)  LPDANFRVLSQQLSRLNKTLAAGRPTINHPTFVGSERCKPGYTFTSITLK
```

Çizelge 4.4'ün devamı

```
KM527391     (1) LPDANFRVLSQQLSRLNKTLAAGRPTINHPTFVGSERCKPGYTFTSITLK
Consensus    (1) LPDANFRVLSQQLSRLNKTLAAGRPTINHPTFVGSERCKPGYTFTSITLK
                 51                                              100
AF316362    (51) PPKIDRGSYYGKRLLLPDSVTEYDKKLVSRIQIRVNPLPKFDSTVWVTVR
AJ829771    (51) PPKIDRGSYYGKRLLLPDSVTEYDKKLVSRIQIRVNPLPKFDSTVWVTVR
   CNK21    (51) PPKIDRGSYYGKRLLLPDSVTEYDKKLVSRIQIRVNPLPKFDSTVWVTVR
HM065509    (51) PPKIDRGSYYGKRLLLPDSVTEYDKKLVSRIQIRVNPLPKFDSTVWVTVR
LC066458    (51) PPKIDRGSYYGKRLLLPDSVTEYDKKLVSRIQIRVNPLPKFDSTVWVTVR
LC066422    (51) PPKIDRGSYYGKRLLLPDSVTEYDKKLVSRIQIRVNPLPKFDSTVWVTVR
AJ829779    (51) PPKIDRGSYYGKRLLLPDPVTEFDKKLVSRIQIRVNPLPKFDSTVWVTVR
EF153734    (51) PPKIDRGSYYGKRLLLPDSVTEFDKKLVSRIQIRVNPLPKFDSTVWVTVR
FN552543    (51) PPKIDRGSYYGKRLLLPDSVTEFDKKLVSRIQIRVNPLPKFDSTVWVTVR
LC003524    (51) PPKIDRGSYYGKRLLLPDSVTEFDKKLVSRIQIRVNPLPKFDSTVWVTVR
JX993914    (51) PPKIDRGSYYGKRLLLPDSVTEFDKKLVSRIQIRVNPLPKFDSTVWVTVR
HQ829827    (51) PPKIDRGSYYGKRLLLPDSVTEFDKKLVSRIQIRVNPLPKFDSTVWVTVR
JX101617    (51) PPKIDRGSYYGKRLLLPDSVTEFDKKLVSRIQIRVNPLPKFDSTVWVTVR
KM527391    (51) PPKIDRGSYYGKRLLLPDSVTEFDKKLVSRIQIRVNPLPKFDSTVWVTVR
Consensus   (51) PPKIDRGSYYGKRLLLPDSVTEFDKKLVSRIQIRVNPLPKFDSTVWVTVR
                 101                                             150
AF316362   (101) KVPASSDLSVAAISAMFADGASPVLVYQYAASGVQANNKLLYDLSAMRAD
AJ829771   (101) KVPASSDLSVAAISAMFADGASPVLVYQYAASGVQANNKLLYDLSAMRAD
   CNK21   (101) KVPASSDLSVAAISAMFADGASPVLVYQYAASGVQANNKLLYDLSAMRAD
HM065509   (101) KVPASSDLSVAAISAMFADGASPVLVYQYAASGVQANNKLLYDLSAMRAD
LC066458   (101) KVPASSDLSVAAISAMFADGASPVLVYQYAASGVQANNKLLYDLSAMRAD
LC066422   (101) KVPASSDLSVAAISAMFADGASPVLVYQYAASGVQANNKLLYDLSAMRAD
AJ829779   (101) KVPASSDLSVAAISAMFADGASPVLVYQYAASGVQANNKLLYDLSAMRAD
EF153734   (101) KVPASSDLSVAAISAMFADGASPVLVYQYAASGVQANNKLLYDLSAMRAD
FN552543   (101) KVPASSDLSVAAISAMFADGASPVLVYQYAASGVQANNKLLYDLSAMRAD
LC003524   (101) KVPASSDLSVAAISAMFADGASPVLVYQYAASGVQANNKLLYDLSAMRAD
JX993914   (101) KVPASSDLSVAAISAMFADGASPVLVYQYAASGVQANNKLLYDLSAMRAD
HQ829827   (101) KVPASSDLSVAAISAMFADGASPVLVYQYAASGVQANNKLLYDLSAMRAD
JX101617   (101) KVPASSDLSVTAISAMFADGASPVLVYQYAASGVQANNKLLYDLSAMRAD
KM527391   (101) KVPASSDLSVAAISAMFADGASPVLVYQYAASGVQANNKLLYDLSAMRAD
Consensus  (101) KVPASSDLSVAAISAMFADGASPVLVYQYAASGVQANNKLLYDLSAMRAD
                 151                     178
AF316362   (151) IGDMRKYAVLVYSKDDALETDELVLHVD
AJ829771   (151) IGDMRKYAVLVYSKDDALETDELVLHVD
   CNK21   (151) IGDMRKYAVLVYSKDDALETDELVLHVD
HM065509   (151) IGDMRKYAVLVYSKDDALETDELVLHVD
LC066458   (151) IGDMRKYAVLVYSKDDALETDELVLHVD
LC066422   (151) IGDMRKYAVLVYSKDDALETDELVLHVD
AJ829779   (151) IGDMRKYAVLVYSKDDALETDELVLHVD
EF153734   (151) IGDMRKYAVLVYSKDDALETDELVLHVD
FN552543   (151) IGDMRKYAVLVYSKDDALETDELVLHVD
LC003524   (151) IGDMRKYAVLVYSKDDALETDELVLHVD
JX993914   (151) IGDMRKYAVLVYSKDDALETDELVLHVD
HQ829827   (151) IGDMRKYAVLVYSKDDALETDELVLHVD
JX101617   (151) IGDMRKYAVLVYSKDDALETDELVLHVD
KM527391   (151) IGDMRKYAVLVYSKDDALETDELVLHVD
Consensus  (151) IGDMRKYAVLVYSKDDALETDELVLHVD
```

CNK21 izolatının CP genlerinin aa dizilerinin, dünyanın farklı alanlarından elde edilen ve gen bankasında kaydı bulunan CMV izolatları ile karşılaştırılması sonucu

%91−99 benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Seçilen CMV izolatları ile CNK21 arasındaki benzerlik Çizelge 4.5'de gösterilmiştir.

