



T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİSEL ÜRETİM VE TEKNOLOJİLERİ ANABİLİM DALI

KIRGIZİSTAN’IN CHUİ BÖLGESİNDEKİ *Cucumber mosaic virüs*’ÜN SEROLOJİK
VE MOLEKÜLER TEŞHİSİ İLE KARAKTERİZASYONU

ATAYAR MAZENOV

Ağustos 2018

T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİSEL ÜRETİM VE TEKNOLOJİLERİ ANABİLİM DALI

KIRGIZİSTAN’IN CHUİ BÖLGESİNDEKİ *Cucumber mosaic virüs*’ÜN SEROLOJİK
VE MOLEKÜLER TEŞHİSİ İLE KARAKTERİZASYONU

ATAYAR MAZENOV

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

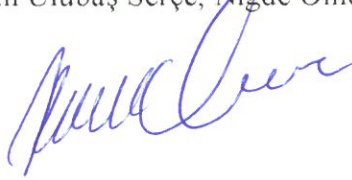
Prof. Dr. Çiğdem Ulubaş Serçe

Ağustos 2018

Atayar Mazenov tarafından **Prof.Dr. Çiğdem Ulubaş Serçe** danışmanlığında hazırlanan “**Kırgızistan’ın Chui bölgesinde *Cucumber mosaic virus*’ün Serolojik ve Moleküler Teşhisi ile Karakterizasyonu**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Bitkisel Üretim ve Teknolojileri** Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Başkan : Prof. Dr. Çiğdem Ulubaş Serçe, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi



Üye : Dr. Öğr. Üyesi, Kahraman GÜRCAN, Erciyes Üniversitesi



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Eminur ELÇİ, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun/...../20.... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

Doç. Dr. Murat BARUT
MÜDÜR V.

TEZ BİLDİRİMİ

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

ATAYAR MAZENOV

ÖZET

KIRGIZİSTAN’IN CHUI BÖLGESİNDEKİ *Cucumber mosaic virus*’ÜN SEROLOJİK VE MOLEKÜLER TEŞHİSİ İLE KARAKTERİZASYONU

MAZENOV, Atayar

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitkisel Üretim ve Teknolojileri Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Çiğdem Ulubaş Serçe

Ağustos 2018, 67 sayfa

Kırgızistan’ın Chui bölgesindeki *Cucurbitaceae* ve *Solanaceae* kültür bitkilerinde zararlı Hıyar Mozayik Virüsü (*Cucumber mosaic virus*, CMV)’nün serolojik ve moleküler teşhisi yapılmıştır. Chui bölgesinin farklı ilçelerindeki tarlalardan toplanan hıyar, kabak, domates, biber, kavun ve patates bitkilerinden oluşan toplam 96 semptomlu bitki örneği, DAS-ELISA, dot-blot, Immunocapture (IC) RT-PCR, IC-real time PCR yöntemleri ile test edilmiştir. DAS-ELISA testine göre CMV enfeksiyon oranı % 3,12 olarak saptanmıştır. IC-RT-PCR yöntemi ile analizler sonucu enfeksiyon oranı % 6,25, IC-real time-PCR analizine göre enfeksiyon oranı %100 olarak tespit edilmiştir. IC-RT-PCR yöntemi ile tespit edilen CMV enfekteli örnekler CMV ırk tayini için tip spesifik ELISA, tip spesifik PCR, RFLP ve kılıf protein dizileme yöntemleri ile analiz edilmiştir. Tespit edilen tüm CMV izolatlarının CMV altgrup IB olduğu belirlenmiştir. CMV’nin *Solanaceae* ve *Cucurbitaceae* bitkilerde enfeksiyonu ve CMV-IB ırkı Kırgızistan için ilk kayıttır.

Anahtar Sözcükler: CMV, ELISA, PCR, IC-RT-PCR, real-time PCR, multipleks PCR, RFLP

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF *Cucumber mosaic virus* IN THE CHUI REGION OF KYRGYZSTAN BY SEROLOGICAL AND MOLECULAR DIAGNOSIS

MAZENOV, Atayar

Niğde Ömer Halisdemir University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Production and Technologies

Supervisor : Prof. Dr. Çiğdem Ulubaş Serçe

August 2018, 67 pages

Serological and molecular diagnosis of the cucumber mosaic virus (CMV) was carried out in *Cucurbitaceae* and *Solanaceae* cultural plants in the Chui region of Kyrgyzstan. A total of 96 symptomatic plant samples including cucumber, squash, tomato, pepper, melon and potato collected from different areas of the Chui area were tested by DAS-ELISA, dot-blot, Immunocapture (IC) RT-PCR and IC-real time PCR methods. According to the DAS-ELISA test, the CMV infection rate was 3.12%. IC-RT-PCR analysis showed that the final infection rate was 6.25% and the infection rate was 100% according to IC-real-time-PCR analysis. CMV infected samples detected by IC-RT-PCR were analyzed by type-specific ELISA, type-specific PCR, RFLP and coat protein sequencing methods for CMV strain identification. It was determined that all CMV isolates identified were CMV subgroup IB. Infection of CMV with *Solanaceae* and *Cucurbitaceae* plants and CMV-IB is the first record for Kyrgyzstan.

Keywords: CMV, ELISA, PCR, IC-RT-PCR, real-time PCR, multiplex PCR

ÖN SÖZ

Yükseköğrenimim sırasında ve bu tezin konusunun belirlenmesinde, laboratuvar çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE'ye sonsuz teşekkür ederim.

Özellikle laboratuvar ve sera çalışmalarında yardımcı olan, sevgili tez arkadaşım Müge DOĞANER'e, teşekkür ederim. Ayrıca, laboratuvarda ve tarlada yardımcı olan arkadaşım Edil Nooruz Kulzhabaev, Munarbek ARZIBEK UULU, Ayşe ÖZTÜRK, Samat BERDALİEV'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ÖN SÖZ	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGE VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II KAYNAK ARAŞTIRMASI	7
2.1 CMV Teşhis ve Tanısı	13
2.2 CMV Alt Gruplarının Belirlenmesi	15
2.3 Kırgızistan’da Bitki Virüs Hastalıkları	16
2.4 Türkiye’de CMV	16
2.5 Dünyada CMV	17
BÖLÜM III MATERYAL VE METOD	20
3.1 Bitki Materyallerinin Toplanması	20
3.2 Toplanan Örneklerde CMV Teşhisi	22
3.2.1 Double antibody sandwich-enzyme linked immuno sorbent assay (DAS ELISA) ile CMV teşhisi	22
3.2.2 Dot blot immuno assay (DBIA) ile CMV teşhisi	24
3.2.3 İmmunocapture reverse transkripsyon polimeraz zincir reaksiyonu (IC-RT-PCR) ile CMV teşhisi	25
3.2.4 SyberGreen real-time PCR ile CMV teşhisi	28

3.3 CMV İzolatlarının Alt Gruplarının Belirlenmesi.....	28
3.3.1 ELISA ile serolojik olarak CMV alt grupların belirlenmesi	28
3.3.2 Multiplex PCR yöntemi ile CMV alt grupların belirlenmesi	28
3.3.3 Kılıf proteini bölgesinin dizilemesi ile alt grupların belirlenmesi.....	29
BÖLÜM IV BULGULAR VE TARTIŞMA	31
4.1 Solanaceae ve Cucurbitaceae Kültür Bitkilerinde Sörvey	31
4.2 DAS ELISA ile CMV Teşhisi	34
4.3 Dot Blot İmmuno Assay (DBIA) ile CMV Teşhisi	35
4.4 IC-RT-PCR ile CMV Teşhisi	36
4.5 IC-Real Time-PCR ile CMV Teşhisi.....	37
4.6 CMV İzolatlarının Irk Tayini.....	43
4.6.1 ELISA ile ırk tayini	43
4.6.2 Multiplex PCR ile CMV izolatlarının ırk tayini	43
4.6.3 CMV genomunun kılıf protein bölgesinde RFLP ile ırk tayini	45
4.6.4 CMV genomunun kılıf protein bölgesini dizileme ile ırk tayini	46
BÖLÜM V SONUÇLAR.....	50
KAYNAKLAR	52
EKLER.....	59
ÖZGEÇMİŞ	67

SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
A	Adenine
Bp	Base Pair
C	Cytosine
°C	Santigrad Derece
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik asit
CMV	Cucumber Mosaic Virus
CP	Coat Protein (Kılıf Protein)
dATP	Deoksiadenozintrifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotidtrifosfat
dsRNA	Double Stranded RNA
EDTA	Ethylenediaminetetra Acetic Acid
ELISA	Enzim Linked Immunosorbent Assay
gr	Gram
H ₂ O	Su
Kb	Kilo Base
kDa	Kilo Dalton
Mg	Miligram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Messenger RNA

Simgeler	Açıklama
Nm	Nanometre
Nt	Nükleotit
ORF	Açık Okuma Çerçevesi
PBS	Potasyum Fosfat Tuz Tamponu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Hidrojen İyonu Konsantrasyonu
Pr	Primer
RNAse	Ribonükleaz
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
RT	Reverse Transcriptase
Sat-RNA	Satellit RNA
TAE	Tris Asetik Asit EDTA
Taq	Termo Stabil Polimeraz Enzimi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Toplam üretim alanı içindeki payları.....	2
Şekil 1.2. Kırgızistan'nın Chui bölgesinin ekim-dikim alanlarının 2011-2015 yılları arasındaki durumu.....	3
Şekil 2.1. Cucumber mosaic virüs enfeksiyonu sonucunda tepe büyümesinin azalması (a), şekilsiz ve benekli hıyar meyvesi (b) (Zitter ve Murphy, 2009).....	7
Şekil 2.2. Cucurbitlerin <i>Cucumber mosaic virüs</i> enfeksiyonu. Yaz kabağında şiddetli epinasti (a). Yeşil kabakda bodur ve şekilsiz yapraklar ve meyve yüzeyler (b). Misket kavunda bodur büyüyen uç sürgünler (c). Balkabağında yeşil lekeler (ç). Kabak meyvesinde mozaik oluşumlar(d) (Zitter ve Murphy, 2009).....	8
Şekil 2.3. Cucurbit olmaya bitkilerde <i>Cucumber mosaic virüs</i> enfeksiyonu. Biber bitkisinde meşe yaprağı ve halkalı leke oluşumları (a). Bozuk, donuk açık yeşil biber yaprakları (b). Halkalı lekeli ve pürüzlü biber meyvesi (c) (Zitter ve Murphy, 2009).....	9
Şekil 2.4. Domateste CMV enfeksiyonuyla oluşan ayakkabı bağı simptomsu (Zitter ve Murphy, 2009).....	9
Şekil 2.5. Cucumber mosaic virus genom yapısı (Viral Zone'dan alıntıdır).....	10
Şekil 3.1. Kırgızistan ve Chui Bölgesi.....	20
Şekil 3.2. Arazi çıkışları ve simptomsu örneklerin toplanması.....	21
Şekil 3.3. Bitki örneklerin kese kağıtlarda muhafazası.....	22
Şekil 3.4. Kurutulmuş örneklerin ölçülmesi (a) bitki örneği havan-havan eli yardımıyla ezilmesi (b).....	23
Şekil 3.5. Tabakları özgü antiserumla (IgG) kaplaması.....	24
Şekil 3.6. Yaprak saplarından nitrocelluloz membranlara baskı yapılan hali.....	25
Şekil 3.7. DTBIA yönteminin sonucuna örnek membran görüntüsü.....	25
Şekil 4.1. Toplanan biber bitkisinin yaprakların sararması ve kıvrılması(A ve B).....	32

Şekil 4.2. Yaprakların kıvrılması(A), Hıyarda mozaik simptomsu(B).....	33
Şekil 4.3. Yaprakta sararma ve kıvrılma(A), sararma ve mozaik simptomsu(B).....	33
Şekil 4.4. Bitki yaprağında deformasyon simptomsu.....	33
Şekil 4.5. Bitki örneklerinin DAS-ELISA analizi sonucu elde edilen sarı renk reaksiyonları(a,b,c).....	34
Şekil 4.6. Bitki ekstraktlarının damlatıldığı nitrocelluloz membran.....	35
Şekil 4.7. Bitki ekstraktlarının damlatıldığı nitrocelluloz membranların dot blot immuno assay (DBIA) testi sonucu.....	35
Şekil 4.8. CMV pozitif örnekler ile IC-RT-PCR sisteminin kurulması. CMV Pfor/Prev primerleri ile 512 bp uzunluğunda fragmentlerin amplifikasyonu. M 100 bp DNA markör (Thermo Scientific).....	36
Şekil 4.9. CMV örneklerinin ile IC-RT-PCR yöntemi ile analizi ile elde edilen ampikonların agaroz jelde kontrol edilmesi(A,B). Analizde 512 bp uzunluğunda fragment amplifiye eden CMV Pfor/Prev primer çifti kullanılmıştır. M 100 bp DNA markör (Thermo Scientific).....	37
Şekil 4.10. CMV pozitif örnekler ile IC-SYBR real time PCR sisteminin kurulması. CMV Pfor/Prev primerleri ile 512 bp uzunluğunda (A), CMVf/CMVr primerleri ile 111 bp uzunluğunda (B) fragmentlerin amplifikasyonu. M 100 bp DNAmarkör (Thermo Scientific).....	38
Şekil 4.11. CMV örneklerinin ile IC-SYBR real time PCR yöntemi ile analizi ile elde edilen ampikonların agaroz jelde kontrol edilmesi. Analizde 512 bp uzunluğunda fragment amplifiye eden CMV Pfor/Prev primer çifti kullanılmıştır(A,B). M 100 bp DNA markör (Thermo Scientific).....	40
Şekil 4.12. CMV örneklerinin ile IC-SYBR real time PCR yöntemi ile analizi ile elde edilen ampikonların agaroz jelde kontrol edilmesi. Analizde 111 bp uzunluğunda fragment amplifiye eden CMVf/CMVr primer çifti kullanılmıştır (A,B). M 100 bp DNA markör (Thermo Scientific).....	41
Şekil 4.13. ELISA Reagent Set for cucumber mosaic virus -subgroup I (CMV I) ve ELISA Reagent Set for Cucumber mosaic virus -subgroup II (CMV II) antiserumları ile alt grupların belirlenmesi.....	43
Şekil 4.14. CMV izolatlarının CMV altgrup I ve altgrup II spesifik primer çiftleri ile PCR ile analizi ile elde edilen ampikonların agaroz jelde kontrol edilmesi. M 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific).....	44

- Şekil 4.15. CMV örneklerinin ile RT-PCR yöntemi ile amplifiye edilen kılıf protein bölgesi fragmenti (866 bp) M 100 bp DNA markör (Thermo Scientific)....45
- Şekil 4.16. CMV örneklerinin ile RT-PCR yöntemi ile amplifiye edilen kılıf protein bölgesi fragmenti (866 bp)'nin *EcoRI* ve *MspI* enzimleri kesimi sonucu oluşan band profilleri. M 100 bp DNA markör (Thermo Scientific).....46
- Şekil 4.17. Kırgızistan'dan temin edilen üç CMV izolatının kılıf protein bölgesinin nükleotid dizilerinin gen bankasında kayıtlı CMV alt grup izolatlarıyla filogenetik analizi. Filogenetik ağaç Neighbour joining metodu ile 1000 Bootstrap değeri ile oluşturulmuştur.....48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Kırgızistan’da 2015 yılındaki ekim-dikim alanları, ürün gruplarına göre ekipmalanları.....	1
Çizelge 1.2. Kırgızistan’ın Chui bölgesinin ekim-dikim alanları.....	2
Çizelge 3.1. Araştırma kapsamında kullanılmış primer dizileri.....	27
Çizelge 4.1. Toplanan bitkilerin türleri ve sayısı(yerleri).....	32
Çizelge 4.2. Farklı yöntemlerle analiz edilen örneklerdeki CMV enfeksiyon durumu...	41
Çizelge 4.3. CMV izolatının kılıf protein bölgesinin nükleotid dizilerinin gen bankasında kayıtlı CMV alt grup izolatları.....	49

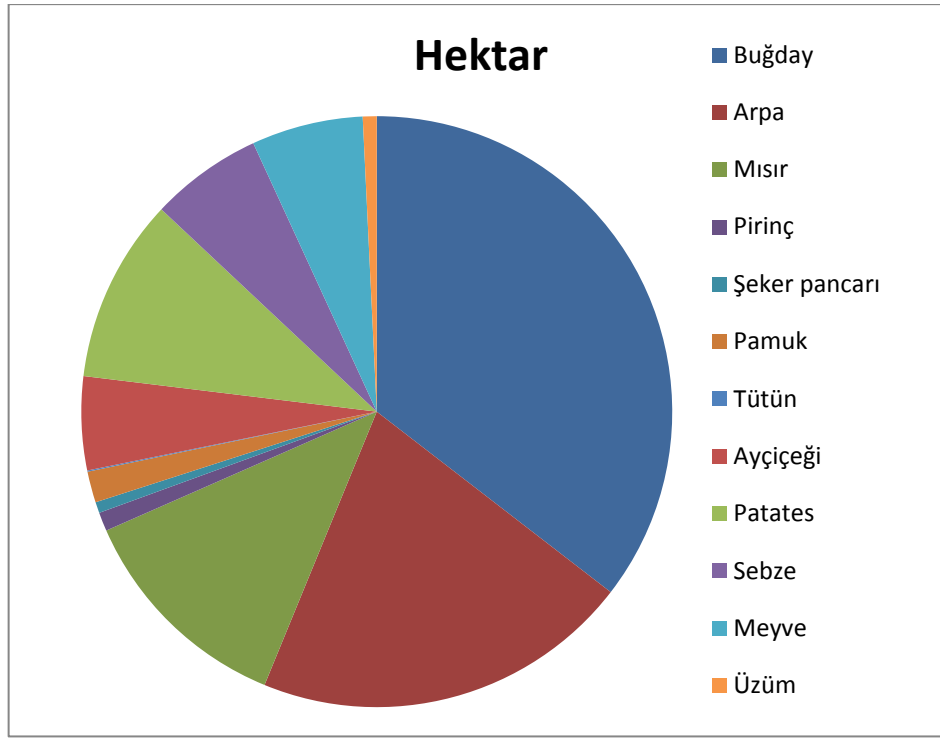
BÖLÜM I

GİRİŞ

Kırgızistan topraklarının büyük kısmı dağlarla kaplıdır. 3000 metreye kadar olan dağlar toprakların yarısından fazlasını kaplar. Ülke ekonomisi tarım ve madencilığe dayalıdır. Daha çok hayvancılık kesimi ağırlıklı bir tarım ekonomisi hâkimdir. Başlıca tarım ürünleri buğday, pamuk, şekerpancarı, mısır, tütün, sebze ve meyvedir (Çizelge 1.1). Dağlık bölgelerde yarış atları yetiştirilir, tavşan beslenir, arıcılık yapılır. En çok küçükbaş hayvan beslenir. Chui bölgesi düzlük ve ziraata elverişli en geniş arazileri içermekte olup, sebze yetiştiriciliği en çok bu bölgede yapılmaktadır (Şekil 1.1 ve 1.2; Çizelge 1.2).

