



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**MARULU ENFEKTE EDEN LETTUCE MOSAIC VIRUS İZOLATININ TÜM
GENOM DİZİ ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYSUN HELVACI

Tez Danışmanı

Prof. Dr. SAVAŞ KORKMAZ

ÇANAKKALE – 2021



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**MARULU ENFEKTE EDEN LETTUCE MOSAIC VIRUS İZOLATININ TÜM
GENOM DİZİ ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYSUN HELVACI

Tez Danışmanı

Prof. Dr. SAVAŞ KORKMAZ

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Kurumu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FYL-2019-3062

ÇANAKKALE – 2021



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Aysun HELVACI tarafından Prof. Dr. Savaş KORKMAZ yönetiminde hazırlanan ve 23/06/2021 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Marulu Enfekte Eden Lettuce Mosaic Virus İzolatının Tüm Genom Dizi Analizi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Bitki Koruma Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Savaş KORKMAZ
(Danışman)

Prof. Dr. Figen MERT

Dr. Öğr. Üyesi Orhan BOZAN

.....

.....

.....

Tez No :

Tez Savunma Tarihi : 23/06/2021

.....

Prof. Dr. Pelin KANTEN
Enstitü Müdürü

.././20..

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

(İmza)

Aysun HELVACI

(Tarih) 23/06/2021

TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanmasında ve yürütülmesinde benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen, her aşamada her türlü bilgi, deneyim ve yardımları ile bana yol gösteren saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Savaş KORKMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans tezi jüri üyeleri saygı değer hocalarım Sayın Prof. Dr. Figen MERT ve Dr. Öğr. Üyesi Orhan BOZAN'a yönlendirici fikirleriyle katkıda bulundukları için teşekkür ederim.

Çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve tezin her aşamasında yardımlarını ve bilgilerini benimle paylaşan saygı değer Araş. Gör. Dr. Ali KARANFİL'e çok teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen arkadaşım Ziraat Mühendisi Gözde DEMİR'e ve hayatımın her evresinde yanımda olduğunu hissettirerek bana destek olan sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

Aysun HELVACI
Çanakkale, Haziran 2021

ÖZET

MARULU ENFEKTE EDEN LETTUCE MOSAIC VIRUS İZOLATININ TÜM GENOM DİZİ ANALİZİ

Aysun HELVACI

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

23/06/2021, 74

Ülkemizde ve dünyada kışlık sebze üretimi yoğun olarak yapılmaktadır. Bu kışlık sebzelerden bir tanesi de marul bitkisidir. Marul birim alandan yüksek getiri potansiyeli ve kış soğuklarına fazla duyarlı olmaması nedeniyle çiftçiler tarafından cazip bir bitki olarak görülmektedir. Marul tarımında ekonomik olarak kayba neden olan viral etmenlerin başında marul mozaik virüsü (lettuce mosaic virus; LMV) gelmektedir. LMV, ülkemizde bu güne kadar gerçekleştirilen çalışmalar sonucu farklı üretim bölgelerinde tespit edilmiştir. Fakat LMV enfeksiyonu ülkemizin hemen hemen her bölgesinden bildirilmesine rağmen, izolatların tüm genom sekans dizilerinin belirlenmesine yönelik herhangi bir çalışma gerçekleştirilmemiştir. Bu çalışmada LMV tüm genom dizilimlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında daha önceden Çanakkale, Balıkesir, Bursa illerinden toplanmış ve LMV ile enfekteli olduğu tespit edilmiş marul bitkilerinden elde edilen izolatlar kullanılmıştır. Seçilen 3 örneğe total nükleik asit izolasyonu yapılarak, izolatların Nİb+CP genlerinin kısmi dizilemesi yapılmıştır. Gerçekleştirilen bu analizleri takiben, dizilemesi yapılan izolatların nükleotit ve amino asit düzeyinde dünya izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik ve filogenetik ilişkilerine göre tüm genom dizi analizleri için bir izolat seçilmiştir. Son aşamada ise seçilen izolatın tüm genomunun belirlenmesi amacı ile gerekli analizler yapılarak, marulu enfekte eden LMV izolatının dünyadaki diğer LMV izolatları ile göstermiş olduğu sekans benzerlikleri ve farklılıklarının yanında filogenetik ilişkileri de ortaya çıkarılmıştır. Çalışmalar sonucunda tüm genom dizileri belirlenen izolatın, dünya LMV izolatları ile yapılan karşılaştırmasında izolatların amino asit düzeyinde %92-99, nükleotit düzeyinde ise %82-98 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Filogenetik analizler

sonucunda ise genel olarak Fransız ve Asya orijinli izolatlar ile yakın ilişkili olarak bulunmuştur. Gerçekleştirilen bu çalışma ile ülkemizde ilk kez bir LMV izolatının tüm genomu dayalı biyoinformatik analizleri belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Marul, RT-PCR, Filogenetik



ABSTRACT

FULL-LENGTH GENOME SEQUENCE OF TURKISH LETTUCE MOSAIC VIRUS ISOLATE INFECTING LETTUCE

Aysun HELVACI

Çanakkale Onsekiz Mart University

Institute of Graduate Education

Master of Science Thesis in Plant Protection

Advisor: Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

23/06/2021, 74

Winter vegetables are intensely cultivated in Turkey and worldwide. Lettuce, produced for its leaves, is an important winter plant. Lettuce mosaic virus (LMV) is one of the most common leading viral diseases, which can cause serious economic losses of 50% in lettuce crops. As a result of the studies carried out in Turkey to date, LMV infections have been detected in different regions. However, although LMV infection has been reported from almost every region in Turkey, no study has been performed to determine the full-length genome sequence of the isolates. This study aims to bridge this gap and determine the LMV full-length genome sequence. Isolates collected from the Canakkale, Balıkesir and Bursa provinces forming the South Marmara region found infected with LMV were used. The total nucleic acid isolation was performed from the three samples selected. Furthermore, NIb+CP sequences of the isolates were amplified and sequenced. Following this, one sample was selected for the full-length genome sequence analysis based on the sequence similarities and phylogenetic relationships with the world isolates at the nucleotide and amino acid levels. In the concluding stage, a full-length genome analysis was undertaken for the selected isolate and the sequence similarities and differences as well as the phylogenetic relationships were revealed with the world isolates. As a result of the full-length genome sequence studies, the Turkish LMV isolate showed similarities of 92% to 99% and 82% to 98% at amino acid and the nucleotide levels, respectively. Furthermore, it was found that this isolate is closely related to isolates of French and Asian origin. In this study, bioinformatic analyses based on the fulllength genome of an LMV isolate were performed for the first time in Turkey.

Keywords: RT-PCR, Lettuce, Phylogenetic



İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
JÜRİ ONAY SAYFASI.....	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xi
TABLOLAR DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

1

İKİNCİ BÖLÜM

KURAMSAL ÇERÇEVE/ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

5

2.1. Dünyada Yapılan Bazı Çalışmalar	5
2.2. Ülkemizde Yapılan Bazı Çalışmalar	11

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL YÖNTEM

15

3.1. Virüs İzolatları	15
3.2. Moleküler Karakterizasyon Çalışmaları	15
3.2.1. Nİb+CP Genine Göre Moleküler Karakterizasyon Çalışmaları	15
Total Nükleik Asit İzolasyonu	16
Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Çalışmaları	16
RT Aşaması	17
Denatürasyon Aşaması	17
Ters Transkriptaz Aşaması (RT)	17

PCR Aşaması (Amplifikasyon)	17
Agaroz Jel Elektroforezi	18
PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	18
3.2.2. Çoklu Dizi Karşılaştırmaları ve Filogenetik Analizler	18
Çoklu Dizi Karşılaştırmaları	19
Filogenetik Analizler	19
3.3. LMV Tüm Genom Dizi Analizi	21

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. RT-PCR Çalışmaları	23
4.1.1. Nİb+CP Analizleri	23
4.1.2. Tüm Genom Analizleri	24
4.2. Nİb+CP Genlerinin Dizi Analizleri.....	26
4.2.1. Nükleotit ve Amino Asit Düzeyinde Çoklu Dizi Analizleri	26
4.2.2. Nİb+CP Genlerinin Filogenetik Analizleri	28
4.3. LMV Tüm Genom Dizileme Analizleri	32
4.3.1. 6K1 Genine Göre Benzerlik Sonuçları	35
4.3.2. 6K2 Genine Göre Benzerlik Sonuçları	36
4.3.3. CI Genine Göre Benzerlik Sonuçları	38
4.3.4. CP Genine Göre Benzerlik Sonuçları	40
4.3.5. HC-Pro Genine Göre Benzerlik Sonuçları	43
4.3.6. Nİa Genine Göre Benzerlik Sonuçları	45
4.3.7. Nİa-VPg Genine Göre Benzerlik Sonuçları	47
4.3.8. Nİb Genine Göre Benzerlik Sonuçları	49
4.3.9. P1 Genine Göre Benzerlik Sonuçları	52
4.3.10. P3 Genine Göre Benzerlik Sonuçları	54
4.4. Filogenetik Analiz Sonuçları	55
4.4.1. 6K1 Geni Filogenetik Analiz Sonuçları	57
4.4.2. 6K2 Geni Filogenetik Analiz Sonuçları	58
4.4.3. CI Geni Filogenetik Analiz Sonuçları	59
4.4.4. CP Geni Filogenetik Analiz Sonuçları	60
4.4.5. HC-Pro Geni Filogenetik Analiz Sonuçları	62

4.4.6.	N1a Geni Filogenetik Analiz Sonuçları	63
4.4.7.	N1a-VPg Geni Filogenetik Analiz Sonuçları	64
4.4.8.	N1b Geni Filogenetik Analiz Sonuçları	65
4.4.9.	P1 Geni Filogenetik Analiz Sonuçları	66
4.4.10.	P3 Geni Filogenetik Analiz Sonuçları	67

BEŞİNCİ BÖLÜM	68
SONUÇ ve ÖNERİLER	

KAYNAKÇA	71
EKLER	I
ÖZGEÇMİŞ	II

SİMGELER VE KISALTMALAR

aa	Amino asit
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AMV	Alfalfa mosaic virus
ArMV	Arabis mosaic virus
bç	Baz çifti
CatMV	Catharanthus mosaic virus
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik asit
Cr	Catharanthus roseus
CH	Changhua
CMV	Cucumber mosaic virus
CP	Coat Protein
CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide
CYMV	Catharanthus yellow mosaic virus
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotittrifostat
dk	dakika
ELISA	Enzim Linked Immunosorbent Assay
EtBr	Etidyum Bromür
FAO	Food and Agriculture Organization
g	Gram
GFP	Green fluorescent protein
Gr	Greece
GRSV	Groundnut ringspot virus
kDa	Kilo dalton
LBVV	Lettuce big-vein virus
LMV	Lettuce mosaic virus
MiLBVV	Mirafiori lettuce big-vein virus
ML	Miaoli
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
mM	Milimolar

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NJ	Neighbour joining
Nlb	Nuclear Inclusion b
Nlb+CP	Nuclear Inclusion b+Coat Protein
nm	Nanometre
nt	Nükleotit
PCR	Polimerase chain reaction
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
RNA	Ribon�kleik asit
RNase	Ribon�kleaz
RoW	Rest of the Word
rpm	Revolutions Per Minute
RT	Reverse Transcription
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
s	saat
sn	Saniye
+ssRNA	Tek sarmallı (+) duyarlılıkta RNA
sp.	T�r
Sp	Spain
Taq polimeraz	Termo stabil polimeraz enzimi
TCSV	Tomato chlorotic spot virus
Tris-HCl	Tris (hydroxymethyl) Aminomethane Hydrochloride
TSWV	Tomato spotted wilt virus
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
V	Volt
vd.	Ve diğ�rleri
Yar	Yemen
%	Yüzde oran
�C	Santigrad derece

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Marulun sistematigi	2
Tablo 2	Dünyada marul üretimi yapan ülkeler ve üretim miktarları (Ton)	2
Tablo 3	Türkiye'nin son yıllardaki marul üretim miktarı (Ton)	3
Tablo 4	Çoklu dizi ve filogenetik analizlerde kullanılan dünyadaki diğer izolatlar	20
Tablo 5	LMV tüm genom dizileme çalışmalarında kullanılan primer çiftleri	22

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Marul mozaik virüsü izolatlarına ait RT-PCR çalışmalarının agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmesi sonucunda oluşan band görüntüleri (M:100-5000 bp marker; 1, 2, 3, 4 marul mozaik virüsü ile enfekteli izolatlara ait numaralar)	23
Şekil 2	Tüm genom çalışmaları kapsamında yapılan RT-PCR çalışmalarının agaroz jel elektroforezinde elde edilen band görüntüsü.	25
Şekil 3	Tüm genom çalışmaları kapsamında yapılan RT-PCR çalışmalarının agaroz jel elektroforezinde elde edilen band görüntüsü.	25
Şekil 4	Marul mozaik virüsü izolatlarının kendi içlerinde ve dünyadaki marul mozaik virüsü izolatları ile Nİb+CP geninin nükleotit dizilimlerine göre benzerlik matrisi.	27
Şekil 5	Marul mozaik virüsü izolatlarının kendi içlerinde ve dünyadaki marul mozaik virüsü izolatları ile Nİb+CP geninin amino asit dizilimlerine göre benzerlik matrisi.	28
Şekil 6	Marul mozaik virüsü izolatlarının Nİb+CP genlerinin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı	29
Şekil 7	Marul mozaik virüsü izolatlarının Nİb+CP genlerinin amino asit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı	31
Şekil 8	Marul mozaik virüsü izolatlarının tüm genom dizilimlerine göre nükleotit seviyesinde dünya marul mozaik virüsü izolatları ile gösterdiği benzerlik matrisi	33
Şekil 9	Marul mozaik virüsü izolatlarının tüm genom dizilimlerine göre amino asit seviyesinde dünya marul mozaik virüsü izolatları ile gösterdiği benzerlik matrisi	34
Şekil 10	Marul mozaik virüsü izolatının 6K1 geninin nükleotit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi	35
Şekil 11	Marul mozaik virüsü izolatının 6K1 geninin amino asit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi	36

Şekil 12	Marul mozaik virüsü izolatının 6K2 geninin nükleotit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi	37
Şekil 13	Marul mozaik virüsü izolatının 6K2 geninin amino asit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi.	38
Şekil 14	Marul mozaik virüsü izolatının CI geninin nükleotit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi	39
Şekil 15	Marul mozaik virüsü izolatının CI geninin amino asit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi	40
Şekil 16	Marul mozaik virüsü izolatının CP geninin nükleotit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi	41
Şekil 17	Marul mozaik virüsü izolatının CP geninin amino asit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi	42
Şekil 18	Marul mozaik virüsü izolatının HC-Pro geninin nükleotit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi	44
Şekil 19	Marul mozaik virüsü izolatının HC-Pro geninin amino asit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi	45
Şekil 20	Marul mozaik virüsü izolatının NIa geninin nükleotit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi	46
Şekil 21	Marul mozaik virüsü izolatının NIa geninin amino asit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi	47
Şekil 22	Marul mozaik virüsü izolatının NIa-VPg geninin nükleotit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi	48
Şekil 23	Marul mozaik virüsü izolatının NIa-VPg geninin amino asit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi	49

Şekil 24	Marul mozaik virüsü izolatının N1b geninin nükleotit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi	50
Şekil 25	Marul mozaik virüsü izolatının N1b geninin amino asit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi	51
Şekil 26	Marul mozaik virüsü izolatının P1 geninin nükleotit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi	52
Şekil 27	Marul mozaik virüsü izolatının P1 geninin amino asit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi	53
Şekil 28	Marul mozaik virüsü izolatının P3 geninin nükleotit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi	54
Şekil 29	Marul mozaik virüsü izolatının P3 geninin amino asit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi	55
Şekil 30	Marul mozaik virüsü izolatlarının tüm genom nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı	56
Şekil 31	Marul mozaik virüsü izolatlarının 6K1 geninin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı	57
Şekil 32	Marul mozaik virüsü izolatlarının 6K2 geninin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı	58
Şekil 33	Marul mozaik virüsü izolatlarının CI geninin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı	59
Şekil 34	Marul mozaik virüsü izolatlarının CP geninin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı	60
Şekil 35	Marul mozaik virüsü izolatlarının HC-Pro geninin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı	62

Şekil 36	Marul mozaik virüsü izolatlarının NIa geninin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı	63
Şekil 37	Marul mozaik virüsü izolatlarının NIa-VPg geninin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı	64
Şekil 38	Marul mozaik virüsü izolatlarının NIb geninin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı	65
Şekil 39	Marul mozaik virüsü izolatlarının P1 geninin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı	66
Şekil 40	Marul mozaik virüsü izolatlarının P3 geninin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı	67

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Dünyanın hemen hemen bütün ülkelerinde yoğun olarak üretilen sebzeler insanoğlunun temel besin kaynaklarından birini oluşturmaktadır. Sebzelerin beslenmedeki öneminin anlaşılması ile birlikte dünyada sebzelere yönelik araştırmalar hızla artmış ve sebze üretiminde de artış gözlenmiştir.

Dünyada sebze üretimi en çok Asya kıtasında görülmektedir. 2018 yılı itibari ile sebze üretiminde Çin 543.1 milyon ton ile en fazla sebze üreten ülke konumunda olup sebze üretiminden %51 oranında pay aldığı görülmektedir. Diğer ülkeler ile sırası ile Hindistan 119.9 milyon ton, ABD 33.1 milyon ton sebze üretmektedirler. Türkiye ise dünya sıralamasında dördüncü sırada olup 31 milyon ton sebze üretimi yapmaktadır. Türkiye'nin dünya sebze üretiminde %2'lik payı bulunmaktadır (FAO, 2018).

Türkiye'nin sebze üretiminde önemli bir yere sahip olmasında ekolojik çeşitlilik, iklimin avantajı ve seracılık bölgesi olmasının etkisi büyüktür. Ülkemizde sebzeler örtü altı, tarla koşulları gibi hemen hemen her yerde yetiştirilebilmektedir. Ülkemizde yaklaşık üretilen 50'nin üzerinde sebze türü bulunmaktadır (Yaş Meyve Sebze Sektör Raporu, 2019: 3-12).

Marul sistematik olarak Plantae alemi içerisinde, Magnoliophyta şubesinde, Magnoliopsida sınıfında, Asterales takımında, Asteraceae familyasında, *Lactuca* cinsi içerisinde yer almaktadır. Asteraceae geniş bir familya olup içerisinde yaklaşık 23.000 ile 30.000 arasında bitki türü barındırmaktadır (Tablo 1) (Günay, 2005: 531).

Tablo 1

Marulun sistematigi

Alem	Plantae
Şube	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Takım	Asterales
Familya	Asteraceae
Cins	<i>Lactuca</i>
Tür	<i>Lactuca sativa</i>

Dünyada toplam 27.256.497 ton marul üretimi yapılmaktadır. Asya kıtası toplam marul üretiminin %69,3'ü ile ilk sırada yer almaktadır. Asya kıtasını %17,4 ile Amerika kıtası takip etmektedir. Ülkeler bazında marul üretimi verilerinde ise Çin yaklaşık olarak 15.541.717 tonluk üretimi ile ilk sıradadır. Çin'i sırası ile ABD, Hindistan, İspanya ve İtalya takip etmektedir. Türkiye ise dünya marul üretiminde 8. sırada bulunmaktadır (Tablo 2) (FAO, 2018).

Tablo 2

Dünyada marul üretimi yapan ülkeler ve üretim miktarları (Ton)

Ülkeler	Üretim (ton)
Çin	15.541.717
Amerika	3.677.323
Hindistan	1.222.571
İspanya	934.670
İtalya	768.055
Japonya	578.829
İran	525.483
Türkiye	487.543
Meksika	486.440

Marul Türkiye'de de önemli derecede yetiştiriciliği yapılan sebzelerden biridir. Türkiye'de kıvırcık, göbekli ve aysberg marul üretimi yapılmaktadır. 2019 yılı üretim verilerine göre kıvırcık marul üretimi 198.491 ton, göbekli marul 215.728 ton, aysberg marul

ise 85.547 ton üretilmiştir. 2020 yılı marul üretim miktarı ise 517.651 ton olarak tahmin edilmektedir (Tablo 3) (TÜİK, 2019).

Tablo 3

Türkiye'nin son yıllardaki marul üretim miktarı (Ton)

Yıllar	Kıvırcık Marul	Göbekli Marul	Aysberg Marul	Toplam
2017	185.070	223.449	81.904	490.423
2018	187.658	215.725	84.160	487.543
2019	198.491	215.728	85.547	499.766

Marul tarımında ekonomik olarak kayba neden olan sorunların başında bitki koruma problemleri gelmektedir. Bu problemlere hastalık, zararlı ve yabancı otlar sebep olmaktadır. Marul yetiştiriciliğinde özellikle fungal hastalıklar ve virüs hastalıkları ekonomik olarak kayba neden olmaktadır (Dinant ve Lot, 1992). Virüslerin sebep olduğu hastalıklar, dünyada ekonomik getirisi olan ürünlerde önemli kayıplara yol açarak ürünlerin kalitesini de olumsuz yönde etkilemektedir. Virüslerin oluşturduğu zararlar yıldan yıla değişiklik göstermektedir.

Marul üretimini çok sayıda virüs hastalığı etkilemektedir. Yaklaşık 15 hastalığa virüsler neden olmaktadır. Bunlardan bazıları; marul mozaik virüsü (LMV), hıyar mozaik virüsü (CMV), domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV), marul iri damar virüsü (LBVV)'dür (Dinant ve Lot, 1992). Marulun en yıkıcı hastalığı ise marul mozaik virüsü (lettuce mosaic virus; LMV) olarak kabul edilmektedir (Dinant ve Lot, 1992; Zerbini, vd., 1995).

LMV potyviridae familyasında olup potyvirus cinsine aittir. Bu virüs 750x13 nm uzunluğunda partiküllere sahip olan ve esnek iplikçiklerden oluşan bir virüstür. LMV 10.080 nükleotite sahip tek sarmal +ssRNA'dan oluşmaktadır (Dinant ve Lot, 1992).

LMV marul yetiştiriciliği yapılan yerlerde %50'ye varan büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. LMV ile enfekteli bitkilerde bazı belirtiler gözlemlenmektedir. Bu oluşan belirtiler oldukça değişken olup, enfekteli bitkilerde ilk olarak damarlarda renk açılmaları görülür ve ilerleyen zamanda bu açılmalar mozaik şekilli belirtilere dönüşür.

Yapraklar kıvrırcıklaşmaya başlar ve solar. Ayrıca bitkilerde bodurlaşma, baş bağlamama, yapraklarda nekrotik lekeler ve sararmalar görülen diğer semptomlardandır. Nekrozlar daha çok yaz aylarında görülmektedir. Marulun erken dönemde enfekte olması durumunda yaprakların tam gelişemediği ve normal bitkilere göre bodur kaldığı gözlemlenmiştir. Iceberg çeşitlerinde ise mozaik semptomlar daha dikkat çekici olup bodurlaşma ve yaprak bozulmaları görülmektedir (Pavan, vd., 2008).

LMV diğer potyviruslerde olduğu gibi yaprak bitleri ile taşınmaktadır. Özellikle *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Acyrtosiphon scariolae*, *Aphis gossypii* etkin olarak LMV'yi taşıyan vektörler olarak bilinmektedir. Yaprak bitleri ile virüs taşındığında yaklaşık bir hafta içinde bir tarla tamamen enfekte olabilmektedir. LMV, enfeksiyonlu genç bitkilerden elde edilen özsu ile bulaşmaktadır, ancak yaşlı yapraklardan elde edilen özsu ile bulaşma, genç yapraklara göre daha zor olduğu bilinmektedir. Ayrıca enfekteli tohumlar ve yabancı otlar da hastalık etmeninin bir diğer önemli inokulum kaynağı olup marul yetiştiriciliğinin yoğun yapıldığı alanlarda büyük sorunlara neden olmaktadır (Pavan, vd., 2008).

Geniş bir konukçu aralığına sahip olan LMV, 16 familya 60 cinse ait yaklaşık 121 türü enfekte edebilmektedir. Enfekte edilen bitki türlerinin çoğunluğunun Compositae familyasına ait olduğu bilinmektedir (Edwardson, 1974; Horvath, 1980). Marul LMV'nin ana konukçusu olup ıspanak, aspir, bezelye, nohut da diğer konukçular arasındadır. Ayrıca LMV *Chenopodium album*, *C.murale*, *Senecio vulgaris* gibi birçok yabancı otu doğal olarak enfekte edebilmektedir.

Bu çalışma kapsamında daha önceden Güney Marmara Bölgesi illerinden (Çanakkale, Balıkesir, Bursa) toplanmış olan LMV izolatlarından bir tanesi seçilmiştir. Seçilen izolatın genomu RT-PCR ile çoğaltılarak sekanslanmıştır. Elde edilen sekans verileri kullanılarak nükleotit ve amino asit düzeyinde dünya LMV izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik ve filogenetik ilişkileri tüm genom ve sahip olduğu gen bölgeleri düzeyinde ortaya konmuştur. Ayrıca filogenetik analizler sonucunda yapılan karşılaştırmalar ile ileriki aşamalarda yapılabilecek olan dayanıklılık çalışmalarına temel oluşturabilecek bilgiler elde edilmeye çalışılmıştır.

İKİNCİ BÖLÜM

KURAMSAL ÇERÇEVE/ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Marul mozaik virüsü'nün ilk tespiti Jagger tarafından 1921 yılında Amerika'nın Florida eyaletinden bildirilmiştir. Daha sonra Almanya'da 1928 yılında Brandenburg tarafından, aynı yıl içerisinde Bermuda'da Olgivie tarafından tespit edilmiştir. LMV 1954 yılında ise İngiltere'de Couch ve Gold tarafından elektron mikroskobu altında gözlemlenmiştir (Dinant ve Lot, 1992: 529). Newhall ise 1923 yılında ilk kez LMV'nin tohum ile bulaşabildiğini tespit etmiştir. 1950'lerin başlarında ise LMV Avrupa ve Kaliforniya'da marulun en temel hastalığı olarak kabul edilmiştir (Dinant ve Lot, 1992: 529). Marul mozaik virüsü ile ilgili dünyada ve ülkemizde birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda verilmiştir.

2.1. Dünyada Yapılan Bazı Çalışmalar

Dinant ve Lot (1992), yaptıkları çalışmada LMV'nin marul ve hindibanın önemli konukçusu olduğunu ve tohum ticareti nedeniyle dünyada oldukça yaygın olduğunu vurgulamışlardır. LMV ile enfekteli olan bitkilerin büyük çoğunluğunun yaprak bitlerinin vektörlüğü ve tohum ile taşındığını belirtmişlerdir. Yaptıkları testler sonucunda g ve mo genlerinin tohum ile taşınmadığını gözlemlemişlerdir. Bu özelliklerin tüm çeşitler üzerinde virüsün tohum üretimini gerekli kıldığını ve yeni direnç kaynakları üzerine araştırmaları teşvik edeceğini bildirmişlerdir.

Revers, vd., (1997a), LMV'nin marul bitkilerinde ciddi enfeksiyonlara neden olması, marul ve LMV arasındaki moleküler etkileşimin daha iyi anlaşılması amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Virülenslik ve saldırganlık şiddeti açısından farklı olduğu bilinen 10 LMV izolatının moleküler ve biyolojik karakterizasyonunu yaparak bu izolatların dayanıklılık genlerine etkisini belirlemeye çalışmışlardır. İmmunocapture-RT-PCR yöntemi ve sekans analizleri sonucunda LMV izolatlarını ayırarak 3 grup oluşturmuşlardır. Çalışmada bu grupların, izolatların patojenisitelerinden daha çok coğrafi kökenleri ile ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca sekans karşılaştırmaları sonucunda Kaliforniya izolatlarının Batı Avrupa izolatları ile ilişkili olduğunu vurgulamışlardır.

Fakhfakh, vd., (2001), yaptıkları çalışmada LMV'nin marul alanlarında oldukça yıkıcı olabildiğini ve çok düşük enfekteli olan tohumlardan dahi bulaşabileceğini belirtmişlerdir. Yetiştiriciler tarafından mo1¹ ve mo1² direnç genlerini kıran LMV izolatlarının çeşitli ülkelerden rapor edildiğini bildirmişlerdir. Bunun üzerine Tunus'taki LMV popülasyonlarındaki değişkenliği saptamak için marul alanlarından elde edilen 9 LMV izolatına biyolojik ve moleküler analiz yapmışlardır. Testler sonucunda 2 izolatın "Mantali" çeşidinde bulunan mo1¹ dayanıklılık genini kırabildiğini gözlemlemişlerdir. Moleküler düzeyde LMV genomunun bir bölgesini incelemek için çalışmalar yapmışlardır. RT-PCR ve filogenetik analizler sonucunda Tunus LMV izolatının diğer Batı Avrupa izolatları ile benzer olduğunu tespit etmişlerdir.

Krause-Sakate, vd., (2002), dünyanın farklı bölgelerinden elde ettikleri 73 LMV izolatı arasındaki genetik farklılığı araştırmışlardır. Çalışmada araştırmacılar virüsün Nİb-kılıf protein (CP) geni üzerindeki değişkenlik içeren 216 nükleotitik bölgesini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda bu izolatları üç gruba ayırmışlar ve bu grupları LMV-Yar, LMV-Greek, ve LMV-RoW olarak adlandırmışlardır. LMV-RoW olarak adlandırılan grubu da kendi arasında iki alt gruba ayırmışlar ve bu izolatları da LMV-common ve LMV-most olarak isimlendirmişlerdir. Bu alt grubu oluşturan izolatların analiz edilen izolatlar arasında çoğunluğu oluşturduğunu saptamışlardır. Bu iki alt grubun tohum kökenli izolatlar olduğunu ve bu avantajlı özellikleri nedeniyle de dünyada yaygın olduğunu bildirmişlerdir. İlaveten LMV-most alt grubu izolatlarının marullarda iki dayanıklılık geni mo1¹ ve mo1² yi kırdıklarını ve bu nedenle de çok daha tehlikeli izolatlar olduklarını belirtmişlerdir.

Tao, vd., (2002), Çin'in Zhejiang ili, Yuhang şehrinde LMV'nin marul bitkilerinde önemli kayıplar oluşturması nedeni ile bu şehirden bir LMV izolatını seçerek bu izolatın tüm genom dizi analizini çalışmışlardır. Virüsün tüm genomunun toplam 10.080 nükleotitten oluştuğunu ve genom organizasyonunun Potyviridae üyelerinin genomlarına benzerlik gösterdiğini saptamışlardır. Bu izolatın nükleotit ve amino asit düzeyinde dünyanın diğer ülkelerinden elde edilen ve gen bankasına yüklenen LMV izolatları ile nükleotit düzeyinde %96,7-98,8 ve amino asit düzeyinde %97,6-99,0 oranında bir benzerliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. Filogenetik analiz çalışmalarında LMV'nin ilk olarak Kaliforniya'da ortaya çıktıktan sonra oradan Batı Avrupa, sonra Yunanistan ve Yemen'e ulaştığını belirtmişlerdir.

Çin izolatının da yüksek olasılıkla Kaliforniya veya Batı Avrupa orijinli olduğunu belirtmişlerdir.