Gen bankasından alınan verilere dayanılarak yapılan aminoasit düzeyindeki karşılaştırmalarda HM065509 erişim numaralı Sırbistan izolatı, AJ829771 erişim numaralı İspanya izolatı, LC066458 erişim numaralı Japonya izolatı, AF316362 erişim numaralı Güney Kore izolatı, HQ829827 erişim numaralı Çin izolatı ve KM527391 erişim numaralı Çin izolatı ile %99 benzerlik gösterdiği saptanırken, en az benzerliği ise nt düzeyinde yapılan karşılaştırmada olduğu gibi JX101617 erişim numaralı Kolombiya izolatı ile göstermiştir.

Çizelge 4.5 Çanakkale Hıyar mozaik virüsü (CMV) izolatı ile seçilen CMV izolatlarının amino asit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları

		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**
HM065509	1	*	100	100	99	98	98	98	98	99	98	98	97	98	91
AJ829771	2	100	*	100	99	98	98	98	98	99	98	98	97	98	91
LC066458	3	100	100	*	99	98	98	98	98	99	98	98	97	98	91
CNK21	4	99	99	99	*	98	99	99	99	98	98	98	98	98	91
LC066422	5	98	98	98	98	*	98	98	98	98	97	98	97	98	91
AF316362	6	98	98	98	99	98	*	99	99	98	98	98	98	98	91
HQ829827	7	98	98	98	99	98	99	*	100	99	99	99	99	99	92
KM527391	8	98	98	98	99	98	99	100	*	99	99	99	99	99	92
EF153734	9	99	99	99	98	98	98	99	99	*	99	99	98	99	92
AJ829779	10	98	98	98	98	97	98	99	99	99	*	98	98	98	91
JX993914	11	98	98	98	98	98	98	99	99	99	98	*	99	99	92
LC003524	12	97	97	97	98	97	98	99	99	98	98	99	*	99	91
FN552543	13	98	98	98	98	98	98	99	99	99	98	99	99	*	91
JX101617	14	91	91	91	91	91	91	92	92	92	91	91	91	91	*

Hindistan'da yürütülen bir çalışmada Sharma ve ark. (2005), zambak yetiştiriciliği yapılan bölgelerde, CMV enfeksiyonunun moleküler karakterizasyonu gerçekleştirmek amacıyla çalışmalar yapmışlardır. Gerçekleştirdikleri aminoasit dizilimi çalışmaları sonucunda, elde ettikleri CMV izolatı ile diğer seçilen CMV izolatları arasında %93-97 aralığında benzerlik olduğunu belirtmişlerdir. Gerçekleştirilen benzer bir çalışmada ise Dubey ve ark. (2010), Hindistan'da glayöl alanlarında yürüttükleri çalışmalarında CMV enfeksiyonunun moleküler karakterizasyonunu yapmayı amaçlamışlardır. Yapılan çalışmalar sonucu CMV-G olarak adlandırdıkları izolatın dünya CMV izolatları ile aminoasit dizilimlerine gore %70-98 benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

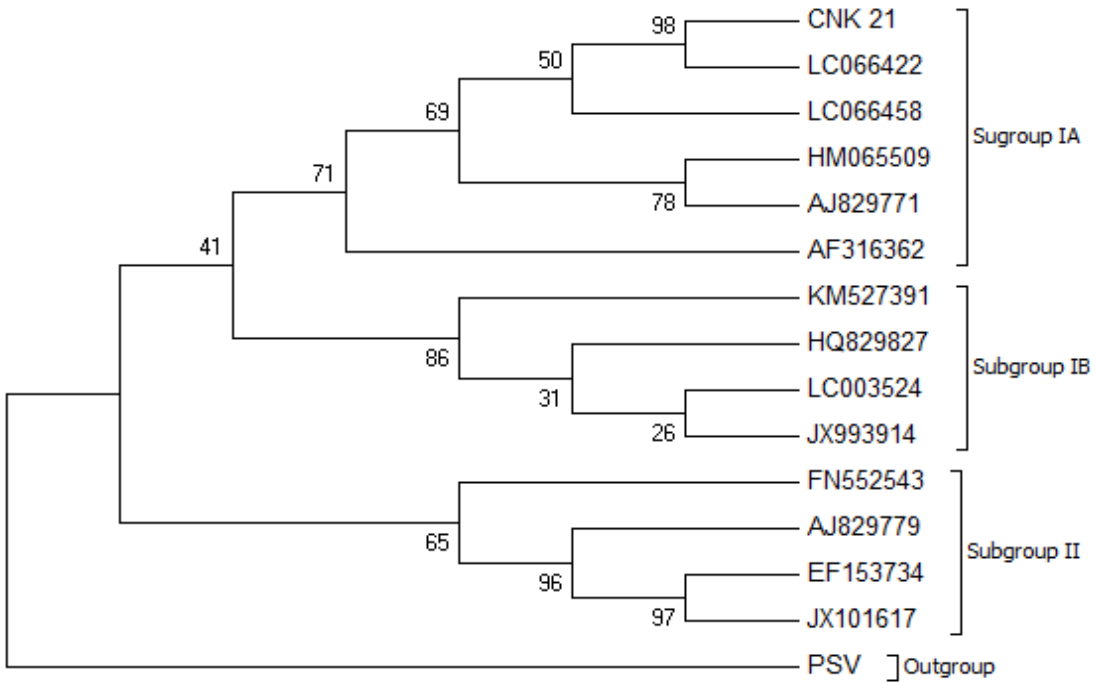
4.4. Filogenetik Analizler

Çanakkale ilinden elde edilen CNK21 izolatının CP genine ait aa ve nt dizileri kullanılarak filogenetik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında CNK21 izolatı ile dünyadaki diğer CMV izolatlarının benzerlik ilişkileri ortaya konulmuştur.