Çizelge 1.1. Kırgızistan’da 2015 yılındaki ekim-dikim alanları, ürün gruplarına göre ekim alanları

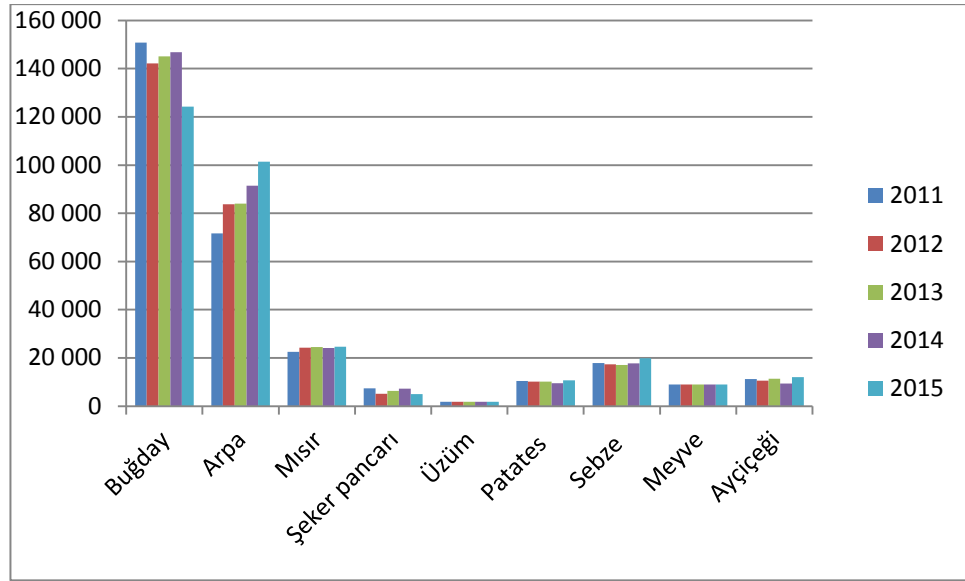
2015	Hektar
Buğday	297 289
Arpa	173 933
Mısır	102 349
Pirinç	8 611
Şeker pancarı	5 048
Pamuk	14 259
Tütün	571
Ayçiçeği	42 894
Patates	84 488
Sebze	51 451
Meyve	51 175
Üzüm	6 366



Şekil 1.1. Toplam üretim alanı içindeki payları

Çizelge 1.2. Kırgızistan'nın Chui bölgesinin ekim-dikim alanları (Hektar)

	2011	2012	2013	2014	2015
Buğday	150 867	142 211	145 088	146 817	124 283
Arpa	71 633	83 709	84 074	91 438	101 459
Mısır	22 555	24 308	24 528	24 076	24 711
Şeker pancarı	7 428	5 148	6 292	7 318	5 048
Üzüm	1 863	1 863	1 863	1 863	1 863
Patates	10 401	10 173	10 121	9 515	10 703
Sebze	17 846	17 312	17 140	17 749	19 860
Meyve	8 943	8 932	8 932	8 932	8 932
Ayçiçeği	11 275	10 583	11 397	9 404	12 088



Şekil 1.2. Kırgızistan'nın Chui bölgesinin ekim-dikim alanlarının 2011-2015 yılları arasındaki durumu (Y eksenini hektar)

Ülkede ve bölgede buğday ve arpadan sonra en çok yetiştirilen ürün grubunu sebze ve patates oluşturmaktadır. Bu ürünlerin yetiştiriciliğinde önemli olan faktörlerden birisi de bitki hastalıkları olup, bunlar içerisinde virüs hastalıkları, tedavi edici yöntemlerinin çok sınırlı olması, bitki hastalandıktan sonra hastalığın önüne geçilmesinin mümkün olmaması nedeniyle önemli olmaktadır.

Bitki virüs hastalıkları ile mücadelede enfeksiyon kaynaklarının yok edilmesi, vektörlerle mücadele edilmesi, virüsten arı bitki kullanımı ve hastalığa dayanıklı bitki üretimi gibi dolaylı mücadele yaklaşımları çözüm olmaktadır. Dolayısı ile hastalığın doğru, hızlı ve erken teşhisi çok önemli olmaktadır. Bitki ve vektörlerde virüsün teşhisini sağlayan metotlar kritik rol oynamaktadır. CMV'nin laboratuvarında ve hatta arazide hızlı bir şekilde teşhisine olanak veren metotlar gerekmektedir. Bunu gerçekleştirmek modern seroloji ve moleküler tekniklerle mümkün olmaktadır.

Bitki viral etmenleri tespit etmek için kullanılan birkaç yöntem vardır. Önceden sadece bitkideki semptomlara bakılarak virüs tespiti yapılmaktaydı. Ancak 1970'li yıllara gelindiğinde virüs tespiti yapmak için ELISA yöntemi virüs tespiti için en uygun yöntem olarak ortaya çıkmıştır (Clark ve Adams, 1979). Bu yöntem kullanılarak özellikle virüsün kılıf proteini hedeflenerek tespiti gerçekleştirilmektedir ve bu yöntem çok sayıda örnek için en uygun yöntemler arasına girmiştir (Boze, 2008). Ancak 1990

yılından itibaren Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) bitki virüslerinin teşhisinde yaygın kullanılır olmuştur. Bu yöntemde virüs tespit etmek için hedef alınan bölge nükleik asittir. PCR yöntemi ELISA yöntemine göre daha kesin ve hassas sonuç vermektedir (Nie ve Singh, 2002; Lorenzen vd., 2006).

Hastalıklı hıyar, domates, patlıcan ve başka bitkilerde CMV ile birlikte diğer viral etmenleri aynı anda tespit etmek ve ırk teşhisini yapmak amacıyla Multiplex Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi de kullanışlı bir yöntemdir. Ancak tüm klasik PCR yöntemlerinde uzun zaman alan jel-elektroforez yöntemi ile uğraşmak gereklidir (Jones vd., 2006). Real-time PCR teknolojisi DNA ya da RNA örneklerinin yapay ortamlarda çoğaltımını ve tek bir tüpte çoğalan ürünlerin miktarını tespit etme imkânı sağlayan bir yöntemdir. Floresan ışıma tekniklerinin moleküler patolojide kullanıma girmesi ile birlikte klasik PCR teknikleri geliştirilerek oluşturulan real time sistemleri teşhis metotlarının geliştirilmesi hızına ivme kazandırmıştır (Klein, 2002). PCR sırasında çoğalan ürünlerin bilgisayar ekranında görünür hale getirilmesini sağlayan floresan işaretli prob ve boyalar, DNA sentezi ile doğru orantılı olarak artmaktadır (Kubista, 2008). Real-time PCR metodu ile çok az miktardaki patojen örnekte hızlı, güvenilir ve hassas bir şekilde tespit edilebilmektedir (Günel vd.,2009).

Damla baskı immunosorbent assay (Dot blot immuno assay; DBIA) metodu ilk kez Lin vd., (1990) tarafından çeşitli bitkilerde kullanılmış ve daha sonraları çok kullanışlı bir yöntem olması nedeniyle yaygın kullanım alanı bulmuştur. DBIA ELISA'ya göre bazı avantajlar sunmuştur. Bu yöntemde doku ekstraksiyonu gerekmemekte, örnekler doğrudan arazide membrana aktarılabilmekte ve baskı yapılan membranlar birkaç ay saklanabilmekte, posta ile gönderilebilmektedir.

Kırgızistan'da *Cucurbitaceae* ve *Solanaceae* kültür bitkilerinin virüs etmenleri ile enfeksiyon durumları hakkında bilgi çok sınırlıdır. Bu bitki gruplarında dünyada en yaygın bulunan *Hıyar mozaik virüsü* (*Cucumber mosaic virus*; CMV)'nün araştırılması ile bölgedeki ürünlerin bu viral etmen bakımından sağlık durumlarının ortaya konulması hedeflenmiştir.

CMV *Bromoviridae* ailesinin *Cucumovirus* cinsi üyesi olup, 1000'den fazla bitki türünü hastalandırabilen ve ürün kayıplarına neden olan bir etmendir (Rybicki, 1995; Hsu,

2002). 1991’de Edwardson ve Christie, CMV’nin monokotiledon ve dikotiledonları içeren, 101 bitki familyasından, 1241 bitkinin konukçu olduğunu bildirmiştir. Virüs oldukça geniş bir konukçu dizinine sahiptir (Palukaitis vd., 1992). Etmen çiçeksiz ve çiçekli süs bitkilerinde de dünya çapında sorun olmaya başlamıştır (Baumgartnerova, 1994; Katoch vd., 2003). CMV tohum içerisinde ve vejetatif üretim materyalleriyle olduğu kadar çok sayıda farklı yaprak biti türü tarafından non-persistent olarak taşınabilmektedir (Gallitelli, 2000; Katoch vd., 2003). CMV’nin tohumla taşınması bazı türlerde gerçekleştiği biyolojik, serolojik ve RT-PCR teknikleri ile belirlenmiştir (Palukaitis vd., 1992). Tohum kabuğunun CMV ile bulaşık olması enfeksiyonun taşınmasında çok önemli olmayıp, embriyoya yerleşen CMV enfeksiyonları virüsün yayılmasında önemli rol oynamaktadır. Embriyoya yerleşerek taşınan CMV enfeksiyonları fasulye, ıspanak (Yang vd., 1997), mercimek (Makkouk ve Attar, 2003), acı bakla (O’Keefe vd., 2007), ve biber (Ali ve Kobayashi, 2010)’de kanıtlanmıştır.

CMV genomu 3 adet tek zincir, pozitif anlamlı RNA (+ssRNAs) molekülünden oluşmaktadır. Virüsün bazı ırkları ile ilişkili simptom gelişimini etkileyen satellit RNA da bulunur. RNA1 ve RNA2 virüs replikasyonundan sorumludur. RNA3’de iki adet açık uçlu okuma bölgesi (open reading frame; ORF) vardır ve 5’ ucunda hareket proteini (movement protein; MP) ve 3’ ucunda kılıf proteini (coat protein; CP) mevcuttur. Virüsün iki ana serolojik gruba veya altgruba ayrılan birçok ırkı bulunmaktadır. CMV ırkları seroloji, nükleik asit hibridzasyonu ve restriksiyon fragment length polymorphisim (RFLP) esaslı çalışmalarla altgrup I ve altgrup II olarak ikiye ayrılmıştır (Owen ve Palukaitis, 1988; Hu vd., 1995; Finetti Sialer vd., 1999; Szilassy vd., 1999). Altgrup I ayrıca kendi içerisinde gen dizileri ve filogenetik analize göre IA ve IB olarak ayrılmıştır (Roossinck, 2002).

CMV simptomları, virüsün bitkiyi enfekte ettiği zaman, çevre koşullarına bağlı olarak değişebilmektedir. Virüs genel olarak enfekteli bitkilerde yaprak ve meyvelerde halkalı lekeler, nekrotik ve klorotik lezyonlar, bitkide genel bir cüceleşme, solgunluk, deformasyon ve genç sürgünlerde geriye doğru ölüm şeklinde belirtilere neden olmaktadır. Hıyar ve domates gibi sebzelerin yapraklarında mozaik, şiddetli sararma, bitkide gelişme geriliği ve verimde azalma oluşturmaktadır (Çağlar, 2006). CMV sadece bitkiye direk zarar vermekle kalmaz aynı zamanda ikincil zararlılara karşı bitkiyi duyarlı hale getirir. Üstelik bu bitkiler hastalık yayılımında kaynak veya ara konukçu

olarak rol oynayabilir (Rist ve Lorbeer, 1991). Bu nedenle, hastalığın önlenmesinde hastalık kaynağının tespit edilmesi önemli bir ilk adımdır.

Kırgızistan’da yetiştirilen *Cucurbitaceae* (hıyar, kabak) ve *Solanaceae* (domates, biber, patlıcan, patates) gruplarındaki kültür bitkilerinin CMV ile enfeksiyon durumlarının farklı teşhis metotları ile araştırılması, bu metotların birbirine karşı avantaj ve dezavantajlarının ortaya konması, belirli amaçlar doğrultusunda hangi teşhis tekniklerinin uygulanacağını araştırılması bu araştırmanın hedeflerini oluşturmuştur. Tez kapsamında uygulanan teşhis metotları daha sonra bölgedeki diğer viral etmenlere de uygulanabilecektir.

BÖLÜM II

KAYNAK ARAŞTIRMASI

Cucumber mosaic virus (CMV) 1916 yılında ilk tespit edildiği bitkinin adı ile adlandırılmasına rağmen, odunsu ve otçu yapıda pek çok bitki türünde enfeksiyon yapabilmektedir (Şekil 2.1). CMV 100'den fazla bitki familyasına ait 1200 bitki türünde önemli ekonomik kayıpla meydana getirebilmektedir. CMV konukçu bitkilerde sistemik enfeksiyonlar yapmakla birlikte pekçok bitkide de (alfalfa gibi) simptomsuz kalabilmektedir. Simptomlar büyük ölçüde enfekte edilen bitki ve enfeksiyon sırasındaki bitki yaşına bağlıdır (Zitter ve Murphy, 2009).



(a)

(b)

Şekil 2.1. Cucumber mosaic virüs enfeksiyonu sonucunda tepe büyümesinin azalması (a), şekilsiz ve benekli hıyar meyvesi (b) (Zitter ve Murphy, 2009).

Cucurbitaceae bitkilerin hemen hepsi, symptom siddeti değişmekle birlikte, duyarlıdır. Şiddetli epinasti, yaprak sapının aşağı doğru bükülmesi ve yaprak yüzey alanında azalma belirtileri yaz kabağında erken sezon simptomlarıdır (Şekil 2.2). Erken dönemde enfekte olan bitkiler şiddetli bir şekilde bodurlaşır, yapraklar şekilsiz ve meyve yüzeyindeki belirgin pürüzlülük nedeniyle pazarlanamaz duruma gelir (Şekil 2.2a,b). Kavun gibi bitkilerin yeni gelişen sürgünleri bodur kalır, meyveler symptom göstermese de kalitesi düşük olur (Şekil 2.2c). Bazı sarı kabak çeşidinde renk kırılması meydana gelir, meyvenin yeşil lekeli görünümde olmasına neden olmaktadır (Şekil 2.2d). Balkabağında erken enfeksiyon halinde meyvede şiddetli mozaik oluşur ve pazarlanamaz hale gelir (Şekil 2.2e) (Zitter ve Murphy, 2009).



(a)

(b)

(c)



(ç)

(d)

Şekil 2.2. Cucurbitlerin *Cucumber mosaic virüs* enfeksiyonu . Yaz kabağında şiddetli epinasti (a). Yeşil kabakda bodur ve şekilsiz yapraklar (b). Misket kavunda bodur büyüyen uç sürgünler (c). Balkabağında yeşil lekeler (ç). Kabak meyvesinde mozaik oluşumlar (d) (Zitter ve Murphy, 2009).

Biber bitkisinde yaprak belirtileri enfeksiyon dönemine göre değişmektedir. İlk sistemik belirtilerin ortaya çıkışı genç yaprakların alt kısımlarının veya tamamının sararmasıdır (kloroz). Bitki yaprakları yaşlandıkça bu yapraklarda meşe yaprağı ve halkalı leke belirtileri gelişebilir (Şekil 2.3.a). Yeni yapraklar çıktığında bu yapraklar tüm yaprağı kaplayabilecek mozaik oluşumlar gösterir. Kloroz ve klorotik mozaik belirtileri gösteren yaprakların devamında gelişen yapraklar çıkıntılı primer damarlar ile batık interveinal yaprak ayası içeren yapraklardır. Bu yapraklar koyu yeşil, parlak bitki yapraklarının aksine, donuk açık yeşil bir görünüme sahiptir (Şekil 2.3b). CMV ile enfekte olmuş biber bitkileri gelişimin erken döneminde enfekte olmuş ise bitkiler

bodurlaşmaya meyillidir, gelişimin daha sonraki aşamalarında enfekte olmuş bitkiler daha az bodurlaşabilirler. Biber meyvesi genellikle halkalı lekeli ve pürüzlü olup pazarlanamaz (Şekil 2.4c) (Zitter ve Murphy, 2009).



(a)

(b)

(c)

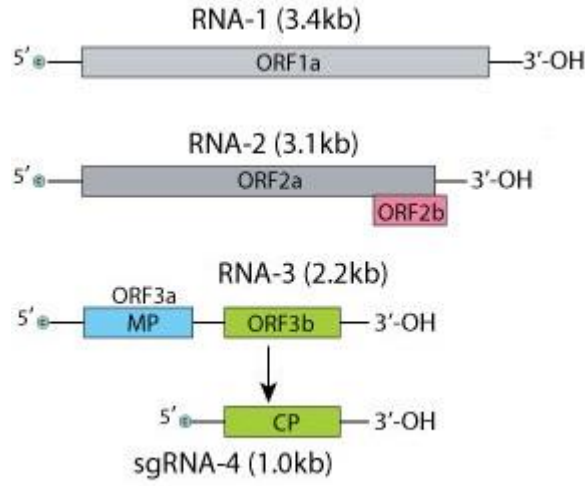
Şekil 2.3. Cucurbit olmayan bitkilerde *Cucumber mosaic virüs* enfeksiyonu. Biber bitkisinde meşe yaprağı ve halkalı leke oluşumları (a). Bozuk, donuk açık yeşil biber yaprakları (b). Halkalı lekeli ve pürüzlü biber meyvesi (c) (Zitter ve Murphy, 2009).

Domateste erken dönemde enfeksiyon sonucu sararma, çalılma ve bodurlaşma görülür. Yapraklar benekli olabilir, en tipik belirtiler yaprakların ayakkabı bağı adı verilen belirtide olmasıdır (Şekil 2.4). CMV belirtileri geçişli olabilir, alt yapraklar veya yeni gelişen tepe yapraklar şiddetli symptom gösterirken, orta yapraklar genellikle normaldir. Şiddetli etkilenmiş bitkilerde meyve verimi çok az, olan meyveler küçük ve benekli veya nekrotik lekeli, olgunlaşması geçdir (Zitter ve Murphy, 2009).