Nebreda, vd., (2004), yaptıkları bu çalışmada İspanya’da marul ve brokoli alanlarında LMV’nin vektörü olan yaprak bitlerinin türlerini ve popülasyonlarını ortaya koymak için bir çalışma yürütmüşlerdir. 2001 yılında yaprak bitlerinin uçuşlarını izlemek için büyüme mevsimi olan ilkbahar ve sonbaharda Moericke sarı su tavası ve yeşil kiremit tuzaklarını kurmuşlardır. Kurulan bu tuzakları haftalık olarak saymışlardır. Yaptıkları sayımlar sonucunda Moericke tuzakları yeşil kiremit tuzaklarına oranla daha fazla yaprak biti türü yakaladığını gözlemlemişlerdir. Ancak yeşil kiremit tuzağının virüsün yayılmasına neden olan yaprak biti türlerinin uçuş aktivitesini tahmin etmek için daha uygun olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmada ilkbahar döneminde yapılan yaprak biti yakalamalarında Madrid ve Murcia bölgelerinde en çok rastlanan türlerin *Hyperomyzus lactucae*, *Brachyudus helichryis* olduğunu, Navarro Bölgesi’nde ilkbahar döneminde brokolide en çok rastlanan türlerin *Aphis fabae*, *B. helichryis* ve *H. lactucae* olduğunu tespit etmişlerdir. Sonbaharda ekilen ürünlerde ise Madrid Bölgesi’nde marullarda bulunan ana türlerin *Hyadaphis coriandri* ve *Aphis spiraecola*, Murcia’da *A. spiraecola* ve *Myzus persicae* olduğunu Navarro’da ise brokoli alanlarında *Therioapsis trifolii*’ye rastlamışlardır. Ayrıca LMV’nin yayılmasını sağlayan yaprak biti türlerinin *M. persicae*, *Aphis gossypii* olduğunu *A. fabae* ve *H. lactucae*’nin LMV’yi taşımada daha az etkili olduğunu, *Rhopalosiphum padi* ve *Nasonovia ribisnigri*’nin LMV’yi taşımada etkili olmadığını bildirmişlerdir.

Mazier, vd., (2004), yaptıkları çalışmada LMV’ye dayanıklı marul bitkilerini *in vitro* ortamda yetiştirmişlerdir. Direnç durumlarına göre farklılık gösteren marul bitkilerinin çeşitli doğal LMV izolatlarının yanında yeşil floresan proteini (GFP) etiketli rekombinant virüs izolatları ile işaretlemişlerdir. Elde edilen bu izolatlar *in vitro* koşullarda yetiştirilen marul bitkilerine bulaştırarak süreci takip etmişlerdir. Yaptıkları gözlemler sonucunda yeşil floresan proteini ile işaretlenmiş virüs izolatlarının kullanılmasının daha avantajlı ve çevresel bakımdan daha sağlıklı olduğunu belirtmişlerdir.

Ormaz, vd., (2006), yaptıkları çalışmada LMV’nin marul ve hindiba yetiştirilen alanlarda büyük kayıplara neden olduğunu belirterek 2004-2005 yıllarında İran’ın İsfahan, Kum, Horasan, Kuzistan, Tahran eyaletlerindeki marul tarlalarından örnekler toplamışlardır.

Toplanan örnekleri ELISA ile testleyerek LMV ile enfekte olanları tespit etmişlerdir. LMV izolatlarında biyolojik saflaştırma yapmışlar ve sonrasında bu izolatu *Chenopodium quinoa* üzerinde çoğaltmışlar ve muhafaza etmişlerdir. Daha sonra bu izolatu *C. amaranticolor*, *C. album*, *Carthamus tinctorius*, *Pisum sativum*, *Spinacia olerace* gibi bir dizi test bitkilerine mekanik inokulasyon yöntemiyle inokule etmişlerdir. Tüm izolatların *C. amaranticolor* üzerinde klorotik lezyonlar ve *C. album*'da damar açılmaları ile birlikte klorotik lekeler oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca Tahran izolatının *Pisum sativum*'u herhangi bir semptom olmadan enfekte ettiğini ve bu izolatların hiçbirinin *Carthamus tinctorius*'u etkilemediğini gözlemlemişlerdir. Poliakrilamid jel elektroforezde bu izolatın CP geninin moleküler ağırlığını 30.33 kDa olarak tespit etmişlerdir. IC-RT-PCR çalışmalarında LMV izolatından beklenen büyüklükte 1300 bp uzunluğunda band elde etmişlerdir. Yaptıkları karşılaştırmalarda nükleotid dizilerinin %98 oranında benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Moreno, vd., (2007), bitki virüslerine karşı yeni kontrol stratejileri geliştirmek için bitki virüsü-vektör ilişkilerini analiz etmede moleküler tekniklerden yararlanılabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada iki aşamalı PCR (Immunocapture ve RT nested PCR) yardımıyla tek bir afid bireyinden LMV'nin teşhisi gerçekleştirilmiştir. Tek bir afitten RT nested PCR ile teşhis başarısı, virüs vektörü olan *Myzus persicae* ve virüs vektörü olmayan *Nasonovia ribisnigri* afitleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her ne kadar aynı beslenme süresi boyunca *N. ribisnigri*, *M. persicae*'den daha fazla virüsü bünyesine alsada da virüsü taşıma da başarılı olmamıştır. *M. persicae*'nin ise virüsü taşımada etkin bir rol oynadığı görülmüştür. Yapılan bu çalışma ile virüslere karşı kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde bu metodolojiden yararlanılabileceği görülmüştür.

Firmino, vd., (2008), yaptıkları çalışmada LMV'nin dünya çapında marulda önemli hastalık yapan etmen olduğunu ve LMV'ye karşı dayanıklı olan mo1¹ ve mo1² genleri olduğunu belirtmişlerdir. LMV-common ve LMV-most izolatlarını değerlendirmek için 2002-2005 yılları arasında Sao Paulo eyaletinde üç farklı marul üretim alanlarında çalışmalar yürütmüşlerdir. Marul üretim alanlarından topladıkları 1362 örneğe RT-PCR uygulamışlar ve LMV'nin varlığını teşhis etmişlerdir. Testler sonucunda 504 (%37,2) örneğin LMV ile enfekteli olduğunu bulmuşlardır. Enfekteli olan örneklerle LMV- most ve LMV- common'a spesifik primerler dizayn ederek ikinci bir RT- PCR yapmışlardır. Test sonucunda kullanılan örneklerin %77,3'ünde LMV-common enfeksiyonunu tespit etmişlerdir.

Naidu, vd., (2008), ABD'ye özgü bir cins olan ve estetik amaçlı yaygın olarak yetiştirilen *Coreopsis auriculata* bitkilerinde, 2006-2007 yıllarında Washington'daki fidanlıklarda klorotik lekeler gözlemlemişlerdir. Simptom gösteren bitkilerden alınan örnekleri tütün (*Nicotiana benthamiana*) bitkilerine inokule etmişler ve tütün bitkilerinde mozaik beneklenme gözlemlemişlerdir. Yaptıkları RT-PCR testleri sonucunda band boyutlarını 1000 bp olarak elde etmişler ve karşılaştırmalar sonucunda da bu virüsün LMV olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmanın ABD'de yaygın olarak yetiştirilen *Coreopsis auriculata*'da LMV'nin ortaya çıktığına dair ilk belge olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca LMV'nin geniş bir konukçu yelpazesi olduğunu ve yaprak bitleri ile bulaşabilmesi nedeniyle diğer süs bitkilerinde ve marul mahsullerinde risk oluşturabileceğini vurgulamışlardır.

Pavan, vd., (2008), yaptıkları bir çalışmada Brezilya'da marul alanlarındaki virüs hastalıklarını araştırmışlardır. Serolojik ve moleküler yöntemler kullanarak marul alanlarında LMV, tomato spotted wilt virus (TSWV), tomato chlorotic spot virus (TCSV), groundnut ringspot virus (GRSV) teşhis etmişlerdir. Ayrıca bu virüslerin vektör popülasyonlarının yüksek olduğu yaz aylarında, önemli kayıplara yol açtığını bildirmişlerdir. Marul alanlarında Mayıs ve Eylül aylarında marul iri damar virüsü'nü tespit edip bu virüsün *Oplidium brassicae* tarafından taşındığını belirtmişlerdir. Ancak bu virüslerin içerisinde en önemli olanının LMV olduğunu ve bu etmenin tohum ve yaprak bitleri tarafından taşındığını vurgulamışlardır.

Soleimani, vd., (2011), Tahran ilindeki marul tarlalarında mozaik, beneklenme, bodurluk, baş bağlamama gibi simptomlar gösteren 452 adet bitki toplamışlardır. Toplanan bitkileri DAS-ELISA ile LMV, cucumber mosaic virus (CMV), tomato spotted wilt virus (TSWV), arabis mosaic virus (ArMV) varlığına karşı testlemişlerdir. Testlerde marul bitkilerinde CMV, LMV, TSWV varlığını tespit etmişler ve ArMV ile enfekteli bitkiye rastlamamışlardır. LMV, CMV, TSWV'nin sırası ile enfeksiyon yüzdeleri %21, %16, %10 olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca örneklerin %16'sı LMV+CMV %8'i LMV+TSWV, %8'i CMV+TSWV ile enfekteli olduğunu %5'inde ise tüm bu virüslerin bulunduğunu tespit etmişlerdir. Örneklerin %49'unda LMV, %44'ünde CMV, %31'inde TSWV bulunduğunu bu nedenle LMV'nin Tahran'daki marul alanlarında büyük bir sorun olduğunu bildirmişlerdir.

Zanganeh, vd., (2014), yaptıkları çalışmada İran’da 7 adet farklı bölgeden elde edilen marul bitkilerinin 2 LMV izolatına (LMV-A, LMV-T) tepkisi, enfeksiyon oranı ve simptom şiddetini istatistiksel olarak değerlendirmişlerdir. LMV-A izolatının $mo1^2$ genini taşıyan “Salinas 88” dirençli çeşidini enfekte ederek mozaik simptomlara neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Salinas ve Varamin marul çeşitlerinin her iki LMV izolatına karşı duyarlı olduğunu, Varesh çeşidinin ise izolatlara toleranslı olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca LMV-A izolatının LMV-T izolatına göre marul bitkilerini daha hızlı ve daha yüksek oranda enfekte edip, çok şiddetli simptomlara sebep olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmanın LMV izolatlarının İran’da $mo1^2$ genini taşıyan LMV’ye dayanıklı marul çeşitlerini enfekte ettiğini gösteren ilk kanıt olduğunu vurgulamışlardır.

Elbeshehy, vd., (2017), Suudi Arabistan’da yaptıkları bir çalışmada Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus* L.) bitkilerinde tomato spotted wilt virus (TSWV), cucumber mosaic virus (CMV), lettuce mosaic virus (LMV), catharanthus mosaic virus (CatMV) ve catharanthus yellow mosaic virus (CYMV) gibi virüsler tarafından oluşturulan mozaik, damar bandlaşması, beneklenme, sararma, çiçek kırılması gibi simptomlar gözlemlemişlerdir. Sörvey çalışmaları kapsamında fidanlık, bahçeler ve peyzaj alanlarından belirtilen simptomları gösteren bitkilerden toplam 240 yaprak örneği toplamışlar ve DAS-ELISA, RT-PCR ve PCR yöntemiyle belirtilen virüsler için testlemişlerdir. Testlemeler sonucunda beş virüsün de toplanan örneklerde varlığını belirlemişlerdir. En yüksek enfeksiyon oranına %58 ile TSWV sahip olurken bunu sırasıyla %35 ile CYMV, %15 ile CatMV, %11 ile CMV ve %6 ile LMV’nin izlediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu beş virüsün Suudi Arabistan’da Cezayir menekşesinde ilk kayıt olduğunu rapor etmişlerdir.

Cheng, vd., (2019), Tayvan’da 2016-2017 yıllarında Miaoli (ML) ve Changhua (CH) şehirlerinde bezelye üretim bölgelerinde yapraklarda damar bandlaşması ve beneklenme simptomları gözlemlemişlerdir. Bu tip bitkilerde aynı zamanda boğum aralarında kısalma ve bezelye baklalarında bozulma belirtileri de görülmüştür. Simptom gösteren bezelye bitkilerine Tayvan’da genel olarak görülen üç virüs hastalığı (cucumber mosaic virus, peanut mottle virus, ve pea seed-borne mosaic virus) için ELISA testi uygulanmış ve sonuçlar negatif çıkmıştır. ML ve CH örnekleri *Chenopodium quinoa* bitkilerine mekanik olarak inokule edilmiş ve bu bitkilerde 8 gün sonra inokule edilen yapraklarda ve yeni oluşan yapraklarda klorotik lokal lezyonlar görülmüştür. Lezyon gösteren iki bitkiden simptomlu

kısımlar izole edilerek tekrar *Chenopodium quinoa* üzerine ve daha sonra *Nicotiana benthamiana* ve Farmer 162 bezelye bitkilerine inokule edilmiştir. İnokule edilen bezelye üzerindeki tüm simptomlar tarla koşullarında elde edilen simptomlara benzerlik göstermiştir. Daha sonra potyvirus ve tobamovirusler için grup spesifik dejene primerler dizayn edilmiş ve bezelye örnekleri RT-PCR ile test edilmiştir. Testlemeler sonucunda 1.4 kb uzunluğunda potyviruslerle ilişkili beklenen bandlar elde edilmiştir. İki RT-PCR amplikonu klonlanmış ve sekanslanmış ve kılıf protein genleri gen bankasında Fransa izolatu (KJ161185) ile %87,1 ve Hindistan izolatu (JQ794776) ile %97,5 oranında bir benzerlik göstermiştir. İki izolat kendi arasında ise nükleotit düzeyinde %97,1 ve amino asit düzeyinde ise %97,5 oranında benzerlik göstermiştir. Araştırmacılar elde ettikleri bu sonuçları bezelye bitkisinde LMV'yi Tayvan'da ilk kayıt olarak rapor etmişlerdir.

2.2. Ülkemizde Yapılan Bazı Çalışmalar

Özalp (1964), İzmir ilinde 1963 yılında çok sayıda bitkide virüs hastalığı simptomları görülmesi üzerine bu virüs hastalıklarının teşhisini yapmak amacıyla bazı sebzelerden aldığı örneklerle özsu inokulasyon yoluyla mekanik inokulasyon çalışmaları gerçekleştirmiştir. Yapılan çalışma sonucunda çok sayıda farklı virüsün yanında “Yedikule” marul çeşidinde Hanım düğmesi (*Gomphrena globosa*) test bitkisi üzerinde marul mozaik virüsü'nün varlığını tespit etmiştir. Aynı zamanda bu çalışma LMV'nin ülkemizde bulunduğu dair ilk kayıt olma özelliğini taşımaktadır.

Tekinel, vd., (1969), Mersin ilinde biber, patlıcan, fasulye ve marul bitkilerinde bulunan virüsleri belirlemek amacıyla, farklı test bitkilerine üç yapraklı dönemde virüs simptomları gösteren farklı kültür bitkilerinden aldığı örnekleri özsu inokulasyonu yoluyla inokule etmişlerdir. Çalışma sonucunda çok sayıda bitkide sebze virüslerinin varlığını belirlemişlerdir. Bu virüslerden “Yedikule” marulundan alınan ve yerli marul üzerine inokule edilen bitkilerde mozaik simptomları gözlemişler ve bu virüsü LMV olarak tanımlamışlardır.

Fidan ve Türkoğlu (1988), İzmir ilinde marul yetiştiriciliği yapılan alanlarda mozaik, damar bandlaşması, nekroz, şekil bozukluğu gibi belirtileri gösteren bitkilerden örnekler toplamışlar ve bu örnekleri test bitkilerine inokule etmişlerdir. Test bitkilerinde görülen

simptomlara göre marullarda 3 virüs hastalığının varlığını saptamışlardır. Çalışma sonucunda 1983 yılında bu virüslerden LMV'nin bulunma oranını ortalama %5,7 olarak belirlemişlerdir. 1984 yılında sadece Merkez ilçede yapılan sörvey sonucunda LMV'nin %9,2 oranında bulunduğunu, bir önceki yıl LMV'nin aynı alanda %11,5 oranında bulunduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar taşınma oranları arasındaki farklılığı iklim koşullarına bağlı olarak vektör popülasyonunun değişimine ve virüsün tohumla taşınma oranındaki farklılığa bağlamışlardır.

Özdemir ve Erilmez (2007), Denizli ilinde 2005-2006 yıllarında patlıcan, biber ve marul alanlarında simptom gösteren bitkilerden örnekler toplamışlardır. Topladıkları patlıcan ve biber örneklerini tomato spotted wilt virus (TSWV), cucumber mosaic virus (CMV), tobacco mosaic virus (TMV) ve alfalfa mosaic virus (AMV), marul örneklerini ise lettuce mosaic virus (LMV), TSWV, CMV ve AMV için DAS-ELISA testi ile testlemişlerdir. Testlemeler sonucunda biber örneklerinin %81,13'ü TSWV, %1,89'u CMV, patlıcan örneklerinin %69,23'ü TSWV, marul örneklerinin ise %31,48'i TSWV, %5,56'sı LMV ve %1,85'i ise AMV ile enfekteli olarak bulmuşlardır. Pozitif sonuç veren bazı örnekler mekanik inokulasyon yoluyla duyarlı test bitkilerine inokule edilmiş ve inokulasyon sonucunda bu bitkilerde virüslere özgü simptomların geliştiğini gözlemlemişlerdir.

Alan ve Kamberoğlu (2012), Doğu Akdeniz Bölgesi'nde 2007-2010 yılları arasında marul bitkisinde görülen virüs hastalıklarının belirlenmesi amacıyla bir çalışma yürütmüştür. Sörveylerde simptomatolojik olarak virüs ve virüs benzeri enfekteli olduğundan şüphelenilen 808 marul bitkisinden örnekler alınmış ve ELISA yöntemi ile LMV için testlemiştir. Testlemeler sonucunda marulda 82 örnek LMV ile enfekteli bulunmuştur. Araştırmacı yapmış olduğu RT-PCR çalışmalarında da LMV için istenilen büyüklükte 800 bp'e karşılık gelen bandlar elde etmiştir. İzolatlardan bir tanesinin sekans analizi yaptırılarak, LMV izolatının NCBI'da dizisi bulunan Amerika izolatı ile %99 oranında benzerlik gösterdiğini belirtmiştir.

Erkan, vd., (2013), İzmir ili ve 8 ilçesinde 2010-2011 yılları arasında yetiştirilen bazı kışlık sebzelerde görülen virüs hastalıklarının tanılanması amacı ile sörveyler yapmışlardır. Araştırmacılar, topladıkları bitkilerde en çok karşılaşılan simptomların bitkinin gelişiminde

yavaşlama, mozaik, sararma, beneklenme, yapraklarda kıvrılma ve meyvelerde bozukluklar olduğunu belirtmişlerdir. Sebzelerde bulunan virüsleri tanılamak amacı ile belirti gösteren ve göstermeyen bitkilerden toplam 218 örnek alarak bunları serolojik ve moleküler yöntemler yardımı ile testleyerek, örneklerde %38,1 oranında virüs enfeksiyonu bulunduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca çalışmada kullanılan 30 marul örneğine yapılan testler sonucunda 15 örnekte marul mozaik virüsü tespit edilmiş ve 5 örnekte ise LMV+CMV karışık enfeksiyonunun görüldüğünü belirtmişlerdir.

Karanfil (2014), Çanakkale ilinde toplamış olduğu LMV enfeksiyon şüphesi taşıyan 77 adet örneği DAS-ELISA ile testleyerek 13 tanesinin LMV ile enfekteli olduğunu bulmuştur. Enfekteli olan örneklerden 9 tane seçmiş ve RT-PCR testleri ile moleküler özelliklerini belirleyerek kılıf protein (CP) genlerini klonlamıştır. Klonlanan bu izolatların kılıf protein genlerinin dizilimlerini çıkararak amino asit ve nükleotit düzeyinde dizilimlerini belirlemiştir. Araştırmaları sonucunda LMV izolatlarının kendi içlerinde nt dizilimleri bakımından %97-100 oranında, dünya LMV izolatları ile %88-100 oranında, aa dizilimleri bakımından ise kendi içlerinde %95-100 oranında, dünya LMV izolatları ile %91-100 oranında benzerlik gösterdiğini belirtmiştir.

Sertkaya (2015), 2011-2012 yılları arasında Hatay ilinde yaptığı çalışmada ıspanak ve marul bitkilerinin yapraklarında kıvrılma, mozaik lezyonlar, damarlarda açılma ve bitkilerde bodurluk gibi çeşitli semptomlar gözlemlemiştir. Araştırmacı topladığı örnekleri biyolojik ve serolojik yöntemler ile aralarında LMV'nin de bulunduğu çeşitli virüslere karşı testlemiştir. Yaptığı testlemeler sonucunda marul örneklerinde %67,9, ıspanak örneklerinde %38,8 oranlarında LMV enfeksiyonu tespit etmiştir.

Karanfil, vd., (2018), Güney Marmara illeri ve ilçelerinde marul yetiştirilen alanlarda 2013-2015 yılları arasında sürveyler düzenlemişlerdir. Marul alanlarında LMV ve benzeri belirtileri olan bitkiler arasında topladıkları 307 adet örneği DAS-ELISA ile testleyerek LMV varlığını belirlemişlerdir. Testler sonucunda örneklerin 35 tanesinin virüs ile enfekteli olduğunu bulmuşlardır. Örneklerden, elde edildikleri bölgeler göz önünde bulundurularak 15 tanesi seçilmiş ve RT-PCR analizleri ile CP genlerinin amino asit ve nükleotit dizilimlerini çıkarmışlardır. Analizler sonucunda elde ettikleri nt ve aa dizilimlerini kullanarak LMV izolatlarının birbirleri ile ve dünyadaki LMV izolatları ile benzerlik ve

filogenetik ilişkilerini ortaya koymuşlardır. Araştırmaları sonucunda LMV izolatlarının kendi içlerinde aa dizilimleri bakımından %97-100, dünyadaki izolatlar ile %93-100 oranında, nt dizilimleri bakımından ise kendi içlerinde %96-100 ve dünya LMV izolatları ile %89-99 oranlarında benzer olduğunu saptamışlardır.

Ertunç ve Zelyüt (2019), Ankara ilinde beş farklı bölgede 2014-2015 üretim sezonunda marul bitkilerinde virüs ve virüs benzeri semptom gösteren 544 örnek toplamışlardır. Toplanan örnekleri, aralarında LMV'nin de bulunduğu çeşitli virüslere karşı DAS-ELISA ile testlemişlerdir. Testlemeler sonucunda 2014 yılında 65 bitkide sadece LMV enfekteli örnekler saptanırken, 2015 yılında 39 örnekte MiLBVV, 25 örnekte ise LMV bulmuşlardır. Toplanan örneklerin hiçbirinde TSWV ve CMV'ye rastlamamışlardır. Ayrıca yapmış oldukları RT-PCR testlerinde virüsler için ilgili gen bölgeleri için beklenen büyüklükte bandlar elde etmişlerdir.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar 2 aşamada yürütülmüştür. İlk olarak Güney Marmara Bölgesi'nin bazı il ve ilçelerden daha önceden toplanan LMV ile enfekteli olan marul bitkilerinden elde edilen 4 izolat tesadüfi olarak seçilmiştir. Seçilen örnekler total RNA izolasyonu yapılmış ve izolatların nuclear inclusion b (Nlb)+kılıf protein (coat protein; CP) genleri RT-PCR ile amplifiye edilmiştir. Agaroz jel elektroforez sonuçlarına göre seçilen 3 izolat sekanslanarak sahip oldukları gen dizilimleri belirlenmiştir. Gerçekleştirilen bu analizleri takiben, dizilemesi yapılan izolatların dünya izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik ve filogenetik ilişkilerine göre aralarından bir izolat seçilmiştir. Çalışmanın son aşamasında ise seçilen bu izolatin tüm genom analizi için 8 farklı primer çifti ile tüm genomu çoğaltılmış ve daha sonra sekanslanarak sahip olduğu gen dizimleri ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen LMV tüm genom dizilimleri kullanılarak LMV izolatının dünyadaki diğer izolatlar ile göstermiş olduğu sekans benzerlikleri ve farklılıklarının yanında filogenetik ilişkileri de ortaya konmuştur.

3.1. Virüs İzolatları

Çalışmada kullanılan izolatlar, Karanfil, vd., (2018)'nin Türkiye'nin Güney Marmara Bölgesi'ni kapsayan Çanakkale, Balıkesir ve Bursa'nın bazı il ve ilçelerinden topladıkları 307 örnekten LMV ile enfekteli olanlardan elde ettikleri izolatlar içerisinde Çanakkale'den elde edilenler arasından tesadüfi olarak 4 tanesi seçilmiştir.

3.2. Moleküler Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.1. Nlb+CP Genine Göre Moleküler Karakterizasyon Çalışmaları

Moleküler karakterizasyon çalışmaları LMV izolatlarının Nlb+CP genlerine göre gerçekleştirilmiştir. İlk olarak belirlenen toplam 4 adet LMV izolatı RT-PCR ile istenilen gen bölgeleri amplifiye edilerek sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sekans verileri, dünya LMV izolatları ile benzerlik ve filogenetik açıdan karşılaştırılmıştır.

Total Nükleik Asit İzolasyonu

LMV ile enfekteli olan bitkilerden elde edilmiş olan virüs izolatlarına yapılan total nükleik asit (TNA) izolasyonu CTAB metodu kullanılarak yapılmıştır (Li, vd., 2008). Bu amaç ile yöntem, 1g örnek alınarak 1 ml CTAB buffer ve 2 µl DDT porselen havanlarda bitki örnekleri ezilerek başlanmıştır. İzolasyon solüsyonunu içeren karışım ile ezilen bitki örnekleri steril eppendorf tüplere konularak 1 dk vortekslenmiş ve -20 °C'de 30 dk tutulmuştur. Beklenen süre sonucunda donan homojenizat çözülene kadar vortekslenmiştir. Sonrasında çözülen örnekler 65 °C'de 30 dk tutularak her 5 dk'da bir vortekslenmiştir. Bu sürenin sonunda örnekler 12.000 rpm'de 6 dk santrifüj işlemi yapılarak yeni eppendorf tüpe homojenizatın supernatant kısmından 500 µl alınarak aktarılmıştır. Üzerine eşit hacimde olacak şekilde 24:1 oranında hazırlanan kloroform: izoamilalkol konularak tüpler alt üst edilip 10 dk süre ile 12.000 rpm'de santrifüj gerçekleştirilmiştir. Oluşan supernatanttan 500 µl alınarak yeni eppendorf tüplere konulmuştur. Üzerine 175 µl soğuk izopropanol ilave edilerek pipetleme işlemi yapılmış ve santrifüj edilmiştir. Supernatant kısım, tüplerdeki pelet kısmına zarar vermeyecek şekilde dikkat edilerek uzaklaştırılmıştır. Tüplerde geriye kalan pelet iki kere %70'lik etil alkol ile yıkanmıştır. Her yıkamanın ardından 12.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra tüplerdeki etil alkolün tamamen uzaklaştırılması için oda sıcaklığında belirli bir süre bekletilmiştir. Son aşamada pelet 50 µl Tris-HCl (20 mM, Ph: 8) solüsyonunda çözdürülerek ortaya çıkan nükleik asitler derin dondurucuda -80 °C muhafaza edilmiştir.

Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Çalışmaları

Çalışmalara LMV ile enfekteli olan 4 adet izolat belirlenerek başlanmış ve RT-PCR yöntemi yapılmıştır. RT-PCR ile daha önceden LMV ile enfekteli olduğu tespit edilmiş olan izolatlardaki Nib+CP gen bölgelerinin amplifiye edilmesi ve hizmet alımı ile sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada LMV ile enfekteli olduğu bilinen izolatlara total nükleik asit izolasyonu (TNA) CTAB metodu ile yapılarak edilen total RNA'lerden cDNA'lar sentezlenmiştir. Bu cDNA'lar kullanılarak PCR ile istenilen gen bölgelerinin amplifikasyonu spesifik primerler kullanarak sağlanmıştır.

RT Aşaması

Denatürasyon Aşaması

Denatürasyon aşamasının amacı virüsün RNA sarmalının bağlarını birbirinden ayrılmasını sağlamaktır. Bu aşama için ilk olarak kullanılan mikro PCR tüplerine etiketleme işlemi yapılmıştır. Etiketleme işlemi yapılan mikro tüplere 2 µl total RNA, 0,5 µl dNTP, 0,5 µl random primer ve 3 µl steril sudan oluşan 6 µl denatürasyon karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım thermal cycler'da 65 °C'de 5 dk bekletilmiştir. Bu işlemin sonrasında örnekler 2 dk boyunca buzda bekletilerek denatürasyon aşaması sonlanmıştır.

Ters Transkriptaz Aşaması (RT)

Bu kısımda denatürasyon işlemi yapılan RNA'lardan cDNA'ların sentezlenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için öncelikle 6 µl denatürasyon karışımına 5X Prime Script Buffer (50 mM Tris HCl pH:8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂)'dan 2 µl, RNase inhibitör'den 0.5 µl, Prime Script Reverse Transcriptase 0.5 µl, random primer'den 1 µl ve ilave edilerek toplam 10 µl RT karışımı hazır hale getirilmiştir. PCR makinesi 10 dk 30 °C'de, 45 dk 42 °C'de, 15 dk 70 °C'de bekletilmiş ve +4 °C'de sonsuz şekilde muhafaza edilecek duruma getirilerek cDNA'ların sentezlenmesi sağlanmış ve bu aşama sonlandırılmıştır.

PCR Aşaması (Amplifikasyon)

Bu aşama için hazırlanan karışım için 10X PCR Buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris HCl 25 °C pH: 9.0, %1 Triton X-100)'dan 2,5 µl, 1 µl 10 mM dNTP karışımından, 0,5 µl LMV 8F ve LMV 8R primer çiftlerinin her birinden (Tablo 4), 0.25 µl Taq polimeraz enziminden ve steril sudan 15,75 µl eklenerek oluşturulmuştur. Mikro PCR tüplerine ise hazırlanan PCR karışımı ve 5 µl cDNA eklenmiştir. Karışım, 94 °C'de 3 dk, 40 defa tekrarlanan 94 °C'de 30 sn, 55 °C'de 30 sn ve 72 °C'de 30 sn, 72 °C'de 5 dk bekletilmiş daha sonra da 4 °C'de sonsuz şekilde bekleyecek halde programlanan PCR makinesine konularak LMV izolatların Nlb+CP genlerinin çoğaltılması yapılmıştır.

Agaroz Jel Elektroforezi

Sentezlenen PCR ürünleri 100-5000 bp DNA büyüklük markörleri ile birlikte 100 voltta, %1 agaroz jelinde, 45 dk ayrıştırılarak ethidium bromür ile boyama işlemi yapılmıştır. Daha sonra Major Science UV-DI jel görüntüleme cihazında Nlb+CP genlerine ait 1430 bp'lik kısmına karşılık gelen bandlar fotoğraflanmıştır. En parlak band veren 3 izolata ait RT-PCR ürünleri seçilerek saflaştırma aşamasına geçilmiştir.

PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Nlb+CP genlerinin amplifikasyonu gerçekleştirildikten sonra EZ-10 Spin Column PCR pürifikasyon kiti kullanılarak üretici firmanın yönlendirdiği şekilde saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma işleminin yapılması amacı ile ilk aşamada 25 µl RT-PCR ürününe 60 µl Binding I buffer ilave edilip, karışımın tamamı EZ-10 kolonlarına aktararak oda sıcaklığında 2 dk bekletilmiştir. Bu süre sonrasında kolonlar 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Tüm santrifüj aşamalarından sonra kolonun alt tarafı boşaltılmıştır. Yeniden kolonlara 500 µl yıkama solüsyonu eklenerek 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Önceki aşama tekrar edilerek, kolonlara 750 µl yıkama solüsyonu ilave edilip, 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Kolonların tamamen kurutulması için yıkama aşamasından sonra bir kez daha kolonlar boş olacak şekilde 10.000 rpm'de 1 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Saflaştırma işleminin son aşamasında ise kolonlara steril eppendorflar konularak kolonun içerisine 40 µl elution solüsyon ilave edilip 2 dk oda sıcaklığında tutulmuştur. Sonrasında 2 dk süre ile 10.000 rpm'de santrifüj edilerek ortaya çıkan ürünler kullanılabilecek kadar -20 °C'de korunmuştur.