4.4.1. Nükleotid Dizilimlerine Göre Filogenetik Soy Ağaçlarının Oluşturulması

Çanakkale'den elde edilen CMV izolatlarına ait nt dizileri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı Şekil 4.6'da verilmiştir. Nükleotid dizilimler kullanılarak oluşturulan filogenetik analizler sonucu CNK21 izolatının dünyadaki diğer CMV izolatları ile genetik ilişkileri belirlenmiştir.

Şekil 4.6'da görüldüğü gibi CMV izolatları iki ana gruba ayrılmış olup ve birde dış grup bulunmaktadır. Ana gruplardan olan altgrup I'de kendi arasında altgrup IA ve altgrup IB olarak iki gruba ayrılmıştır. Altgrup I'da kendi içerisinde IA (LC066422 ve LC066458 erişim numaralı Japonya izolatları, HM065509 erişim numaralı Sırbistan izolatı, AJ829771 İspanya izolatı ve AF316362 erişim numaralı Güney Kore izolatı ve ülkemizden elde edilen CNK21 izolatı) ve IB (KM527391, JX993914 ve HQ829827 erişim numaralı Çin izolatları ve LC003524 erişim numaralı Güney Kore izolatı) olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. Altgrup II'nin ise FN552543 erişim numaralı Tayland izolatı, AJ829779 erişim numaralı İspanya izolatı, EF153734 erişim numaralı Hindistan izolatı ve JX10161 erişim numaralı Kolombiya izolatlarından oluştuğu belirlenmiştir. Dışgrup'ta bulunan PSV izolatı ise filogenetik ağacın doğruluğunu artırmak için kullanılmış ve beklenildiği gibi diğer gruplardan ayrılmıştır.



Şekil 4.6. Çanakkale Hıyar mozaik virüsü izolatının kılıf protein geninin nt dizilimleri baz alınarak TreeView programı ile görüntülenerek oluşturulan filogenetik soy ağacı

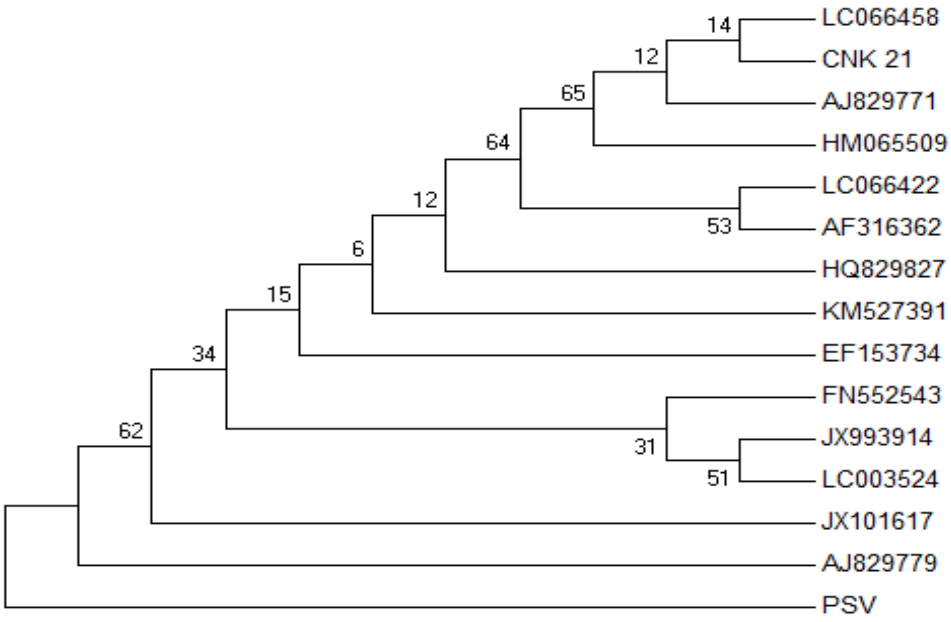
CNK21 izolatının ise filogenetik analizler sonucu altgrup IA'da yer aldığı belirlenmiştir. Roossinck (2002), yürüttüğü çalışmasında gerçekleştirdiği moleküler karakterizasyon sonucunda CMV izolatlarının IA, IB ve II olmak üzere 3 alt gruba ayrıldığını belirtmiştir. Benzer şekilde Karanfil ve Korkmaz (2017)'da börülce CMV izolatının moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirdikleri çalışmasında da CMV izolatlarının 3 farklı alt gruptan oluştuğunu bildirmişlerdir. Araştırmacıların elde ettiği sonuçlar, bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçları desteklemektedir.