Şekil 2.4. Domateste CMV enfeksiyonuyla oluşan ayakkabı bağı symptomu (Zitter ve Murphy, 2009).

CMV *Bromoviridae* familyasının *Cucumovirus* cinsinin tip üyesidir. Virüs 28 nm çapında küresel parikül içerir. Genomu üç adet tek-zincir, messenger-anlamalı RNA molekülü, RNA 1 (~3,350 nükleotid), RNA 2 (~3,050 nükleotid) ve RNA 3 (~2,200 nükleotid) içerir. Her RNA molekülü birbirinden farklı küresel şekilli partiküllerden oluşan koruyucu protein tabakası ile çevrilir. Bu nedenle, olgun bir CMV molekülü üç RNA patikülü içerir, birisi RNA1, diğeri RNA2 ve üçüncüsü RNA3'dür. RNA3 partikülü kılıf protein kodlayan ve CMV'nin kılıf proteinin üreten RNA4 (~1,030 nükleotid) olarak adlandırılan dördüncü bir zincir içerir. Bu tip RNA'ya subgenomik RNA denir ve replikasyon sırasında yeni bir zincir üretilir (Şekil 2.5) (Zitter ve Murphy, 2009).



Şekil 2.5. *Cucumber mosaic virus* genom yapısı (Viral Zone'dan alıntıdır)

RNA1, 1a olarak adlandırılan ve viral genomun replikasyonundan sorumlu olan tek bir protein kodlar. 1a proteini iki fonksiyonel domaine sahiptir: N-terminal ve C-terminal domainler. N-terminal domain methyltransferase aktivitesine sahiptir, bu aktivasyon genomik ve subgenomik RNA'ların 5'-ucuna cap yapısının eklenmesini sağlar. Diğer taraftan, 1a proteinin C-terminal domaini viral replikasyon sırasında RNA'nın açılmasını sağlayan putative helikazdır. RNA2, 2a ve 2b olarak adlandırılan iki protein kodlar. 2a proteini 2b proteinin N'ucundadır ve viral genomik replikasyonda rol alır. 2a protein CMV replikasyonu için gereklidir ve tipik olarak RNA-depended-RNA motifine sahiptir. Bu motif RNA zincirini complemeter RNA yapmak üzere kalıp olarak kullanır. 2b protein konukçunun posttranskripsiyonel gen susturma mekanizmasına

karşı koyar. CMV bitkiyi enfekte ettiğinde bitki dayanıklılık mekanizmasını aktive ederek cevap verir ve sonucunda virüsün enfekte ettiği bölgede veya yeni dokularda yayılması enjekte edilir. Bu tip dayanıklılık gen susturma olarak adlandırılır. RNA3, 3a ve kılıf protein olarak adlandırılan iki protein kodlar. 3a proteini (diğer adıyla hareket proteini, MP) virüsün hücreden hücreye ve bitki içinde uzak mesafelere yayılmasında gereklidir. Bir subgenomik RNA'dan (RNA4)'dan üretilen kılıf protein virüs partiküllerinin yaprak biti vektörlerle taşınmasındaki tek belirleyicidir. Kılıf protein virüsün bitki içinde uzak mesafelere yayılmasında doğrudan etkiye sahipse de hücreden hücreye yayılmada da rol alır. CMV 300 nt uzunluğunda fonksiyonu bilinmeyen RNA2 ve RNA3'ün 3'ucunu içeren küçük bir RNA5 de üretebilir. Genomik ve subgenomik RNA'lardan farklı olarak RNA5'de cap yoktur. RNA5 ve RNA4 (2b protein) sadece subgroup II izolatlarında bulunmaktadır (Jacquemond, 2012).

CMV'nin genomik ve subgenomik RNA türlerinin dışında, bazı ırkları bir uydu (satellite) RNA'yı destekler (RNA 5 veya satRNA olarak adlandırılır). Bir satRNA, tek-zincirli, yaklaşık 332-342 nükleotid uzunluğunda ve replikasyonu tamamen CMV'ye bağımlıdır. Bunun dışında, satRNA CMV partiküllerinde enkapside olmuştur, bu durum ona bitkiden bitkiye yaprak bitleriyle taşınan CMV ile hareket imkânı sağlar. Bu satRNA CMV'ye (Helper virüs olarak adlandırılır) gerekli bir fonksiyon sağlamaz. CMV ile birkilte satRNA oluşumu CMV-nedeniyle oluşan semptomları veya semptomların şiddeti üzerinde etkili olmayabilir. Hastalık ekspresyonu satRNA türü, CMV izolatu veya ırkı ve konukçu bitkiye göre değişir (Zitter ve Murphy, 2009). CMV'nin Satellit RNA'larının etkisi ile ilgili olarak 1995 yılında yapılan çalışmalarda ortaya konmuş ve CMV'nün enfekte ettiği bitkilerde çoğalma miktarını etkilediği sonucu ortaya çıkmıştır (Gal-on vd., 1995). Satellit RNA'lar ile yapılan çalışmalar, virüsün ırklarına ve konukçusuna göre değişmekle birlikte, virüsün bitkideki çoğalma miktarını etkilediğini ortaya koymaktadır.

CMV ırkları iki altgruba ayrılır, altgrup I ve altgrup II, serolojik ve dizi analizi ile ayrılırlar. Altgrup I ırkları kendi içinde yem bezelyesindeki (*Vigna unguiculata*) semptomlar ve RNA3'deki 5'- kodlanmayan bölge varyasyonuna göre IA ve IB olarak ayrılır (Rossincik vd., 1999). Ayrıca altgrup IA ırkları sistemik mozaik semptomlar üretir. IB ırkları inokule edildiği bitkinin yaprağında nekrotik lokal lezyonlar meydana getirir. Bazı CMV ırkları konukçu spesifiktir, aynı familyadan bazı belirli konukçuları

enfekteler; örneğin CMV'nin baklagil ırkı. CMV serolojik olarak *Tomato aspermy virus* and *Peanut stunt* virüs ile ilişkilidir (Zitter ve Murphy, 2009). Farklı altgruplara ait izolatların dizi benzerlikleri genomik bölgeye göre %69 ile %77 arasında değişmektedir. Aynı altgrup içerisindeki izolatların benzerlikleri altgrup I için % 88, altgrup II için %96'dan fazladır (García-Arenal ve Palukaitis, 2008). CMV popülasyonlarının en önemli kaynağı genomik segmentlerin yeniden düzenlenmesi (reassortment) veya rekombinasyonlardır ve bu gibi izolatlar birçok ülkede bildirilmiştir (Bonnet vd. 2005; Nouri vd, 2014). Altgrup I daha çok tropik ve subtropik alanlarda şiddetli simptom ve epidemi yaparken, altgrup II daha çok ılıman iklimlerde ortaya çıkmaktadır (Haase vd., 1989).

Çok geniş konukçu dizisinin bulunması sebebiyle çok sayıda yabancı ot CMV'yi barındırabilir ve böylece sezonun erken dönemlerinde yayılmaya yardımcı olur. Çok yıllık, yıllık veya kışlık yabancı otlar CMV'yi köklerinde, yumrularında ve toprak altı organlarında tüm kış boyunca barındırırlar. Enfekteli yabancı otlar genellikle simptomsuzdurlar. Tohumun da CMV için kaynak olabileceği sıçankulağı otunda (taşınma oranı %40) bildirilmiştir. CMV'nin tohum kökenli olduğu diğer bitki türleri *Amaranthaceae* (syn. *Chenopodiaceae*) (ıspanak), *Brassicaceae*, *Fabaceae* (syn. *Leguminosae*) (fasulye, nohut, yembezelyesi, mercimek, acı bakla, topraklatı yoncası) and *Labiatae*. *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* 'yi de içeren 80'den fazla yaprak biti türü (Insecta: Hemiptera: Aphidoidea) virüsü non-persistent olarak stilet-kökenli yolla taşımaktadır. Taşınma kapasitesi yaprak türü, virüs ırkı ve konukçu bitki türüne çevresel koşullar ve yılın dönemine göre değişmektedir. Deneysel olarak CMV mekanik olarak kolayca taşınabilmektedir, ancak etkinlik inokulum hazırlanan buffera 10 mM sodium sülfite eklenmesi ile artmaktadır. CMV tobacco mosaic virüs gibi stabil bir virüs olmadığından arazi koşullarında işçilerin dokunması ile taşınması pek muhtemel görülmemektedir (Zitter ve Murphy, 2009).

CMV'nin neden olduğu. ürün kayıpları yıldan yıla değişebilir, çünkü ilkbahar veya sonbaharda virüs taşınmasından sorumlu yaprak biti popülasyonunun miktarı, coğrafik lokasyon hastalık oluşumunu etkilemektedir. Eğer ilkbahar ve sonbahar soğuk ve ıslak geçerse yaprak biti sayısı azalır ve virüs yayılması sporadik olur. Eğer ilkbahar ve sonbahar ılıman ve daha az yağışlı geçerse, yaprak biti popülasyonu hızla artar ve virüs daha hızlı yayılır. Bu dönemlerde enfeksiyon 100% lere ulaşabilir. Genelde %10-20

kayıp gözlenmektedir. Virüsün konukçu dizisi sebzeler enginar, fasulye, pancar, havuç, kereviz, cucurbitler (hıyar, lif kabağı, kavun, bal kabağı, yaz ve kış kabağı, karpuz), marul, bezelye, biber, patates, tatlı patates (*Ipomoea*), ıspanak ve domates. Bunun dışında alfalfa (simptomsuz), muz (simptomsuz veya hafif-şiddetli zarar), nohut, acı bakla, rapiska, toprakaltı yoncası ve yam (*Dioscorea* spp.)dır. Süs bitkilerinden anemon, dalya, delphinium, sardunya, glayöl, zambak, kadife çiçeği, petunya, phlox, viyola, zinnia vb. ve odunsu ve yarı odunsu bitkiler (ixora, tutku meyvesi, vb.) konukçudur (Zitter ve Murphy, 2009).

Virüs hastalıkları ile mücadelede bitkide genetik dayanıklılık geliştirme en basit ve en eski metotlardanır. CMV'ye dayanıklılık hıyar ve ıspanakta başarılı olmuştur, ancak diğer kültür bitkilerinde değişken olmuştur. Diğer taraftan enfeksiyon kaynaklarının yok edilmesi bakımından yabancı otların özellikle CMV yayılmasında anahtar rol oynayan yıllık ve çok yıllık bitkilerin yok edilmesi virüs baskısını düşürebilir. Diğer bir yöntem, uzun, enfeksiyona duyarlı olmayan bariyer bitkiler ile (Örn: mısır) kullanmak enfeksiyonu geçiktirebilmektedir. CMV kontrolünde yaprak biti vektörlerini engellemek için insektisit ve mineral yağ kullanımı yaygındır. Çapraz dayanıklılık ile üretilen bitkilerin yetiştirmede kullanılması da diğer bir yöntemdir. Çapraz dayanıklılıkta virüsün zayıf ırkları, satRNA kullanılarak yetiştirilecek bitkinin enfekte edilmesi ve daha sonra şiddetli enfeksiyon meydana getiren ırkları ile enfeksiyon sonucu patojenin bitkide gelişmemesi esasına dayanmaktadır. CMV kılıf protein, satRNA gibi genleri eksprese eden transgenik domates bitkileri mevcuttur. Ayrıca bitkilerde dayanıklılık mekanizmasını arttıran bazı bakterilerin uygulanması ile gerek virüs ve gerekse yaprak bitkisi ile mücadele uygulamaları da mevcuttur (Zitter ve Murphy, 2009).

2.1 CMV Teşhis ve Tanısı

Viral diagnostik, bitki hastalıklarıyla mücadelede en önemli araçlardan biridir. Bitki virüslerinin kontrolü, bitki sağlığı uygulamaları, böcek vektörü kontrolü ve spesifik bitki virüslerine karşı dayanıklı çeşitlerin kullanımına dayanır. Etkili kontrol uygulamalarını başlatmak için virüsler öncelikle doğru bir şekilde tanımlanmalıdır. Virologlar, geleneksel biyolojik indikatörlerin kullanımından ziyade, yeni virüsler

tanımlamak, virüslerin grupları, cinsleri ve familyaları arasında ilişki kurmak için moleküler teşhis ve dizi verisine geçmişlerdir (Jordan vd., 2008).

Diagnostik olarak CMV teşhisinde kullanılan hassas bitkiler hıyar (virüs yeşil ya da sarı-yeşil sistemik mozaik oluşturur), domates (virüs sistemik mozaik ve yaprak ayasının daha dar olmasına neden olur), *Chenopodium amaranticolor* ve *C. quinoa* (virüs enfeksiyonu ile klorotik veya nekrotik lokal lezyonlar oluşur ancak sistemik lezyon oluşmaz)'dır. Teşhis amacıyla ELISA ve dot immunobinding assay (DIBA) gibi serolojik metodlar genellikle kullanılan yöntemlerdir. Ancak son yıllarda, RT-PCR kullanımı hassasiyetinin daha yüksek olması nedeniyle tercih edilmektedir. Diğer taraftan CMV genomik RNA'ların kopya sayılarının da belirlenmesine olanak veren real-time RT-PCR sistemleri de yaygındır. CMV teşhisi için kullanılan diğer metodlar oligonucleotide microarray-temelli teknikler ve immunogold–silver staining (IGSS) tekniğidir (Moreno ve Fereres, 2012).

CMV teşhisi için ticari olarak kullanılabilen pekçok antiserum bulunmaktadır. Rutin testlerde yaygın olarak DAS-ELISA yöntemi antiserumun sağlandığı firma önerilerine göre yapılmaktadır. Buna alternatif olarak arazide veya araziden toplanan örneklerin laboratuvarında işlenerek uzun süre korunmasını sağlayan dot immunobinding assay (DIBA) de uygulanabilmektedir. Bu teknikte bitki dokusu ezilerek bir miktar protein tutan membran üzerine damlatılmakta, bitki özsuğu ile membranda tutunan hedef protein (virüs kılıf proteini) primer bir antibadi ile tanınmakta, bunu takiben ikinci bir işaretli antibadi uygulaması ile işarete göre renk reaksiyonu geliştirilmektedir (Zein ve Miyatake, 2009). Bu teknik özellikle vektörlerle taşınan virüs teşhisinde pratik olmakta, ELISA'dan daha az miktarda patojen olması yeterli olmaktadır.

Ancak düşük titrasyondaki viral partiküllerin teşhisine olanak veren PCR temelli sistemler hızla diagnostik sistemde yerini almıştır. Bhat ve Siju (2007), CMV ve *Pepper yellow mottle virüs* (PYMoV)'ü aynı anda teşhise olanak veren tek tüpte RT-PCR sistemi geliştirmiştir. Bu sistemde CMV'nin 650 bp kılıf protein fragmenti ve PYMoV'nin 450 bp ORF I fragmenti sağlayan primerler kullanarak mütipleks PCR gerçekleştirmiştir. Uyguladıkları metodun hızlı, kullanışlı ve hassas bir teşhis için çok küçük miktarda örnek gerektirdiğini bildirmişlerdir. Bashir ve Siljo (2014) CMV'nin hassas ve düşük titrasyonda teşhisine olanak veren Real-time PCR ve real-time RT-PCR

metotlarını geliştirmişlerdir. Araştırıcılar biberde CMV'nin SYBR Green real time PCR ile teşhisini yapmışlar ve yöntemin klasik RT-PCR'ye göre 1000 kat daha hassas olduğunu belirtmişlerdir.

Bitki özsularındaki bazı bileşikler PCR çalışmaları için hazırlanan RNA ekstraktlarının kalitesinin iyi olmamasına neden olabilmektedir. Bu nedenle immunocapture (IC) RT-PCR sistemleri geliştirilmiştir. Bu metotta Bitki özsuyundaki viral partiküller virüse özgü antiadilerle kaplanmış tüplere eklenmekte ve burada immünolojik olarak yakalanmakta, daha sonra cDNA ve PCR işlemleri yapılmaktadır (Candresse vd., 1995). Bu yöntemde PCR için kullanılan viral partiküller intakt olarak kaldığı gibi test için viral konsantrasyon da artırılmakta ve testin hassasiyeti arttırılmaktadır. Varveri ve Boutsika (1999) domates bitkilerinde CMV sörveyi ve altgruplarının belirlenmesi çalışmasında IC-RT-PCR yöntemini etkili bir şekilde kullanmışlardır.

2.2 CMV Alt Gruplarının Belirlenmesi

CMV'nin altgruplarını belirlemek için moleküler üç farklı metot kullanılabilir. Birincisi ve en genel kullanılanı RNA dizilemedir. Orijinal RNA'dan amplifiye edilen dizi, bilinen ırkların dizileri ile nükleotid ve amino asit seviyesinde karşılaştırılır, filogenetik çalışmalar ile gruplar belirlenir (Bashir vd., 2006; Chen vd., 2007; Roossinck, 2002). İkinci metodta, CMV'nin farklı altgruplarına spesifik primerler kullanılır. Bu spesifik primerler sadece alt gruplarını ayıran RNA alanlarıyla sınırlıdır (Yanming et al., 1997). Bu spesifik primerler kullanılarak multipleks PCR ile de altgrupların belirlenmesi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Chen vd., (2011) CMV altgrupları, satRNA, tomato mosaic virüs (ToMV) ve tobacco mosaic virus (TMV) ü aynı anda teşhise olarak veren multipleks PCR yöntemi geliştirmişler ve yöntemin DAS-ELISA'dan 100 kat daha hassas olduğunu bildirmişlerdir. Son metod, restriktio-tipleme, DNA sekansındaki spesifik lokasyonları kesmek için tasarlanmış restriksiyon enzimlerinin kullanılmasını içerir. Böyle bir enzim olan *MspI*, RNA 3'ün belirli dizilerden kesilmesi sonucu oluşan restriksiyon fragment oluşumlarının sayısına bağılı olarak bazı CMV izolatının kendi alt gruplarına ayrılmasında oldukça başarılı olmuştur. CMV'nin Ixora ırkı (altgrup IB) dışında tüm CMV izolatlarının kılıf proteininin tamamı ve 5' ucundan 92 bp ve 3' ucundan 123 bp bölgelerini kapsayan 872 bp uzunluğunda fragmentin *MspI* enzimi ile kesim sonucu, eğer altgrup I ise iki fragment (537 bp ve 335 bp), altgrup II

ise 1 adedi çok hafif görülebilen 5 fragment sonuçlamaktadır (Bashir vd., 2006). Restrikto-tipleme, re-assortant izolatların belirlenmesinde de başarılı olmaktadır (Chen vd., 2007). Re-assortment çok genomlu virüslerde doğal bir oluşum olmakla birlikte genetik varyasyon ve yeni ırkların gelişmesinde önemlidir. CMV’de reassortment altgrup I ile II den ziyade yüksek derecede benzerlikten dolayı daha çok altgrup IA ile IB arasında gerçekleşmektedir (Bonnet vd., 2005; Fraile vd., 1997).