3.2.2. Çoklu Dizi Karşılaştırmaları ve Filogenetik Analizler

Seçilen izolatların agaroz jel elektroforezindeki numaraları dikkate alınarak büyükten küçüğe olacak şekliyle izolatlara TURCNKA (2 numaralı izolat), TURCNKB (3 numaralı izolat) ve TURCNKC (4 numaralı izolat) olacak şekilde isimlendirilerek çoklu dizi ve filogenetik analizlerde kullanılmıştır.

Çoklu Dizi Karşılaştırmaları

Güney Marmara illerinden daha önceden elde edilmiş olan LMV izolatlarının DNA dizileri CLC Main Work Bench V.7.9.1 programında Clustal W ile belirlenerek, nükleotit ve amino asit dizi karşılaştırmaları yapılmıştır. Sonrasında LMV izolatlarının dünya izolatları ile gösterdiği benzerlik oranları saptanmıştır. İlk aşamada Clustal W ve CLC Main Work Bench V.7.9.1 programı yardımı ile LMV izolatlarının Nlb+CP genine ait olan nt ve aa dizileri hizalanarak aynı program ile izolatların dünya izolatları ile gösterdiği benzerlik oranı belirlenmiştir. Benzerlik oranlarının renklendirilmiş matris olarak elde edilmesinde Sequence Demarcation Tool Version 1.2 (SDTv1.2) programı kullanılmış ve MEGA7 programında ise LMV izolatların evrimsel ilişkileri araştırılmıştır (Muhire, vd., 2014).

Filogenetik Analizler

LMV izolatlarının nükleotit ve amino asit seviyesinde belirlenen Nlb+CP gen dizilimleri Clustal W programı yardımı ile belirlenmiştir. Filogenetik analizler için Kiamura iki parameter algoritması uygulanan UPGMA ve neighbour-joining (NJ) yöntemleri kullanılarak filogenetik soy ağacı oluşturulmuştur. Ayrıca elde edilen soy ağaçlarının istatistiki olarak doğruluğunu belirlemek amacı ile 1000 tekerrürlü bootstrap analizi yapılmıştır.

Güney Marmara illerinden daha önceden elde edilmiş olan LMV izolatlarından tesadüfi olarak seçilen 3 adet izolat için araştırmalar yürütülmüştür. LMV izolatlarının gen bankasında bulunan diğer izolatların istenilen gen bölgelerine göre benzerlik oranları ve filogenetik ilişkileri belirlenmiştir. Tablo 4’de çalışmada kullanılan dünya izolatlarına ait olan izolatlar, konukçular ve elde edildikleri ülkeler verilmiştir.

Tablo 4

Çoklu dizi ve filogenetik analizlerde kullanılan dünyadaki diğer izolatlar

Orjin	İzolat	Konukçu	Erişim Numarası
Fransa	Strain_O	Marul	X97704
Fransa	Strain_E	Marul	X97705
Brezilya	AF199	Marul	AJ278854
Çin	Yuhang	Marul	AJ306288
Güney Kore	Muju	Marul	KF955619
Brezilya	Br6	Marul	KJ161174
Fransa	FR25	<i>Dimorphotheca</i> sp.	KJ161186
Fransa	13	Marul	KJ161173
Şili	CL574	Acı marul	KJ161183
Şili	CL246	Acı marul	KJ161177
Fransa	9	Marul	KJ161172
Şili	CL117	<i>Dimorphotheca</i> sp.	KJ161175
Fransa	LMVCr	<i>Catharantus roseus</i>	KF268956
İspanya	ES16	<i>Dimorphotheca</i> sp.	KJ161185
Yemen	Yar	Marul	KJ161194
Tunus	Tn51	Marul	KY440645
Tunus	KHam6	<i>Dimorphotheca</i> sp.	KJ161187
Yunanistan	Gr5	Marul	Z78228
Yunanistan	Gr4	Marul	Z78229
Yunanistan	GrB	Marul	Z78230

3.3. LMV Tüm Genom Dizi Analizi

Tüm genom dizilimi belirlenecek olan izolatan seçimi Nib+CP gen bölgelerine göre gerçekleştirilen benzerlik ve filogenetik analiz sonuçları göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Bu baēlamda her 3 izolatan da birbirleri ile oldukça benzer ve çok yakın ilişkili bulunmasından dolayı tesadf olarak TURCNKA izolatu seçilmiştir. Gerçekleştirilen analizlerde TURCNK olarak isimlendirilerek kullanılmıştır

Tüm genom dizi analizlerine LMV ile enfekteli olduēu önceden belirlenen izolatlar arasından tüm genom dizilimleri belirlenecek bir adet LMV izolatanın seçimi yapılmıştır. Tüm genomu belirlenecek olan yeni izolatan genom dizilemesi için daha önceden yapılmış olan LMV genom dizilimi kullanılmıştır. Gen bankasındaki tüm genoma ait olan diziler karılatırıldıktan sonra “3.2. Moleküler Karakterizasyon alımaları” balıēı içerisinde gerçekleştirilen RT-PCR aşamaları tekrar edilerek LMV izolatanın tüm genomu Tablo 5’de verilen 8 farklı birbirinden baēımsız primer çifti ile 8 parça olacak şekilde overlapping PCR ile amplifiye edilmiştir (Lim, vd., 2014). Her bir gen bölgesi için RT-PCR testleri 3 tekrerrür olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen LMV tüm genom dizilimleri yeni nesil dizileme teknoloēisi kullanılarak hizmet alımı ile FicusBio Teknoloēisi irketi tarafından gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA dizileri CLC Genomic Workbench programında bulunan ContigAssembly Modlyle analizi yapılarak LMV tüm genomuna ait DNA dizisi elde edilmiştir. Bu genom dizilimleri gen bankasında bulunan diēer LMV izolatlarının tüm genomları ile çoklu dizi ve filogenetik analizlerin nükleotit ve amino asit temelli olarak yapılmıştır.

Tablo 5

LMV tüm genom dizileme çalışmalarında kullanılan primer çiftleri

Primer Kodu	Primer Dizilimi	Ürün Büyükülüğü (bp)
LMV 1F	AAAATAAAACAACCCAACACAACCTC	1700
LMV 1R	GTACATGCACGAAGCGTGGA	
LMV 2F	ATACTCCATACCTGCACATC	1215
LMV 2R	AGTCGTGATTGAACCATATG	
LMV 3F	CGAGATAGCAGTGAAACAGC	1260
LMV 3R	GTGCGTATGCGCTTACGTAG	
LMV 4F	GGTCGGAGTGCAAGTGCAAG	1440
LMV 4R	CCATTTTCTATGATGTTGGT	
LMV 5F	TGGAAGTAGAAACAGTAGGC	1250
LMV 5R	CTGTCTTTGCCGTTTACCTT	
LMV 6F	CATGGATGATGTTTCAGAGC	1550
LMV 6R	GCTCTTCTGGTAGGCTCCCA	
LMV 7F	CACAGTCAAGGGTAAGTGCA	1180
LMV 7R	ATCCCACTCTAGGATTGACA	
LMV 8F	TGGTTCATGTACATTGCGG	1430
LMV 8R	GTCTCCGACTGAAAACCAGA	

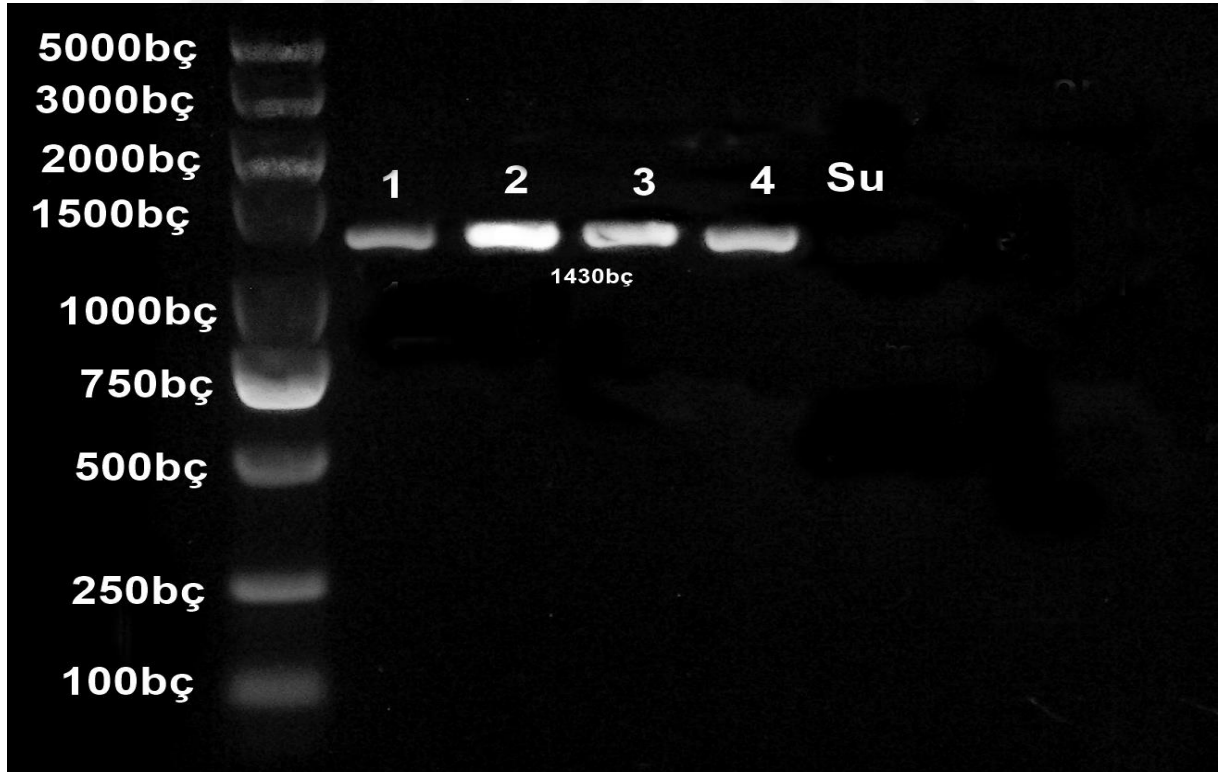
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. RT-PCR Çalışmaları

4.1.1. Nİb+CP Analizleri

Nİb+CP genlerinin RT-PCR analizleri için LMV ile enfekteli olduğu bilinen 4 örnek üzerinden çalışmalar yürütülmüştür. Yapılan RT-PCR çalışmalarında LMV Nİb+CP genine ait 1430 bç uzunluğunda band oluşumu gözlemlenmiştir. LMV'nin Nİb+CP genlerine spesifik olan primer çiftleri ile 4 izolat amplifiye edilerek içlerinden en parlak gözlenen 3 izolat seçilmiş ve hizmet alımı ile sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Sekans dizileri belirlenen 2, 3, 4 numaralı izolatların nükleotit ve amino asit dizileri kendi içlerinde ve dünya LMV izolatları ile benzerlik ve filogenetik açıdan karşılaştırılarak tüm genom dizileri belirlenecek bir adet LMV izolatının seçimi amacıyla RT-PCR analizleri yapılmıştır (Şekil 1).



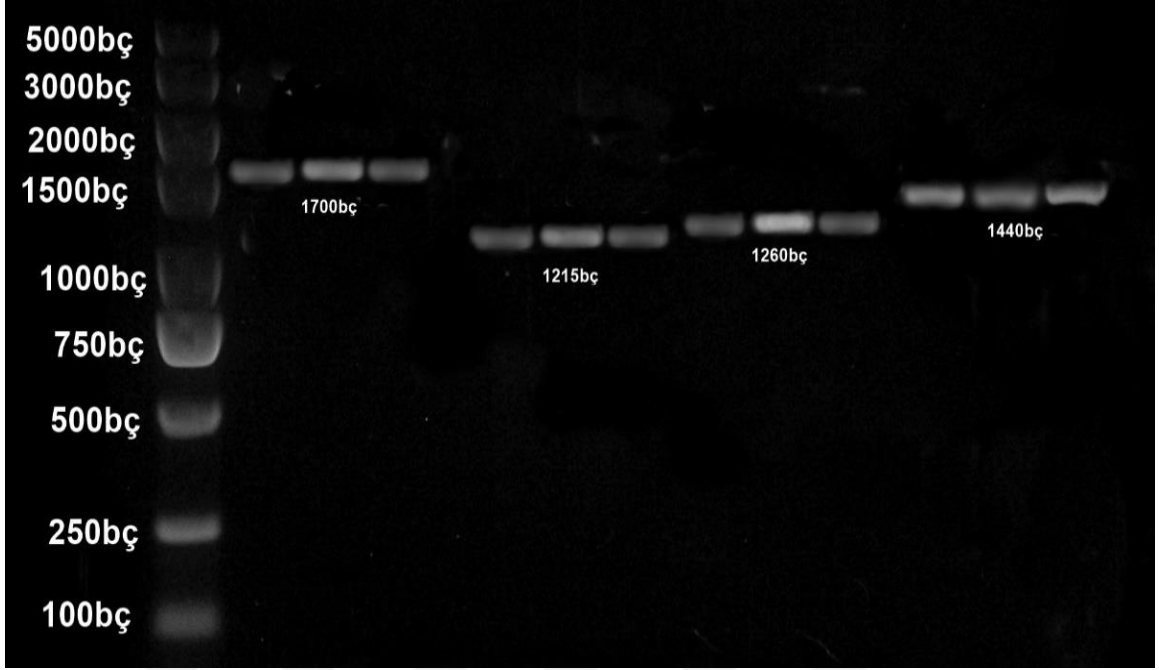
Şekil 1. Marul mozaik virüsü izolatlarına ait RT-PCR çalışmalarının agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmesi sonucunda oluşan band görüntüleri (M:100-5000 bç marker; 1, 2, 3, 4 marul mozaik virüsü ile enfekteli izolatlara ait numaralar).

Yapılan bir çalışmada Naidu, vd., (2008: 486), Amerika’da yetiştiriciliği yapılan çok yıllık otsu bir bitki olan *Coreopsis auriculata* bitkilerinden aldıkları örneklerde LMV varlığını belirlemek için yaptıkları çalışmalarda LMV Nib+CP genlerine spesifik primer çiftleri kullanarak RT-PCR çalışmalarını yürütmüşlerdir. RT-PCR analizleri sonucunda ise LMV Nib+CP genine ait olan 1000 bp uzunluğunda bandlar oluştuğunu tespit etmişlerdir. Gerçekleştirilen bu çalışmada da RT-PCR sonuçlarında beklenen büyüklükte bandlar elde edilmiştir. Her iki çalışmada farklı büyüklükte bandlar elde edilmesi, kullanılan primerlerin amplifiye ettiği bölgelerden kaynaklanmaktadır.

4.1.2. Tüm Genom Analizleri

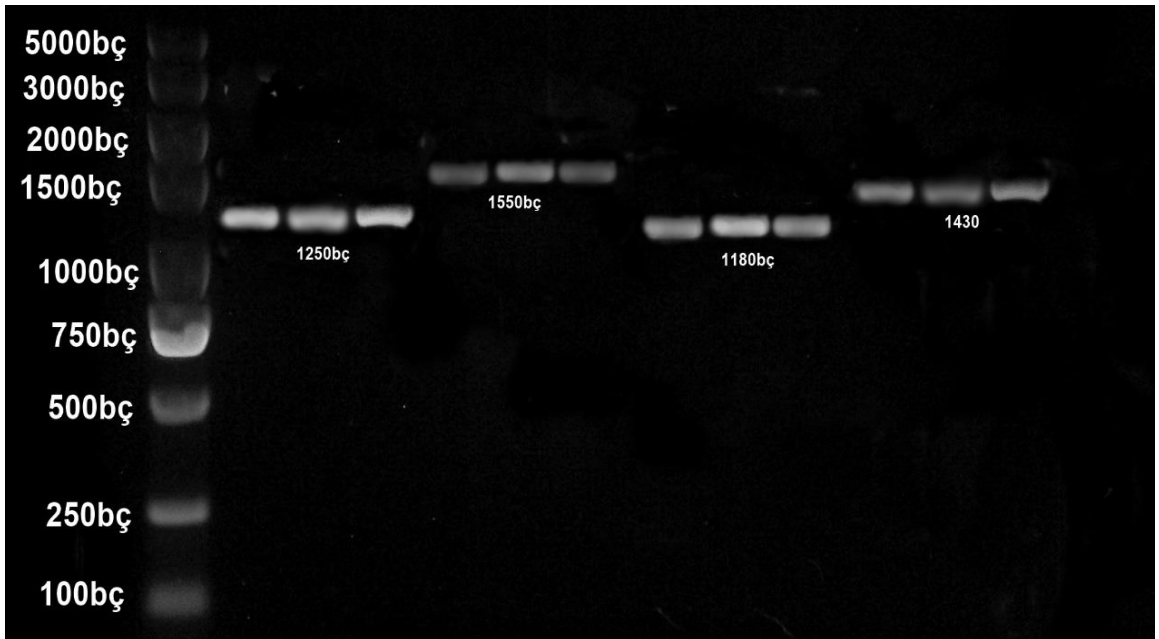
Moleküler karakterizasyon çalışmaları temel alınarak seçilen bir adet LMV izolatının tüm genom dizilimleri, 8 farklı birbirinden bağımsız primer çifti ile 8 parça olacak şekilde Lim, vd., (2014)’nin belirttiği şekilde PCR ile amplifiye edilerek belirlenmiştir. Elde edilen LMV tüm genom sekans dizileri, benzerlik ve filogenetik analizlerin yanı sıra evrimsel ilişkilerinin ortaya çıkarılmasında kullanılmıştır.

Tüm genom çalışmaları kapsamında seçilen bir adet LMV izolatına yapılan RT-PCR analiz sonuçlarında istenilen band büyüklüklerinin elde edildiği tespit edilmiştir. LMV 1F ve 1R için 1700 bp uzunluğunda, LMV 2F ve 2R için 1215 bp uzunluğunda, LMV 3F ve 3R için 1260 bp uzunluğunda, LMV 4F ve 4R için 1440 bp uzunluğunda bandlar elde edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Tüm genom çalışmaları kapsamında yapılan RT-PCR çalışmalarının agaroz jel elektroforezinde elde edilen band görüntüsü.

LMV 5F ve 5R için 1250 bp uzunluğunda, LMV 6F ve 6R için 1550 bp uzunluğunda, LMV 7F ve 7R için 1180 bp uzunluğunda ve LMV 8F ve 8R için ise 1430 bp uzunluğunda LMV tüm genomuna ait istenilen band büyüklükleri elde edilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Tüm genom çalışmaları kapsamında yapılan RT-PCR çalışmalarının agaroz jel elektroforezinde elde edilen band görüntüsü.

4.2. Nİb+CP Genlerinin Dizi Analizleri

Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda tüm genom dizilimi belirlenecek olan izolatin seçimi amacı ile Nİb+CP genlerinin hizmet alımı ile içerdikleri sekans dizileri belirlenmiştir. LMV Nİb+CP genlerine karşılık gelen 1430 bp uzunluğunda band oluşumu gözlemlenmiştir. Ayrıca istenilen gen bölgelerinin karşılaştırılmasında genellikle 216 bp'lık bölge kullanıldığından dolayı nükleotit ve amino asit düzeyinde yapılan karşılaştırmalarda bu bölgeye ait gen bankasından alınan veriler kullanılmıştır (Krause-Sakate, vd., 2002: 564).

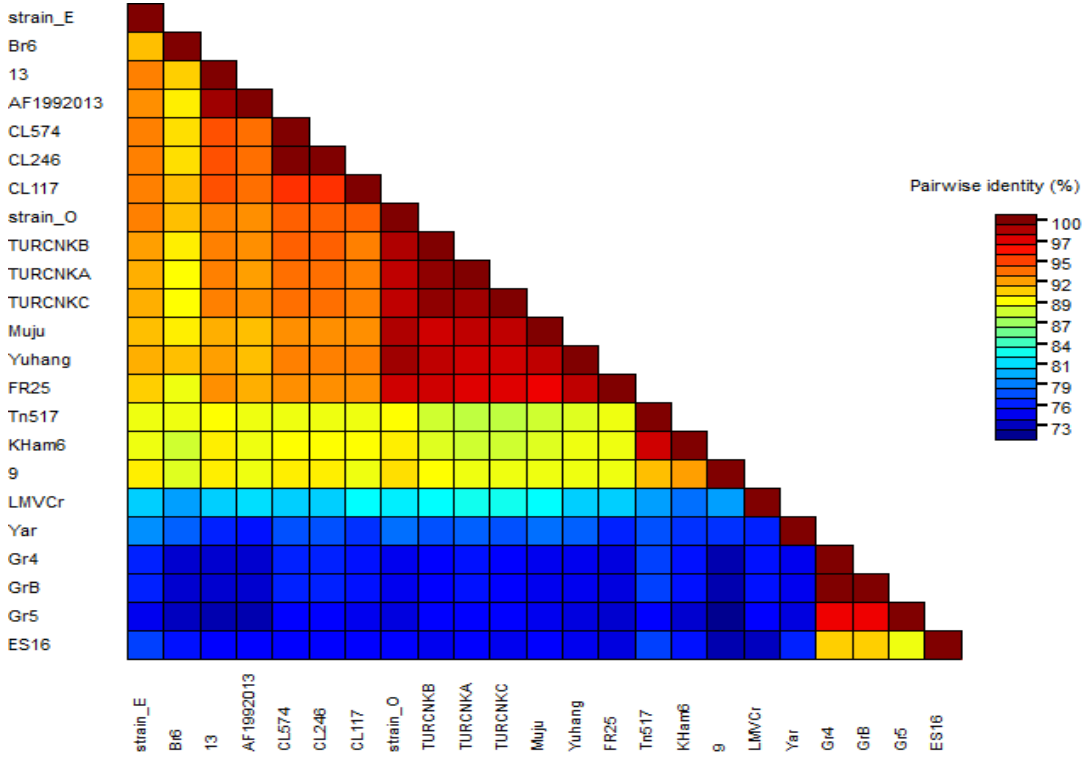
4.2.1. Nükleotit ve Amino Asit Düzeyinde Çoklu Dizi Analizleri

Çalışma kapsamında tüm genomu belirlenecek olan LMV izolatlarının seçimi amacıyla Nİb+CP genlerine göre yapılan çoklu dizi karşılaştırmaları ile LMV marul izolatının nükleotit ve amino asit düzeyinde kendi içlerinde ve dünya LMV izolatları ile gösterdiği benzerlik oranları belirlenmiştir. Bu benzerlik oranları Sequence Demarcation Tool Version 1.2 (SDTv1.2) programı kullanılarak renklendirilmiş matris olarak elde edilmiştir.

LMV izolatlarının nükleotit ve amino asit düzeyinde Nİb+CP genlerine göre kendi aralarında yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlenerek, nükleotit düzeyinde %99 ve üzeri, amino asit düzeyinde ise %100'e varan benzerlik gösterdiği sonucuna varılmıştır (Şekil. 4 ve 5). Çalışma kapsamında kullanılan LMV izolatlarının Nİb+CP genlerine göre nükleotit düzeyinde kendi içlerinde gerçekleştirilen benzerlik analizlerinde TURCNKA TURCNKB ve TURCNKC'nin %99 ile %100'e varan bir benzerlik oranı gösterdiği tespit edilmiştir. TURCNKA ile TURCNKB izolatları aralarında %100 oranla en yüksek benzerliği gösterirken, en düşük benzerliği ise TURCNKB izolatu diğer izolatlar ile %99 oranında göstermiştir.

Benzerlik analizlerinde tüm izolatlar dikkate alındığında benzerlik oranının %73 ile %100 arasında olduğu görülmüştür. TURCNKA, TURCNKB, TURCNKC izolatlarının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında ise Nİb+CP genine göre nükleotit seviyesinde %73-98 aralığında benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. En yüksek benzerliği %98 oranında X97704, KJ161186 erişim numaralı Fransa izolatları, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatu

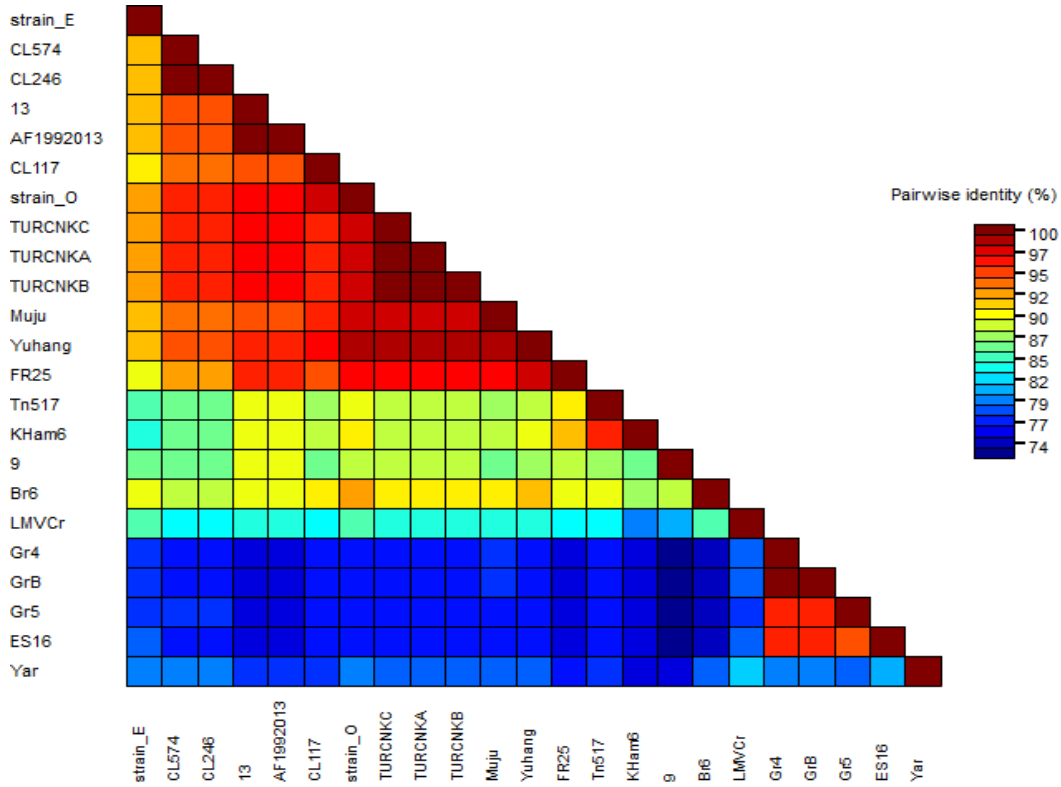
ve KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı ile göstermiştir. En düşük benzerliği ise %75 oranında KJ161194 erişim numaralı İspanya izolatı ve Z78228, Z78229, Z78230 erişim numaralarına sahip olan Yunanistan izolatları ile gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Marul mozaik virüsü izolatlarının kendi içlerinde ve dünyadaki marul mozaik virüsü izolatları ile Nİb+CP geninin nükleotit dizilimlerine göre benzerlik matrisi.

Çalışma kapsamında elde edilen TURCNKA, TURCNKB ve TURCNKC izolatlarının Nİb+CP genlerine göre amino asit benzerlik oranları incelendiğinde, kendi içlerinde %100'e varan bir benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir.

Tüm izolatların benzerlik analizleri dikkate alındığında %74 ile %100 arasında benzerlik oranı olduğu görülmüştür. TURCNKA, TURCNKB, TURCNKC izolatlarının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında ise Nİb+CP genine göre amino asit seviyesinde %76-99 arasında benzerlik gösterdikleri görülmüştür. LMV izolatları AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ile %99 oranında en yüksek benzerliği gösterirken, en düşük benzerliği ise %76 oran ile KJ161194 erişim numaralı İspanya izolatı ve Z78228, Z78229, Z78230 erişim numaralarına sahip olan Yunanistan izolatları ile gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 5).



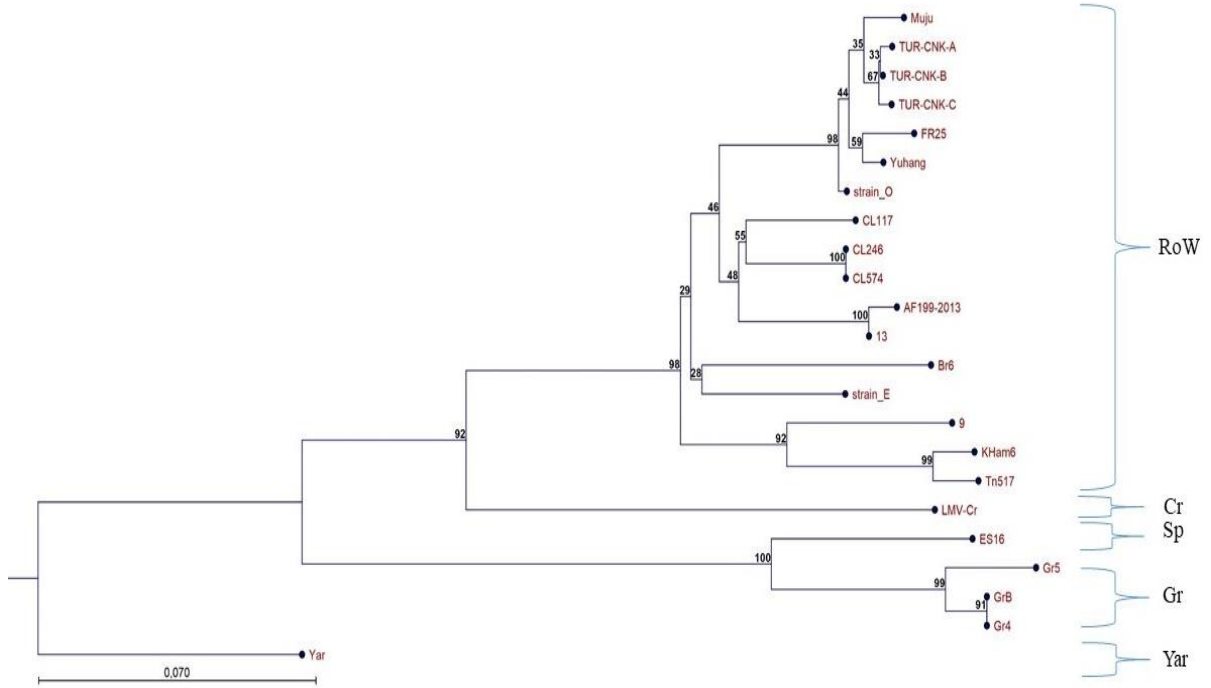
Şekil 5. Marul mozaik virüsü izolatlarının kendi içlerinde ve dünyadaki marul mozaik virüsü izolatları ile Nİb+CP geninin amino asit dizilimlerine göre benzerlik matrisi.

Naidu, vd., (2008: 486), tarafından yapılan bir çalışmada ABD'ye özgü bir cins olan ve estetik amaçlı yetiştirilen *Coreopsis ariculata* bitkilerinden elde ettikleri LMV izolatının dizilemesini gerçekleştirmişlerdir. Gen bankasında bulunan diğer LMV izolatları ile yaptıkları kıyaslamalarda ABD izolatının Nİb+CP genlerine göre Fransa ve Çin izolatları ile %93-99 aralığında benzer olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ulaşılan benzerlik analiz sonuçları ile çalışmamızda elde edilen sonuçların birbirleri ile uyumlu olduğu görülmektedir.