Ayrıca filogenetik ağaçta oluşan altgruplara gore CNK21 izolatının kendi grubu I ile nt dizilimlerine göre %93-98 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. En çok benzerliği LC066422 erişim numaralı Japonya izolatı ile %98 gösterirken, kendi altgrubunda en az benzerliği JX993914 erişin numaralı Çin izolatı ile göstermektedir. CNK21 izolatının ait olduğu altgrup IA izolatları ile nt dizilimleri bazında %95-98 benzerlik göstermektedir. En yakın ilişkiyi LC066422 erişim numaralı Japonya izolatı ile %98 gösterirken, kendi altgrubunda en uzak ilişkiyi %95 ile AF316362 erişim numaralı Güney Kore izolatı ile göstermiştir. Mederos ve ark. (2018), Arjantin'de yürüttükleri çalışmada, muz bitkisinde tespit ettikleri CMV enfeksiyonunun moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucu izolatlarının altgrup IA'da yer aldığını ve IA altgrubu izolatları

ile nt düzeyinde %96,9–98,3 benzerlik gösterdiklerini bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada Krishnan ve ark. (2018), Hindistan'da yılan su kabağı ve şişe su kabağı bitkilerinde CMV'nin enfeksiyon gösterdiğini saptamışlardır. Gerçekleştirilen moleküler karakterizasyon sonucu izolatlarının altgrup IB'de bulunduğunu ve IB izolatları ile nükleotid düzeyinde %92'nin üzerinde benzerlik gösterdiklerini bildirmişlerdir. Bu sonuçlar aynı altgrupta bulunan izolatların birbirleri ile daha yüksek benzerlik göstermeleri beklenilen bir olgu olarak öne çıkmaktadır.

4.4.2. Amino Asit Dizilimlerine Göre Filogenetik Soy Ağaçlarının Oluşturulması

CNK21 izolatının CP genlerine ait aa dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik analizler sonucunda Şekil 4.7'de verilmiştir. CMV izolatlarının nt dizilimlerinin kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacına göre bazı farklılıklara sahip olduğu görülmektedir. Gerçekleştirilen filogenetik analizler sonucunda nt dizilimleri kullanılarak elde edilen filogenetik ağaçta altgrup oluşumu görülürken, aa dizilimleri sonucu elde edilen filogenetik ağaçta altgrup oluşumu görülmemiştir. Bunun nedeni nt dizilerinin aa'ya çevrildikten sonra benzerlik oranlarının artması ve kullanılan bölgenin kısalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Gerçekleştirilen bazı çalışmalar da incelendiğinde genel olarak CMV izolatlarının filogenetik ilişkilerinin belirlenmesinde nt dizilimlerinin kullanıldığı görülmektedir (Roossinck, 2002; Ohshima ve ark., 2016).



Şekil 4.7. Çanakkale Hıyar mozaik virüsü izolatının kılıf protein geninin aa dizilimleri baz alınarak TreeView programı ile görüntülenerek oluşturulan filogenetik soy ağacı

BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında Çanakkale ili ve ilçelerinde ıspanak yetiştiriciliği yapılan alanlardan elde edilen CMV izolatlarının serolojik ve moleküler yöntemlerle tanılanması gerçekleştirilmiştir. Ispanak bitkisi yetiştiriciliği yapılan tarla ve ev bahçelerinden virüs benzeri simptom gösteren ıspanaklardan 66 örnek alınmıştır. Örnekleme yapılılan alanlar tamamen tesadüfî olarak seçilmiştir. Toplanan örnekler ilk olarak DAS-ELISA yöntemi ile test edilmiştir. CMV ile pozitif olduğu belirlenen izolatların arasından rastgele bir tanesi seçilmiş ve RT-PCR analizi uygulanmıştır.

Toplanan örneklerde mozaik, nekrotik lezyonlar, şekil bozuklukları, damar açılmaları, şerit şeklinde sarı, açık-koyu yeşil çizgiler, yapraklarda çizgilenme, kloroz ve büyüme geriliği gibi farklı simptomlar gözlemlenmiştir.

Gerçekleştirilen DAS-ELISA testi sonuçlarına göre 2016-2017 yılları üretim sezonunda toplanan 66 örnekten 4'ü (%6) CMV ile enfekteli olarak bulunmuştur. Enfeksiyon oranının örneklerin toplandığı yerlere göre dağılımına bakılacak olursa, ilk sırada Lapseki (%25) bulunurken, Biga (%17) ikinci ve son olarak da Ayvacık (%6)'ın yer aldığı belirlenmiştir. Enfekteli olarak bulunan örneklerdeki en tipik simptom tipinin ise yapraklarda şekil bozuklukları ile yoğun kıvrılmalar olduğu tespit edilmiştir.