CMV ırklarının altgrup çeşitliliği serolojik olarak da belirlenebilir. Hsu vd (2000) altgrup I ve II’ye spesifik monoklonal antibodi geliştirmişlerdir, böylece genel CMV teşhisi veya altgrup teşhisi ELISA ile yapılabilir. Altgrup IA ve IB tanılması için daha ileri bir aşama olarak dizileme yapılması gereklidir.

2.3 Kırgızistan’da Bitki Virüs Hastalıkları

Bilgimiz dahilinde Kırgızistan’da bitki virüs hastalıkları ile ilgili çalışma bulunmamaktadır.

2.4 Türkiye’de CMV

Erdiller ve Özayanar (1983)’ın Ankara ilinde yetiştirilen hıyar örneklerinde yaptıkları mekanik inokulasyon, serolojik testler ve elektron mikroskobu çalışmalarıyla CMV enfeksiyonu belirlemişlerdir. Cucurbit bitkilerde yapılan sörveyler ve DAS-ELISA ile teşhis çalışmaları sonucunda CMV Samsun %20,6 (Sevik ve Arli-Sokmen, 2003), Gaziantep ilinde %36, Karaman’da (Özaslan vd., 2006) oranında belirlenmiştir. CMV enfeksiyonu biber bitkilerinde İslahiyede %25 ve Nurdağı’nda %37 olarak belirlenmiştir (Özaslan vd., 2006). Tekirdag, Edirne ve Kırklareli illerinde CMV enfeksiyonu karpuzda %19,9, kavunda %7,2 olarak belirlenmiştir (Köklü ve Yılmaz, 2006). Burdur ilinde biberde %6,45 enfeksiyon oranı belirlenmiştir (Culal-Kılıç vd., 2015).

Türkiye’de CMV ‘nin konukçusu olarak ilk kayıt örnekleri de mevcuttur. Çanakkale’de virüs belirtileri gösteren bürüncelerde CMV testi DAS-ELISA ile yapılmış ve 6 örnekte enfeksiyon tespit edilmiştir, sonuçlar PCR ve dizi analizleri ile teyid edilmiştir, tespit edilen CMV izolatı altgrup IB olarak belirlenmiştir (Karanfil ve Korkmaz, 2017). Virüs belirtileri gösteren 120 enginar bitkisinden 5 adedinde CMV enfeksiyonları

DAS-ELISA ile tespit edilmiş sonuçlar PCR ve dizi analizleri ile teyid edilmiştir (Ergün vd., 2013). Mersin’de Yapraklı Sütotu ya da Küçük Kelebek, olarak bilinen *Polygala myrtifolia*’da CMV tespit edilmiş ve bu süs bitkisinde enfeksiyon oranının %13.1 olduğu belirtilmiştir (Koç ve Fidan, 2017). Aynı şekilde, Samsun ilinde, viral belirtiler gösteren brokoli bitkilerinde (Sevik, 2017) ve Orta Karadeniz’de maydonozlarda (Sevik ve Akcucura, 2011), Uşak ilinde pepino bitkilerinde (Özdemir ve Erilmez, 2012) CMV enfeksiyonu tespit edilmiştir.

Dursunoğlu ve Ertunç, (2003) Ankara ili ve çevresinde yetiştirilen kabakgillerde görülen CMV izolatlarının altgrup I olarak karakterize etmiştir.

Şanlıurfa ilinde, 2013-2014 yıllarında, biberde CMV enfeksiyon oranı iki yıl değerlendirilmiş, ilk yıl %47, ikinci yıl %76 olarak belirlenmiştir (Ünlü ve Güldür, 2004).

2.5 Dünyada CMV

İran’ın kuzeybatının farklı bölgelerinden toplanan domates ve *Cucurbitaceae* bitki örnekleri kullanılarak elde edilen CMV izolatlarının moleküler karakterizasyonu, yapılmıştır (Bashir vd., 2006) ELISA ile taramadan sonra, 91 CMV ile enfekteli örnek tespit edilmiştir. Sekiz izolatın biyolojik özellikleri karşılaştırılmış, kabak ve domates bitkilerinde iki ayrı fenotip ortaya çıkmıştır. İran CMV izolatlarının kılıf proteini (CP) hareket proteini (MP) ve 2b gen bölgesi nükleotid dizileri gen bankasındaki diğer CMV izolatlarıyla filogenetik analizi sonucu, İran izolatları CP ve MP genlerine göre altgrup IA ve IB içerisinde yer alırken, 2b genine göre altgrup IA içerisinde yer almıştır. Bu yeni sınıflamanın verileri, İran’da CMV’nin evriminde önemli olup, İran izolatlarının ortak bir atadan geldiğini göstermektedir.

Mısırdaki leke ve cücelik symptomuna neden olan bir virüs Kore’nin Ulleng-do bölgesinde gözlenmiş; biyolojik, serolojik ve moleküler özelliklere dayalı olarak CMV-ZM olarak tespit edilmiştir (Mi-Kyeong Kim vd., 2011). Konukçu dizisi araştırmalarında, CMV-ZM izolatı, *Datura stramonium*, *Vigna unguiculata*, *Cucurbita moschata*, *C. amaranticolor* üzerinde lokal lezyonları oluşturmuştur. Oysaki bu izolat *N. tabacum*, *C. annuum*, *Solanum lycopersicum*, *S. melongena*, *C. pepo* ve *Zea mays* üzerinde sistemik

mozayik üretmiştir. Buna ek olarak, inokule edilmiş *N. glutinosa* bitkilerinin yaprakları üzerinde klorotik halka lekeler, üst yapraklarda şiddetli sistemik mozaik ve deformasyon belirtileri görülmüştür. Her bir RNA genom parçasının komple nükleotid dizileri belirlenmiş ve diğer CMV izolatları ile karşılaştırılmıştır. ORF nükleotid dizisinin karşılaştırılması, CMV altgrup II ile sadece % 78 dizi benzerliği gösterirken, her CMV altgrup IA ve IB ile yaklaşık % 89.2-92.4 arasında dizi benzerliği göstermiştir. RNA2 ORF'lerinin nükleotid dizisi analizi, altgrup I ile % 85.3-97.6 arasında dizi benzerliği ortaya koymuştur. RNA3'ün ORF'lerinde, nükleotid sekans benzerlik seviyeleri CMV altgrup I'de % 92-99.2'den ve altgrup II CMV izolatları ile % 82'den daha düşüktür. Bu sonuçlar, CMV-ZM izolatının altgrup I 'e göre altgrup II 'ye daha yakından ilişkili olduğunu ve dolayısıyla CMV-ZM izolatının biyolojik ve moleküler analizlerine dayalı CMV altgrup I olarak sınıflandırılabileceğini göstermektedir.

2003 ve 2004 yıllarında, kuzeydoğu İspanya'daki domates alanlarında, semptomsuz yapraklar ve meyvede renk kaybı, meyve tutumunda azalma ve olgunlaşma döneminde, üzerinde hafif deformasyon ile karakterize edilen bir hastalık tespit edilmiştir (Aramburu vd., 2007). DAS ELISA analizi, hastalıklı bitkilerde CMV varlığını ortaya çıkarmıştır. CMV izolatları, çift kollu RNA'ların (dsRNA'lar) poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) analizi ve nükleotid dizi analizi ile karakterize edilmiş ve kontrol olarak kullanılan alt gruplara ait bazı CMV izolatları ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışma için seçilen enfekteli domates bitkilerinden elde edilen toplam 12 izolat, üç genomik dsRNA için aynı elektroforez modelini vermiştir. Birkaç yıl önce aynı bölgede toplanan CMV izolatlarının gösterdiği desenlere göre farklılık göstermiştir. Bu CMV izolatlarından nükleotid dizisinin kimliğini ve diğer izolatların kısmi İtalya'daki Tfn ırkla ve 1992'de Barselona'da toplanan BAR92 / 1 izolat ile karşılaştırıldığında, her ikisi de % 99 CMV altgrup IB 'ye ait olduğu tespit edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda doğu İspanya'da bulunan bu altgrupun CMV izolatları 1996'dan sonra saptanmamıştır. Önceki yıllarda daha sık tespit edilen CMV izolatlarının temsilcileri olarak seçilen iki izolatın nükleotid dizileri CMV altgrup IA 'ya ait olduğunu ortaya koymuştur. İspanya'nın kuzey doğusundaki CMV altgrup IB izolatlarının ortaya çıkışı ve nedenleri tartışılmıştır.

Son yıllarda, Polonya'da kabakgillerde CMV görülmüştür. Enfeksiyonlu bitkilerde mozaik ve kloroz gösteren izolatların yanında yeni nekrotik izolatlar da tanımlanmıştır. Ülkenin çeşitli bölgelerinde kabaktan toplanan 27 CMV izolatının moleküler değişkenliği analiz edilmiştir. CP ve MP genlerini kodlayan dizi ve filogenetik analizler Polonya izolatlarının altgrup II ile IA olmak üzere iki alt gruba ait olduğu tespit edilmiştir. RNA3 için IA-MP / II-CP modeline sahip yeni rekombinant varyantlar da tespit edilmiştir (Hasio vd., 2017).

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOD

3.1 Bitki Materyallerinin Toplanması

CMV izolatlarının temini amacıyla, Chui bölgesinde *Cucurbitaceae* (hıyar, kabak) ve *Solanaceae* (Domates, biber, patlıcan, patates) gruplarındaki kültür bitkilerinin yetiştiriciliği yapılan alanlara, 2017 yılı Haziran-Temmuz aylarında arazi çıkışları düzenlenerek sekiz ilçeden virüs belirtileri gözlenen bitkilerinden toplam 96 örnek toplanmıştır (Şekil 3.1). Virüs belirtileri olarak bitkide küçükleme, deformasyon ve genç sürgünlerde geriye doğru ölüm, yapraklarda ve meyveler üzerinde halkalı lekeler, solgunluk, nekrotik ve klorotik lezyonlar, meyvelerde deformasyon ve lezyonlar gibi belirtiler aranmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Kırgızistan ve Chui Bölgesi



Şekil 3.2. Arazi çıkışları ve simptomlu örneklerin toplanması

Toplanan örnekler daha sonra kalsiyum klorür (CaCl_2) yardımı ile kurutularak testler yapılncaya kadar $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. Kalsiyum klorür yardımıyla bitki örneklerini kurutmak için her bir örnek simptomlu yaprak bölgelerinden steril bir makas yardımı ile küçük parçalara kesilerek bir peçete içinde toplanıp etiketi ile birlikte küçük bir bohça haline getirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan bitki örneklerinin bohçaları, tabanında 2-3 cm yüksekliğe kadar CaCl_2 bulunan 5 lt'lik plastik kavanozlara yerleştirilmiştir. Bitki materyali içeren bohçaların CaCl_2 ile doğrudan teması önlemek için CaCl_2 'nin üzerine peçete kâğıtları yerleştirilmiştir. Bu kavanozlar $+4^\circ\text{C}$ 'de bitki örnekleri kuruyuncaya kadar tutulmuştur. Arada bohçalar kontrol edilerek bitkilerin kuruma durumları ve alttakilerin üste çıkarılması işlemleri yapılmıştır. Bitki örnekleri kuruduktan sonra kese kâğıtları veya falkon tüplere aktarılarak $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir (Şekil 3.2).



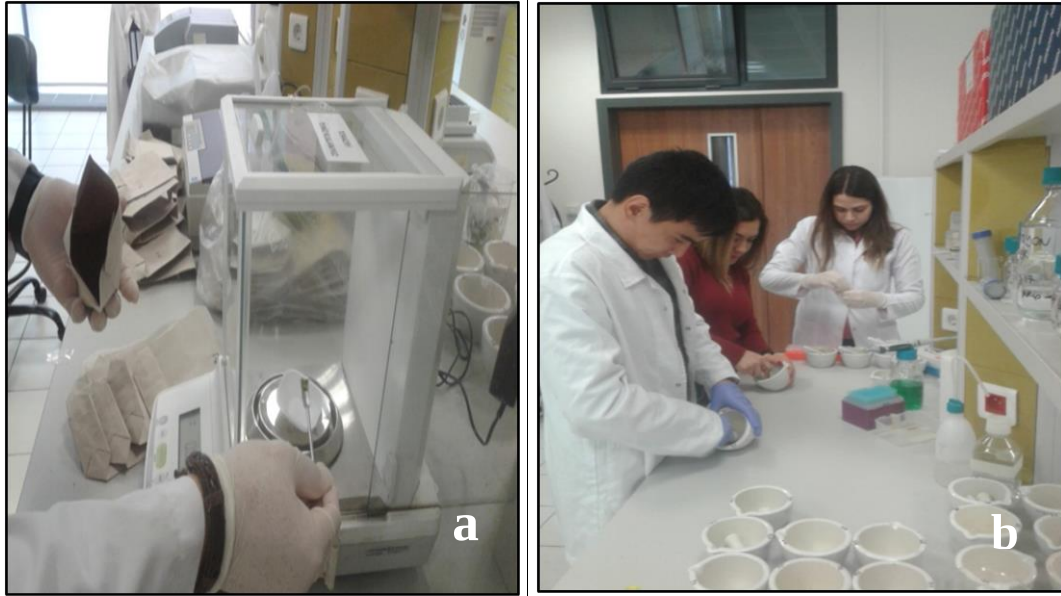
Şekil 3.3. Bitki örneklerin kese kağıtlarda muhafazası

3.2 Toplanan Örneklerde CMV Teşhisi

3.2.1 Double antibody sandwich- enzyme linked immuno sorbent assay (DAS ELISA) ile CMV teşhisi

Tüm örneklerin DAS-ELISA ile testi amacıyla Bioreba firmasından temin edilen CMV antiserum kiti kullanılmıştır. Test tekniği, Clark ve Adams, (1977)'ye göre yürütülmüştür. Toplanan bitki örnekleri kurutulmuş olduğundan 0,5 gram bitki örneği havan-havan eli yardımıyla 5 ml phosphate buffer (PBS) (8.0 g/l NaCl, 0.2 g/l KH_2PO_4 , 2.9 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/l KCl, 0.2 g/l NaN_3 , 20 g/l polyvinylpyrrolidone-25, pH 7.4) içerisinde ezilmiştir ve bitki öz suyu çıkartılmıştır (Şekil 3.3). ELISA tabakaları karbonat bufferda (1.59 g/l Na_2CO_3 , 2.93 g/l NaHCO_3 , 0.2 g/l NaN_3 , pH 9.6) hazırlanan virüse özgü antiserumlarla (1:1000 IgG) her bir çukura 100 µl eklenerek ve 37°C'de 4 saat inkübe edilerek kaplanmıştır (Şekil 3.4). İnkübasyonu takiben yıkama bufferı olan PBST (8.0 g/l NaCl, 0.2 g/l KH_2PO_4 , 2.9 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/l KCl, 0.2 g/l NaN_3 , 0.5 ml/l Tween- 20) ile 3 kez 1 dakika süre ile yıkanan tabakalara ezilen örneklerden 100 µl eklenerek tabakalar nem çemerine alınmış ve 4°C'de tüm gece

bekletilmiştir. Daha sonra tekrar PBST ile 5 kez yıkanan tabakalara konjugat buffer (PBST + 2% polyvniylpyrrolidone-25 + 0.2% BSA (bovine serum albumin), pH 7.4) içerisinde 1:1000 sulandırılarak hazırlanan virüse spesifik Alkalın Fosfataz ile konjuge edilmiş antibody eklenmiştir. Bu işlemi tabakaların nem çemberinde 37°C’de 2 saat inkübasyonu takip edilmiştir. İnkübasyon sonrası tekrarlanan 3 kez yıkama işleminin ardından tabaka çukurlarına 1 mg/ml oranında Para-nitrophenylphosphate içeren substrate buffer (97 ml/l diethanolamine, 0.2 g/l NaN₃, pH 9.8) eklenmesi takip etmiş, daha sonra tabakalarkaranlıkta oda sıcaklığında 2 saat süreyle muhafaza edilmiştir. Test sonucu oluşan reaksiyon miktarı (sarı renk oluşumu) spektroptmetrede absorbans değeri olarak 405 nm’de ELISA Reader’da ölçülmüştür. Negatif kontrol örnekte belirlenen absorbans değerinin en az iki katı değeri elde edilen örnekler CMV ile enfekteli kabul edilmiştir.



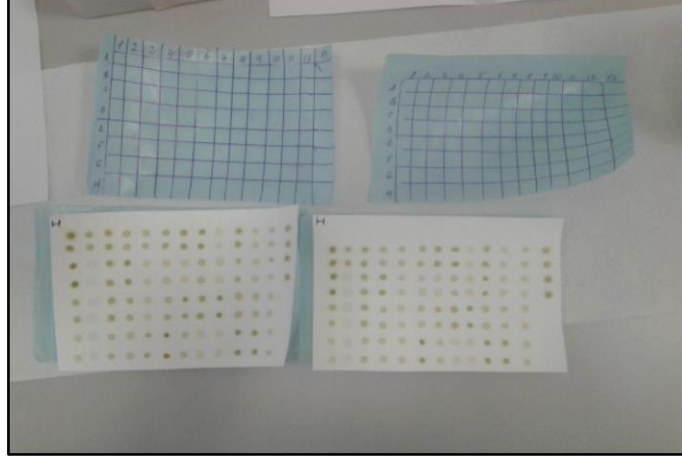
Şekil 3.4. Kurutulmuş örneklerin tartılması (a), bitki örneğinin havan-havan eli yardımıyla ezilmesi (b)



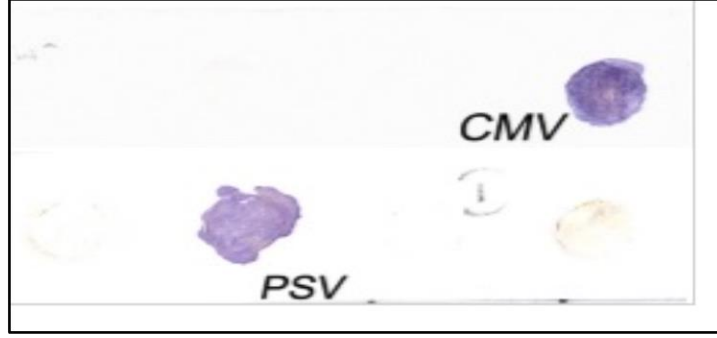
Şekil 3.5 ELISA tabakalarının CMV'ye özgü antiserumla kaplaması

3.2.2 Dot blot immuno assay (DBIA) ile CMV teşhisi

Araziden toplanan tüm örnekler, ELISA testi için ezildikten sonra elde edilen bitki ekstraktları kullanılarak nitrocelluloz membranlara 5 µl damlatılarak kuruduktan sonra zarflar içerisinde tüm örnekler membranlarda muhafaza edilmiştir (Şekil 3.6) (EPPO, 2015). Bu membranlardaki bitki örnekleri, daha sonra western blot metodunun bazı aşamaları takip edilerek CMV testi yapılmıştır. Buna göre, membranlar %5 Triton X-100 solüsyonunda 10 dak. klorofil ve diğer yaprak kalıntılarının uzaklaştırılması için yıkanmıştır. Daha sonra üç kez 0.05% Tween-20 içeren potassium phosphate buffered saline (KPS) (0.02 M K_2HPO_4 , 0.15 M NaCl, pH 7.4) ile yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra 5% yağsız süt tozu ve 0.5% bovine serum albumin (BSA) içeren KPS solüsyonu ile 20 dak süreyle membranlar bloklamıştır. Daha sonra membran CMV anti-virus polyclonal antibody ve goat anti-rabbit (GAR-AP) (herikisi de 1:10,000 KPS'de) ile 90 dak. muamele edilmiştir. Bu aşamadan sonra, renk reaksiyonu için nitroblue tetrazolium (NBT) ile 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) solüsyonu ile membranların 5-10 dak muamele işlemleri yapılmıştır. Sonuç olarak, virüs bulunan baskılarda pembe-mor renk değişimi meydana gelmesi ile CMV'nin bulunduğu işaret etmiştir (Şekil 3.7). Tüm aşamalar oda sıcaklığında 200 devir/dak'da çalışan çalkalayıcı üzerinde yapılmıştır.