4.2.2. Nİb+CP Genlerinin Filogenetik Analizleri

Çalışma kapsamında Nİb+CP genlerinin nükleotit ve amino asit dizilimlerine göre NJ yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağaçlarda TURCNKA, TURCNKB ve TURCNKC izolatlarının gen bankasında bulunan diğer LMV izolatları ile genetik ilişkileri belirlenmiştir.

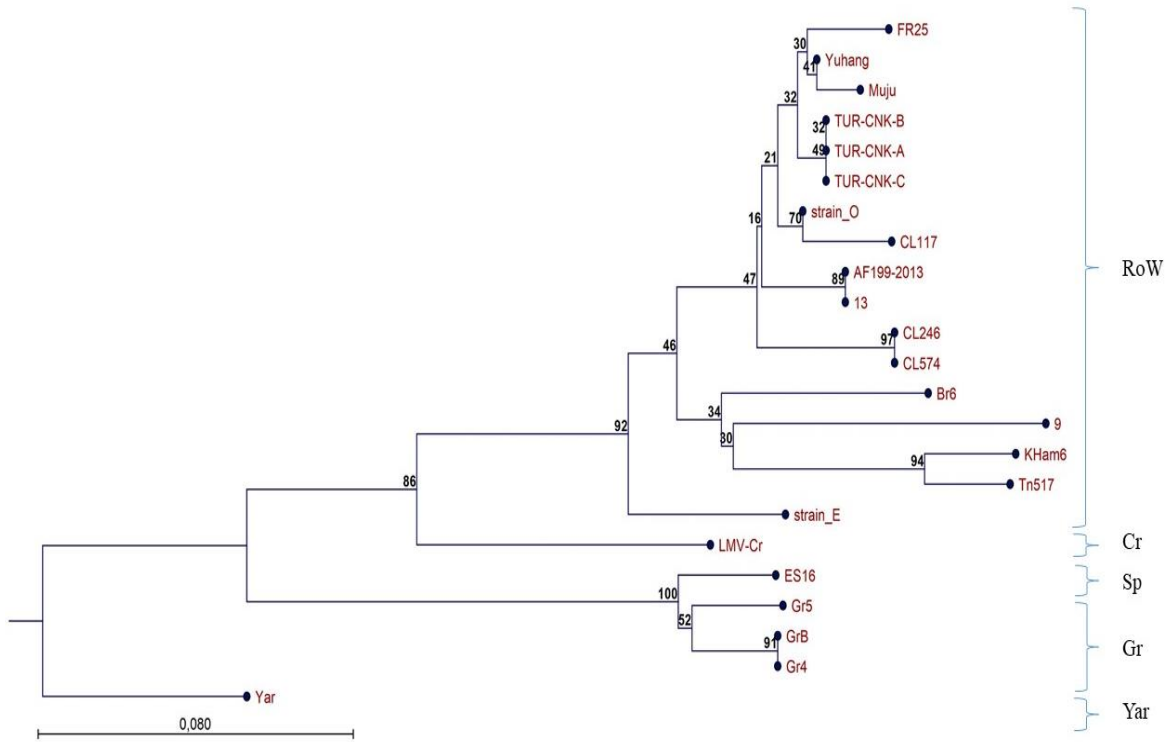
Nİb+CP genlerinin nükleotit dizilimlerine göre belirlenen filogenetik soyağaç incelendiğinde, temelde 5 ana gruba ayrıldığı görülmüş olup, Yar grubunda 1 izolat, Gr grubunda 3 izolat, Sp grubunda 1 izolat, Cr grubunda 1 izolat ve RoW grubunda ise 17 izolat bulunmaktadır. Filogenetik soyağaç daha detaylandırıldığında ise; Yar grubunda KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatının bulunduğu, Gr grubunda Z78228, Z78229, Z78230 erişim numaralı Yunanistan izolatları, Sp grubunda KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatları ve Cr grubunda ise KF268956 Erişim numaralı Fransa izolatı bulunmaktadır. RoW grubunda ise KJ161186, KJ161173, X97704, X97705, KJ161172 erişim numaralı Fransa izolatları, KJ161175, KJ161177, KJ161183 erişim numaralı Şili izolatları, KJ161187, KY440645 erişim numaralı Tunus izolatları, KJ161174, AJ278854 erişim numaralı Brezilya izolatları, KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı bulunmaktadır. Son olarak ise AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ve ülkemizden elde edilen izolatlar bulunmaktadır. TURCNKA, TURCNKB ve TURCNKC LMV izolatlarının RoW grubuna dahil olduğu belirlenerek KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı ile en yakın ilişkili ve KJ161186 erişim numaralı Fransa izolatı ile de ikinci en yakın ilişkili olduğu belirlenmiştir. Gen bankasında bulunan diğer LMV izolatları ile en uzak ilişkiyi ise KJ161194 erişim numarasına sahip olan Yemen izolatı ile göstermiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Marul mozaik virüsü izolatlarının Nİb+CP genlerinin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı.

Nlb+CP genlerinin amino asit dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağaç incelendiğinde, 5 ana gruba ayrıldığı görülmüştür. Gr grubunda 3 izolat, Cr grubunda 1 izolat Yar grubunda 1 izolat, Sp grubunda 1 izolat, ve RoW grubunda ise 17 izolat bulunmaktadır.

Filogenetik soyağaç daha detaylandırıldığında ise; Gr grubunda Z78228, Z78229, Z78230 erişim numaralı Yunanistan izolatları, Sp grubunda KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatları, Yar grubunda KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatının bulunduğu ve Cr grubunda ise KF268956 erişim numaralı Fransa izolatı bulunmaktadır. RoW grubunda ise KJ161186, KJ161173, X97704, X97705, KJ161172 erişim numaralı Fransa izolatları, KJ161175, KJ161177, KJ161183 erişim numaralı Şili izolatları, KJ161187, KY440645 erişim numaralı Tunus izolatları, KJ161174, AJ278854 erişim numaralı Brezilya izolatları, KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı bulunmaktadır. Son olarak ise AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ve ülkemizden elde edilen izolatlar bulunmaktadır. Çalışmada kullanılan LMV izolatları olan, TURCNKA, TURCNKB ve TURCNKC'nin KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı ile en yakın ilişkiyi gösterdiği, AJ306288 erişim numarasına sahip olan Çin izolatı ile ikinci en yakın ilişkiyi gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca yapılan filogenetik analizlerde KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ile en uzak ilişkili olarak bulunmuş ve izolatların RoW grubuna dahil olduğu belirlenmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. Marul mozaik virüsü izolatlarının Nib+CP genlerinin amino asit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı.

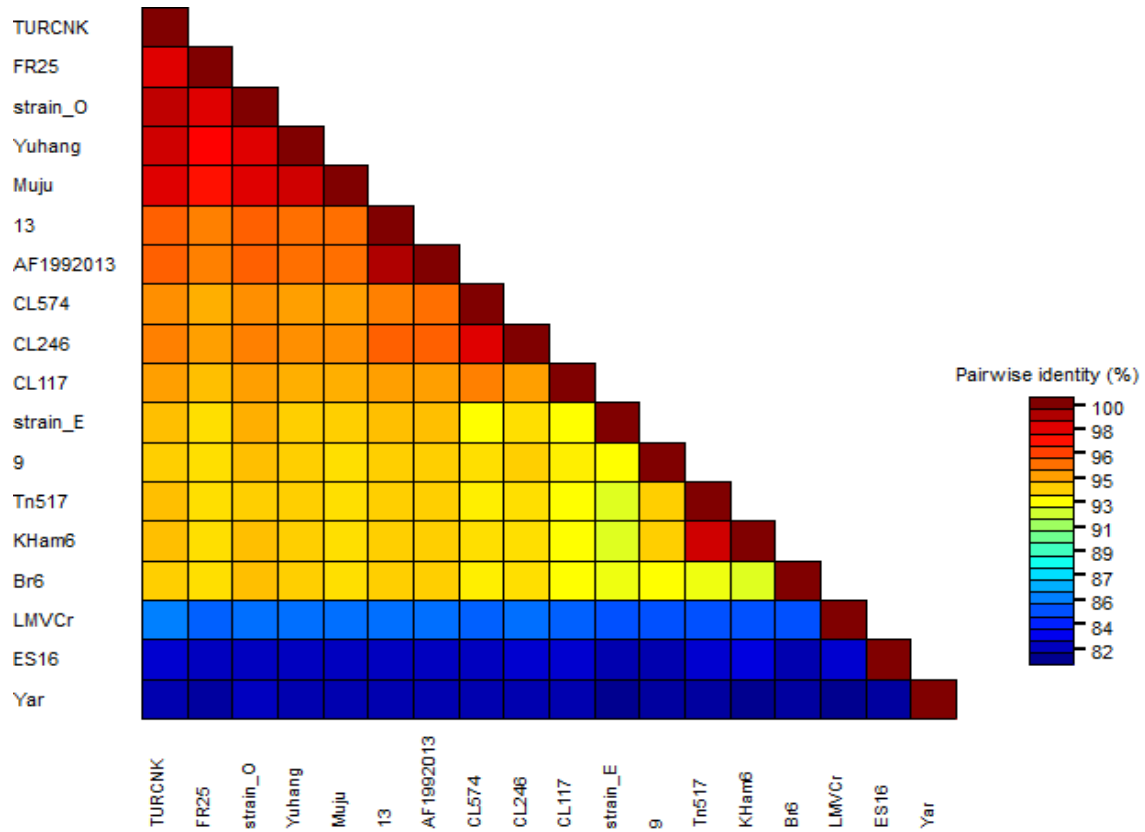
Krause-Sakate, vd., (2002: 563), yaptıkları çalışmada 73 LMV izolatının Nib+CP birleşimini kodlayan değişken bölgedeki nükleotit sekansına dayalı olarak incelemiştir. Araştırmaları sonucunda oluşturdukları filogenetik ağaçlarda izolatların 3 gruba ayrıldığını belirterek bu grupların LMV-Yar, LMV-Greek ve LMV-RoW olduğunu bildirmişlerdir. Bu izolatları yaptıkları daha geniş analizler sonucunda da LMV-RoW'un 2 alt gruba ayrıldığını ve bunların da LMV-most ve LMV-common olduğunu tespit etmişlerdir.

Lim, vd., (2014: 184-186), bir başka çalışmada Kore'nin Muju ilçesinde ortaya çıkan semptomlu marul bitkilerinden elde ettikleri KF955619 erişim numaralı LMV-Muju izolatının moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada oluşturulan filogenetik ağacın 3 ana gruba ayrıldığını ve bu grupların daha önceden belirlenen LMV-Yar, LMV-Greek ve izolatların büyük bir çoğunluğunu kapsayan LMV-RoW grubu olduğunu belirtmişlerdir. Kore izolatı olan LMV-Muju'nun Nib+CP genlerinin nükleotit dizilimlerine göre şekillenmiş olan sınıflandırmada LMV-RoW grubuna ait olduğunu tespit etmişlerdir. Her iki çalışma sonuçları ile bizim elde ettiğimiz sonuçlar grup düzeyinde birbirine benzer özellik göstermektedir.

4.3. LMV Tüm Genom Dizileme Analizleri

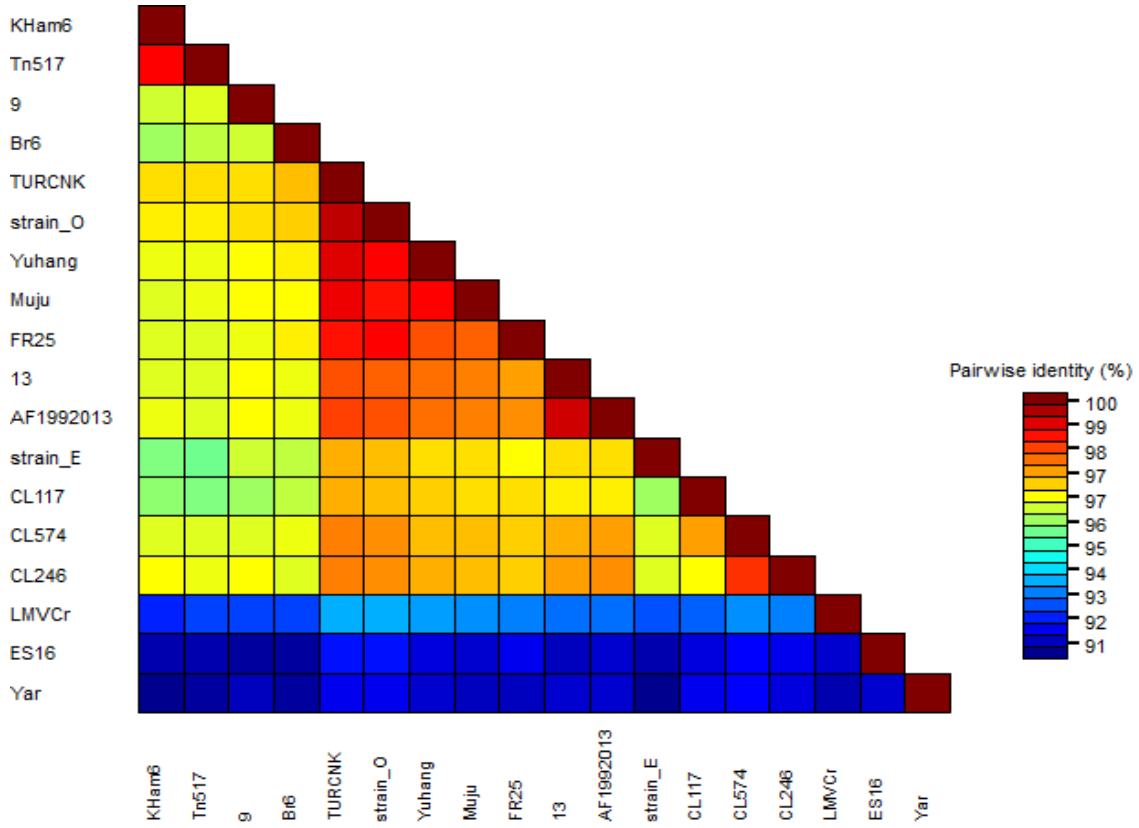
İlk aşama olan Nİb+CP genlerine göre yapılan nükleotit ve amino asit düzeyinde benzerlik analizlerinde, çalışma 3 izolat üzerinden yürütülmüştür. 2. aşama olan tüm genom analizlerinde ise bu izolatlar birbirleri ile %100'e varan bir benzerlik gösterdiği için bundan sonraki benzerlik ve filogenetik çalışmalarında TURCNKA izolatı seçilmiş, TURCNK olarak isimlendirilerek benzerlik ve filogenetik analizlerde kullanılmıştır. Çalışma kapsamında seçilen TURCNK LMV izolatının tüm genom düzeyinde gen bankasında bulunan diğer dünya LMV izolatları ile benzerlik ilişkileri belirlenmiştir.

Nükleotit düzeyinde yapılan benzerlik analizlerinde tüm izolatlar dikkate alındığında %82 ile %100 arasında benzerlik oranı olduğu grlmştir. Tüm genom dizilimlerine göre TURCNK izolatının, dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında ise izolatların %82-98 aralığında benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. TURCNK LMV izolatı X97704 erişim numarasına sahip olan Fransa izolatı ile %98 oranla en yüksek benzerliği gösterirken, en düşük benzerliği ise %82 oranla KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ve KJ161194 erişim numaralı İşpanya izolatı ile gösterdiği belirlenmiştir (şekil 8).



Şekil 8. Marul mozaik virüsü izolatlarının tüm genom dizilimlerine göre nükleotit seviyesinde dünya marul mozaik virüsü izolatları ile gösterdiği benzerlik matrisi.

Amino asit temelli benzerlik analizlerinde tüm izolatlar incelendiğinde %91 ile %100 arasında benzerlik oranı olduğu görülmüştür. Tüm genom dizilimlerine göre TURCNK izolatının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında ise izolatların %92-99 aralığında benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. TURCNK LMV izolatı X97704 erişim numaralı Fransa izolatı ve AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ile %99 oranla en yüksek benzerliği göstermiştir. En düşük benzerliği ise %92 oranla KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ve KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatı ile gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 9).

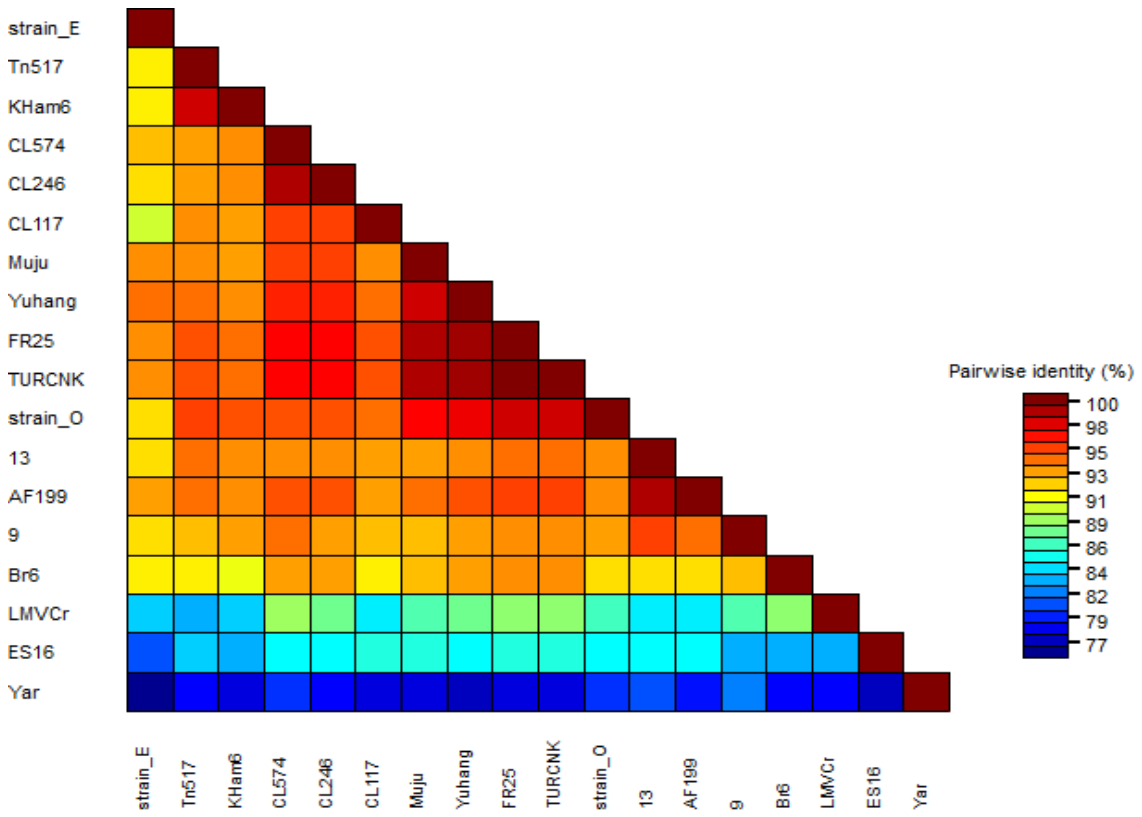


Şekil 9. Marul mozaik virüsü izolatlarının tüm genom dizilimlerine göre amino asit seviyesinde dünya marul mozaik virüsü izolatları ile gösterdiği benzerlik matrisi.

Tao, vd., (2002), yaptıkları çalışmada Çin'in Yuhang şehrinde LMV'nin marul bitkilerinde önemli kayıplar oluşturması nedeniyle seçtikleri bir LMV izolatının tüm genom dizi analizini çalışmışlardır. Bu izolatın nükleotit ve amino asit düzeyinde dünyanın diğer ülkelerinden elde edilen ve gen bankasına yüklenen LMV izolatları ile nükleotit düzeyinde %96,7 ile %98,8 ve amino asit düzeyinde %97,6 ile %99,0 oranında bir benzerliğe sahip olduğunu bulmuşlardır. Bir diğer çalışmada ise Revers, vd., (1997b), LMV-E ve LMV-O izolatlarının tüm genom dizilerini belirleyerek karşılaştırmalarını yapmışlardır. Tüm genom dizi karşılaştırmaları sonucunda izolatların nükleotit düzeyinde %94 oranında, amino asit düzeyinde ise %97 oranında benzerlik gösterdiklerini belirtmişlerdir. Bu çalışmalar ve bizim çalışmalarımızda elde edilen benzerlik oranları oldukça yüksek oranda olup birbirleri ile uyumlu görünmektedir.

4.3.1. 6K1 Genine Göre Benzerlik Sonuçları

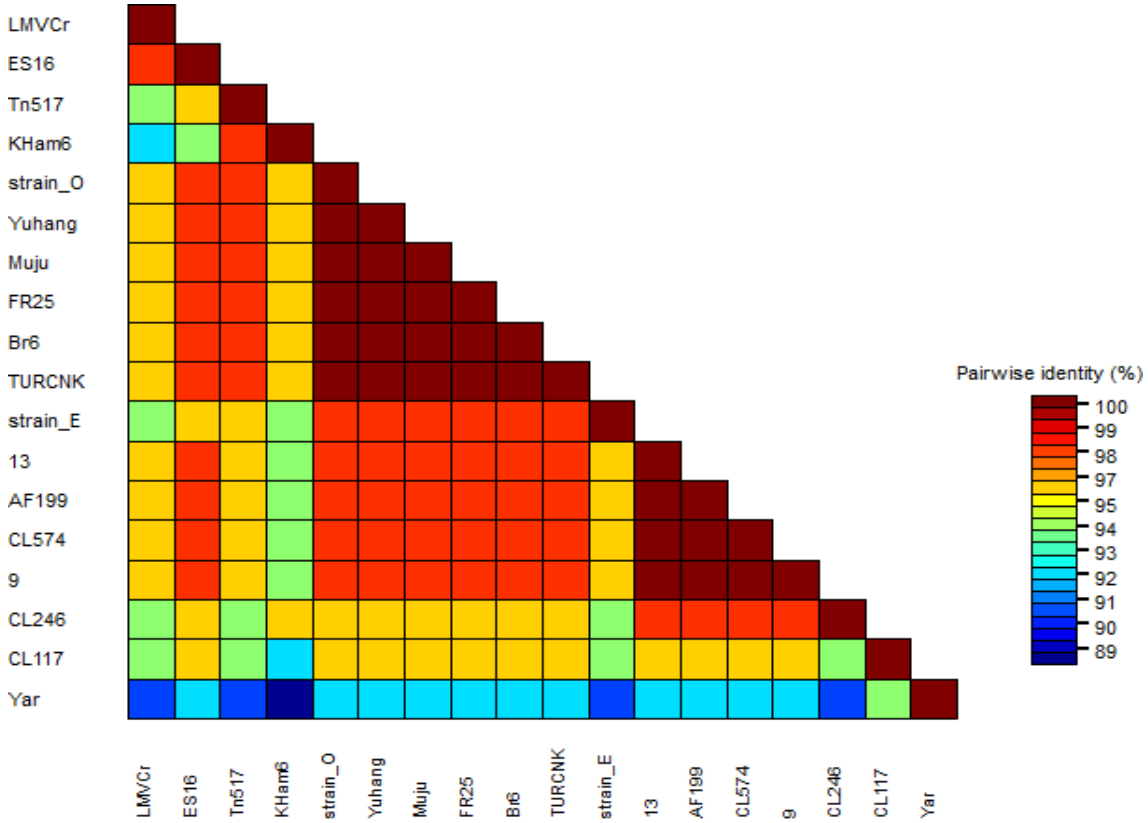
6K1 geninin nükleotit dizilimlerine göre TURCNK izolatının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında izolatların farklı düzeylerde benzerlik gösterdikleri ve bu oranın %79-100 aralığında olduğu belirlenmiştir. TURCNK LMV izolatı KJ161186 erişim numaralı Fransa izolatı ile %100 oranla en yüksek benzerliği gösterirken, en düşük benzerliği ise %79 oranla KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ile göstermiştir (Şekil 10).



Şekil 10. Marul mozaik virüsü izolatının 6K1 geninin nükleotit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi.

6K1 geninin amino asit dizilimlerine göre TURCNK izolatının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında izolatların %92-100 aralığında benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. TURCNK LMV izolatı KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı, KJ161174 erişim numaralı Brezilya izolatı, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ve X97704, KJ161186 erişim numaralı Fransa izolatları ile %100 oranla en yüksek benzerliği

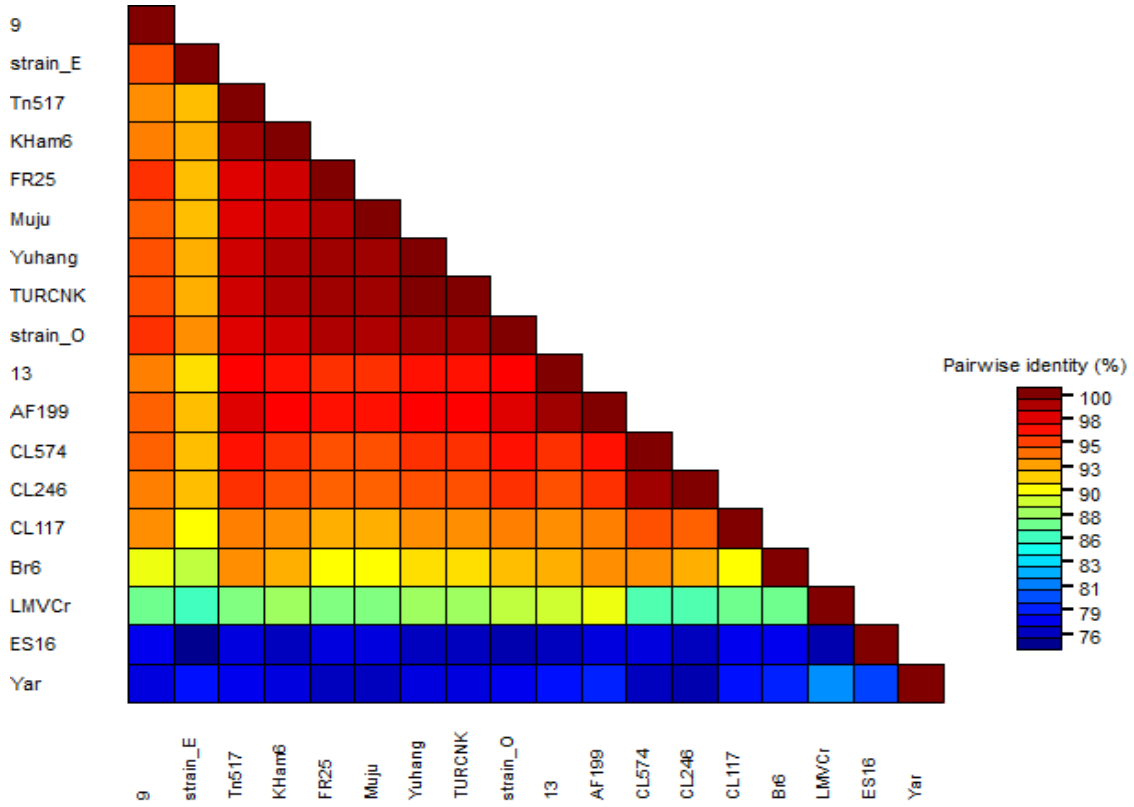
göstermiştir. En düşük benzerliği ise %92 oranla KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatu ile gösterdiği görülmüştür (Şekil 11).



Şekil 11. Marul mozaik virüsü izolatının 6K1 geninin amino asit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi.

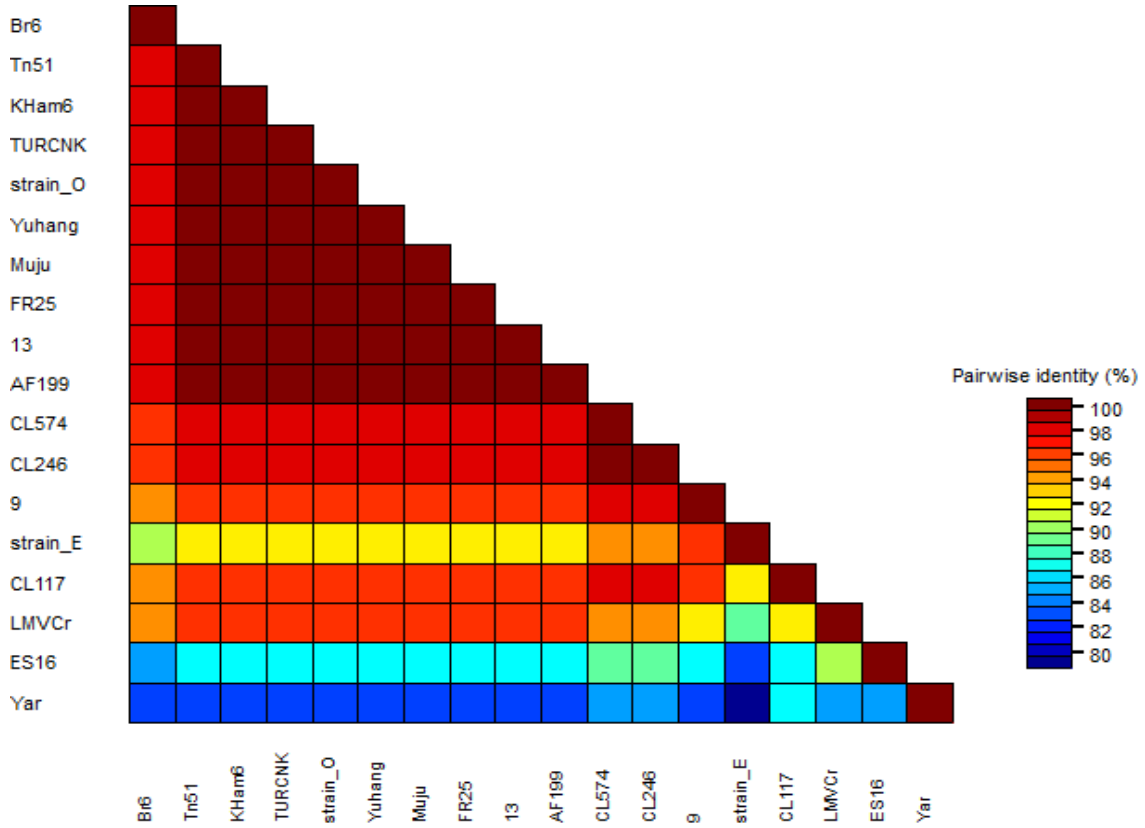
4.3.2. 6K2 Genine Göre Benzerlik Sonuçları

6K2 geninin nükleotit dizilimlerine göre TURCNK LMV izolatının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında izolatların %77-100 aralığında benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. TURCNK izolatının AJ306288 erişim numaralı Çin izolatu ile %100 oranla en yüksek benzerliği gösterirken, en düşük benzerliği ise %77 oranla KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatu ve KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatu ile gösterdiği görülmüştür (Şekil 12).



Şekil 12. Marul mozaik virüsü izolatının 6K2 geninin nükleotit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi.