Çalışma kapsamında yapılan analizler sonucunda, CMV benzeri belirtiler gösteren örneklerin bazıları CMV ile enfekteli bulunmuş, bazı örneklerde tipik virüs simptomu görülmesine rağmen negatif olarak saptanmıştır. Bu sonuca göre örneklerin CMV dışında başka virüslerle enfekteli olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucu CNK21 izolatının, dünya CMV izolatları ile göstermiş olduğu filogenetik ilişkiler ve benzerlik oranları ortaya konulmuştur. Bu bağlamda, çoklu aminoasit ve nükleotid dizi analizleri sonucunda CNK21 kodlu Çanakkale CMV izolatı, dünya CMV izolatları ile nükleotid düzeyinde %87−98 oranında, aminoasit düzeyinde ise %91−99 arasında benzerlik göstermiştir. Nükleotid düzeyinde benzerliklere bakılacak olursa en fazla benzerliği %98 oranında LC066422 erişim numaralı Japonya izolatı göstermekle birlikte en az benzerliği ise aminoasit düzeyinde olduğu gibi %87 oranında JX101617 erişim numaralı Kolombiya izolatı ile olduğu ortaya konulmuştur. CNK21 Çanakkale CMV izolatı aminoasit dizilimleri göz önüne alındığında bir çok izolat ile %99 oranında benzerlik gösterirken, en az benzerliği JX101617 erişim numaralı Kolombiya izolatı ile gösterdiği belirlenmiştir.

Gerçekleştirilen filogenetik analizler sonucunda CNK21 izolatının altgrup IA'da yer aldığı görülmüştür. Oluşturulan bu filogenetik ağaçta CNK21 izolatı ile beraber altgrup IA'da yer alan izolatlar, AF316362 erişim numaralı Güney Kore izolatı, HM066509 erişim numaralı Sırbistan izolatı, AJ829771 erişim numaralı İspanya izolatı ve LC066458 erişim numaralı Japonya izolatı olduğu belirlenmiştir.

Bitki virüs hastalıkları diğer etmenlere göre ciddi ürün ve kalite kayıplarına neden olmaktadır. Viral hastalıklarda hastalık görüldükten sonra mücadele yapmak mümkün değildir. Virüs hastalıkları ile doğrudan bir kimyasal mücadele yöntemi bulunmamaktadır, bu yüzden bitkiye virüs bulaştırılmamaya gayret gösterilmelidir. Bu bağlamda vektör böceklerle mücadele, dayanıklı çeşit geliştirme ve artık bitkilerin temizlenmesi vs. gibi koruyucu önlemler alınmalıdır. Bitki virüs hastalıklarının kontrolünde erken tanı ve teşhis yapmak çok önemlidir. Çünkü virüs hastalıkları ile mücadele edilmesi için öncelikle virüsün tanılanması gerekir.

Hıyar mozaik virüsü (CMV) ekonomik değeri olan, birçok meyve, sebze gibi insanların beslenmesi için gerekli olan bitkilerde hastalık yapabildiği gibi süs bitkilerinde ve yabancı otlar üzerinde enfeksiyona neden olabilmektedir. CMV geniş konukçu dizinine sahiptir, bu yüzden kültür bitkilerinin birçoğunda varlık gösterebilmektedir. Ayrıca yabancı otlar üzerinde canlı kalabilir ve yaşamını devam ettirebilir. Bu özelliği sayesinde kültür bitkilerini enfekte etmesi kolaylaşmaktadır. Virüsün yayılmasını önleyecek tüm tedbirlerin alınması gerekmektedir. Önlem alınmazsa ekonomik açıdan büyük kayıplara yol açabilir. Bununla beraber geleceğe yönelik dayanıklılık çalışmalarına katkıda bulunmak amacıyla bilimsel çalışmalara devam edilmesi gerekmektedir.

İleride yapılacak olan çalışmalara yardım sağlayacağı düşünülen bu çalışma ile Çanakkale ili ve ilçelerinde yetiştiriciliği yapılan ıspanak bitkisinde Hıyar mozaik virüsü'nün varlığı serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Hıyar mozaik virüsünün en yoğun; yaprak bitleri, mekanik olarak ve tohum ile taşındığı yapılan birçok çalışmada rapor edilmiştir. Bu yüzden ekonomik olarak yetiştiriciliği yapılan ve insanlar için önemi olan kültür bitkilerine çok kolay bir şekilde taşınabilir. Bu yüzden viral hastalık etmenlerinin tanılanması ve mücadelesi büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

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

Anonim 2018a. https://viralzone.expasy.org/135?outline=all_by_species, Erişim tarihi: 10.01.2019.

Anonim 2018b. http://www.virology.wisc.edu/virusworld/viruslist.php?virus=cuc, Erişim tarihi: 10.01.2019.

Anonim 2018c. http://www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=1&figno=02, Erişim tarihi: 10.01.2019.

Arafati N., Farzadfar S., Pourrahim R., 2013. Characterization of Coat Protein Gene of *Cucumber Mosaic Virus* Isolates in Iran. Iranian Journal of Biotechnology, 11 (2): 109-114.

Ayo-John E., D'Arros H., Ekpo E., Shoyinka S., 2008. A Survey in Southern Nigeria Reveals the Presence of *Cucumber mosaic virüs* Subgroup I in Musa crops. Fruits, 63 (3): 135-143.

Beler Ö., Açıkgöz S., 2005. Ege ve Marmara Bölgelerindeki Zeytin Fidanlıkları ve Ağaçlarında Görülen Bazı Virüs Hastalıklarının ELISA Testi ile Saptanması. Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2 (1): 79–84.

Clark M.F., Adams A.N., 1977. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. Journal of General Virology, 34: 475-483.

Correll J.C., Morelock T.E., Black M.C., Koike S.T., Brandenberger L.P., Dainello F.J., 1994. Economically İmportant Disease of Spinach. The American Phytopathological Society, 78 (7): 653-659.

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, Türkiye.