Şekil 3.6. Ezilmiş bitki dokularının damlatıldığı nitrocelluloz membranlar



Şekil 3.7. DBIA yönteminin sonucunu gösteren örnek bir membran görüntüsü (Chang vd., 2011)

3.2.3 İmmuncapture reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (IC-RT-PCR) ile CMV teşhisi

Bu yöntem tüm örnekler üzerine uygulanmıştır. Bu amaçla, PCR tüpleri 1:1000 (Bioreba) oranında hazırlanan virüs antiserumundan 50 µl eklenerek 37°C’de 4 saat inkübe edilerek IgG ile kaplanmıştır. Daha sonra ELISA yıkama buffer ile üç kez yıkanarak, ELISA amacı ile ezilen bitki dokularından 50 µl eklendikten sonra 4°C’de tüm gece bekletilip ELISA yıkama buffer ile beş kez, 1 kez de % 0,1 Triton X-100 içeren steril solüsyon ile yıkanmıştır. Bu işlem ile bitki örneklerinde CMV enfeksiyonu var ise virüs partikülleri IgG aracılığı ile PCR tüplerinde yakalanmıştır. Daha sonra aynı tüp içerisinde cDNA elde edilip PCR aşaması gerçekleştirilmiştir.

Virüs partiküllerinin immunolojik olarak yakalandığı PCR tüplerindeki CMV RNA'sından komplementer DNA (cDNA) elde edilmiştir. Bu işlem için ticari olarak bulunabilen cDNA sentez kitleri (Thermo Scientific) firmanın önerileri doğrultusundaki metotla kullanılmıştır. Buna göre, 1 µl random hexamer (0.2 µg/µl), 1 µl dNTPs (10 µM) ve 4 µl RNA karışımı toplam 10 µl reaksiyona su ile tamamlanarak hazırlandıktan sonra 65 °C 'de 5 dakika tutulmuş ve hemen buz içerisine alınarak 2 dakika bekletilmiştir. Daha sonra üzerine son hacmi 10 µl olan 2 µl 5xRT buffer, 0,5 µl RNase inhibitör ve 1 µl MMLV reverse transkriptaz enzimi içeren karışım her bir tüpe eklenmiştir. cDNA sentezi için tüpler 25°C 5 dakika, 42 °C'de 45 dakika ve son aşamada enzim 70°'de 10 dakika tutularak in-aktifte edilmiştir. cDNA'lar kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Elde edilen cDNA'lar daha sonra polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizine tabi tutulmuştur. Bu amaçla, Çizelge 3.1'deki primerler araştırmada kullanılmıştır. PCR reaksiyon karışımı DNA son hacim 20 µl olacak şekilde 2 µl 10xPCR buffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.8), 500 mM KCl, 0.8% (v/v) Nonidet P40), 1 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl dNTPs (10 µM), 1 µl forward ve reverse primer (herbiri 10 µM), 0,2 µl Taq DNA polimeraz enzimi (5 U/ µl) (Thermo Scientific) içermiştir. DNA amplifikasyonları 95 °C'de 10 dakika ön denatürasyon, 95 °C'de 45 saniye, ilgili primere göre sıcaklıkta 45 saniye annealing, 72 °C 'de 45 saniyeden oluşan 35 döngü, son aşamada 72 °C'de 10 dakika uygulanarak gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri %1,5 agaroz jel ile elektroforeze tabi tutularak ethidium bromide solüsyonu ile boyandıktan sonra UV transilluminatörde incelenmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırma kapsamında kullanılan primer dizileri

Kullanım amacı	Primer adı	Primer dizisi (5'-3')	Hedef bölge	Annealin g sıcaklığı (°C)	Amplikon uzunluğu (bp)	Literatür
CMV teşhisi	P _{For}	CCATCACCTTAGC TTCCATGT	1403–1423	60	512	Grieco vd., 2000.
	P _{Rev}	TAACCTCCCAGTT CTCACCGT	1895–1915			
CMV subgroup I	CMV I (F)	GCCACCAAAAAT AGACCG	1484–1502	56	593	Chen vd., 2011
	CMV I (R)	ATCTGCTGGCGT GGATTCT	2057–2076			
CMV subgroup II	CMV II (F)	CTACGTTTATCTT CC	970–984	50	704	
	CMV II (R)	AACCGGTGATTT ACCATCGC	1655–1674			
CMV satRNA	satRNA (F)	GTTTTGTTTGTG GAGAGTTGCG	1–22	60	385	
	satRNA (R)	GGGTCCTGTAGA GGAATGTGACAT T	369–385			
18S rRNA (İç kontrol)	18S (F)	GAGAAACGGCTA CCACATCCA	399–419	52	255	
	18S (R)	CGTGCCATCCCA AAGTCCAAC	633–653			
Kılıf protein bölgesi	CP _f	GCTTCTCCGCGA G	1149–1161	55	866	Bashir vd., 2006
	CP _r	GCCGTAAGCTGG ATGGAC	1998–2015			
SYBR Real time PCR	CMV _f	TGTGGGTGACAG TCCGTAAA	362-381	59	111	Bhat ve Siljo, 2014
	CMV _r	ACGCGGCATACT GATAAACC	453-472			

3.2.4 SyberGreen real-time PCR ile CMV teşhisi

Daha önce immunocapture sonrası elde edilen tüm örneklerle ait cDNA'larla SyberGreen (SYBR) real time PCR gerçekleştirilmiştir. Real-time aşaması [Bhat ve Siljo, \(2014\)](#)'ya göre bazı değişikliklerle uygulanmıştır. Reaksiyon karışımı son hacmi 20 µl olacak şekilde 2 µl FastStart SYBR Green 2xMaster mix, 0,6 µl forward ve reverse primerler (herbiri 10 µM) ile hazırlanıp Rotor Gene real time PCR makinasında (Qiagen) amplifikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Amplifikasyon koşulları 95 °C'de 10 dakika, 40 döngü 95 °C'de 15 saniye, ilgili primer annealing sıcaklığında 15 saniye, 72 °C'de 25 saniye şeklinde uygulanmıştır. SYBR Real-Time PCR işlemini takiben elde edilen amplikonlar 60°C'den 95°C'ye kadar 5 saniye aralıklarla melt analizine tabi tutulmuştur. Melt analzinin altgrupları tespit etme durumu araştırılıp aynı zamanda ürünlerin %1,5 agaroz elektroforezi de yapılarak teyid işlemleri de gerçekleştirilmiştir.

3.3 CMV İzolatlarının Alt Gruplarının Belirlenmesi

DAS-ELISA ve PCR yöntemleri ile tespit edilen CMV izolatlarının alt gruplarının belirlenmesi amacıyla dört farklı yöntem uygulanmıştır:

3.3.1 ELISA ile serolojik olarak CMV alt grupların belirlenmesi

CMV'nin altgruplarının belirlenmesinde kullanılabilen antiserumlar geliştirilmiş ve ticari olarak bulunabilmektedir. Agdia firmasından temin edilip ELISA Reagent Set for cucumber mosaic virus -subgroup I (CMV I) ve ELISA Reagent Set for Cucumber mosaic virus -subgroup II (CMV II) antiserumları firmanın önerilerine göre CMV izolatlarına uygulanıp serolojik olarak alt grupların belirlenmesi yapılmıştır.

3.3.2 Multiplex PCR yöntemi ile CMV alt grupların belirlenmesi

Araştırılan virüs olan CMV genomu RNA olduğundan, multipleks PCR'da kullanılmak üzere CMV enfekteli bitki örneklerinden toplam RNA izolasyonları yapılmıştır. Bu amaçla, ticari olarak satılan RNeasy Mini kiti (Qiagen) kullanılmıştır. Bu amaçla, ELISA için ezilen bitki dokularından 200 µl bitki ekstraktı kit içerisinde bulunan 400 µl RLT buffer ile karıştırılmış, 60 °C'de 5 dakika inkübasyondan sonra buzda 30-60 saniye bekletilerek oda sıcaklığına getirilmiş ve kit içerisindeki kolondan santrifüj yardımı ile

geçirilmiştir. Kolon, daha sonra kit içinde bulunan bufferlar ile firmanın önerilerine göre yıkanmış ve en son total RNA 50 µl DNase-RNase ari su ile kolondan tüpe alınmıştır. Elde edilen toplam RNA'larda yukarıda açıklandığı gibi cDNA elde edilerek multipleks PCR işlemlerinde kullanılmıştır.

CMV alt gruplarının multiplex PCR yardımı ile belirlenmesi [Chen vd., \(2011\)](#)'e göre yapılmıştır. Bu yöntemde göre CMV izolatlarının Çizelge 3.1'de belirtilen CMV subgroup I, CMV subgroup II, satRNA ve 18S rRNA (İç kontrol) primerlerini bir arada içeren PCR reaksiyon karışımları hazırlanmıştır.

Analiz önce simpleks (tek) PCR şeklinde tek bir primerin forward ve revers primerini içerecek şekilde yapılmıştır. Toplam 20 µl reaksiyonda, 2.0 µl 10xPCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1 µl dNTPs (10 mM herbiri), 1 µl forward and reverse primer (10 mM herbiri), 0.25 µl Taq (5 U/µl), ve 2 µl cDNA içermiştir. PCR reaksiyon koşulları : 94°C de 2 dak, takiben 35 döngü 94°C de 30 san, 52°C de 30 san, 72°C de 45 san, ek olarak 72°C de 10 dak. olmuştur. Annealing 48-60°C arasında gradient olarak uygulanarak optimum annealing derecesi belirlenmiştir. Multipleks uygulaması bu çalışmaların sonucuna göre gerçekleşmiştir. Multipleks PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi %1,5 agaroz konsantrasyonunda yapılmıştır.

3.3.3 Kılıf proteini bölgesinin dizilemesi ile alt grupların belirlenmesi

CMV alt grupları kılıf protein bölgesi dizilerinin gen bankasında kayıtlı diğer alt grup dizileriyle filogenetik analizleri ile de belirlenebilmektedir. Bu yöntemde, CMV alt grup I'in A ve B grupları da belirlenebildiği gibi yeni ırklar da tespit etme söz konusu olabilmektedir.

Bu amaçla, diğer yöntemlerle belirlenen CMV altgrup izolatları ve olası farklı gruplardan en az birer izolat seçilmiştir. Bu izolatlara ait tüm kılıf proteini dizilerini içeren, 866 bp uzunluğunda kılıf protein fragmenti veren CPf/CPr (Çizelge 3.1) primerleri kullanılarak PCR işlemleri yapılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri doğrudan CPf ve CPr primerleri ile dizilenmiştir.

DNA dizileme firmasından gelen dizilerin forward ve reverse okumaları Geneious V11 (Biomatters Limited) Bioinformatik yazılımı kullanılarak birleştirilmiştir. CMV

izolatlarının kılıf dizileri gen bankasında kayıtlı CMV alt grup üyeleri ile filogenetik analizlere tabi tutulmuştur. Filogenetik analizler MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tamura vd., 2013).

BÖLÜM IV

BULGULAR VE TARTIŞMA

Kırgızistan'ın Chui bölgesinde en yaygın yetiştirilen *Solanaceae* ve *Cucurbitaceae* familyasındaki bitkilerin kayıplarına Hıyar mozaik virüsü (CMV) neden olabilmektedir. Bu virüs polifag olduğundan dolayı, başka kültür bitkilerine de zarar gösterebilmektedir. Bakteri ve fungus hastalıklarına karşı kültürel yöntemlerin dışında, kimyasal mücadele kullanılabilmektedir, virüs hastalığına ise kullanılamamaktadır. Bu nedenle, virüs hastalıklarına karşı sistemli mücadele yöntemleri kullanılmalıdır.

Bu çalışmada, Kırgızistan'ın Chui bölgesinde yetiştirilen *Solanaceae* ve *Cucurbitaceae* familyasındaki bitkilerde CMV enfeksiyonlarını araştırmak ve tespit edilen izolatların CMV alt gruplarını belirlemek için serolojik, moleküler, ve biyolojik (inokulasyon) yöntemler kullanılmıştır.

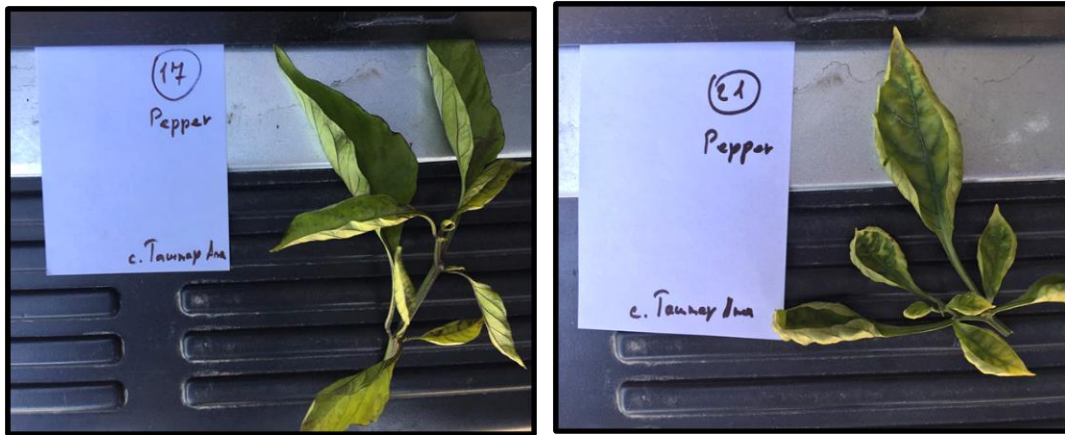
4.1 Solanaceae ve Cucurbitaceae Kültür Bitkilerinde Sörvey

CMV'nin enfeksiyon oranının ortaya konulması amacıyla, 2017 yılı Haziran-Temmuz aylarında, Chui bölgesinde *Solanaceae* ve *Cucurbitaceae* bitkilerinin yetiştirildiği alanlara arazi çıkışları yapılmıştır. Chui bölgesinin Dostuk, Milanfan, Ala-too, Taştar-ata, Voennno-Antonovka, Seleksiya, Belovodskoe, Kirov ve Kemin köylerinde patates, domates, biber, hıyar, kabak ve kavun yetiştirilen arazilerde virüs simptomları gösteren bitkiler aranmış, toplam 96 bitki örneği toplanmıştır. Dostuk köyünden kabak- 2 adet; hıyar- 1 adet; biber- 5 adet; kavun- 3 adet; domates- 1 adet,. Milanfan köyünden kabak- 1 adet; kavun- 1 adet; hıyar- 6 adet; domates- 1 adet, Ala-too köyünden hıyar- 15 adet, Taştar-ata köyünden biber- 12 adet; domates- 10 adet; hıyar- 2 adet, Voennno- Antonovka köyünden kavun- 1 adet; Seleksiya köyünden domates- 7 adet; Belovodskoe köyünden patates- 3 adet; Kirov köyünden kabak- 1 adet; Kemin köyünden patates- 25 adet toplanmıştır (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Kırgızistan'ın Chui bölgesinde yetiştirilen *Solanaceae* ve *Cucurbitaceae* bitkilerin toplandığı köyler, türleri ve örnek sayısı

Köy	Kabak	Hıyar	Kavun	Biber	Domates	Patates	Toplam
Dostuk	-	-	2	4	1	-	7
Milanfan	2	5	2	-	1	-	10
Ala-Too	-	16	-	-	-	-	16
Tashtar-Ata	-	2	-	9	9	1	21
Voeno-Antonovka	1	-	1	-	-	-	2
Seleksiya	-	-	-	-	6	-	6
Belovodskoe	-	-	-	-	-	4	4
Kirov	1	-	-	-	-	-	1
Kemin	-	-	-	-	-	29	29
Toplam	4	23	5	13	17	34	96

Toplanan örneklerde yapraklarda sararma, mozaik, damarlarda renk açılmaları, yapraklarda kıvrılma, beneklenme, deformasyon, gelişme geriliği gibi genel simptomlar aranmıştır.