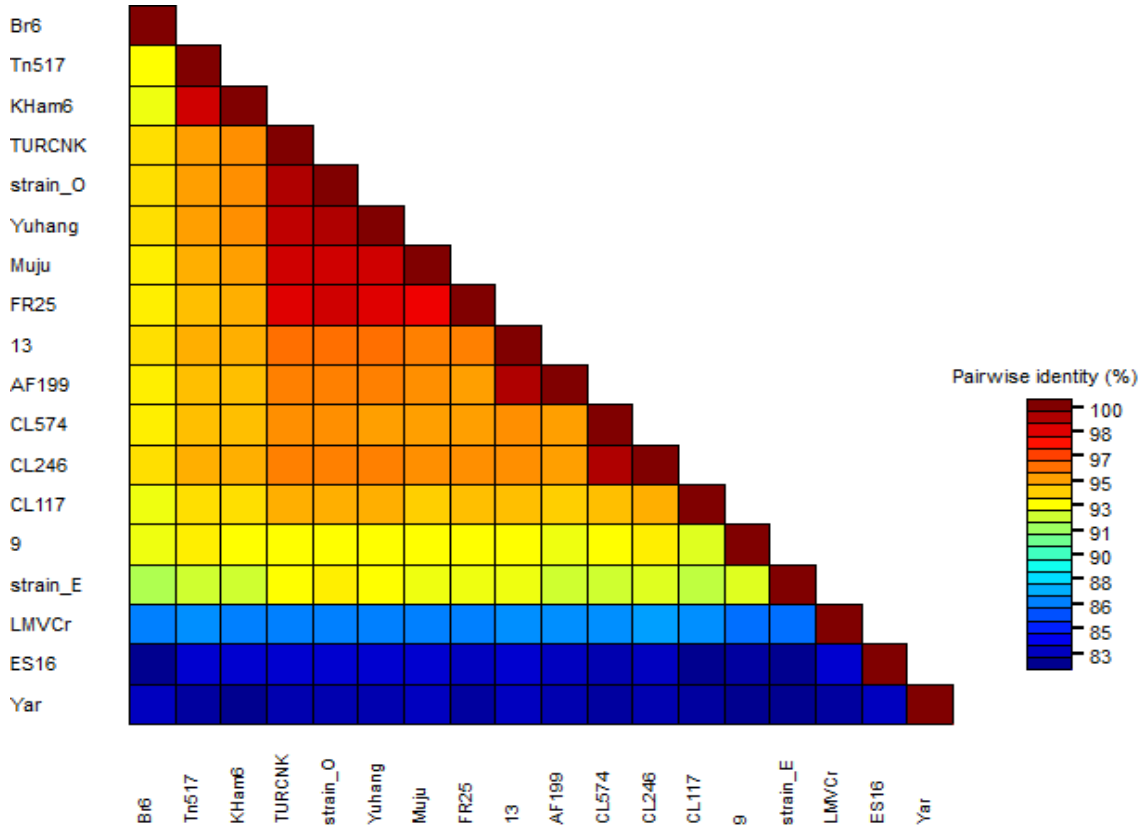
6K2 geni amino asit dizilimlerine göre TURCNK izolatının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında izolatların %83-100 aralığında benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. TURCNK LMV izolatı X97704, KJ161173, KJ161186 erişim numaralı Fransa izolatları, AJ278854 erişim numaralı Brezilya izolatı, KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ve KY440645, KJ161187 erişim numaralı Tunus izolatları ile %100 oranla en yüksek benzerliği göstermiştir. En düşük benzerliği ise %84 oranla KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ile gösterdiği görülmüştür (Şekil 13).



Şekil 13. Marul mozaik virüsü izolatının 6K2 geninin amino asit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi.

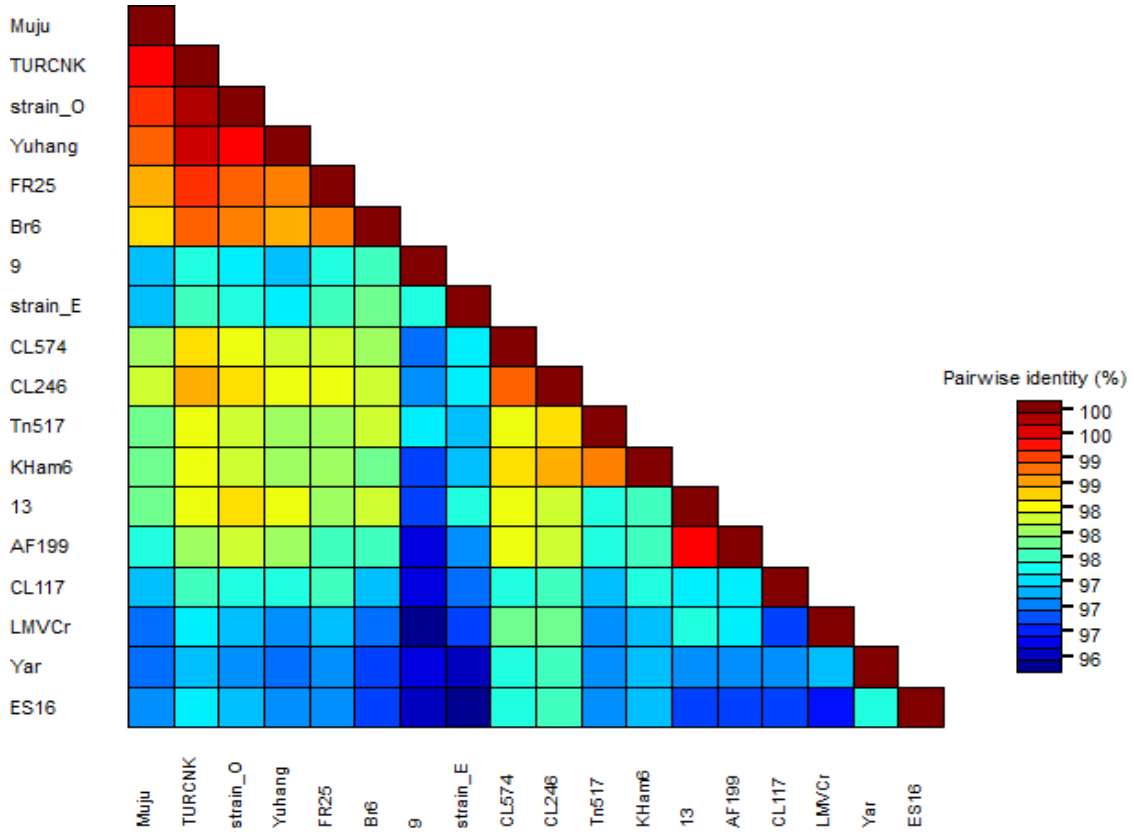
4.3.3. CI Genine Göre Benzerlik Sonuçları

CI geninin nükleotit dizilimlerine göre TURCNK LMV izolatının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında izolatların %84-99 aralığında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. TURCNK LMV izolatı X97704 erişim numaralı Fransa izolatı ve AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı %99 oranla en yüksek benzerliği gösterirken, en düşük benzerliği ise %84 oranla KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ve KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatı ile gösterdiği görülmüştür (Şekil 14).



Şekil 14. Marul mozaik virüsü izolatının CI geninin nükleotit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi.

CI geninin amino asit dizilimlerine göre TURCNK izolatının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında izolatların %97-100 aralığında benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. TURCNK LMV izolatı X97704 erişim numaralı Fransa izolatı ve AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ile %100 oranla en yüksek benzerliği gösterirken, en düşük benzerliği ise %97 oranla KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ile gösterdiği görülmüştür (Şekil 15).



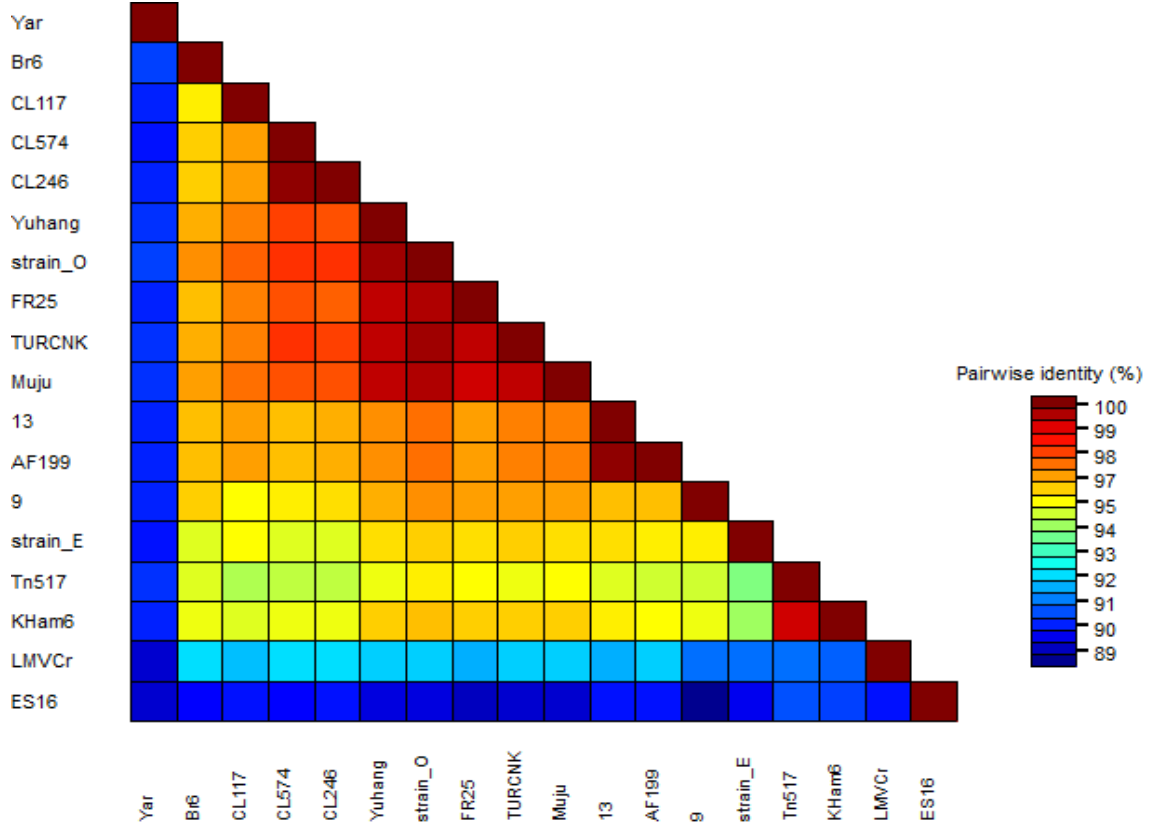
Şekil 15. Marul mozaik virüsü izolatının CI geninin amino asit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi.

Revers, vd., (1997b: 174), yaptıkları çalışmada marul bitkilerinden elde ettikleri iki izolatın tüm genom sekans dizilerini belirleyerek bu dizilerin karşılaştırmalarını gerçekleştirmişlerdir. LMV-E ve LMV-O izolatlarının tüm genom karşılaştırmaları sonucunda CI geni bakımından nükleotit düzeyinde en düşük benzerliğin %91 oranında, en yüksek benzerliğin ise %96 oranında olduğunu belirtmişlerdir. Amino asit düzeyinde ise en düşük benzerliğin %92 oranında, en yüksek benzerliğin ise %100 oranında olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışma ve bizim elde ettiğimiz benzerlik çalışması sonuçları birbirine çok yakındır.

4.3.4. CP Genine Göre Benzerlik Sonuçları

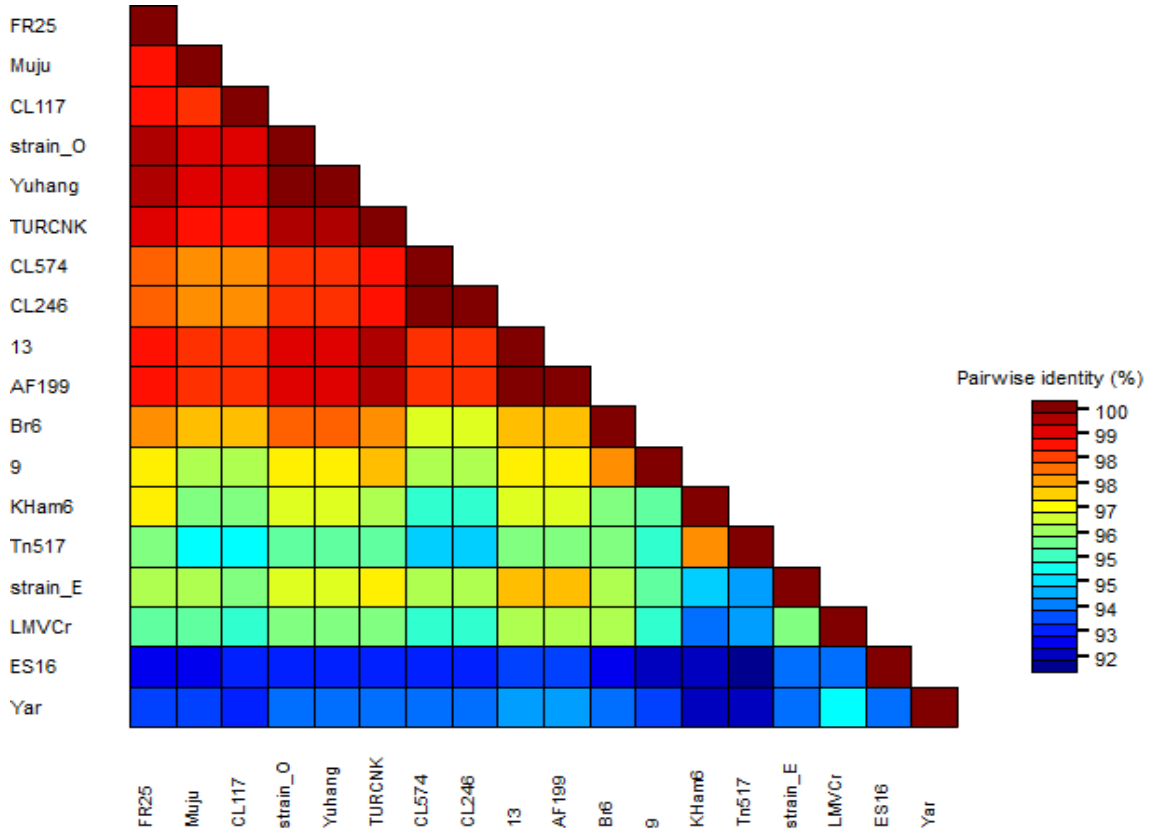
CP geninin nükleotit dizilimlerine göre TURCNK LMV izolatının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında izolatların %90-100 aralığında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. TURCNK LMV izolatı X97704 erişim numaralı Fransa izolatı ile %100 oranla en yüksek benzerliği gösterirken, en düşük benzerliği ise %90 oranla KJ161194 erişim

numaralı Yemen izolatu ve KJ16118 erişim numaralı İspanya izolatu ile gösterdiği görülmüştür (Şekil 16).



Şekil 16. Marul mozaik virüsü izolatuının CP geninin nükleotit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatlari ile göstermiş olduklari benzerlik matrisi.

CP geninin amino asit dizilimlerine göre TURCNK izolatuının dünya izolatlari ile ilişkilerine bakıldığında izolatlariın %93-99 aralıgında benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. TURCNK LMV izolatuı AJ278854 erişim numaralı Brezilya izolatuı, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatuı ve KJ161173, X97704 erişim numaralı Fransa izolatlari ile %99 oranla en yüksek benzerliğı göstermiştir. En düşük benzerliğı ise %93 oranla KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatuı ile gösterdiği görülmüştür (Şekil 17).



Şekil 17. Marul mozaik virüsü izolatının CP geninin amino asit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi.

Benzer bir çalışmada Zerbini, vd., (1995: 748), Kaliforniya'dan elde etmiş oldukları LMV izolatlarına CP genleri bakımından sekans analizleri yaparak benzerlik oranlarını belirlemişlerdir. LMV-R ve LMV-O izolatlarının arasındaki karşılaştırmalar sonucunda nükleotit dizilimleri bakımından izolatların %99 oranında, amino asit düzeyinde ise %95 ile %99 arasında benzerlik oranı gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada Doğu Akdeniz Bölgesi'nde marul bitkisinde görülen virüs hastalıklarını belirlemek amacıyla çalışmalar yürütülmüştür. Elde edilen izolatlardan bir tanesinin sekans analizi gerçekleştirilerek CP geni bakımından dünyadaki LMV izolatları ile gösterdiği benzerlik ilişkilerine bakılmıştır. Sekans analizleri sonucunda izolatın Brezilya izolatları ile %96 oranında, Çin izolatları ile %91 oranında benzerlik gösterdiğini tespit etmiştir (Alan ve Kamberoğlu 2012: 91). Bir başka çalışmada ise Karanfil, vd., (2018: 365), Türkiye'nin Güney Marmara illerinden marul yetiştirilen alanlardan elde ettikleri LMV izolatlarının CP geninin amino asit ve nükleotit dizilimlerini çıkarmışlardır. Analizler sonucunda elde ettikleri nükleotit ve amino asit dizilimlerini kullanarak LMV

izolatlarının birbirleri ile ve dünyadaki LMV izolatları ile benzerlik ve filogenetik ilişkilerinin ortaya koymuşlardır. İzolatların, nükleotit dizilimleri bakımından %89 ile %99 oranında, amino asit dizilimleri bakımından ise %93 ile %100 oranlarında benzer olduğunu saptamıştır.

Sharma ve Jain (2013: 849), Hindistan’da yapılan bir çalışmada marul alanlarından simptom gösteren bitkilerden elde edilen bir adet LMV izolatının moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu izolatı, gen bankasında bulunan AJ297630 erişim numaralı Birleşik Krallık izolatı, NC003605 erişim numaralı ABD izolatı, AJ278854 erişim numaralı Brezilya izolatı ve AJ488153, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatları ile CP genleri bakımından kıyaslamışlardır. CP genlerinin, nükleotit düzeyinde %96 ile %100 arasında, amino asit düzeyinde %90 ile %99 arasında benzerlik gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

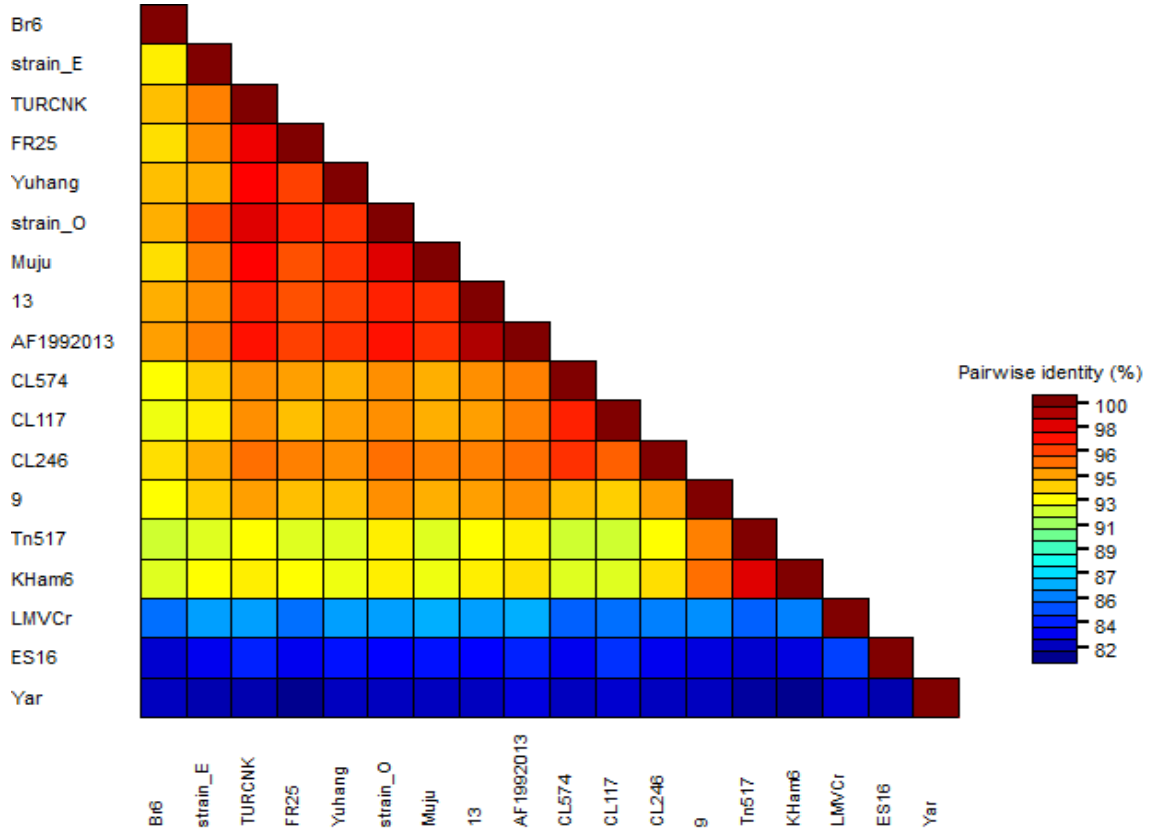
Bir diğer çalışmada ise Cheng, vd., (2019), Tayvan’da bezelye üretim bölgelerinden elde ettikleri izolatların moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları analizler sonucunda İki RT-PCR amplifikonu klonlanmış, sekanslanmış ve kılıf protein genleri bakımından gen bankasında bulunan KJ161185 erişim numaralı Fransa izolatı ile %87,1 ve JQ794776 erişim numaralı Hindistan izolatı ile %97,5 oranında bir benzerlik göstermiştir. İki izolat kendi arasında ise nükleotit düzeyinde %97,1 ve amino asit düzeyinde ise %97,5 oranında benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmalardan da anlaşılacağı üzere çalışma sonuçları birbirleri ile paralellik göstermektedir.

Gerek ülkemizde gerekse dünyada yapılan çalışmalarda bizim elde ettiğimiz sonuçlara paralel olarak marul mozaik virüsü izolatlarının CP genine göre hem nükleotit hemde amino asit düzeyinde genel olarak %90’ın üzerinde bir benzerlik gösterdiği görülmektedir.

4.3.5. HC-Pro Genine Göre Benzerlik Sonuçları

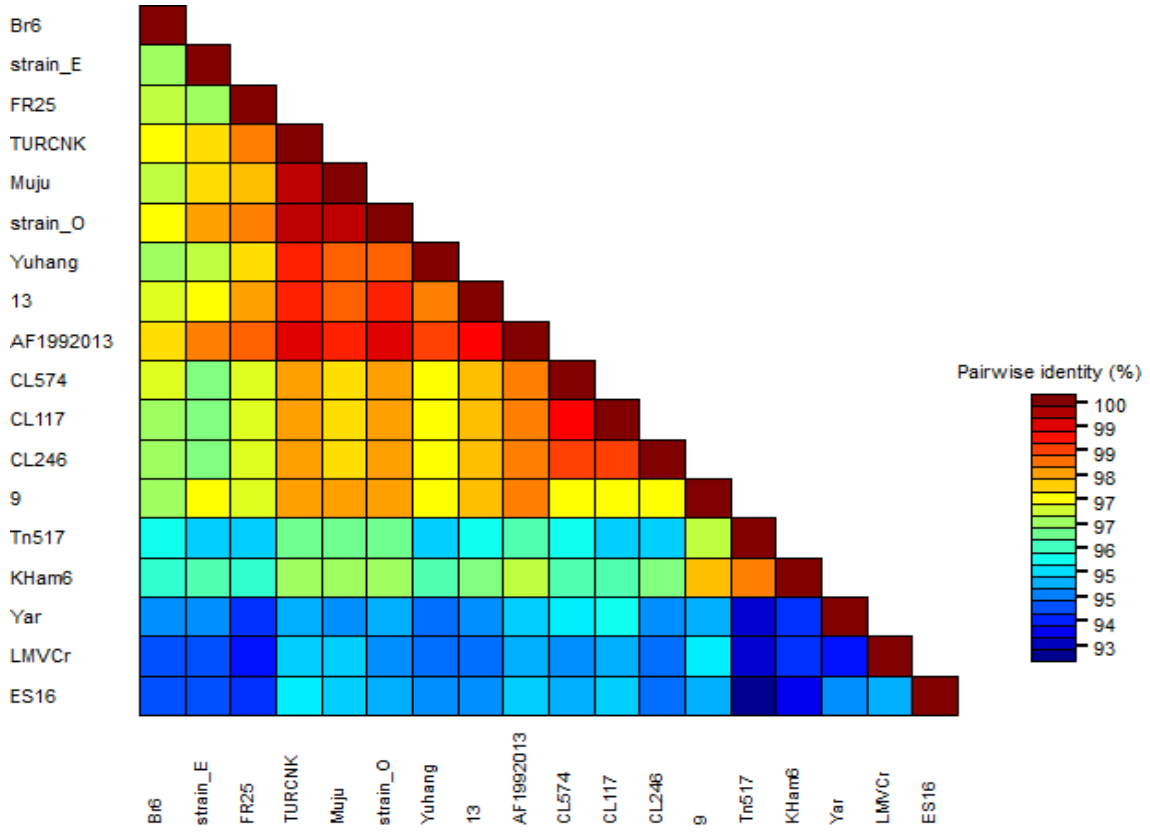
HC-Pro geninin nükleotit dizilimine göre TURCNK LMV izolatının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında izolatların %83-98 aralığında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. TURCNK LMV izolatı X97704 erişim numaralı Fransa izolatı ile %98 oranında

en yüksek benzerliği gösterirken, en düşük benzerliği ise %83 oranla KJ161194 erişim numarası ile gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 18).



Şekil 18. Marul mozaik virüsü izolatının HC-Pro geninin nükleotit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi.

HC-Pro geninin amino asit dizilimine göre TURCNK izolatının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında izolatların %95-99,5 aralığında benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. TURCNK LMV izolatı KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı ve K97704 erişim numaralı Fransa izolatı ile %99,5 oranla en yüksek benzerliği gösterirken, en düşük benzerliği ise %95 oranla KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ile gösterdiği görülmüştür (Şekil 19).



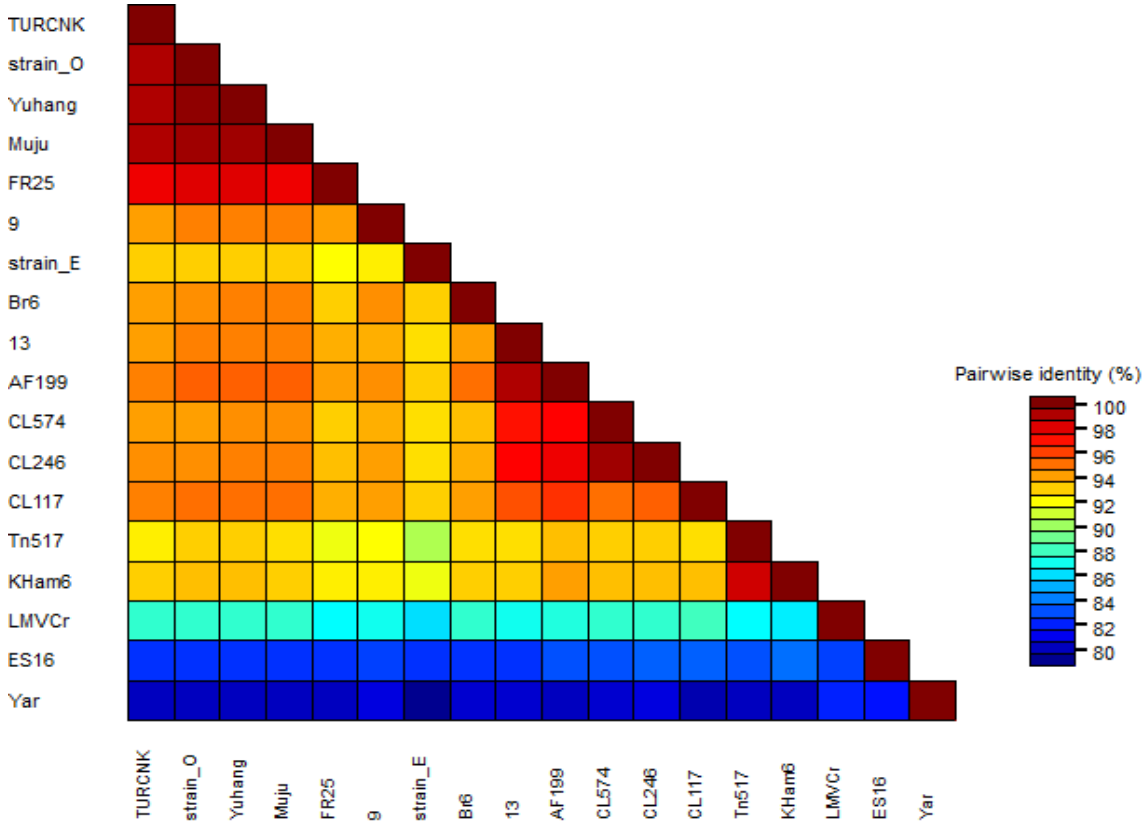
Şekil 19. Marul mozaik virüsü izolatının HC-Pro geninin amino asit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi.

Revers, vd., (1997b: 172), yaptıkları çalışmada marul bitkilerinden elde ettikleri iki izolatın tüm genom sekans dizilerini belirleyerek bu dizilerin karşılaştırmalarını gerçekleştirmişlerdir. LMV-E ve LMV-O izolatlarının tüm genom karşılaştırmaları sonucunda HC-Pro geni bakımından nükleotit düzeyinde en düşük benzerliğin %91 oranında, en yüksek benzerliğin ise %99 oranında olduğunu belirtmişlerdir. Amino asit düzeyinde ise en düşük benzerliğin %90 oranında, en yüksek benzerliğin ise %100 oranında olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışma ve bizim çalışmamız benzer sonuçları içermektedir

4.3.6. NIa Genine Göre Benzerlik Sonuçları

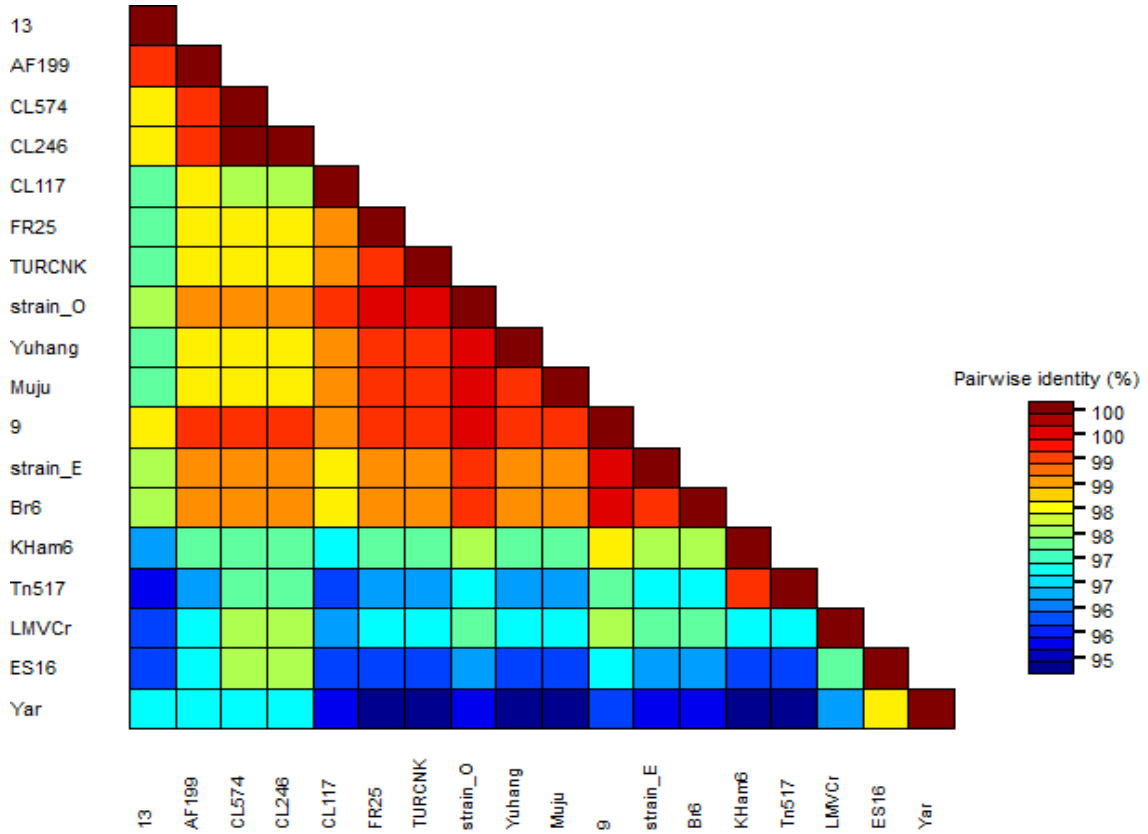
NIa geninin nükleotit dizilimlerine göre TURCNK LMV izolatının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında izolatların %82-99 aralığında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. TURCNK LMV izolatı K97704 erişim numaralı Fransa izolatı, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ve KF955619 erişim numarası Güney Kore izolatı ile %99 oranında

en yüksek benzerliği göstermiştir. En düşük benzerlik ise %82 oranla KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ile gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 20).