Çat A.,Yardımcı N., Çulal-Kılıç H., 2016. Antalya İli ve İlçelerindeki Örtüaltı Hıyar (*Cucumis sativus* L.) ve Kabak (*Cucurbita pepo* L.) Üretim Alanlarında Viral Etmenlerin Saptanması. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 20 (1): 129-132.

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

Desbiez C., Verdin E., Moury B., Lecoq H., Millot P., Wipf-Scheibel C., Mirzayeva S., Sultanova N., Balakishiyeva G., Ammadov A., Kheyr-Pour A., Huseynova I., 2018. Prevalence and Molecular Diversity of the Main Viruses İnfecting Cucurbit and Solanaceous Crops in Azerbaijan. European Journal of Plant Pathology, 10.1007/s10658-018-1562-0.

Dinant S., Lot H., 1992. *Lettuce Mosaic Virus*, Plant Pathology, 41 (5): 528-542.

Dubey K.V., Aminuddin-Singh V.P., 2010. Molecular Characterization of *Cucumber mosaic virus* İnfecting Gladiolus, Revealing its Phylogeny Distinct from the Indian İsolate and Alike the Fny Strain of CMV. Virus Genes, 41 (1): 126–134.

Erbay E., 2010. Gediz Havzası Ispanak Üretim Alanlarında Görülen Virüs Hastalıklarının Belirlenmesi Üzerinde Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, Türkiye.

Erilmez S., Erkan S., 2014. Aydın, Balıkesir ve İzmir İllerinde Zeytin Ağaçlarındaki Viral Hastalık Etmenlerinin Tanılanması ve Bulunma Durumlarının Belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni, 54 (1): 45-67.

Erkan S., Gümüş M., Paylan İ., Duman İ., Ergün M., 2013. İzmir İli ve Çevresindeki Bazı Kışlık Sebzelerde Görülen Viral Etmenlerin Saptanması. Ege Universitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 50 (3): 311-322.

FAO 2013. Agriculture Statistics (http://www.fao.org/faostat/en/#home).

Fotopoulos V., Dovas C., Katis N., 2011. Incidence of Viruses Infecting Spinach in Greece, Highlighting the Importance of Weeds as Reservoir Hosts. Journal of Plant Pathology, 93 (2): 389-395.

Francki R.T.B., Habili N., 1972. Stabilization of Capsid Structure and Enhancement of Imminogenicity of *Cucumber mosaic virus* (Q Strain) by Formaldehyde. Virology, 48 (2): 309-315.

Fulton J.P., 1950. Studies on Strains of *Cucumber mosaic virus* I from Spinach. Phytopathology, 40:729-36.

Geyik S., 2017. Marmara Bölgesindeki Domates Üretim Alanlarında Virüs Hastalıklarının Saptanması Üzerine Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi. Namık Kemal Üniversitesi, Türkiye.

Gökdağ Ş., 2014. Çanakkale İli Ispanak Üretim Alanlarında Görülen Viral Hastalıklar. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Türkiye.

Gökdağ Ş., Karanfil A., Korkmaz S., 2016. Çanakkale İli Ispanak Alanlarındaki Şalgam Mozaik Virüsü ve Hıyar Mozaik Virüsü Varlığının Belirlenmesi. Bahçe Özel Sayı: VII. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Bildirileri, 2: 166-170.

Gümüş M., Erbay E., Erkan S., Paylan İ., 2014. Occurrence of Viruses İnfecting Spinach in Western Anatolia of Turkey: The First Field Survey Report. Journal of Food, Agriculture & Environment 12 (1): 272-275.

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

Güngör M., Uzunbacak H., Kutluk Yılmaz N.D., Şevik M.A., 2017. Samsun İli Ispanak Üretim Alanlarında Enfeksiyon Oluşturan Virüslerin Belirlenmesi. Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi, 32 (2): 164-168.

Hord M.J., Garcia A., Villalobos H., Rivera C., Macaya G., Roossinck M.J., 2001. Field Survey of *cucumber mosaic virüs* Subgroups I and II in Crop Plants Costa Rica. Plant Disease, 85 (9): 952-954.

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

Kaper J.M., Waterworth H.M., 1981. Cucumoviruses. Hand Book of Plant Virus Infections, 257-263.

Karakurt M.Y., 2015. İstanbul İlinde Karpuz Ekim Alanlarında *Cucumber mosaic virus* (CMV) ve *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) 'nin Yaygınlıklarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Namık Kemal Üniversitesi, Türkiye.

Karamanlı A., 2007. Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti (KKTC)'nde Kabakgil Yetiştirilen Alanlarda Hıyar Mozaik Virüsü (*Cucumber mosaic virus*, CMV) ve Kabak Sarı Mozaik Virüsü (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV)'nün Sörveyi. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Türkiye.

Karanfil A., Soylu B., Korkmaz S., 2016. Çanakkale İli ve İlçelerindeki Soğanlı Süs Bitkilerinde Hıyar Mozaik Virüsü Enfeksiyonunun Serolojik ve Moleküler Yöntemler ile Araştırılması. Trakya University Journal of Natural Sciences, 17 (2): 105-110.

Karanfil A., Korkmaz S., 2017. Çanakkale İli Börülce Üretim Alanlarında Hıyar Mozaik Virüsü (*Cucumber mosaic virus*; CMV)'nün Tespiti ve Kılıf Protein Genine göre Moleküler Karakterizasyonu. Bitki Koruma Bülteni, 57 (3) : 293-304.