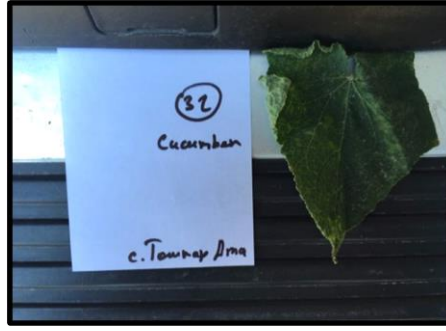
(a)

(b)

Şekil 4.1. IC-RT-PCR yöntemi ile CMV enfekteli tespit edilen biber bitkisinin yapraklarında sararma ve kıvrılma (a ve b)



(a)



(b)

Şekil 4.2. IC-RT-PCR yöntemi ile CMV enfekteli tespit edilen biber yapraklarının kıvrılması (a), Hıyar yaprağında mozaik simptom (b)



(a)



(b)

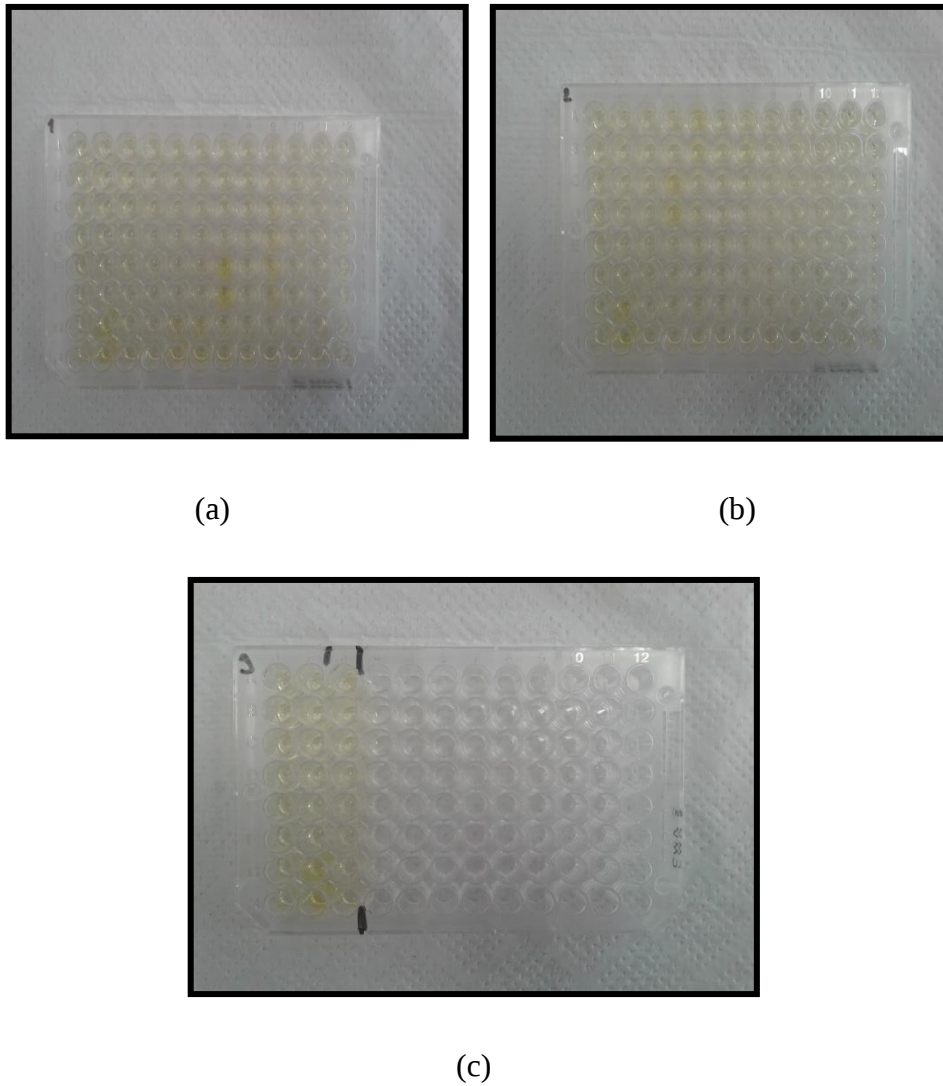
Şekil 4.3. IC-RT-PCR yöntemi ile CMV enfekteli tespit edilen biberde yaprakta sararma ve kıvrılma (a), kavun yaprağında sararma ve mozaik simptomu (b)



Şekil 4.4. IC-RT-PCR yöntemi ile CMV enfekteli tespit edilen biber yaprağında deformasyon simptomu

4.2 DAS ELISA ile CMV Teşhisi

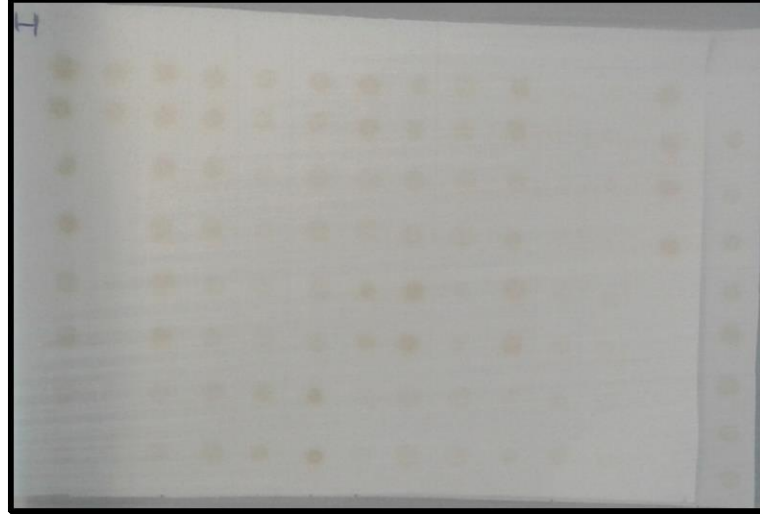
CMV enfeksiyonu araştırılan 96 bitki örneğinin DAS-ELISA analizleri sonucunda (Şekil 4.5) 3 adet örnek (24, 32, 56 nolu örnekler) CMV ile enfekteli olarak belirlenmiştir. Bu örnekler Dostuk köyünden 1 adet kavun (örnek no 56), Tashar-Ata köyünden 1 adet biber (örnek no 24) ve 1 adet hıyar (örnek no 32) bitkisinden toplanmıştır (Çizelge 4.2). Bunun dışında absorbans değeri negatif örnekte belirlenenin iki katı olmayan ancak yakın olan 8 örnek (17, 21, 25, 29, 31, 34, 59, 67 nolu örnekler) daha belirlenmiştir.



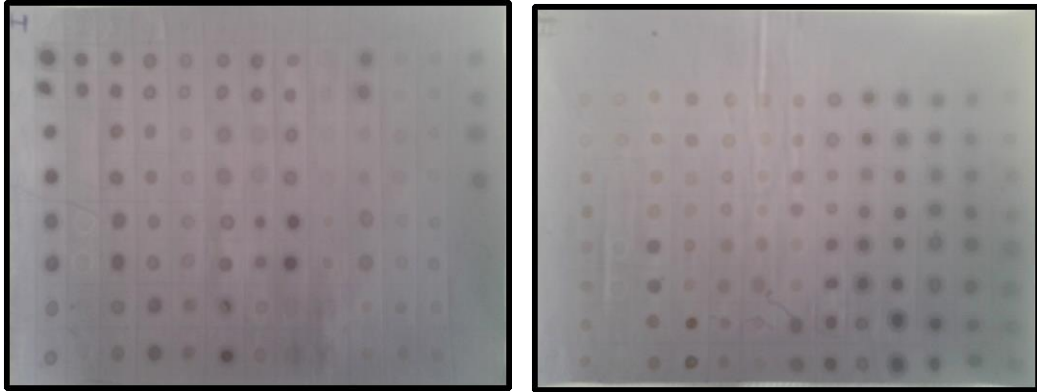
Şekil 4.5. Bitki örneklerinin DAS-ELISA analizi sonucu elde edilen sarı renk reaksiyonları (a,b,c)

4.3 Dot Blot İmmuno Assay (DBIA) ile CMV Teşhisi

DIBA testinde nitrocelluloz membranlarına bitki ekstraktları damlatıldıktan sonra bitki kalıntılarının yarattığı yeşil-sarı renklerin temizlenmesi yeterince olmamıştır. Bu yıkamaların süresi uzatılarak tekrar edilse de kalıntı giderilememiştir. Reaksiyon tamamlandığında tüm örneklerde mor renkli reaksiyon gözlenmiştir (Şekil 4.6- 4.7).



Şekil 4.6. Bitki ekstraktlarının damlatıldığı nitrocelluloz membran

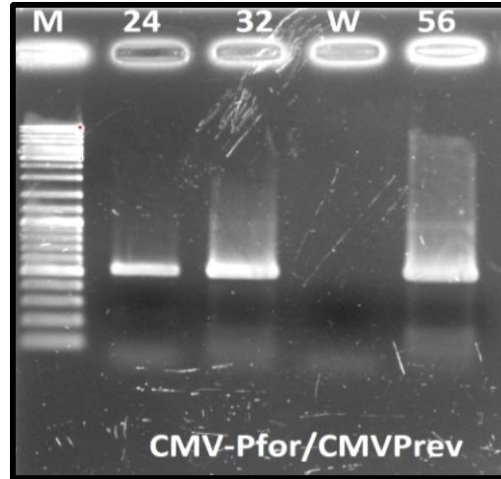


Şekil 4.7. Bitki ekstraktlarının damlatıldığı nitrocelluloz membranların dot blot immuno assay (DBIA) testi sonucu.

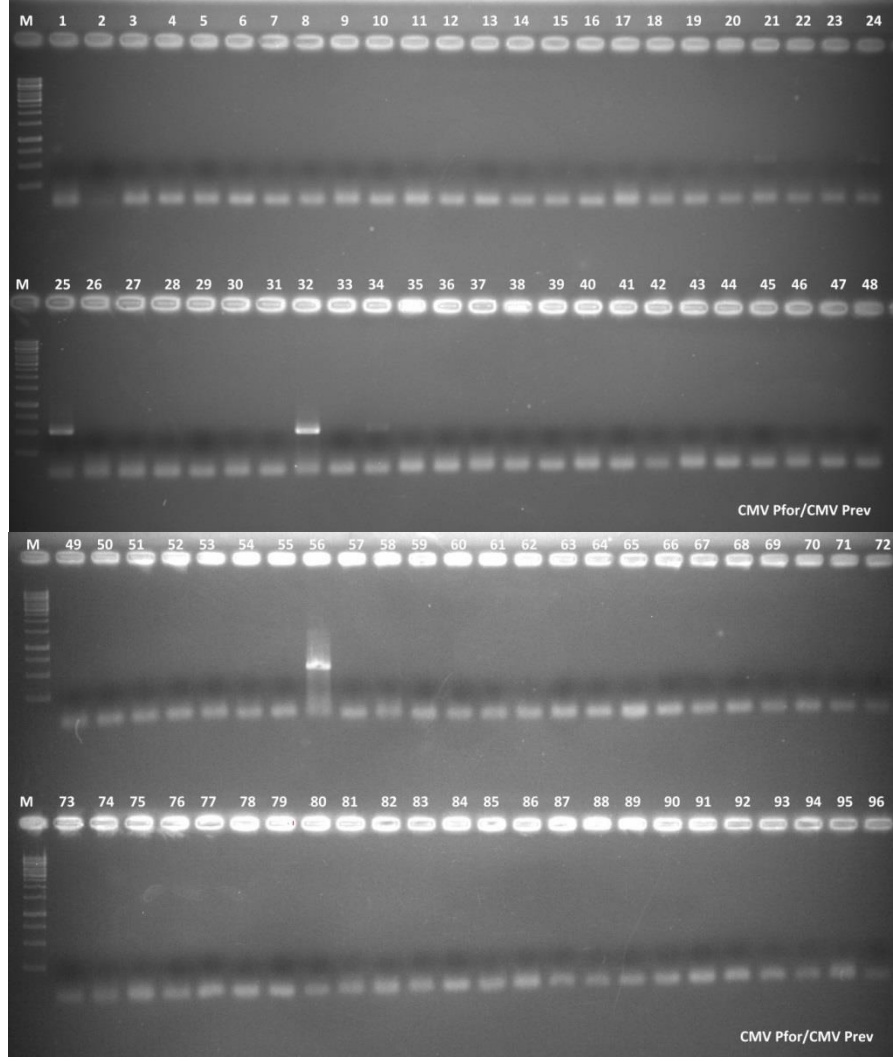
4.4 IC-RT-PCR ile CMV Teşhisi

CMV teşhisinin IC-RT-PCR ile yapılabilmesi için öncelikle 512 bp fragment amplifiye eden CMV Pfor/Prev primerleri ile daha önce DAS-ELISA’da pozitif tespit edilen örneklerle (örnek no 24, 32, 56) PCR sistemi kurulmuştur (Şekil 4.8).

CMV enfeksiyonu araştırılan 96 bitki örneğinin IC-RT-PCR analizleri sonucunda (Şekil 4.9) 6 adet örnek CMV ile enfekteli olarak belirlenmiştir. Bu örnekler Dostuk köyünden 1 adet kavun (örnek no 56), Tashar-Ata köyünden 2 adet biber (örnek no 21, 24), 2 adet hıyar (örnek no 25, 32) ve 1 patates (örnek no 34) bitkisinden toplanmıştır (Çizelge 4.2). Bu örneklerden 3 adedi (örnek no 24, 32, 56) daha önce DAS-ELISA metodunda da teşhis edilmiştir.



Şekil 4.8. CMV pozitif örnekler ile IC-RT-PCR sisteminin kurulması. CMV Pfor/Prev primerleri ile 512 bp uzunluğunda fragmentlerin amplifikasyonu. M 100 bp DNA markör (Thermo Scientific).

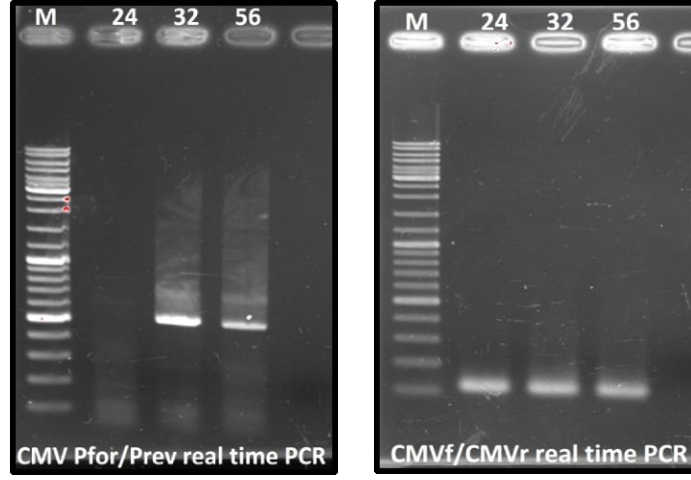


Şekil 4.9. CMV örneklerinin ile IC-RT-PCR yöntemi ile analizi ile elde edilen amplikonların agaroz jelde kontrol edilmesi(A,B). Analizde 512 bp uzunluğunda fragment amplifiye eden CMV Pfor/Prev primer çifti kullanılmıştır. M 100 bp DNA markör (Thermo Scientific).

4.5 IC-Real Time-PCR ile CMV Teşhisi

CMV teşhisinin SYBR real time PCR ile yapılabilmesi için öncelikle 512 bp fragment amplifiye eden CMV Pfor/Prev primerleri daha sonra da 111 bp fragment amplifiye eden CMVf/CMVr primerleri ile daha önce DAS-ELISA'da pozitif tespit edilen örneklerle IC-SYBR real time sistemi kurulmuştur (Şekil 4.10). CMV Pfor/Prev primerleri 24 nolu örneğin teşhisinde SYBR real time PCR ile teşhisinde başarısız olmuştur. Araştırılan 96 örneğin IC-SYBR Real Time-PCR yöntemi ile CMVf/CMVr primerleri kullanılarak yapılan analizi sonucunda tüm örneklerin CMV ile enfekteli olduğu görülmüştür.

Ancak, CMV Pfor/Prev primeri ile 21 ve 28 nolu örnekler teşhis edilememiştir (Şekil 4.10-4.11).

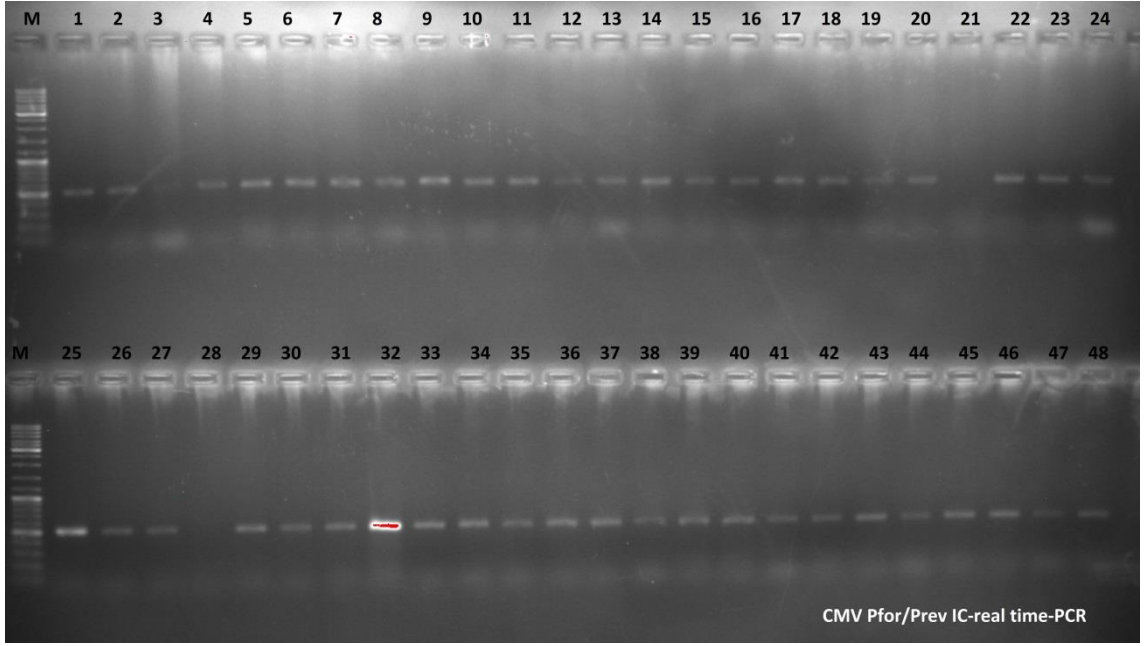


(a)

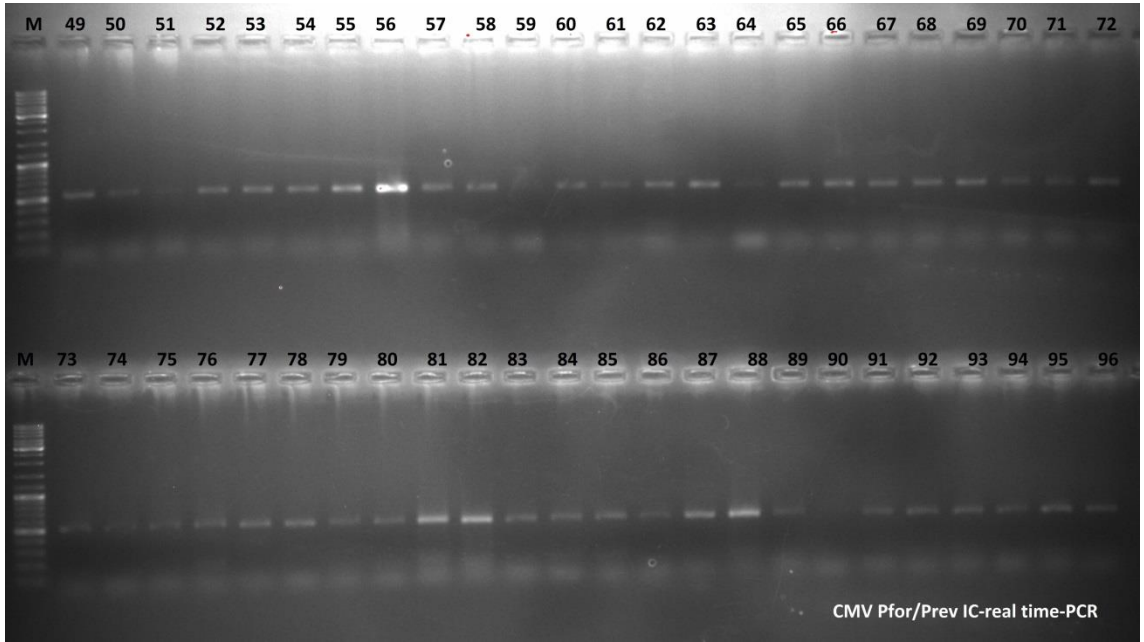
(b)

Şekil 4.10. . CMV pozitif örnekler ile IC-SYBR real time PCR sisteminin kurulması. CMV Pfor/Prev primerleri ile 512 bp uzunluğunda (a), CMVf/CMVr primerleri ile 111 bp uzunluğunda (b) fragmentlerin amplifikasyonu. M 100 bp DNA markör (Thermo Scientific).