Şekil 20. Marul mozaik virüsü izolatının N1a geninin nükleotit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi.

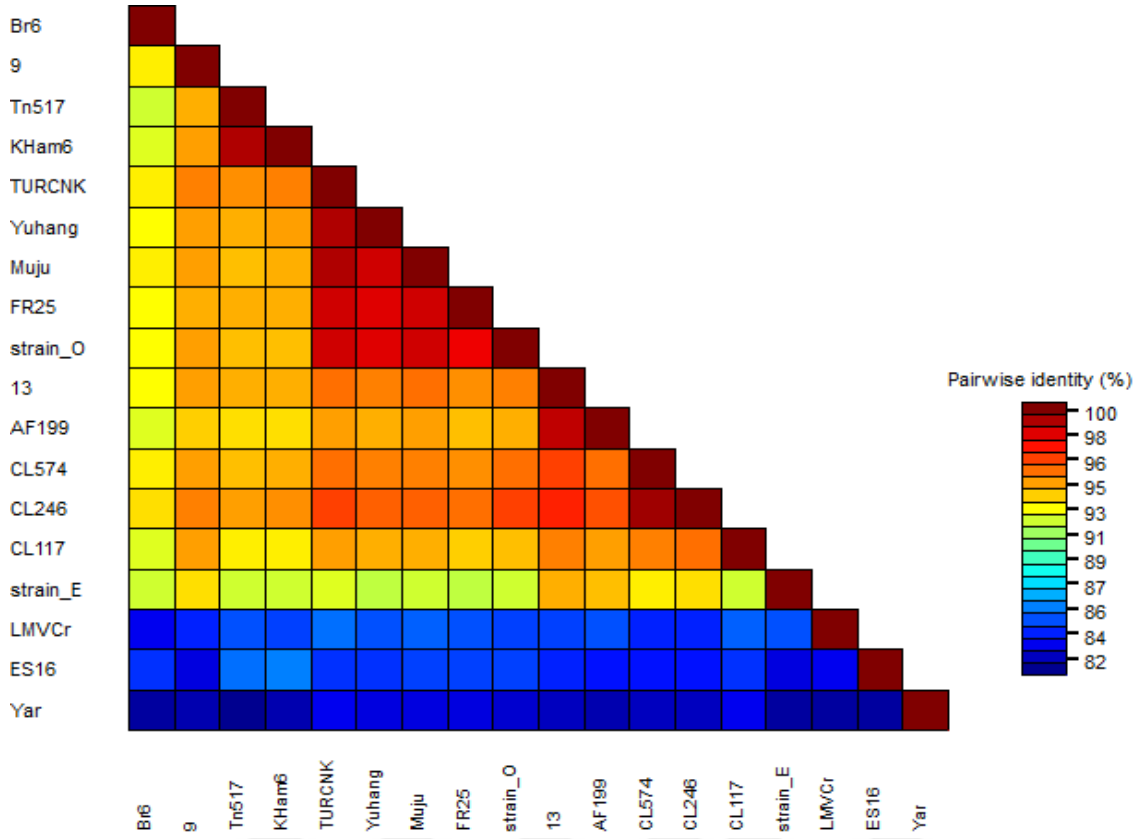
N1a geninin amino asit dizilimlerine göre TURCNK izolatının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında izolatların %95-100 aralığında benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. TURCNK LMV izolatı K97704 erişim numaralı Fransa izolatı ile %100 oranla en yüksek benzerliği gösterirken, en düşük benzerliği ise %95 oranla KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ile gösterdiği görülmüştür (Şekil 21).



Şekil 21. Marul mozaik virüsü izolatının NIa geninin amino asit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi.

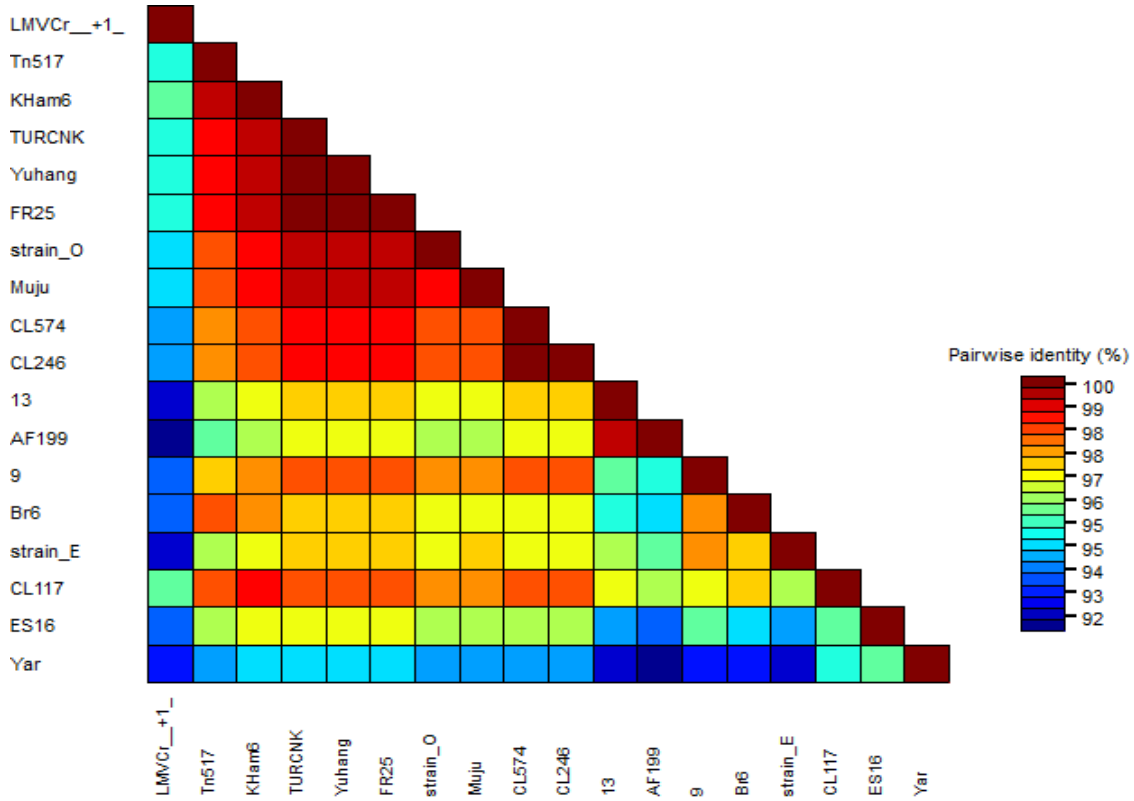
4.3.7. NIa-VPg Genine Göre Benzerlik Sonuçları

NIa-VPg geninin nükleotit dizilimlerine göre TURCNK LMV izolatının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında izolatların %84-99 aralığında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. TURCNK LMV izolatı AJ306288 ve KF955619 erişim numaralı sırası ile Çin ve Güney Kore izolatları ile %99 oranla en yüksek benzerliği gösterirken, en düşük benzerliği ise %84 oranla KJ161194 erişim numaralı Yemen ve KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatı ile gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 22).



Şekil 22. Marul mozaik virüsü izolatının NIa-VPg geninin nükleotit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi.

NIa-VPg geninin amino asit dizilimlerine göre TURCNK izolatının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında izolatların %95-100 aralığında benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. TURCNK LMV izolatı AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ve KJ161186 erişim numaralı Fransa izolatı ile %100 oranla en yüksek benzerliği gösterirken, en düşük benzerliği ise %95 oranla KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ve KF268956 erişim numaralı Fransa izolatı ile gösterdiği görülmüştür (Şekil 23).



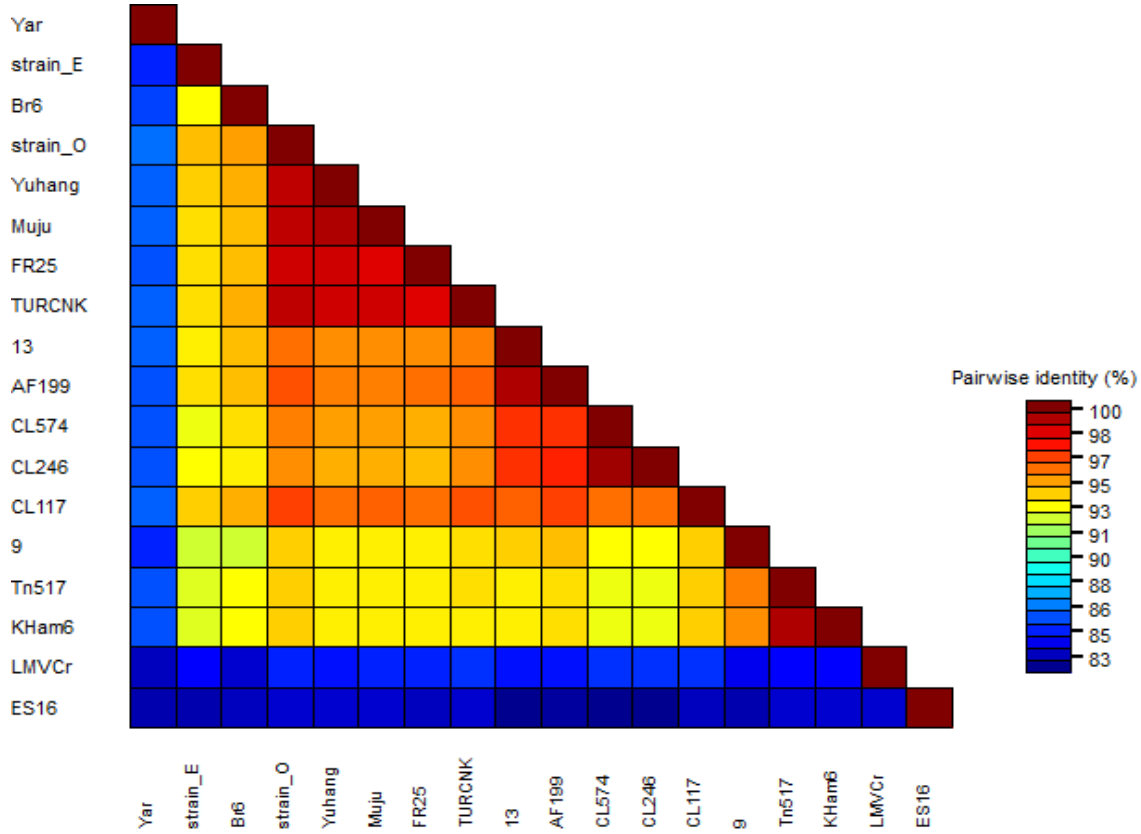
Şekil 23. Marul mozaik virüsü izolatının NIa-VPg geninin amino asit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi.

Revers, vd., (1997b: 174), marul bitkilerinden elde ettikleri iki izolatın tüm genom sekans dizilerini belirleyerek bu dizilerin karşılaştırmalarını gerçekleştirmişlerdir. LMV-E ve LMV-O izolatlarının tüm genom karşılaştırmaları sonucunda NIa-VPg geni bakımından nükleotit düzeyinde en düşük benzerliğin %88 oranında, en yüksek benzerliğin ise %94 oranında olduğunu amino asit düzeyinde ise en düşük benzerliğin %94 oranında, en yüksek benzerliğin ise %99 oranında olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada bizim çalışmamızla uyumlu olarak görünmektedir.

4.3.8. Nİb Genine Göre Benzerlik Sonuçları

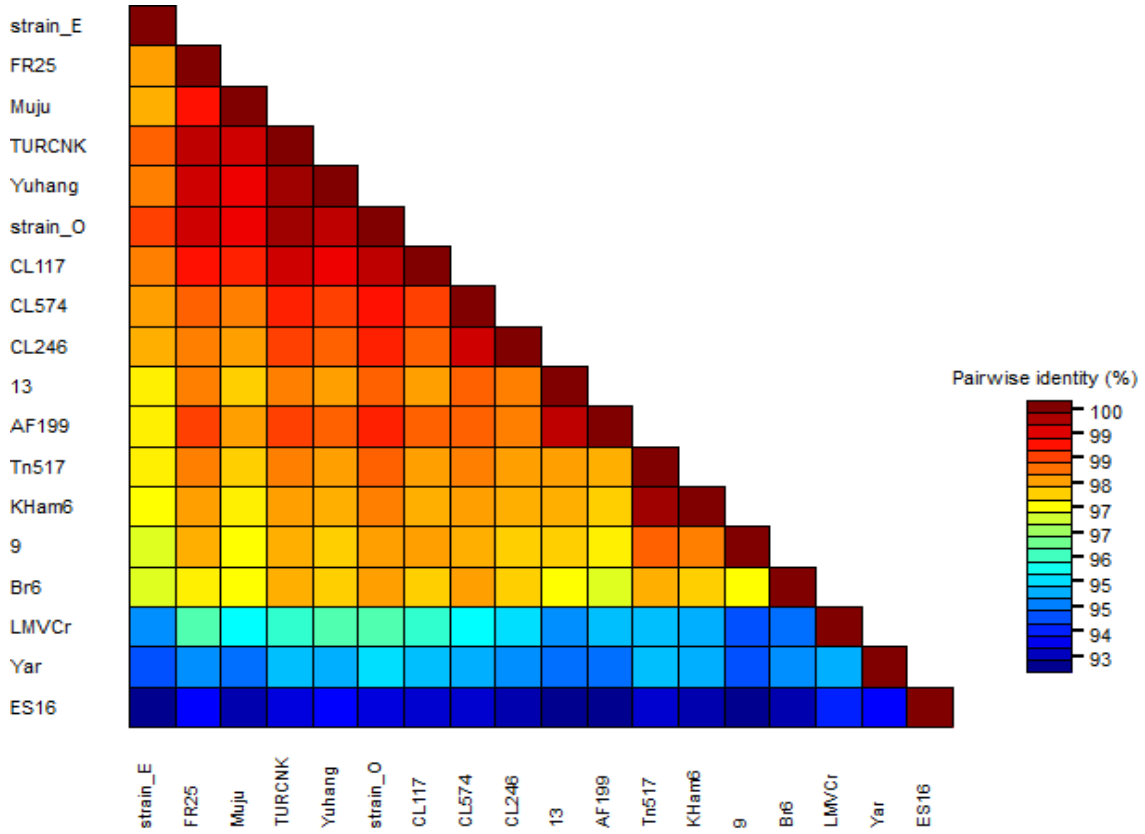
Nİb geninin nükleotit dizilimlerine göre TURCNK LMV izolatının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında izolatların %84-99 aralığında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. TURCNK LMV izolatı X97704 erişim numaralı Fransa izolatı, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ve KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı ile %99 oranında en

yüksek benzerliği gösterirken, en düşük benzerliği ise %84 oranla KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatı ve KF268956 erişim numaralı Fransa izolatı ile göstermiştir (Şekil 24).



Şekil 24. Marul mozaik virüsü izolatının Nİb geninin nükleotit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi.

Nİb geninin amino asit dizilimlerine göre TURCNK izolatının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında izolatların %94-99,5 aralığında benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. TURCNK LMV izolatı AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ve X97704 erişim numaralı Fransa izolatı ile %99,5 oranla en yüksek benzerliği gösterirken, en düşük benzerliği ise %94 oranla KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatı ile gösterdiği görülmüştür (Şekil 25).



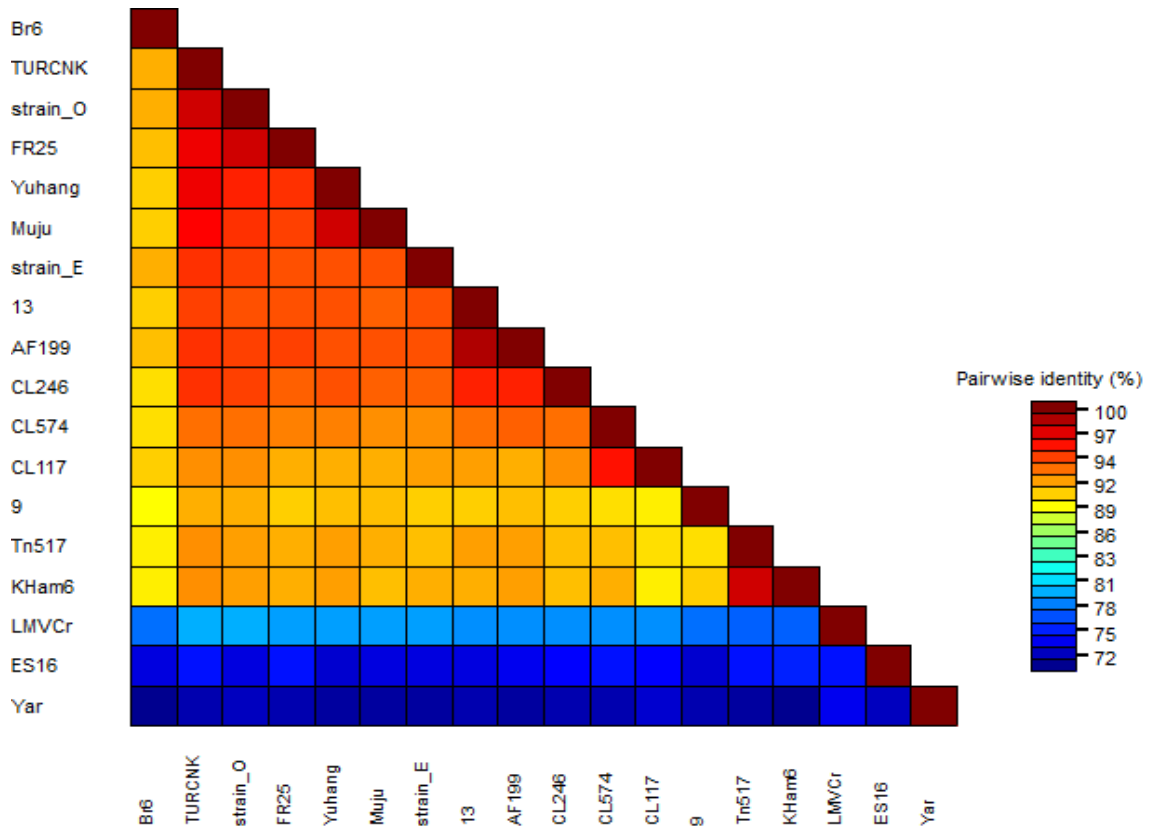
Şekil 25. Marul mozaik virüsü izolatının Nİb geninin amino asit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi.

Revers, vd., (1997b: 174), yaptıkları çalışmada marul bitkilerinden elde ettikleri LMV-E ve LMV-O izolatlarının tüm genom sekans dizilerini belirleyerek bu dizilerin karşılaştırmalarını gerçekleştirmişlerdir. Tüm genom karşılaştırmaları sonucunda Nİb geni bakımından nükleotit düzeyinde en düşük benzerliğin %92 oranında, en yüksek benzerliğin ise %97 oranında olduğunu belirtmişlerdir. Amino asit düzeyinde ise en düşük benzerliğin %95 oranında, en yüksek benzerliğin ise %100 oranında olduğunu tespit etmişlerdir.

Sharma ve Jain (2013: 849), Hindistan’da 2012 yılında yapılan bir çalışmada marul alanlarından elde edilen izolatların moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu izolatların, gen bankasında bulunan AJ488153, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatları, NC003605 erişim numaralı ABD izolatı, AJ297630 erişim numaralı Birleşik Krallık izolatı, AJ278854 erişim numaralı Brezilya izolatı ile Nİb genleri bakımından kıyaslamışlardır. Nİb geninin, nükleotit düzeyinde %93 ile %96 arasında benzer olduğunu belirlemişlerdir.

4.3.9. P1 Genine Göre Benzerlik Sonuçları

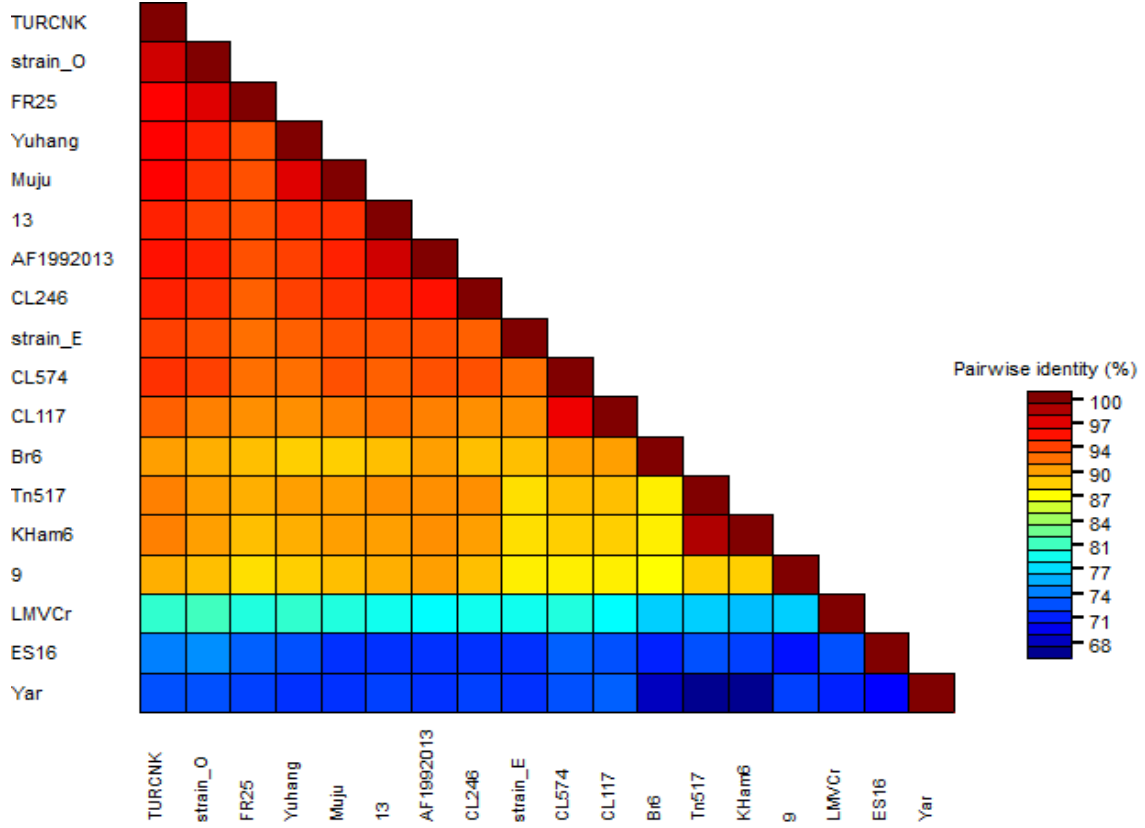
P1 geninin nükleotit dizilimine göre TURCNK LMV izolatının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında izolatların %75-98 aralığında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. TURCNK LMV izolatı X97704 erişim numaralı Fransa izolatı ile %98 oranla en yüksek benzerliği gösterirken, en düşük benzerliği ise %75 oranla KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ve KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatı ile gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 26).



Şekil 26. Marul mozaik virüsü izolatının P1 geninin nükleotit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi.

P1 geninin amino asit dizilimine göre TURCNK izolatının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında izolatların %74-98 aralığında benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. TURCNK LMV izolatı X97704 erişim numaralı Fransa izolatı ile %98 oranla en yüksek benzerliği gösterirken, en düşük benzerliği ise %74 oranla KJ161194 erişim numaralı

Yemen izolatu ve KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatu ile gösterdiği görülmüştür (Şekil 27).

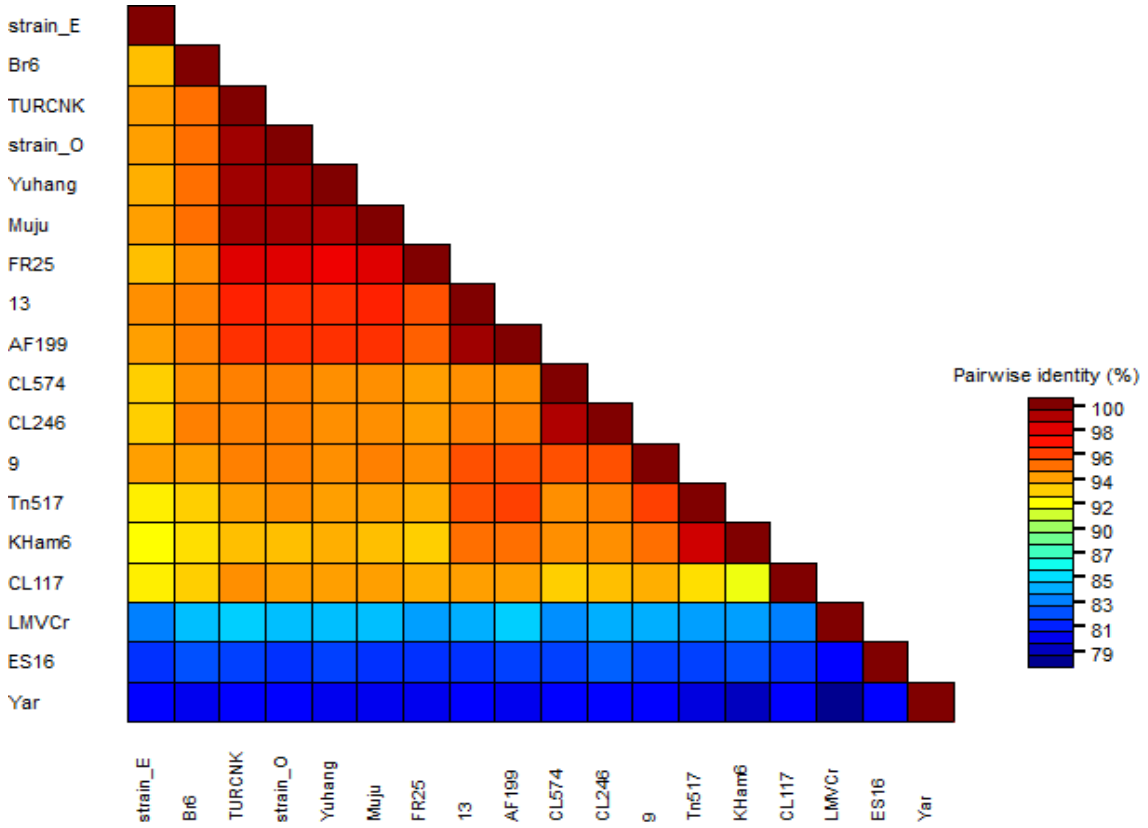


Şekil 27. Marul mozaik virüsü izolatuının P1 geninin amino asit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi.

Revers, vd., (1997b: 172), yaptıkları çalışmada marul bitkilerinden elde ettikleri iki izolatuın tüm genom sekans dizilerini belirleyerek bu dizilerin karşılaştırmalarını gerçekleştirmişlerdir. LMV-E ve LMV-O izolatlarının tüm genom karşılaştırmaları sonucunda P1 geni bakımından nükleotit düzeyinde en düşük benzerliğin %91,5 oranında, en yüksek benzerliğin ise %98 oranında olduğunu belirtmişlerdir. Amino asit düzeyinde ise en düşük benzerliğin %86 oranında, en yüksek benzerliğin ise %98 oranında olduğunu tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda elde edilen benzerlik oranları daha düşük olarak gerçekleşmiştir.

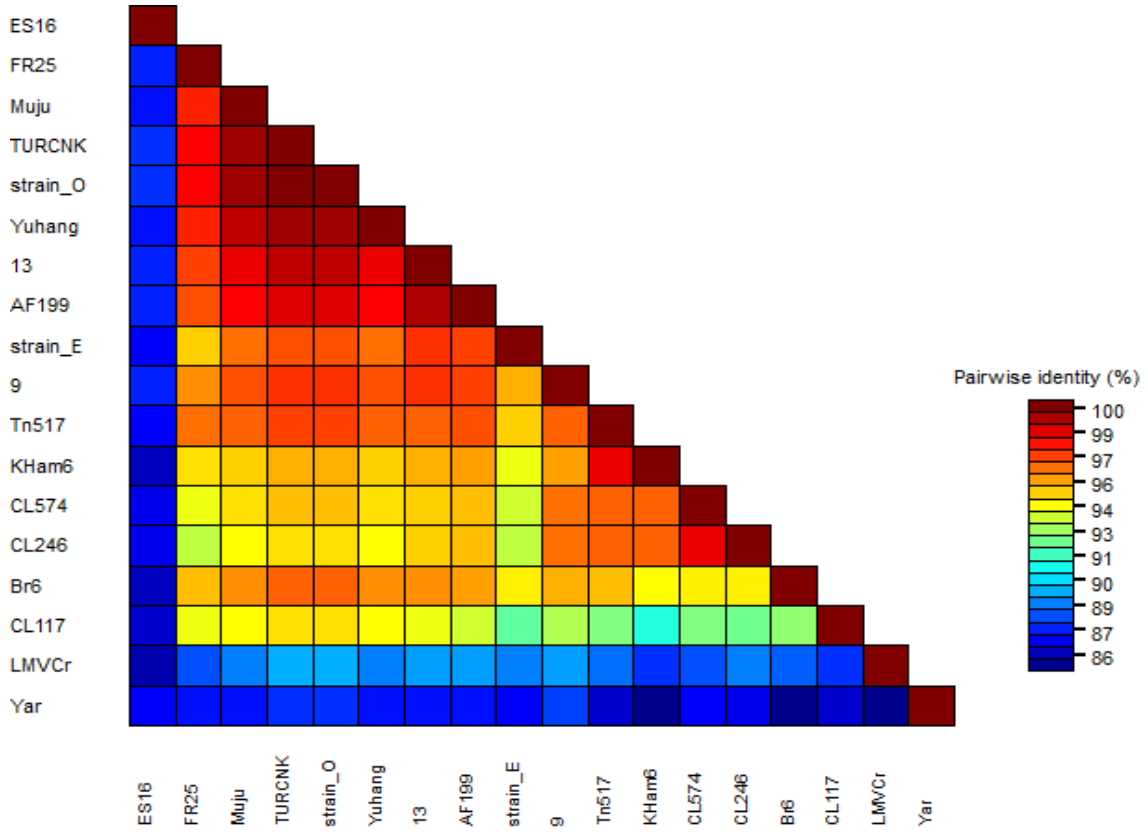
4.3.10. P3 Genine Göre Benzerlik Sonuçları

P3 geninin nükleotit dizilimlerine göre TURCNK LMV izolatının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında izolatların %81-99,5 aralığında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. TURCNK LMV izolatı X97704 erişim numaralı Fransa izolatı, AJ306288, KF955619 erişim numaralı sırası ile Çin ve Güney Kore izolatları ile %99,5 oranla en yüksek benzerliği göstermiştir. En düşük benzerliği ise %81 oranla KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ve KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatı ile gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 28).



Şekil 28. Marul mozaik virüsü izolatının P3 geninin nükleotit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi.

P3 geninin amino asit dizilimine göre TURCNK izolatının dünya izolatları ile ilişkilerine bakıldığında izolatların %87-100 aralığında benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. TURCNK LMV izolatı X97704 erişim numaralı Fransa izolatı ile %100 oranla en yüksek benzerliği gösterirken, en düşük benzerliği ise %86 oranla KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatı ile gösterdiği görülmüştür (Şekil 29).