Kaya A., Erkan S., 2011. İzmir, Aydın, Manisa ve Balıkesir İllerinde Üretilen Kabakgillerdeki Viral Etmenlerin Tanılanması ve Yaygınlıklarının Belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni, 51 (4): 387-405.

Koç G., Fidan H., 2017. Türkiye'de *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) için Herdem Yeşil Bir Konukçu: *Polygala myrtifolia*. Derim, 34 (1): 29-36.

Korkmaz F., Topkaya Ş., Yanar Y., 2018. Tokat İli Kabakgil Üretim Alanlarında Enfeksiyon Oluşturan Virüslerin Belirlenmesi. Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi (GBAD), 7 (2): 46-56.

Krishnan N., Rajendran P., Ramarasu A., Gnana C.B., Prashant S., Basavaraj B., Subbarayalu M., Gandhi K., 2018. Characterization of *Cucumber mosaic virüs* İnfecting Snake Gourd and Bottle Gourd in İndia. Physiological and Molecular Plant Pathology, 103: 102-106.

Kumar S., Stecher G., Tamura K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution, 33 (7): 1870-1874.

Mazenov A., Ulubaş S.Ç., 2018. First Report of *cucumber mosaic virus* on Solanaceae and Cucurbitaceae Crops in the Chui Region of Kyrgyzstan. Journal of Plant Pathology, 10.1007/s42161-018-0190-z.

Mederos D., Jaramillo Z.M., Filipovich J.V., Nome C.F., Torres C., Portal O., Giolitti F., 2018. *Cucumber mosaic virüs* İnfecting 'Cavendish' Banana in Argentina. Australasian Plant Disease Notes, 13.10.1007/s13314-018-0322-5.

Nogay A., 1986. Trakya'da Önemli Domates Ekim Alanlarında Görülen Domates Sürgün Yanıklığı Üzerinde Ön Çalışmalar. Bitki Koruma Bülteni, 26: 1-2.

Ohshima K., Matsumoto K., Yasaka R., Nishiyama M., Soejima K., Korkmaz S., Ho S.Y.W., Gibbs A.J.,Takeshita M., 2016. Temporal Analysis of Reassortment and Molecular Evolution of *Cucumber mosaic virus*: Extra Clues from its Segmented Genome. Virology, 487: 188–197.

Oreshkoviky B.K., Rusevski R., Kuzmanovska B., Jankulovska M., Popovski Z., Bandzo K., 2018. Occurrence of Plant Viruses on Pepper Cultivated in Open Fields in R. Macedonia and Partial Characterization of *cucumber mosaic virüs* Isolates. Journal of Plant Pathology, 100.10.1007/s42161018-0110-2.

Opiyo S.A., Ateka E.M, Owuor1 P.O., Manguro L.O.A., Karur H.W., 2010. Survey of Sweet Potato Vıruses In Western Kenya and Detectıon Of *Cucumber mosaic virus*. Journal of Plant Pathology, 92 (3): 797-801.

Palukaitis P., Garcia-Arenal F., 2003. *Cucumber mosaic virus*. AAB. Descriptions of Plant Viruses, No. 400.

Parella G., Gognalons P., Gebre-Selassi K., Volvas C., Marchoux G., 2003. An Update of the Host Range of *Tomato spotted wilt virus*. Journal of Plan Pathology, 85 (4): 227-264.

Price W.C., 1934. Isolation and Study of Some Yellow Strains of *cucumber mosaic virus*. Phytopathology, 24: 743-761.

Radouane N., Ermadi S., Abdessalem T., Benjelloun M., Lahlali R., 2018. Survey and Prevalence of Viruses İnfecting Cucurbit Crops in Morocco. Proceedings of the Fourth International American Moroccan Agricultural Sciences Conference, 485.

Roossinck M.J., 2002. Evolutionary History of *Cucumber mosaic virus* Deduced by Phylogenetic Analyses. Journal of Virology, 76 (7): 3382–3387.

Sarı S., 2015. Samsun İlinde Yetiştirilen Yazlık Sebzelerde Enfeksiyon Oluşturan *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) İzolatlarının Karakterizasyonu ve Konukçu-Simptom-Satellit RNA İlişkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Türkiye.

Sertkaya G., 2015. Hatay İli Marul ve Ispanak Alanlarında Bazı Virüslerin Araştırılması. Journal of Agricultural Faculty of Mustafa Kemal University Research Article, 20 (1): 7-12.

Sertkaya G., Yılmaz, M., 2017. Hatay İli Örtü altı Organik Domates Yetiştiriciliğinde Bazı Begomovirüslerin Enfeksiyon Oranları ile Doğal Taşınması ve Diğer Konukçularının Araştırılması. Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 22 (1): 1-15.

Sharma A., Mahinghara B. K., Singh A. K., Kulshrestha S., Raikhy G., Singh L., Verma N., Hallan V., Ram R., Zaidi A. A., 2005. Identification, Detection and Frequency of Lily Viruses in Northern India. Scientia Horticulturae, 106 (2): 213–227.

Soylu B., 2014. Çanakkale İli Ev Bahçelerinde Yetiştirilen Soğanlı Süs Bitkilerinde Hıyar Mozaik Virüsü'nün Serolojik Ve Moleküler Teşhisi. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Türkiye.

Şevik M.A., Balkaya A., 2015. Samsun, Sinop ve Bolu İllerindeki Bal Kabağı (*Cucurbita Moschata* Duch) Popülasyonlarına Ait Tohum Örneklerinde Virüslerin Tanılanması ve Bulunma Durumlarının Belirlenmesi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 32 (3): 70-77.