Topraktaki TMV'yi tespit etmek için IC-real-time RT-PCR testi kullanılmıştır. RT-PCR veya DAS-ELISA analizlerinden daha hızlı, hassas ve spesifiktir. Bu analiz yöntemi, toprağın TMV içeriğini doğru bir şekilde belirlemeye yardımcı olabilir. Toprakta virüs oluşumunun doğru tespitine dayanarak, ürün rotasyonunu kontrol etmek ve ekinlerde viral hastalık salgınlarını azaltmak için ekim rotasyonları kullanılabilir veya dirençli çeşitler ekilebilmektedir(Jin-Guang Yang vd., 2012)

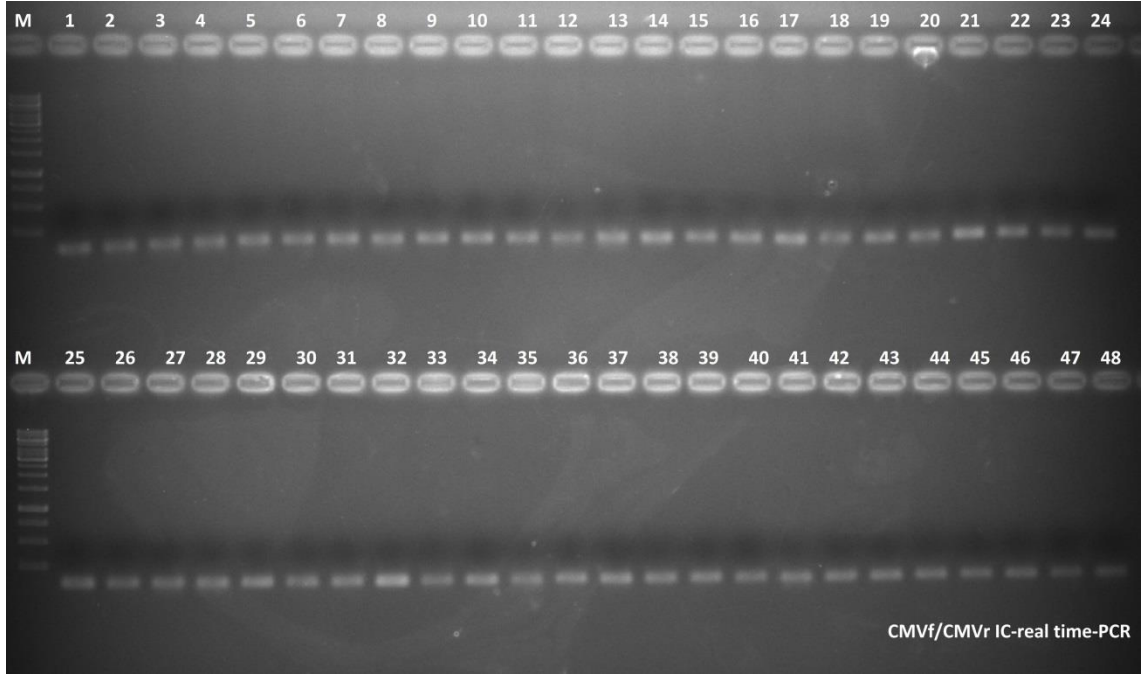


(a)

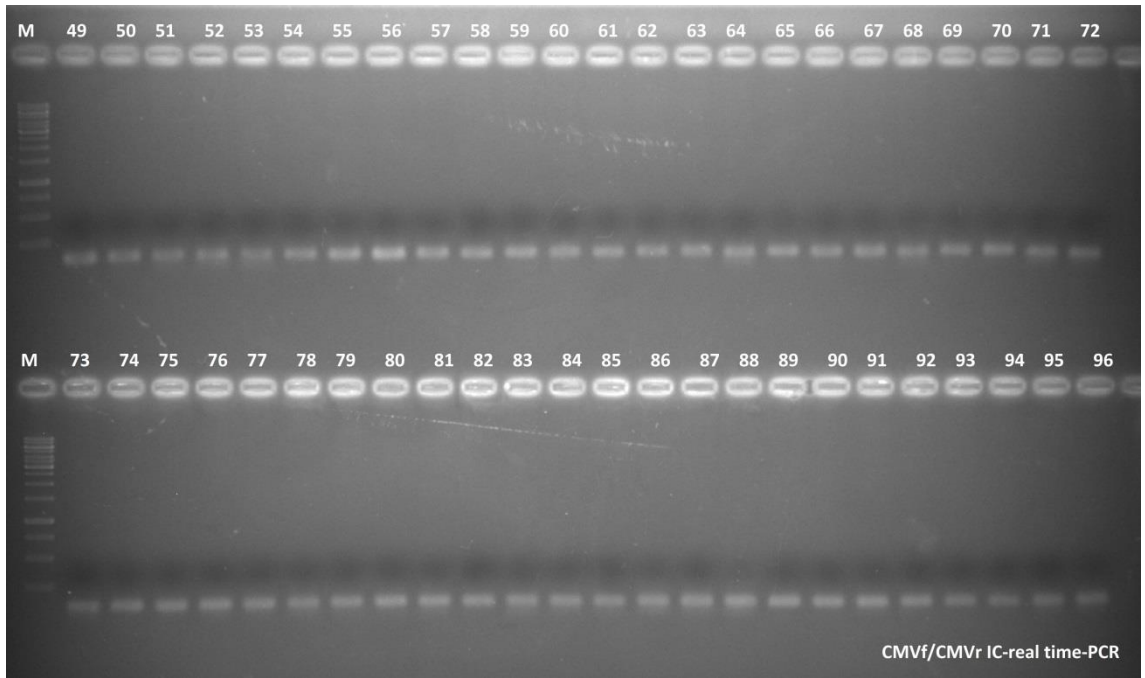


(b)

Şekil 4.11. CMV örneklerinin ile IC-SYBR real time PCR yöntemi ile analizi ile elde edilen amplikonların agaroz jelde kontrol edilmesi. Analizde 512 bp uzunluğunda fragment amplifiye eden CMV Pfor/Prev primer çifti kullanılmıştır(a,b). M 100 bp DNA markör (Thermo Scientific).



(a)



(b)

Şekil 4.12. CMV örneklerinin ile IC-SYBR real time PCR yöntemi ile analizi ile elde edilen amplikonların agaroz jelde kontrol edilmesi. Analizde 111 bp uzunluğunda fragment amplifiye eden CMVf/CMVr primer çifti kullanılmıştır (a,b). M 100 bp DNA markör (Thermo Scientific).

Çizelge 4.2. Farklı yöntemlerle analiz edilen örneklerdeki CMV enfeksiyon durumu

Köy	Bitki adı	Bitki sayısı	CMV enfekteli bitki sayısı		
			DAS-ELISA	IC-RT-PCR	IC-Real Time-PCR
Dostuk	Biber	4	0	0	4
	Kavun	2	1	1	2
	Domates	1	0	0	1
Milanfan	Kabak	2	0	0	2
	Kavun	2	0	0	2
	Hıyar	5	0	0	5
	Domates	1	0	0	1
Ala-Too	Hıyar	16	0	0	16
Tashtar-Ata	Biber	9	1	2	9
	Domates	9	0	0	9
	Hıyar	2	1	2	2
	Patates	1	0	1	1
Voen-Antonovka	Kabak	1	0	0	1
	Kavun	1	0	0	1
Seleksiya	Domates	6	0	0	6
Belovodskoe	Patates	4	0	0	4
Kirov	Kabak	1	0	0	1
Kemin	Patates	28	0	0	28
Toplam		96	3	6	96

Virüs hastalıklarının doğru bir şekilde teşhisi ve tanımlanması bitki korumada ilk önemli adımlardan birisidir. Virüs hastalıklarında enfeksiyondan sonra bir uygulama ile bitkiyi iyileştirmek mümkün olmadığından en etkili kontrol enfeksiyon oluşmadan önlemler almaktır. Üreticiler tarafından uygulanabilecek en uygun yaklaşım, sağlıklı bitki materyalinin kullanımıdır. Bu nedenle, bitki üretim sistemlerinde iyi bir sertifikasyon sisteminin kurulması ve yürütülmesi gereklidir. Bu sertifikasyon

progrmlarında da hızlı ve doğru teşhis sağlayan teşhis metotlarının kullanılması elzemdir.

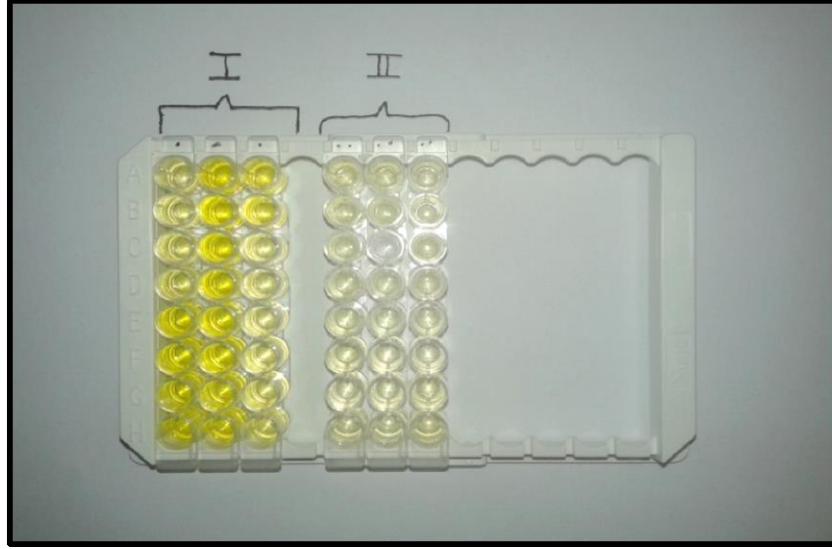
Bitki virüslerinin teşhisinde seroloji kullanımı çok yaygın hale gelmiştir. ELISA temelli teşhisde viral protein sıcak kanlı bir hayvana enjekte edilmekte ve hayvan antijen görevi gören viral proteinlere antipodi üretmektedir. Bu antipadi hayvandan ekstrakte edilmekte, bazı boya ve enzimlerle birlikte antijen teşhisinde kullanılmaktadır. PCR temelli teşhis metotlarında patojenin nükleik asidi ekstrakte edilmekte ve çoğaltılarak agaroz jelde veya flourosens boyalarla görsel hale getirilmektedir.

Her tekniğin kullanım amacı, hassasiyet ve maliyet olarak üstünlük ve dezavantajları bulunmaktadır. ELISA temelli metotların kullanımını sınırlandıran en önemli faktör iyi bir viral antiserum'un her zaman bulunmaması ve bazı virüslere karşı antiserum geliştirilmemiş olması, antiserum geliştirmenin maliyet gerektirmesidir. Diğer taraftan ELISA testi çok sayıda örneğin virüse karşı taranmasında kullanışlı olmasına rağmen iki günde tamamlanması nedeniyle zaman alıcıdır. PCR temelli yöntemler nükleotid bilgisi gerektirmekte, virüse özgü tasarlanan primerler kullanılarak hedef bölge çoğaltılmaktadır. ELISA yöntemine göre daha az titrasyondaki viral partikülleri teşhis etme başarısına sahiptir [Bashir ve Siljo \(2014\)](#). Bu sistem immunocapture ile viral partiküllerin yakalanması sistemi ile birleştirildiğinde nükleik asit ekstraksiyonu sırasında karşılaşılan fenolik bileşiklerin DNA veya RNA'yarar vermesi problemini ortadan kaldırmaktadır ([Candresse vd., 1995](#); [Varveri ve Boutsika 1999](#)). Real time PCR diğer ELISA ve PCR teknikleri ile karşılaştırıldığında DNA amplifikasyonunun flourometrik olarak izlenmesinden dolayı hassasiyeti daha da artmakta ve teşhis sırasında çok küçük miktardaki bitki dokularından çok az titrasyondaki viral partiküllerin belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Real time PCR teknikleri hızlı, hassas, spesifik ve hedef organizmanın miktarını ölçmeye olanak veren yöntemlerdir. Moleküler yöntemlerin dezavantajları deneyimli personel ve ekipman ihtiyacı, maliyetinin yüksek olmasıdır. DIBA gibi katı bir yüzeyde gerçekleştirilen blot tekniklerinde viral genom transfer ve uzun bekleme sürelerinden etkilenmemekte, maliyet düşmekte, büyük alanlarda sörvey yapılacağına kullanılabilir bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Virüs teşhisinde amaç, test edilecek örnek sayısı ve amaca yönelik olarak testten beklenen hassasiyet önemli olmakta bu koşullara göre test yöntemi seçilmektedir.

4.6 CMV İzolatlarının Irk tayini

4.6.1 ELISA ile ırk tayini

Monoklonal antiserum kullanılarak yapılan ELISA testleri sonucu Kırgızistan'da tespit edilen CMV izolatlarının CMV altgrup I olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. ELISA Reagent Set for cucumber mosaic virus -subgroup I (CMV I) ve ELISA Reagent Set for Cucumber mosaic virus -subgroup II (CMV II) antiserumları ile alt grupların belirlenmesi

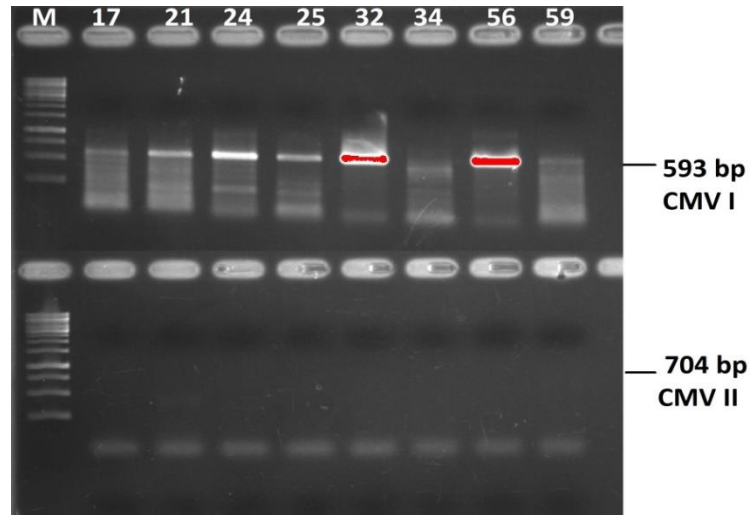
4.6.2 Multipleks PCR ile CMV izolatlarının ırk tayini

Multipleks PCR denemesinde CMV I, CMV II ve internal kontrol primerlerinin hepsini içeren primerler ile reaksiyon gerçekleştirilmiş, çalışma sonucunda sadece internal kontrol amplifikasyonları elde edilmiştir. Daha önceki çalışmalardan elimizdeki CMV izolatlarının CMV I olduğunun tespit edilmesi ve CMV II pozitif kontrolün olmaması nedeniyle spesifik primerlerle ırk belirleme çalışmaları multipleks PCR şeklinde değil ayrı PCR çalışmaları şeklinde yapılmıştır (Şekil 4.14). Yapılan analiz sonucunda CMV izolatlarının altgrup I olduğu teyid edilmiştir.

Altgrup I ırkları kendi içinde yem bezelyesindeki (*Vigna unguiculata*) belirtiler ve RNA3'deki 5' - kodlanmayan bölge varyasyonuna göre IA ve IB olarak ayrılır. Ayrıca

altgrup IA ırkları sistemik mozaik belirtiler üretir. IB ırkları inokule edildiği bitkinin yaprağında nekrotik lokal lezyonlar meydana getirir. Altgrup I daha çok tropik ve subtropik alanlarda şiddetli belirtiler ve salgın yaparken, altgrup II daha çok ılıman iklimlerde ortaya çıkmaktadır (Rossincik vd., 1999; Haase vd., 1989).

TMV ve ToMV'nin farklılaşması için bir multipleks IC-RT-PCR testi Çin'de geliştirilmiştir. Bununla birlikte, negatif sonuçların yorumlanmasının yanı sıra CMV'nin uydu RNA'sının saptanması için bir internal kontrol prosedürü, IC-RT-PCR ve ELISA yöntemlerine dahil edilmemiştir. ELISA yöntemleri, iki virüs arasındaki çapraz reaksiyon nedeniyle TMV ve ToMV'yi güvenilir bir şekilde ayırt edememiştir. Multiplex RT-PCR, farklı primer setleri kullanarak birden fazla bitki virüsünün saptanması için yararlı bir tekniktir. Bu tür yöntemler birçok bitki virüsünün saptanması için geliştirilmiştir. 18S rRNA'yı bir internal kontrol olarak kullanarak, domates bitkilerinde TMV, ToMV ve CMV alt gruplarını ve CMV-satRNA'yı eş zamanlı olarak saptamak ve ayırt etmek için bir multipleks RT-PCR sistemi geliştirilmiştir. Yeni geliştirilen multipleks protokol, satRNA ve farklı Tobamovirüsleri ile CMV alt gruplarının salgın durumlarını araştırmak için uygun bir yol sağlamıştır (Shaoning Chen v.d., 2011).