Şekil 29. Marul mozaik virüsü izolatının P3 geninin amino asit dizilimlerine göre dünya marul mozaik virüsü izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik matrisi.

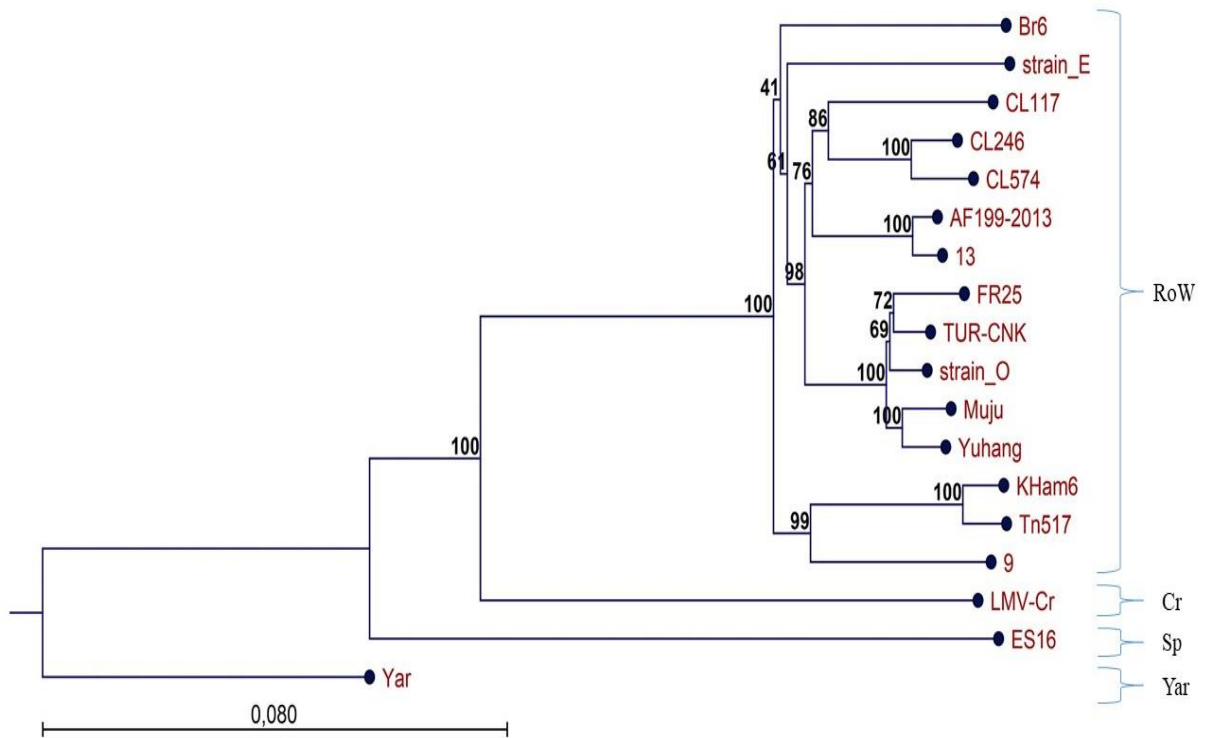
Revers, vd., (1997b: 174), marul bitkilerinden elde ettikleri iki izolatın tüm genom sekans dizilerini belirleyerek bu dizilerin karşılaştırmalarını gerçekleştirmişlerdir. LMV-E ve LMV-O izolatlarının tüm genom karşılaştırmaları sonucunda P3 geni bakımından nükleotit düzeyinde en düşük benzerliğin %90 oranında, en yüksek benzerliğin ise %96,8 oranında olduğunu, amino asit düzeyinde ise en düşük benzerliğin %95 oranında, en yüksek benzerliğin ise %100 oranında olduğunu tespit etmişlerdir.

4.4. Filogenetik Analiz Sonuçları

TURCNK izolatının tüm genom nükleotit dizilimleri kullanılarak oluşturulan ve ilk aşamada 5 gruba ayrılan filogenetik soyağacın tüm genom analizlerinde 4 gruba ayrıldığı görülmektedir. Bunun sebebinin ise Yunanistan orjinli izolatların tüm genom analizleri bulunmadığı için yapılan soyağaçta yer almamasıdır.

Soyağaçta Yar grubunda 1 izolat, Sp grubunda 1 izolat, Cr grubunda 1 izolat ve RoW grubunda ise 15 izolat bulunduğu görülmektedir. Filogenetik soyağaç daha detaylı incelendiğinde ise; Yar grubunda KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatu, Sp grubunda KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatu ve Cr grubunda KF268956 Erişim numaralı Fransa izolatu bulunmaktadır. RoW grubunda ise KJ161174, AJ278854 erişim numaralı Brezilya izolatları, KJ161187, KY440645 erişim numaralı Tunus izolatları, KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatu, KJ161186, KJ161173, X97704, X97705, KJ161172 erişim numaralı Fransa izolatları, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatu bulunmaktadır. Son olarak ise KJ161175, KJ161177, KJ161183 erişim numaralı Şili izolatları ve ülkemizden elde edilen izolat bulunmaktadır.

Çalışmada kullanılan LMV izolatu olan TURCNK KJ161186 erişim numarasına sahip olan Fransa izolatu ile en yakın ilişkiyi, ikinci en yakın ilişkiyi ise X97704 erişim numarasına sahip olan yine bir Fransa izolatu ile göstermiştir. TURCNK'nın KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatu ile de en uzak ilişkiyi gösterdiği belirlenerek, RoW grubuna dahil olduğu tespit edilmiştir (Şekil 30).

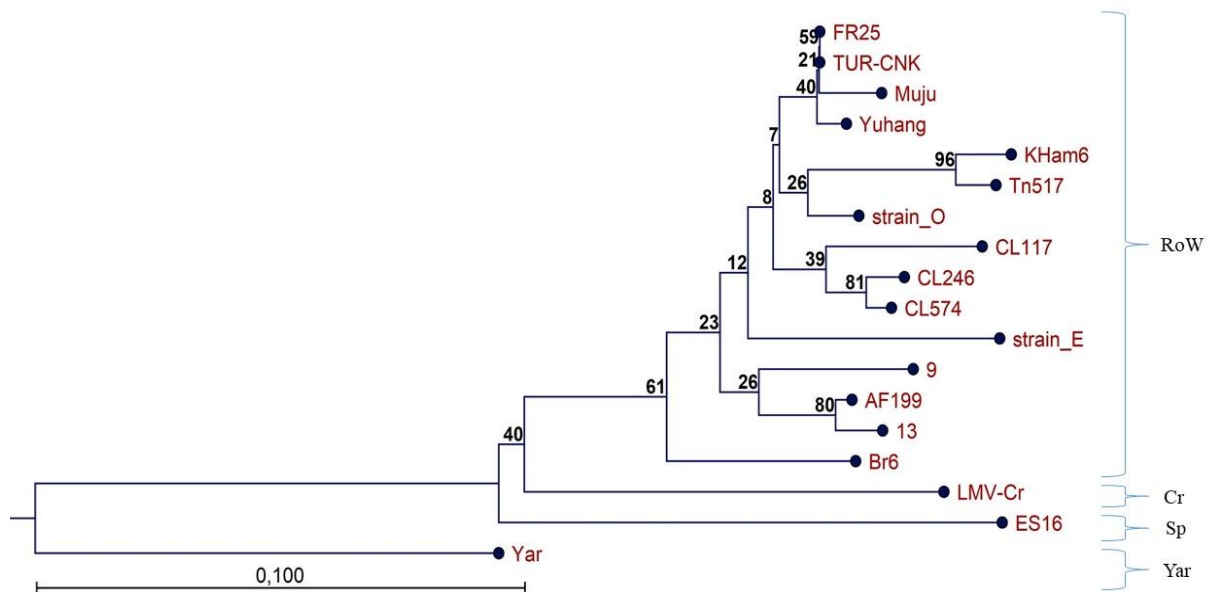


Şekil 30. Marul mozaik virüsü izolatlarının tüm genom nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı.

4.4.1 6K1 Geni Filogenetik Analiz Sonuçları

6K1 geninin nükleotit dizilimlerine göre belirlenen filogenetik soyağaç incelendiğinde, temelde 4 ana gruba ayrıldığı görülmektedir. Sp grubunda 1 izolat, Cr grubunda 1 izolat, Yar grubunda 1 izolat, ve RoW grubunda ise 15 izolat bulunmaktadır. Filogenetik soyağaç daha detaylandırıldığında ise; Yar grubunda KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatının bulunduğu, Cr grubunda KF268956 erişim numaralı Fransa izolatı, Sp grubunda KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatı bulunmaktadır. RoW grubunda ise KJ161187, KY440645 erişim numaralı Tunus izolatları, KJ161175, KJ161177, KJ161183 erişim numaralı Şili izolatları, KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı, KJ161174, AJ278854 erişim numaralı Brezilya izolatları, KJ161186, KJ161173, X97704, X97705, KJ161172 erişim numaralı Fransa izolatları bulunmaktadır. Son olarak ise AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ve ülkemizden elde edilen izolat bulunmaktadır.

TURCNK LMV izolatinın RoW grubuna dahil olduğu belirlenerek, KJ161186 erişim numaralı Fransa izolatu ile en yakın ilişkili ve KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatu ile de ikinci en yakın ilişkili olduğu belirlenmiştir. Gen bankasında bulunan diğer LMV izolatları arasında en uzak ilişkiyi ise KJ161194 erişim numarasına sahip olan Yemen izolatu ile göstermiştir (Şekil 31).

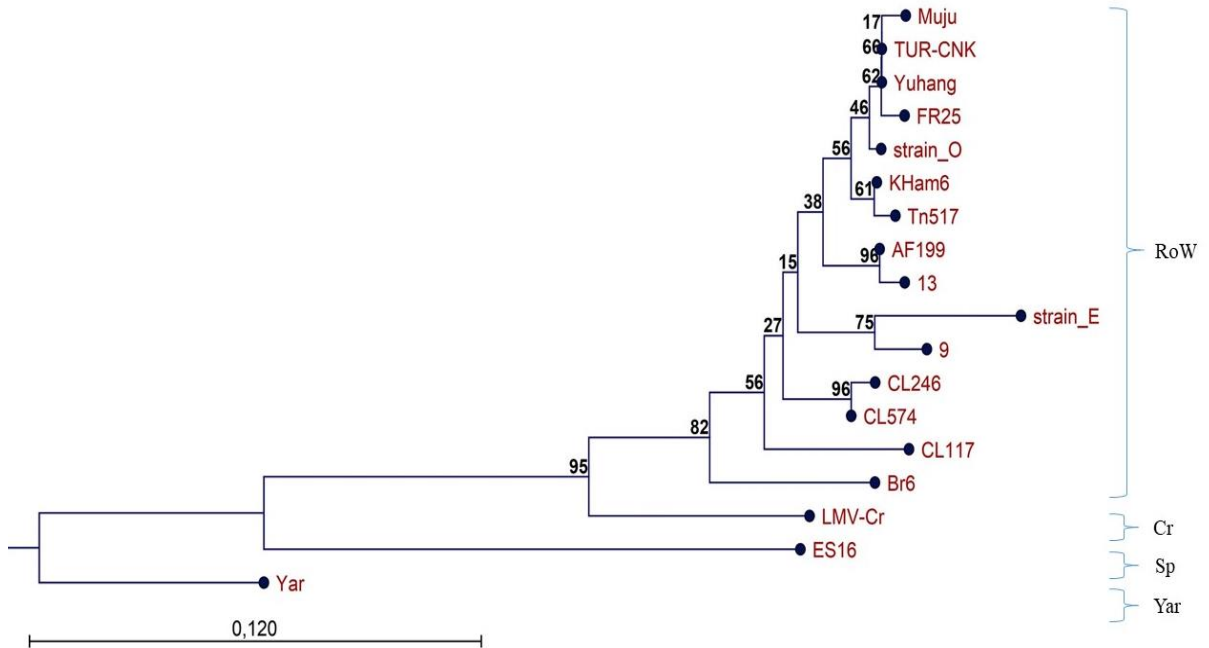


Şekil 31. Marul mozaik virüsü izolatlarının 6K1 geninin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı.

4.4.2. 6K2 Geni Filogenetik Analiz Sonuçları

6K2 geninin nükleotit dizilimlerine göre oluşturulan filogenetik soyağaç incelendiğinde, temelde 4 ana gruba ayrılmış ve Yar grubunda 1 izolat, Sp grubunda 1 izolat, Cr grubunda 1 izolat ve RoW grubunda ise 15 izolat bulunduğu görülmektedir. Filogenetik soyağaç daha detaylandırıldığında ise; Cr grubunda KF268956 erişim numaralı Fransa izolatı, Yar grubunda KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ve Sp grubunda KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatı bulunmaktadır. RoW grubunda ise KJ161174, AJ278854 erişim numaralı Brezilya izolatları, KJ161187, KY440645 erişim numaralı Tunus izolatları, KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı, KJ161186, KJ161173, X97704, X97705, KJ161172 erişim numaralı Fransa izolatları, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı bulunmaktadır. Son olarak ise KJ161175, KJ161177, KJ161183 erişim numaralı Şili izolatları ve ülkemizden elde edilen izolat bulunmaktadır.

Çalışmada kullanılan LMV izolatı TURCNK'nın KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı ve AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ile en yakın ilişkili olarak bulunmuştur. İkinci en yakın ilişkiyi ise KJ161186 erişim numaralı Fransa izolatı ile gösterdiği belirlenerek TURCNK'nın RoW grubuna dahil olduğu tespit edilmiştir (Şekil 32).

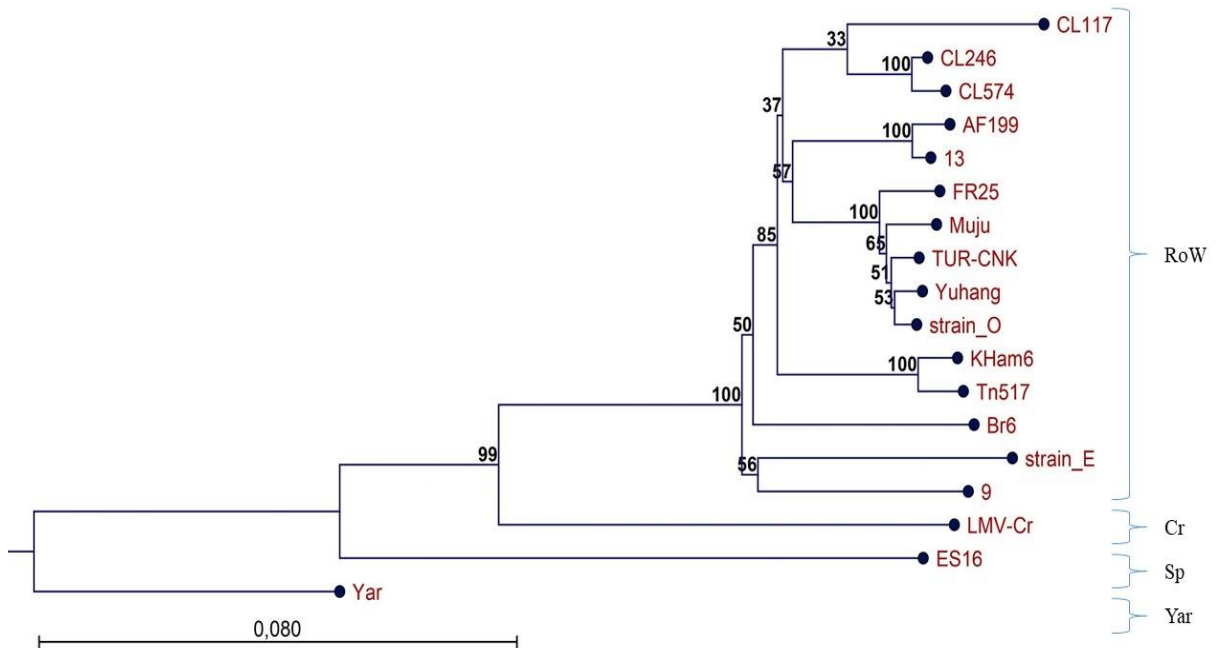


Şekil 32. Marul mozaik virüsü izolatlarının 6K2 geninin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı.

4.4.3. CI Geni Filogenetik Analiz Sonuçları

CI geninin nükleotit dizilimlerine göre şekillenmiş olan filogenetik soyağaç incelendiğinde, temelde 4 ana gruba ayrıldığı görülmektedir. Yar grubunda 1 izolat, Cr grubunda 1 izolat, Sp grubunda 1 izolat ve RoW grubunda ise 15 izolat bulunmaktadır. Filogenetik soyağaç daha detaylı incelendiğinde ise; Cr grubunda KF268956 erişim numaralı Fransa izolatı, Sp grubunda KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatı ve Yar grubunda KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı bulunmaktadır. RoW grubunda ise KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı, KJ161186, KJ161173, X97704, X97705, KJ161172 erişim numaralı Fransa izolatları, KJ161187, KY440645 erişim numaralı Tunus izolatları, KJ161175, KJ161177, KJ161183 erişim numaralı Şili izolatları, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı bulunmaktadır. Son olarak ise KJ161174, AJ278854 erişim numaralı Brezilya izolatları ve ülkemizden elde edilen izolat bulunmaktadır.

TURCNK LMV izolatının RoW grubuna dahil olduğu belirlenerek, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ile en yakın ilişkiyi göstermiştir. X97704 erişim numaralı Fransa izolatı ile ikinci en yakın ilişkiyi ve KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ile de en uzak ilişkiyi gösterdiği görülmektedir (Şekil 33).

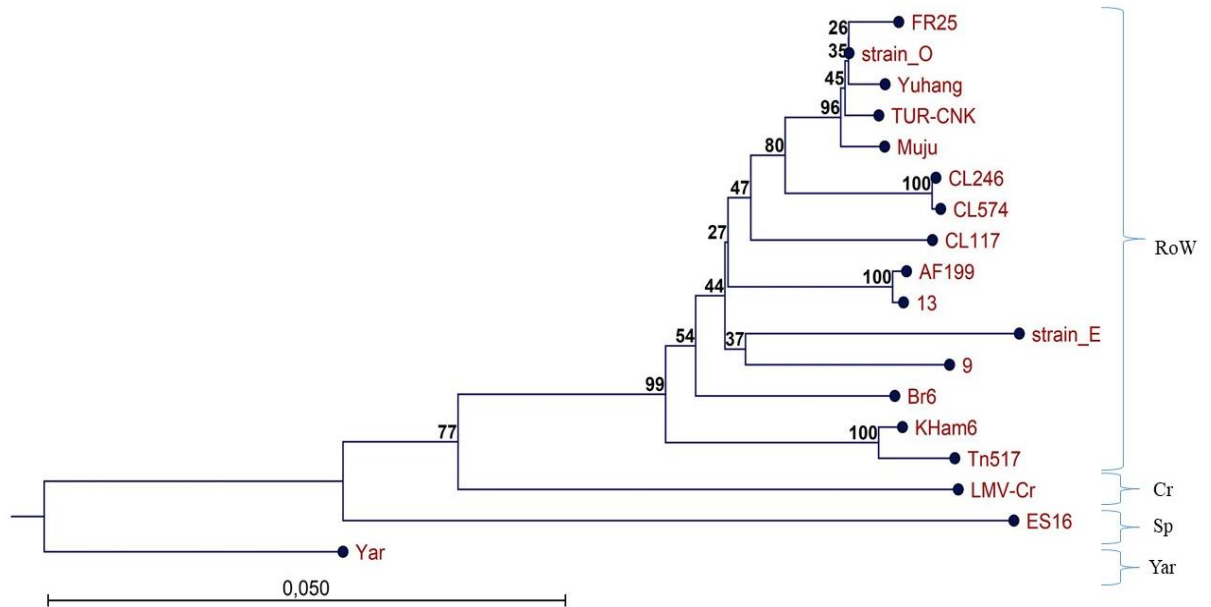


Şekil 33. Marul mozaik virüsü izolatlarının CI geninin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı.

4.4.4. CP Geni Filogenetik Analiz Sonuçları

CP geninin nükleotit dizilimlerine göre oluşturulan filogenetik soyağaç incelendiğinde, temelde 4 ana gruba ayrılmış olduğu belirlenmiş ve Cr grubunda 1 izolat, Yar grubunda 1 izolat, Sp grubunda 1 izolat, ve RoW grubunda ise 15 izolat bulunduğu görülmektedir. Filogenetik soyağaç daha detaylandırıldığında ise; Yar grubunda KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı, Cr grubunda ise KF268956 erişim numaralı Fransa izolatı ve Sp grubunda KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatı bulunmaktadır. RoW grubunda ise KJ161174, AJ278854 erişim numaralı Brezilya izolatları, KJ161187, KY440645 erişim numaralı Tunus izolatları, KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı, KJ161186, KJ161173, X97704, X97705, KJ161172 erişim numaralı Fransa izolatları, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı bulunmaktadır. Son olarak ise KJ161175, KJ161177, KJ161183 erişim numaralı Şili izolatları ve ülkemizden elde edilen izolat bulunmaktadır.

Çalışmada kullanılan LMV izolatı TURCNK'nın AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ile en yakın ilişkili, X97704 erişim numaralı Fransa izolatı ile de ikinci en yakın ilişkili olduğu görülmektedir. KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ile ise en uzak ilişkiyi gösterdiği belirlenerek ülkemizden elde edilen TURCNK izolatının RoW grubuna dahil olduğu tespit edilmiştir (Şekil 34).



Şekil 34. Marul mozaik virüsü izolatlarının CP geninin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı.

Tao, vd., (2002), Çin'in Zhejiang ili, Yuhang şehrinden elde ettikleri bir adet LMV izolatının moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. CP genine ait olan ve 5p-UTR'nin nt dizisine dayalı yaptıkları filogenetik çalışmalar sonucunda izolatların 3 gruba ayrıldığını belirtmişlerdir. Bu grupların Batı Avrupa-Kaliforniya, Yunanistan ve Yemen olduğunu belirterek Çin LMV izolatının büyük olasılıkla Kaliforniya veya Batı Avrupa orjinli olduğunu belirtmişlerdir.

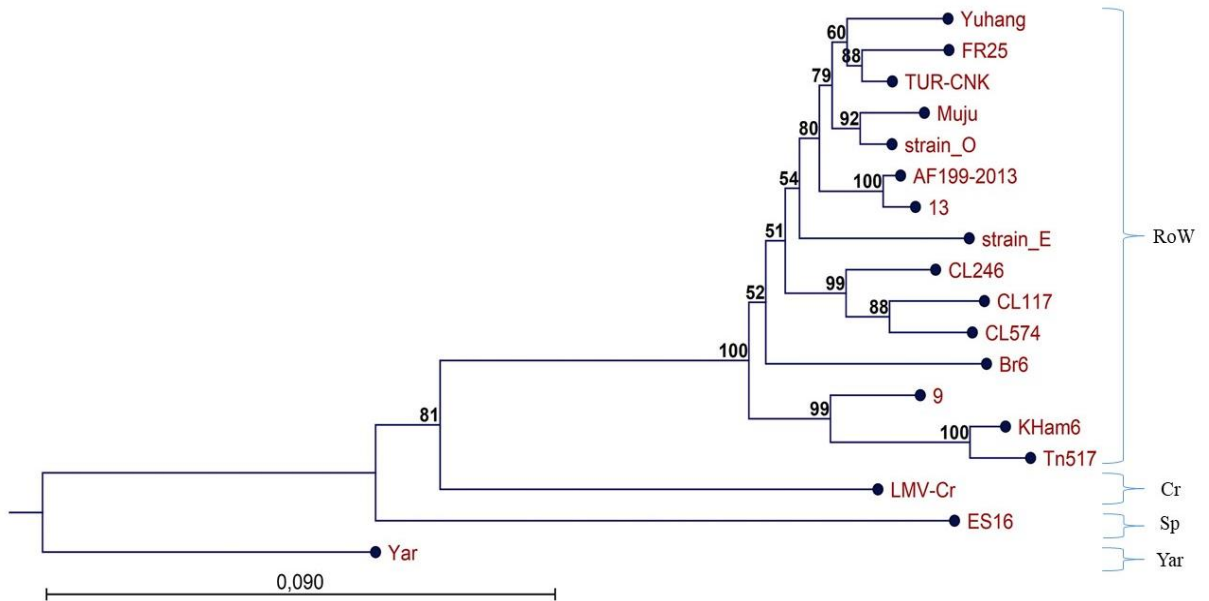
Alan ve Kamberoğlu (2012: 91-92), ülkemizde yapılan bir çalışmada ise Doğu Akdeniz Bölgesi'nde marul bitkisinde görülen virüs hastalıklarının belirlenmesi amacı ile bir çalışma yürütmüştür. Araştırmacı marul bitkilerinden elde ettiği LMV izolatının RT-PCR analizleri ile CP genine ait olan nükleotit ve amino asit dizilerini çıkarmıştır. Elde ettiği nükleotit ve amino asit dizilerini dünya LMV izolatları ile benzerlik ve filogenetik ilişkilerini belirlemiştir. Oluşturduğu filogenetik soyağaçta Doğu Akdeniz Bölgesi'nden elde edilen marul izolatının Amerika izolatları ile en yakın ilişkili olduğunu ve LMV izolatının RoW grubunda bulunduğunu tespit etmiştir.

Karanfil, vd., (2018: 365-367), yaptıkları çalışmada Güney Marmara Bölgesi illeri ve ilçelerinden enfekteli olduğunu belirledikleri örneklerin içinden 15 tanesini seçerek RT-PCR analizleri ile CP genlerinin amino asit ve nükleotit dizilimlerini çıkarmışlardır. Elde ettikleri nükleotit ve amino asit dizilerini kullanarak LMV izolatlarının dünyadaki LMV izolatları ile filogenetik ilişkilerini ortaya koymuşlardır. Araştırma sonuçlarında izolatların filogenetik ağaçlarda 4 gruba ayrıldığını belirleyerek Türkiye Güney Marmara Bölgesi'nden elde edilen LMV izolatlarının birbirleri ile yakın ilişki gösterdiğini ve RoW grubuna dahil olduğunu tespit etmişlerdir. RoW grubu içinde çok sayıda yakın ilişki gösteren alt grup bulunduğunu ve Güney Marmara Bölgesi'nden elde edilen LMV izolatlarının amino asit sekansları kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlarda artan sekans benzerliği nedeniyle oluşan alt grupların azaldığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada da TURCNK LMV izolatı RoW grubu içinde yer almıştır.

4.4.5. HC-Pro Geni Filogenetik Analiz Sonuçları

HC-Pro geninin nükleotit dizilimlerine göre şekillenmiş olan filogenetik soyağaç incelendiğinde, temelde 4 ana gruba ayrıldığı görülmektedir. Yar grubunda 1 izolat, Cr grubunda 1 izolat, Sp grubunda 1 izolat ve RoW grubunda ise 15 izolat bulunmaktadır. Filogenetik soyağaç daha detaylı incelendiğinde ise; Yar grubunda KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı, Cr grubunda KF268956 erişim numaralı Fransa izolatı ve Sp grubunda KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatı bulunmaktadır. RoW grubunda bulunan izolatlar ise KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı, KJ161186, KJ161173, X97704, X97705, KJ161172 erişim numaralı Fransa izolatları, KJ161187, KY440645 erişim numaralı Tunus izolatları, KJ161175, KJ161177, KJ161183 erişim numaralı Şili izolatları, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı bulunmaktadır. Son olarak ise KJ161174, AJ278854 erişim numaralı Brezilya izolatları ve ülkemizden elde edilen izolat bulunmaktadır.

TURCNK LMV izolatının RoW grubuna dahil olduğu belirlenerek, KJ161186 erişim numaralı Fransa izolatı ile en yakın, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ile de ikinci en yakın ilişkili olarak belirlenmiştir. KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ile de en uzak ilişkiyi gösterdiği görülmektedir (Şekil 35).

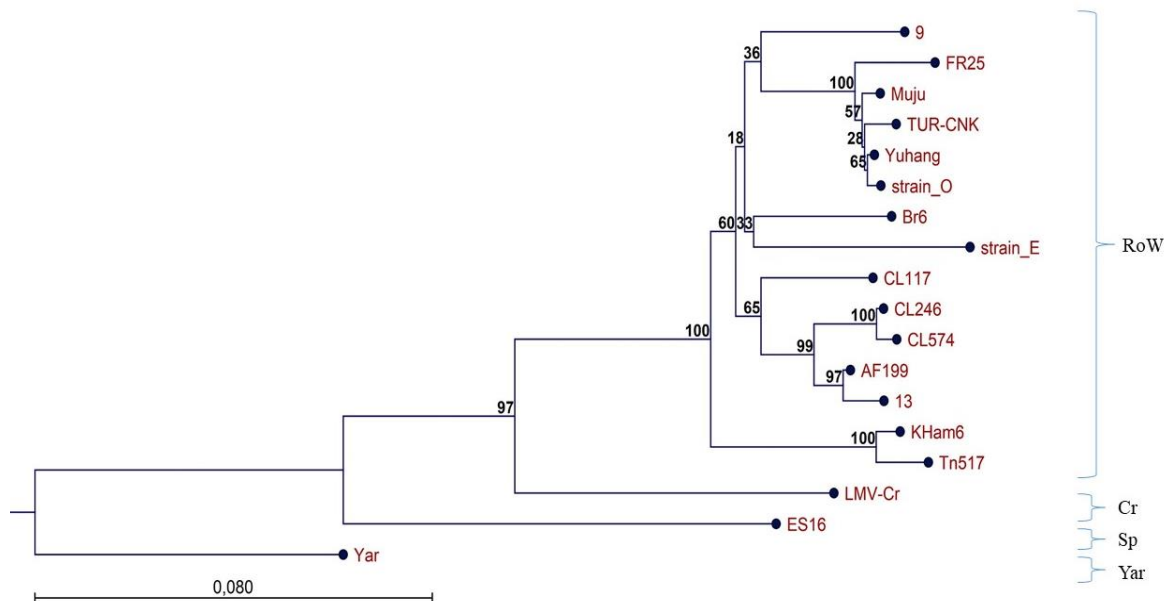


Şekil 35. Marul mozaik virüsü izolatlarının HC-Pro geninin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı.

4.4.6. NIa Geni Filogenetik Analiz Sonuçları

Nİa geninin nükleotit dizilimlerine göre belirlenen filogenetik soyağaç incelendiğinde, temelde 4 ana gruba ayrılmış olduğu belirlenmiş ve Cr grubunda 1 izolat, Yar grubunda 1 izolat, Sp grubunda 1 izolat, ve RoW grubunda ise 15 izolat bulunduğu görülmektedir. Filogenetik soyağaç daha detaylandırıldığında ise; Sp grubunda KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatı, Yar grubunda KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ve Cr grubunda KF268956 erişim numaralı Fransa izolatı bulunmaktadır. RoW grubunda ise KJ161186, KJ161173, X97704, X97705, KJ161172 erişim numaralı Fransa izolatları, KJ161174, AJ278854 erişim numaralı Brezilya izolatları, KJ161187, KY440645 erişim numaralı Tunus izolatları, KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı bulunmaktadır. Son olarak ise KJ161175, KJ161177, KJ161183 erişim numaralı Şili izolatları ve ülkemizden elde edilen izolat bulunmaktadır.

Çalışmada kullanılan LMV izolatı TURCNK'nın AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ile en yakın ilişkili, X97704 erişim numaralı Fransa izolatı ile de ikinci yakın ilişkili olduğu belirlenmiştir. KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ile ise en uzak ilişkiyi gösterdiği ve ülkemizden elde edilen TURCNK izolatının RoW grubuna dahil olduğu tespit edilmiştir (Şekil 36).