Tamada T., Baba T., 1973. *Beet necrotic yellow vein virus* from "*Rhizomania*" Affected Sugar Beet in Japan. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 39: 325-352.

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

TÜİK 2016. Bitkisel Üretim İstatistikleri Veri Tabanı, www.tüik.com.tr. Erişim Tarihi: 10.03.2017.

Uehara-Ichiki T., Ohashi M., Hanada K., 2018. Yellowing of *Panax ginseng* Meyer İnduced by *cucumber mosaic virus* İnfection. Journal of General Plant Pathology, 10.1007/s10327-018-0829-9.

Uzunoğulları N., Gümüş M., 2015. Marmara Bölgesi'nde Bazı Kültür Bitkilerinde Doğal Enfeksiyona Neden Olan Hıyar Mozaik Virüsü (*Cucumber mosaic vırus*, CMV)'nün Tespiti. Trakya University Journal of Natural Sciences, 16 (1): 9-15.

Vural H., Eşiyok D., Duman İ., 2000. Kültür Sebzeleri (Sebze yetiştirme) kitabı. 440s.

Whitney A.D., Duffus J.E. 1986. Compendium of Beet Diseases and İnsects. American Phytopathoiogical Society, St. Paul, MN. 76p.

Wilson A.D., 1983. Studies of Two *cucumber mosaic virüs* İsolates from Spinach in the Winter Garden Area of Texas. Master Thesis. Texas A&M University, United States of America.

Yang Y., Correll J.C., Morelock T.E., Anderson E.J., 1993. Characterization of a Seed-Transmitted of *cucumber mosaic virus* (CMV) İsolate from Spinach (*Spinacia Olerecea*). Phytopathology, 83: 1403.

Yeşil S., 2013. Konya, Karaman ve Aksaray İlleri Kabakgil Ekim Alanlarında Görülen Virüs Hastalıklarının Serolojik ve Moleküler Yöntemlerle Tespiti ve Enfeksiyon Kaynaklarının Belirlenmesi. Doktora Tezi. Selçuk Üniversitesi, Türkiye.

Yılmaz E., 2014. Edirne İli Sebze Üretim Alanlarındaki Virüs Hastalıklarının Saptanması Üzerine Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi. Namık Kemal Üniversitesi, Türkiye.

Yu C.M., Geng G.W., Cao X.R., Yang C., Qi Z., Liu S.S., Zhu C.X., Yuan X.F., 2018. First İdentification of *cucumber mosaic virus* İnfecting Six Fruit Crops in China. Journal of Plant Pathology, 10.1007/s42161-018-0185-9.

Zelyüt F.R., 2016. Ankara İli Marul Ekim Alanlarında Görülen Virüs Hastalıklarının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Türkiye.

EKLERİ

EK 1. DAS-ELISA Analizlerinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

Bioreba Kitinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

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

NaCl 8 g

KH2 PO4 0,2 g

Na2 HPO4 1,15 g

KCl 0,2 g

Tween 20 0,5 g

2.Coating buffer pH 9.6, 1000 ml saf su içerisinde

Na2CO3 1,59 g

NaHCO3 2,93 g

NaN3 0,2 g

3.Conjugate buffer pH 7.4, 1000 ml saf su içerisinde

TRIS 2,4 g

NaCl 8 g

PVP K25 (MW 24000) 2 g

Tween 20 0,5 g

BSA (bovine serum albumin) 2.00 g

MgCl2 · 6 H2 O 0,2 g

KCl 0,2 g

4.Substrate buffer pH 9.8, 1000 ml saf su içerisinde

Diethanolamine 97 ml

NaN3 0,2 g

5.Extraction buffer General pH 7.4, 1000 ml saf su içerisinde

TRIS 2,4 g

NaCl 8 g

PVP K25 (MW 24000) 2 g

Tween 20 0,5 g

KCl 0,2 g

NaN3 0,2 g

EK 2. RT-PCR Analizleri Kapsamında Kullanılan Tampon Çözeltiler

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

10mM Tris, 0,5 mM EDTA

Tris 1.211 g

Glical Asetik asit 57.1 g

EDTA 100 ml

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

EDTA 186,1 g

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

Tris 121,1 g

4. Ethidium bromide, 1000 ml saf su içerisinde

Ethidium bromide 10 mg

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ali KURTOĞLU

Doğum Yeri : Alaşehir / MANİSA

Doğum Tarihi : 08.11.1993

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü
Yüksek Lisans Öğrenimi : ÇOMÜ Fen Bilimleri Ens. Bitki Koruma Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar

Kurtoğlu A, Korkmaz S, 2018. Çanakkale İli Ispanak Üretim Alanlarındaki Hıyar mozaik virüsü (Cucumber mosaic virus; CMV) Enfeksiyonunun Moleküler Karakterizasyonu. Turkish Journal of Phytopathology, 47 (2): 43-51.

b) Bildiriler - Uluslararası – Ulusal

Kurtoğlu A, Korkmaz S, 2017. Çanakkale İli Ve İlçeleri Ispanak Üretim Alanlarındaki Hıyar Mozaik Virüsü Enfeksiyonunun Moleküler Karakterizasyonu. Trakya Üniversiteler Birliği İkinci Lisansüstü Öğrenci Kongresi, 15-16 Mayıs, 65.

İLETİŞİM

E-posta Adresi : alikurtogluzm@gmail.com