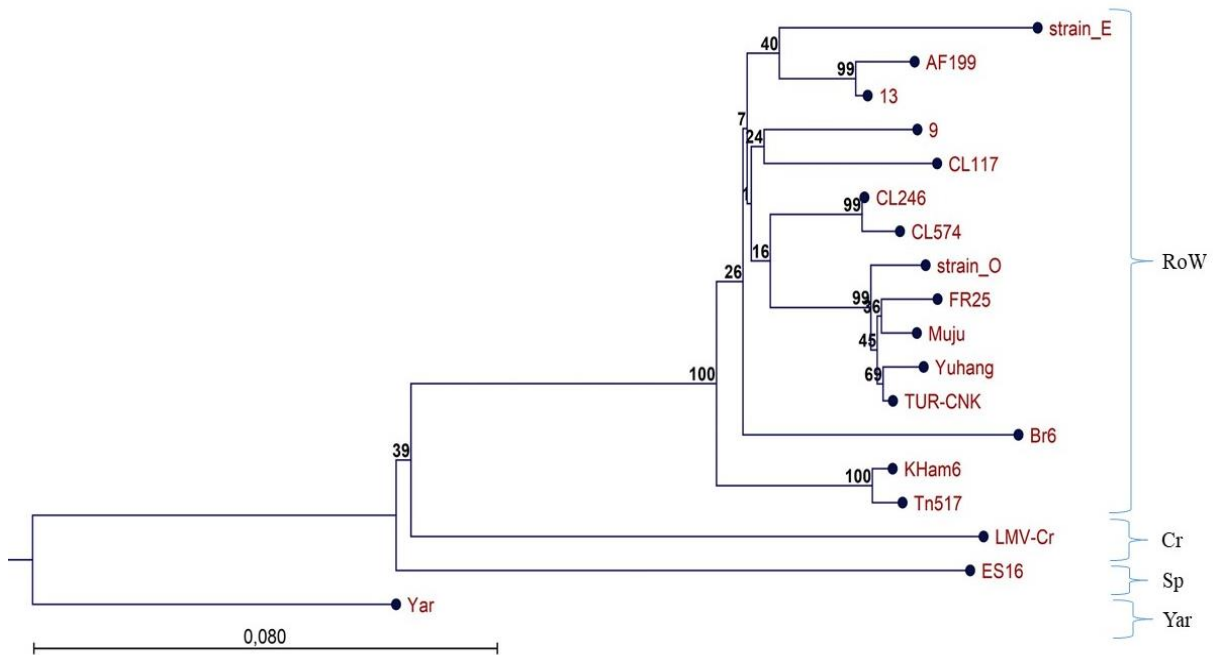


Şekil 36. Marul mozaik virüsü izolatlarının NIa geninin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı.

4.4.7. NIa-Vpg Geni Filogenetik Analiz Sonuçları

NIa-VPg geninin nükleotit dizilimlerine göre şekillenmiş olan filogenetik soyağaç incelendiğinde, 4 ana gruba ayrıldığı görülmektedir. Sp grubunda 1 izolat, Yar grubunda 1 izolat, Cr grubunda 1 izolat ve RoW grubunda ise 15 izolat bulunmaktadır. Filogenetik soyağaç daha detaylı incelendiğinde ise; Yar grubunda KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı, Cr grubunda KF268956 erişim numaralı Fransa izolatı ve Sp grubunda KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatı bulunmaktadır. RoW grubunda bulunan izolatlar ise KJ161187, KY440645 erişim numaralı Tunus izolatları, KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı, KJ161186, KJ161173, X97704, X97705, KJ161172 erişim numaralı Fransa izolatları, KJ161175, KJ161177, KJ161183 erişim numaralı Şili izolatları, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı bulunmaktadır. Son olarak ise KJ161174, AJ278854 erişim numaralı Brezilya izolatları ve ülkemizden elde edilen izolat bulunmaktadır.

TURCNK LMV izolatının RoW grubuna dahil olduğu belirlenerek, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ile en yakın ilişkili, KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı ile de ikinci yakın ilişkili olarak belirlenmiştir. KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ile de en uzak ilişkiyi gösterdiği görülmektedir (Şekil 37).

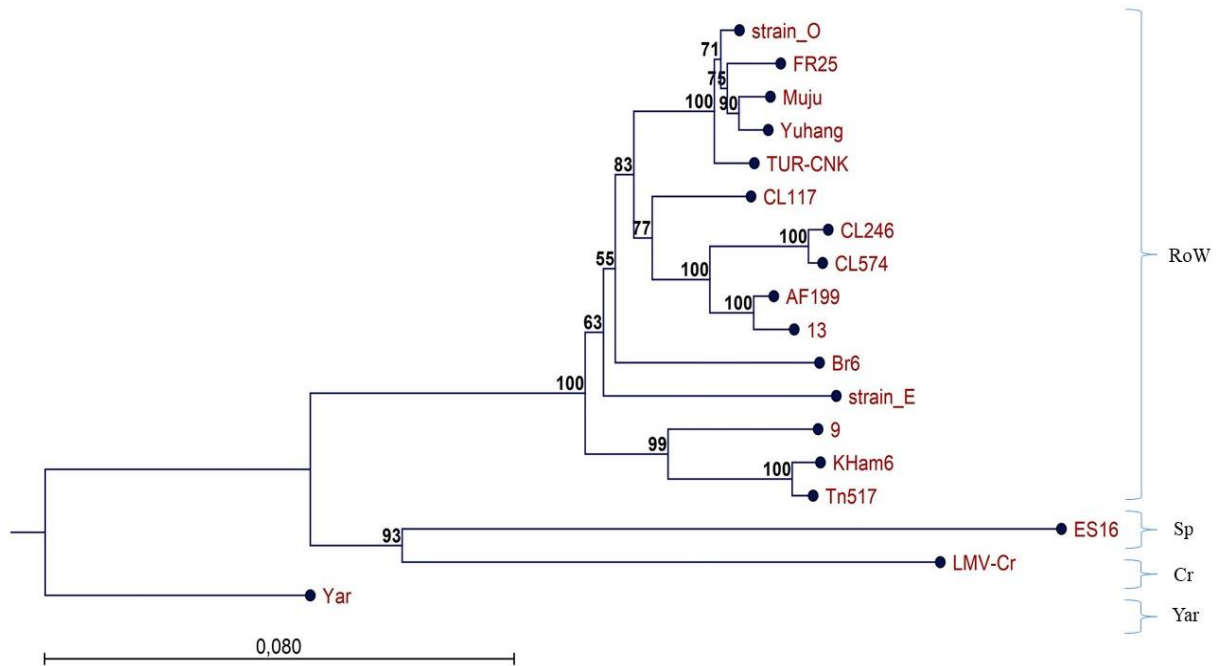


Şekil 37. Marul mozaik virüsü izolatlarının NIa-VPg geninin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı.

4.4.8. Nİb Geni Filogenetik Analiz Sonuçları

Nİb geninin nükleotit dizilimlerine göre oluşturulan filogenetik soyağaç incelendiğinde, temelde 4 ana gruba ayrılmış olduğu belirlenmiş ve Cr grubunda 1 izolat, Yar grubunda 1 izolat, Sp grubunda 1 izolat, ve RoW grubunda ise 15 izolat bulunduğu görülmektedir. Filogenetik soyağaç daha detaylandırıldığında ise; Yar grubunda KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı, Cr grubunda KF268956 erişim numaralı Fransa izolatı ve Sp grubunda KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatı bulunmaktadır. RoW grubunda ise KJ161174, AJ278854 erişim numaralı Brezilya izolatları, KJ161187, KY440645 erişim numaralı Tunus izolatları, KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı, KJ161186, KJ161173, X97704, X97705, KJ161172 erişim numaralı Fransa izolatları, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı bulunmaktadır. Son olarak ise KJ161175, KJ161177, KJ161183 erişim numaralı Şili izolatları ve ülkemizden elde edilen izolat bulunmaktadır.

Çalışmada kullanılan LMV izolatı TURCNK'nın RoW grubuna dahil olduğu tespit edilerek AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ile en yakın ilişkiyi göstermiştir. İkinci en yakın ilişkiyi ise KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı ile göstermiş ve KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ile de en uzak ilişkili olarak belirlenmiştir (Şekil 38).

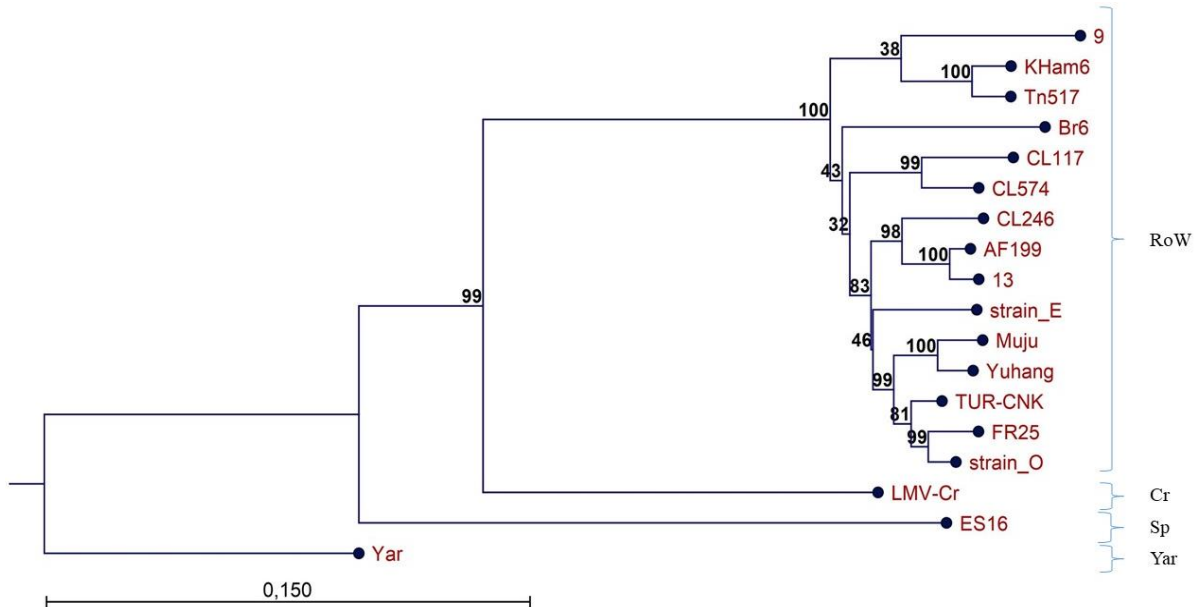


Şekil 38. Marul mozaik virüsü izolatlarının Nİb geninin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı.

4.4.9. P1 Geni Filogenetik Analiz Sonuçları

P1 geninin nükleotit dizilimlerine göre şekillenmiş olan filogenetik soyağaç incelendiğinde, temelde 4 ana gruba ayrıldığı görülmektedir. Yar grubunda 1 izolat, Cr grubunda 1 izolat, Sp grubunda 1 izolat ve RoW grubunda ise 15 izolat bulunmaktadır. Filogenetik soyağaç daha detaylı incelendiğinde ise; Cr grubunda KF268956 erişim numaralı Fransa izolatı, Yar grubunda KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ve Sp grubunda KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatı bulunmaktadır. RoW grubunda bulunan izolatlar ise KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı, KJ161186, KJ161173, X97704, X97705, KJ161172 erişim numaralı Fransa izolatları, KJ161187, KY440645 erişim numaralı Tunus izolatları, KJ161175, KJ161177, KJ161183 erişim numaralı Şili izolatları, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı bulunmaktadır. Son olarak ise KJ161174, AJ278854 erişim numaralı Brezilya izolatları ve ülkemizden elde edilen izolat bulunmaktadır.

TURCNK LMV izolatının RoW grubuna dahil olduğu belirlenerek, KJ161186 erişim numaralı Fransa izolatı ile en yakın ilişkiyi, X97704 erişim numaralı yine bir Fransa izolatı ile de ikinci yakın ilişkiyi göstermektedir. KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ile de en uzak ilişkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 39).

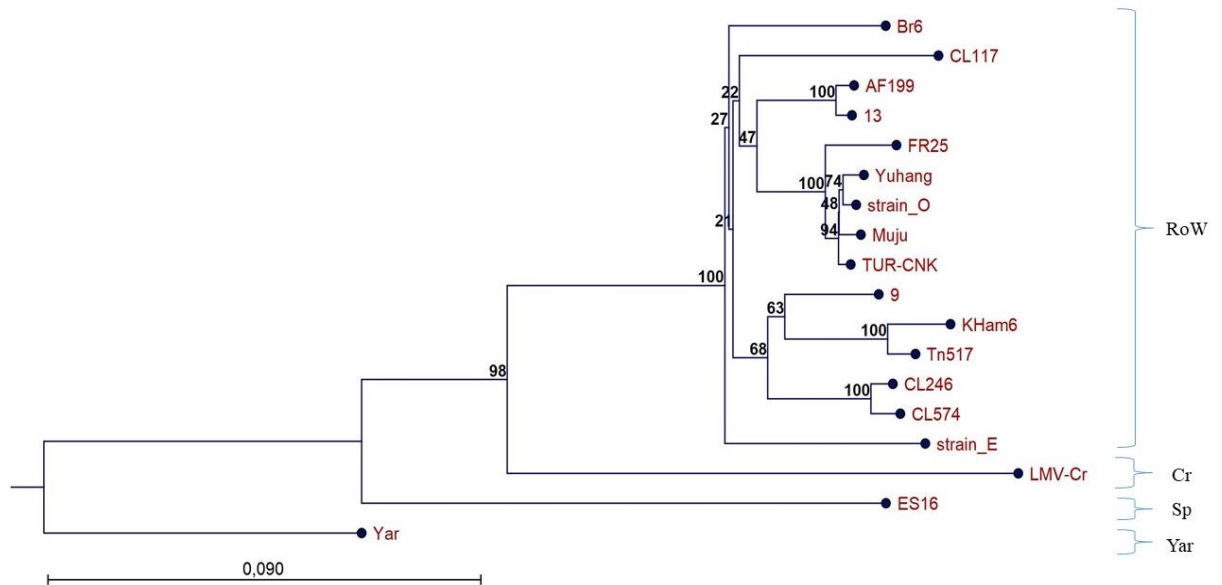


Şekil 39. Marul mozaik virüsü izolatlarının P1 geninin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı.

4.4.10. P3 Geni Filogenetik Analiz Sonuçları

P3 geninin nükleotit dizilimlerine göre oluşturulan filogenetik soyağaç incelendiğinde, temelde 4 ana gruba ayrılmış olduğu belirlenmiş ve Cr grubunda 1 izolat, Yar grubunda 1 izolat, Sp grubunda 1 izolat, ve RoW grubunda ise 15 izolat bulunduğu görülmektedir. Filogenetik soyağaç daha detaylandırıldığında ise; Yar grubunda KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı, Cr grubunda KF268956 erişim numaralı Fransa izolatı ve Sp grubunda KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatı bulunmaktadır. RoW grubunda ise KJ161174, AJ278854 erişim numaralı Brezilya izolatları, KJ161187, KY440645 erişim numaralı Tunus izolatları, KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı, KJ161186, KJ161173, X97704, X97705, KJ161172 erişim numaralı Fransa izolatları, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı bulunmaktadır. Son olarak ise KJ161175, KJ161177, KJ161183 erişim numaralı Şili izolatları ve ülkemizden elde edilen izolat bulunmaktadır.

Çalışmada kullanılan LMV izolatı TURCNK'nın KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı ile en yakın, X97704 erişim numaralı Fransa izolatı ile de ikinci en yakın ilişkiyi göstermiştir. Ayrıca ülkemizden elde edilen TURCNK izolatının RoW grubuna dahil olduğu belirlenerek, KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ile ise en uzak ilişkiyi gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 40).



Şekil 40. Marul mozaik virüsü izolatlarının P3 geninin nükleotit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı.

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan tez çalışması kapsamında kullanılan LMV izolatları Güney Marmara Bölgesi'nden ve LMV ile enfekteli olduğu daha önceden tespit edilmiş olan marul bitkilerinden elde edilmiştir. LMV izolatlarının moleküler karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi amacı ile ilk aşamada RT-PCR çalışmaları yapılarak enfekteli olan 3 adet LMV izolatının Nİb+CP genlerine ait olan 1430 bp uzunluğunda bandlar elde edilmiştir. LMV'nin Nİb+CP genlerine spesifik olan primer çiftleri ile TURCNKA, TURCNKB ve TURCNKC izolatlarının nükleotit ve amino asit düzeyinde sekans dizileri çıkarılarak dünyada bulunan diğer LMV izolatları ile gösterdiği benzerlik oranları ve filogenetik ilişkileri ortaya konmuştur.

TURCNKA, TURCNKB ve TURCNKC izolatlarının Nİb+CP genlerine ait nükleotit düzeyinde %73 ile %98 aralığında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek benzerliği %98 oranında X97704, KJ161186 erişim numaralı Fransa izolatları, AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ve KF955619 erişim numaralı Güney Kore izolatı ile göstermiştir. En düşük benzerliği ise %75 oranında KJ161194 erişim numaralı İspanya izolatı ve Z78228, Z78229, Z78230 erişim numaralarına sahip olan Yunanistan izolatları ile gösterdiği tespit edilmiştir.

TURCNKA, TURCNKB ve TURCNKC izolatlarının Nİb+CP genlerine ait amino asit bazlı yapılan benzerlik oranlarında ise izolatların, %76 ile %99 aralığında benzerlik gösterdikleri görülmüştür. LMV izolatları AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ile %99 oranında en yüksek benzerliği gösterirken, en düşük benzerliği ise %76 oran ile KJ161194 erişim numaralı İspanya izolatı ve Z78228, Z78229, Z78230 erişim numaralarına sahip olan Yunanistan izolatları ile gösterdiği tespit edilmiştir.

Gerçekleştirilen filogenetik analizlerde ise TURCNKA, TURCNKB ve TURCNKC izolatlarının Nİb+CP genlerinin nükleotit ve amino asit dizilimlerine göre belirlenen filogenetik soyağaç incelendiğinde, temelde 5 ana gruba ayrıldığı görülmüştür. Yar grubunda 1 izolat, Gr grubunda 3 izolat, Sp grubunda 1 izolat, Cr grubunda 1 izolat ve RoW grubunda ise 17 izolat bulunmaktadır. Nİb+CP gen gölgelerinin, gen bankasında bulunan

diğer LMV izolatları ile yakın ilişkili olduğu görülmüştür. Filogenetik analizleri belirlenen izolatların nükleotit ve amino asit düzeyinde RoW grubuna dahil olduğu belirlenmiştir.

Çalışmanın 2. aşamasında ise seçilen TURCNK LMV izolatının tüm genomunun belirlenmesi için yapılan RT-PCR çalışmalarında istenilen büyüklükte bandlar elde edilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri kullanılarak TURCNK izolatının nükleotit ve amino asit dizileri belirlenerek gen bankasında bulunan izolatlar ile ilişkileri ortaya konmuştur. Nükleotit düzeyinde yapılan tüm genom benzerlik analizlerinde izolatın %82 ile %98 aralığında benzerlik gösterdiği görülmüştür. TURCNK LMV izolatı X97704 erişim numarasına sahip olan Fransa izolatı ile %98 oranla en yüksek benzerliği gösterirken, en düşük benzerliği ise %82 oranla KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ve KJ161194 erişim numaralı İspanya izolatı ile gösterdiği belirlenmiştir.

Amino asit düzeyinde yapılan benzerlik analizlerinde TURCNK LMV izolatının tüm genom benzerlikleri incelendiğinde ise %92 ile %99 aralığında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. TURCNK LMV izolatı X97704 erişim numaralı Fransa izolatı ve AJ306288 erişim numaralı Çin izolatı ile %99 oranla en yüksek benzerliği göstermiştir. En düşük benzerliği ise %92 oranla KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ve KJ161185 erişim numaralı İspanya izolatı ile gösterdiği belirlenmiştir.

TURCNK LMV izolatının tüm genom nükleotit dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlarda ise izolatların 4 gruba ayrıldığı belirlenmiştir. Yar grubunda 1 izolat, Sp grubunda 1 izolat, Cr grubunda 1 izolat ve RoW grubunda ise 15 izolat bulunduğu TURCNK izolatının da RoW grubuna dahil olduğu tespit edilmiştir. RoW grubu daha detaylandırıldığında ise bu gruba dahil olan Brezilya izolatları, Tunus izolatları, Fransa izolatları, Şili izolatları, Güney Kore izolatı, Çin izolatı ve son olarak ise ülkemizden elde edilen izolat bulunmaktadır. Çalışmada kullanılan LMV izolatı olan TURCNK, KJ161186 erişim numarasına sahip olan Fransa izolatı ile en yakın ilişkiyi, ikinci en yakın ilişkiyi ise X97704 erişim numarasına sahip olan yine bir Fransa izolatı ile göstermiştir. TURCNK'nın KJ161194 erişim numaralı Yemen izolatı ile de en uzak ilişkiyi gösterdiği belirlenmiştir.

Marul tarımında ekonomik olarak kayba neden olan sorunların arasında virüs hastalıkları da ilk sıralarda gelmektedir. Virüslerin oluşturduğu zararlar yıldan yıla

değişiklik göstermekle beraber LMV marul yetiştiriciliği yapılan yerlerde hastalığın kontrolünün sağlanamadığı durumlarda önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. LMV ile enfekteli bitkilerin özsuları ile kolaylıkla mekanik olarak taşınabilmektedir. Marul tarımının yoğun şekilde yapıldığı alanlarda bu durum büyük bir sorun oluşturmaktadır. Marul alanlarında yaptığı şiddetli zararlar ve verim kayıpları oluşturarak ekonomik olarak önemli kayıplara neden olabilmektedir. Etmenin neden olduğu kayıplar tohum sertifikasyonu, ekim nöbetine benzer uygulamalar ile marul yetiştiriciliğinde boş bir periyot bırakılması, yabancı ot kontrolü ve yaprak bitleri ile savaşım gibi önlemler ile azaltılabilmektedir.

Gerçekleştirilen bu çalışma ile ülkemizde ilk kez LMV izolatının tüm genom sekans dizileri belirlenmiştir. Hastalığın orijinine ilişkin yeni bulgular elde edilmiştir. Gen bankasına kaydedilen izolatlar bundan sonraki çalışmalara kaynak teşkil ederek, elde edilen tüm bulgular ulusal ve uluslararası alanlarda bilim dünyasının hizmetine sunulmuştur. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda ise moleküler karakterizasyonun LMV'nin diğer konukçularında da belirlenmesi ve dayanıklılık ile ilgili çalışmalara ağırlık verilmesi gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Alan, B. ve Kamberoğlu, M. A. (2012). *Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yetiştirilen bazı kışlık sebzelerde hastalık yapan virüslerin tanınması ve karakterizasyonu*. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, 134.
- Anonim, (2018). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Erişim adresi: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (Erişim tarihi: 02.11.2020).
- Cheng, Y.H., Chiang, C. H. ve Chang, C.A. (2019). *First Report of Lettuce Mosaic Virus Infecting Pea in Taiwan*. Plant Disease, 103(11), 2971-2971.
- Dinant, S. ve Lot, H. (1992). *Lettuce mosaic virus*. Plant Pathology, 41(5), 528-542.
- Edwardson, J. R. (1974). *Host ranges of viruses in the PVY-group*. Host Ranges of Viruses in the PVY-group, (5).
- Elbeshehy, E., Al-Zahrani, H., Aldhebiani, A. ve Elbeaino, T. (2017). *Viruses infecting periwinkle (Catharanthus roseus L.) in Western Saudi Arabia*. Phytopathologia Mediterranea, 56, 3, 479-485.
- Erkan, S., Gümüş, M., Paylan, İ.C., Duman, İ. ve Ergün, M. (2013). *İzmir İli ve Çevresindeki Bazı Kışlık Sebzelerde Görülen Viral Etmenlerin Saptanması*. Ege Üniv. Ziraat Fakültesi Dergisi, 50(3), 311-322.
- Ertunç, F. ve Zelyüt, R. F. (2019), *Virus diseases of lettuce in ankara province*. International Journal of Agriculture Forestry and Life Sciences, 3(2), 202-206.
- Fakhfakh, H., Le Gall, O., Candresse, T. ve Marrakchi, M. (2001). *Analysis of The Variability of Tunisian Isolates of Lettuce Mosaic Virus Using Biological and Molecular Properties*. Journal of Plant Pathology, 83 (1), 3-11.
- Fidan, Ü. ve Türkoğlu, T. (1988). *Ege Bölgesi Marul Bitkilerinde Görülen Virüs Hastalıkları Üzerine Çalışmalar*. Bitki Koruma Bülteni, 28 (1-2), 43-56.
- Firmino, A.C., Krause-Sakate, R., Pavan, M.A., Silva, N., Hanai, S.M., Anbo, R.H., Nietzsche, T. ve Le Gall, O. (2008). *Prevalence of Lettuce Mosaic Virus-Common Strain on Three Lettuce Producing Areas from Sao Paulo State*. Summa Phytopathol. Botucatu, 34 (2), 161-163.
- Günay, A. (2005). *Sebze yetiştiriciliği*. Cilt-II, Meta Basımevi, İzmir.
- Horvath, J. (1980). *Viruses of lettuce; II. Host range of lettuce mosaic virus and cucumber mosaic virus*. Acta Agronomica Academiae Scientiarum Hungaricae, 29, 333-352.

Karanfil, A. (2014). *Çanakkale ilinde marul mozaik virüsü (Lettuce mosaic virüs; LMV) izolatlarının tanılanması ve karakterizasyonu*. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Çanakkale.

Karanfil, A., Cevik, B. ve Korkmaz, S. (2018). *Detection of Lettuce mosaic virus infection in South Marmara Region of Turkey and coat protein gene characterization*. Zemdirbyste-Agriculture, 105(4), 363-368.

Krause-Sakate, R., Le Gall, O., Fakhfakh, H., Peypelut, M., Marrakchi, M., Varveri, C., Sylvie, S.M.A., Lot, H., Zerbini, F.M. ve Candresse, T. (2002). *Molecular and Biological Characterization of Lettuce Mosaic Virus (LMV) isolates reveals a Distinct and Widespread Type of Resistance-Breaking Isolate: LMV-Most*. Virology, 92(5), 563-572.

Li, R., Mock, R., Huang, Q., Abad, J., Hartung, J. ve Kinard, G. (2008). *A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens*. Journal of Virological Methods, 154(1-2), 48-55.

Lim, S., Zhao, F., Yoo, R. H., Igori, D., Lee, S. H., Lim, H. S. ve Moon, J. S. (2014). *Characteristics of a Lettuce mosaic virus isolate infecting lettuce in Korea*. Plant Pathology Journal, 30(2), 183-187.

Mazier, M., German-Retana, S., Flamain, F., Dubois, V., Botton, E., Sarnette, V., Le Gall, O., Candresse, T. ve Maisonneuve, B. (2004). *A Simple and Efficient Method for Testing Lettuce Mosaic Virus Resistance In Vitro Cultivated Lettuce*. Journal of Virological Methods, 116(2), 123-131.

Moreno, A., Bertolini, E., Olmos, A., Cambra, M. ve Fereres, A. (2007). *Estimation of vector propensity for Lettuce mosaic virus based on viral detection in single aphids*. Spanish Journal of Agricultural Research, 5(3), 376-384.

Muhire, B. M., Varsani, A. ve Martin, D. P. (2014). *SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation*. PlosOne, 9(9), 0108277.

Naidu, R. A., Karthikeyan, G., Jarugula, S. ve Nelson, M. (2008). *First Report of The Natural Infection of Coreopsis Auriculata 'Nana' with Lettuce Mosaic Virus in The United States*. Plant Disease, 92(3), 486.

Nebreda, M., Moreno, A., Perez, N., Palacios, I., Seco-Fernandez, V. ve Fereres, A. (2004). *Activity of Aphids Associated with Lettuce and Broccoli in Spain and Their Efficiency as Vectors of Lettuce Mosaic Virus*. Virus Research, 83-88.

Ormaz, B., Winter, S., Koochi-Habibi, M., Mosahebi, G. ve Izadpanah, K. (2006). *Comparison of Biological and Molecular Characterization of Iranian Lettuce Mosaic Virus Isolates*. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 71(3), 1289-1294.

Özalp, M.O. (1964). *İzmir’de Sebzelerde Görülen Virus Hastalıkları*. Bitki Koruma Bülteni, 4(1), 18-25.

Özdemir, S. ve Erilmez, S. (2007). *Denizli İlinde Yetiştirilen Biber, Patlıcan ve Marul Alanlarında Bazı Viral Etmenlerin Saptanması*. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 27-29.

Pavan, M. A., Krause-Sakate, R., Silva, N., Zerbini, F.M. ve Gall, O. L. (2008). *Virus Diseases of Lettuce in Brazil*. Plant Viruses, 2(1), 35-41.

Revers, F., Lot, H., Souche, S., Le, Gall, O., Candresse, T. ve Dunez, J. (1997a). *Biological and Molecular Variability of Lettuce Mosaic Virus Isolates*. Molecular Plant Pathology, 87 (4): 397-403.

Revers, F., Yang, S.J., Walter, J., Souche, S., Lot, H., Le Gall, O., Candresse, T. ve Dunez, J. (1997b). *Comparison of the complete nucleotide sequences of two isolates of lettuce mosaic virus differing in their biological properties*. Virus Research, 47(2), 167-177.

Sebze verileri, (2019). Ankara: Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK).

Sertkaya, G. (2015). *Hatay İli Marul ve Ispanak Alanlarında Bazı Virüslerin Araştırılması*. Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 20(1), 7-12.

Sharma P. ve Jain R.K. (2013). *First Report of Lettuce mosaic virus Infecting Lactuca sativa in India*. Plant Disease, 97(6), 849.

Soleimani, P., Mosahebi, G. ve Habibi, G. M. (2011). *Identification of Some Viruses Causing Mosaic on Lettuce and Characterization of Lettuce Mosaic Virus from Tehran Province in Iran*. African Journal of Agriculture Research, 6(13), 3029-3035.

Tao, Z., Jiong, C. ve JianPing, C. (2002). *Complete sequence analysis of a Chinese isolate of lettuce mosaic virüs*. Chinese Journal of Virology, 18(1), 66-70.

Tekinel, N., Dolar, M. S., Sağgöz, S. ve Salcan, Y. (1969). *Mersin Bölgesinde Ekonomik Bakımdan Önemli Bazı Sebze Virüsleri Üzerinde Araştırmalar*. Bitki Koruma Bülteni, 9(1), 37-49.

Yaş Meyve Sebze Sektör Raporu, (2019). *Uludağ İhracatçı Birlikleri Genel Sekreterliği Arge Şubesi Yaş Meyve Sebze Sektör Raporu*. Erişim: 02.11.2020, <https://uib.org.tr/tr/kbfile/yas-meyve-sebze-sektor-raporu>.

Zanganeh, M., Dizadji, A. ve Mossahebi, G.H. (2014). *The responsse of lettuce cultivars Against Two Lettuce mosaic virus Isolates, One Able to Systemically Infect The Resistant Cultivar Salinas 88*. Journal of Phytopathology, 162(7-8), 491-498.

Zerbini, F.M., Koike, S.T. ve Gilbertson, R.L. (1995). *Biological and Molecular Characterization of Lettuce Mosaic Potyvirus Isolates from The Salinas Valley of California*. Phytopathology, 85(7), 746-752.



EKLER



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

İsim SOYİSİM :

Doğum Yeri :

Doğum Tarihi :

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi :

Yüksek Lisans Öğrenimi :

İLETİŞİM

E-posta Adresi :

ORCID :