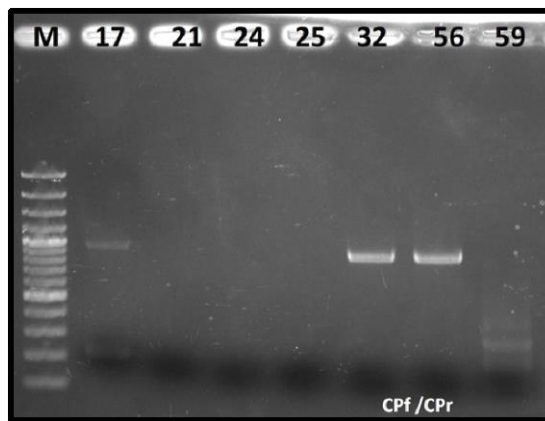


Şekil 4.14. CMV izolatlarının CMV altgrup I ve altgrup II spesifik primer çiftleri ile PCR ile analizi ile elde edilen ampliconların agaroz jelde kontrol edilmesi. M 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific)

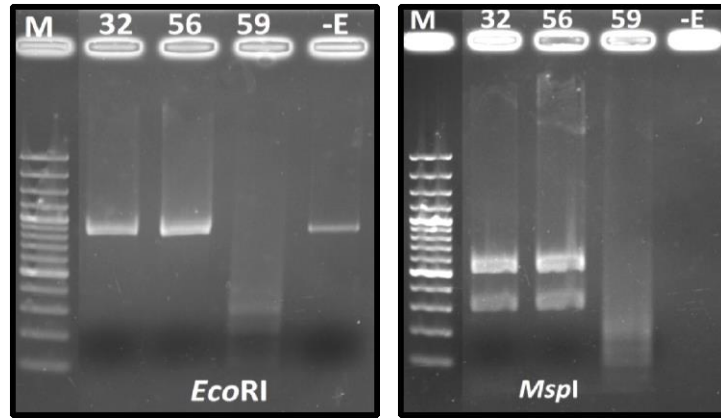
4.6.3 CMV genomunun kılıf protein bölgesinde RFLP ile ırk tayini

Tespit edilen izolatların kılıf proteinlerinin amplifikasyonunda başarılı olunabilen 32 ve 56 nolu izolatların (Şekil 4.15) *EcoRI* ve *MspI* restirksiyon endonukleaz enzimleri ile kesimi sonucu CMV I ırkı için beklendiği şekilde *EcoRI* enzimi kesim yapmamış, *MspI* enzimi iki fragment şeklinde yaklaşık 537 bp ve 335 bp büyüklüğünde band profilleri sonuçlamıştır (Şekil 4.16). Buna göre, Bashir vd., (2006) ya göre amplifiye edilen virüsün kılıf protein bölgesinin araştırmacılar tarafından bildirildiği şekliyle 537 bp ve 335 bp uzunluğunda iki farklı fragmente *MspI* yardımıyla kesilmesi, Kırgızistan'dan tespit edilen CMV izolatlarının altgrup I olduğunu göstermiş ve CMV ırkı RFLP metodu ile de teyid edilmiştir.

Re-assortment çok genomlu virüslerde doğal bir oluşum olmakla birlikte genetik varyasyon ve yeni ırkların gelişmesinde önemlidir. CMV'de reassortment altgrup I ile II den ziyade yüksek derecede benzerlikten dolayı daha çok altgrup IA ile IB arasında gerçekleşmektedir (Bonnet vd., 2005; Fraile vd., 1997). İran CMV izolatlarının kılıf proteini (CP) hareket proteini (MP) ve 2b gen bölgesi nükleotid dizileri gen bankasındaki diğer CMV izolatlarıyla filogenetik analizi sonucu, İran izolatları CP ve MP genlerine göre altgrup Ia ve Ib içerisinde yer alırken, 2b genine göre altgrup Ia içerisinde yer almıştır (Bashir vd., 2006).



Şekil 4.15. CMV örneklerinin ile RT-PCR yöntemi ile amplifiye edilen kılıf protein bölgesi fragmenti (866 bp) M 100 bp DNA markör (Thermo Scientific).



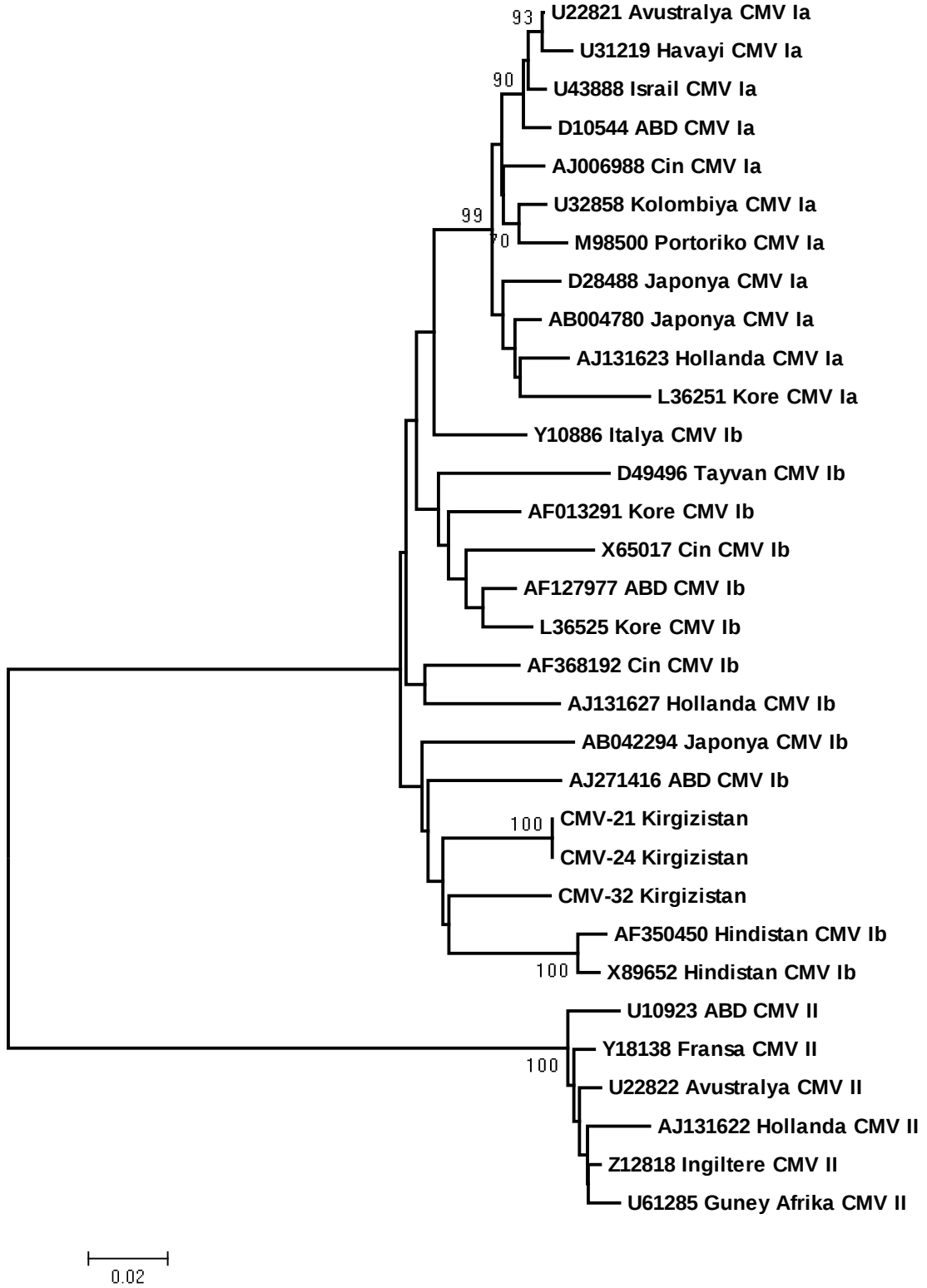
Şekil 4.16. CMV örneklerinin ile RT-PCR yöntemi ile amplifiye edilen kılıf protein bölgesi fragmenti (866 bp)'nin *EcoRI* ve *MspI* enzimleri kesimi sonucu oluşan band profilleri. M 100 bp DNA markör (Thermo Scientific).

4.6.4 CMV genomunun kılıf protein bölgesini dizileme ile ırk tayini

Tespit edilen izolatların kılıf proteinlerinin 866 bp uzunluğunda amplifikasyonunda başarılı olunabilen 21, 24 ve 32 nolu izolatların elde edilen 711 (21 ve 24 nolu izolatlar) ve 734 bp (32 nolu izolat) dizilerinin Gen bankasından temin edilen CMV Ia, CMV Ib ve CMV II alt gruplarına ait nükleotid dizilerinin çoklu karşılaştırmaları ve filogenetik analizleri sonucu CMV ırklarından altgrup I olduğu olduğu teyid edilmiştir. Ayrıca altgrup içerisinde IB grubuna dâhil olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.17).

Farklı altgruplara ait izolatların dizi benzerlikleri genomik bölgeye göre %69 ile %77 arasında değişmektedir. Aynı altgrup içerisindeki izolatların benzerlikleri altgrup I için % 88, altgrup II için %96'dan fazladır. Kore'de yapılan çalışmada, Her bir RNA genom parçasının komple nükleotid dizileri belirlenmiş ve diğer CMV izolatları ile karşılaştırılmıştır. Açık okuma çerçevesinin (Open Reading Frame) nükleotid dizisinin karşılaştırılması, CMV alt II grubu ile sadece % 78 dizi benzerliği gösterirken, her CMV alt IA ve IB grubu soyuyla yaklaşık% 89.2-92.4 arasında dizi benzerliği göstermiştir. RNA2 ORF'lerinin nükleotid dizisi analizi, alt grup I ile % 85.3-97.6 arasında dizi benzerliği ortaya koymuştur. RNA3'ün ORF'lerinde, nükleotid sekans benzerlik seviyeleri CMV alt grup I'de % 92-99.2'den ve alt grup II CMV izolatları ile % 82'den daha düşüktür. Bu sonuçlar, CMV-ZM izolatının alt I grubuna göre alt II grup

daha yakından ilişkili olduğunu ve dolayısıyla CMV-ZM izolatının biyolojik ve moleküler analizlerine dayalı CMV alt I grup olarak sınıflandırılabilirliğini göstermektedir. Polonya izolatlarının alt grup II prevalansı ile IA ve II olmak üzere iki alt gruba ait olduğu tespit edilmiştir. RNA3 için IA-MP / II-CP modeline sahip yeni rekombinant varyantlar da tespit edilmiştir (Mi-Kyeong Kim vd., 2011).



Şekil 4. 17. Kirgizistan'dan temin edilen üç CMV izolatının kılıf protein bölgesinin nükleotid dizilerinin gen bankasında kayıtlı CMV alt grup izolatlarıyla filogenetik analizi. Filogenetik ağaç Neighbour joining metodu ile 1000 Bootstrap değeri ile oluşturulmuştur.

Çizelge 4.3. CMV izolatının kılıf protein bölgesinin nükleotid dizilerinin gen bankasında kayıtlı CMV alt grup izolatları

Gen bankası kayıt no	Ülke	Konukcu	Alt grup
AF316362	Kore	<i>Chrysanthemum boreale coat</i>	Ib
AB004780	Japonya	<i>Cucurbita ficifolia</i>	Ib
AJ131623	Hollanda	<i>Gladiolus</i>	Ib
L36251	Kore	-	Ib
D28488	Japonya	<i>Cucurbita pepo</i>	Ib
AJ006988	Çin	-	Ib
U32858	Colombiya	<i>Musa spp.</i>	Ib
M98500	Puerto Riko	-	Ib
D10544	ABD	-	Ib
U43888	İsrail	<i>Musa acuminata</i>	Ib
U22821	Australya	-	Ib
U31219	Havai	<i>Musa acuminata</i>	Ib
Y10886	İtalya	<i>Solanum lycopersicum</i>	Ia
D49496	Taiwan	-	Ia
AF013291	Kore	-	Ia
AF127977	ABD	-	Ia
L36525	Kore	<i>Gladiolus</i>	Ia
AF368192	Çin	<i>Passiflora edulis</i>	Ia
AJ131625	Hollanda	<i>Amaranthu</i>	Ia
AB042294	Japonya	-	Ia
U32859	Colombiya	<i>Musa acuminata</i>	Ia
AJ271416	ABD	-	Ia
AF350450	Hindistan	<i>Hyoscyamus muticus</i>	Ia
X89652	Hindistan	<i>Nicotiana rustica</i>	Ia
AF268598	Çin	<i>Musa acuminata</i>	II
U10923	ABD	<i>Spinacia oleracea</i>	II
Y18138	Fransa	-	II
U22822	Australya	-	II
Z12818	İngiltere	-	II
U61285	Güney Afrika	-	II
AJ131622	Hollanda	-	II

Bu çalışmada, Bashir vd., (2006) tarafından bildirilen sonuçlar ile uyum içerisindedir. Araştırmacılar tarafından bildirildiği şekliyle amplifiye edilen virüsün kılıf protein bölgesinin 537 bp ve 335 bp uzunluğunda iki farklı fragmente *MspI* yardımı ile kesilmiştir.

BÖLÜM V

SONUÇLAR

Kırgızistan’da *Solanaceae* ve *Cucurbitaceae* grubu domates, biber, patates, hıyar, kavun ve kabaklar yetiştiriciliğinin en yoğun yapıldığı Chui bölgesinde toplanan 96 örneğin CMV virüsü ile enfeksiyon durumları araştırılmıştır. Bu amaçla, virüs hastalıklarının teşhisinde kullanılan temel teşhis metotları kullanılmıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda, örneklerin analiz edilmesinde hassas (çok düşük titrasyonda virüs miktarlarını tespit edebilen) teşhis metotları kullanıldığında bölgeden toplanan tüm bitki örneklerinin CMV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Ancak, rutin test yöntemlerinden DAS-ELISA kullanıldığında enfeksiyon oranı sadece %2.88 olarak belirlenmiştir. Bu durum, seçilecek teşhis metotlarının amaca uygun olarak değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Özellikle tohum üretiminde virüsten arı bitkilerin seçilmesinde hassas teşhis metotlarının kullanılması önem arz etmektedir.

Moleküler teşhis metotları uygulandığında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. IC-RT-PCR sonuçlarına göre enfeksiyon oranı %6,25 tespit edilmiştir.
2. IC-Real Time PCR sonucuna göre %100 hastalık oranı belirlenmiştir.
3. Multipleks PCR ile ırk tayin analizi sonucunda CMV altgrup I olduğu tespit edilmiştir.
4. RFLP ırk tayini sonucunda ise CVM altgrup I olduğu teyid edilmiştir.
5. Virüsün kılıf protein geni bölgesinin nükleotid dizi analizi sonucu Kırgızistan’dan temin edilen CMV izolatlarının CMV altgrup IB ‘ye dahil olduğu belirlenmiştir.

CMV virüs ile mücadelede vektörleri yok edilmesi, virusden arı bitki kullanımı ve hastalığa dayanıklı bitki üretimi gibi mücadeleler uygulanmalıdır. CMV virüsün erken ve doğru teşhisi çok önemlidir.

Bu çalışmada, Chui bölgesinde *Solanaceae* ve *Cucurbitaceae* grubundaki kültür bitkilerin yetiştiriliciliğini sınırlayan CMV virüsün serolojik ve moleküler teşhis

yöntemleri başarı ile gerçekleştirilmiştir. Ülkede CMV enfeksiyonları ilk kez rapor edilmiş ve CMV izolatlarının altgrup IB olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Al- Musa, A.M., “Severe mosaic caused by *Zucchini yellow mosaic* virüs in cucurbits from Jordan”, ***Plant Disease*** 38:541-546, 1989.
- Anderson, B.J, Boyce, P.M. and Blanchard, C.L., “RNA 4 sequences from *Cucumber mosaic virus* subgroup I and II”, ***Genetics*** 161:193– 194, 1995.
- Anonymous, “PM 7/125 (1) ELISA tests for viruses”, ***Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*** 45 (3), 445–449, 2015.
- Aramburu, J., Galipienso, L. and C. Lopez., “Reappearance of *Cucumber mosaic virus* isolates belonging to subgroup IB in tomato plants in north-eastern Spain”, ***J. Phytopathology*** 155, 513–518, 2007.
- Bashir, N.S., Kalhor, M.R. and Zarghani, S.N., “Detection, differentiation and phylogenetic analysis of *Cucumber mosaic virus* isolates from cucurbits in the northwest region of Iran”, ***Virus Genes*** 32, 277–288, 2006.
- Bhat, A.I. and Siju, S., “Development of a single-tube multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of *Cucumber mosaic virus* and Piper yellow mottle virus associated with stunt disease of black pepper”, ***Curr. Sci.*** 93:973–976, 2007.
- Bhat, A.I. and Siljo, A., “Detection of viruses infecting black pepper by SYBR green-based real-time PCR assay”, ***Journal of Plant Pathology*** 96 (1), 105-109, 2014.
- Bonnet, J., Fraile, A., Sacrista’n, S., Malpica, J.M. and Garcí’a-Arenal, F., “Role of recombination in the evolution of natural populations of *Cucumber mosaic virus*, a tripartite RNA plant virus”, ***Virology*** 332:359–368, 2005.
- Bostan, H., Kaymak, H, Ç. and Haliloglu, K., “Detection on CMV and ZYMV in squash in Erzurum, Erzincan and Artvin provinces by serological and biological methods”. ***The Journal of Turkish Phytopathology*** 1, 32: 9-14, 2002.

Brunt, A., Crdootree, K., Dallwitz, M., Gibbs, A. and Watson, L., “Virüs of Plants”, **Cab International Wallingfor,. Oxon 0x10 8de Uk. Yayın No: 085198 794**, 1484s, 1996.

Chang, Peta-Gaye S., McLaughlin, Wayne A., Tolin, Sue A. “Tissue blot immunoassay and direct RT-PCR of cucumoviruses and potyviruses from the same NitroPure nitrocellulose membrane” **Journal of Virological Methods**, 171 (2): 345-351, 2011.

Chen, S., Gu, H., Wang, X., Chen, J. and Zhu, W., “Multiplex RT-PCR detection of *Cucumber mosaic virus* subgroups and *Tobamoviruses* infecting Tomato using 18S rRNA as an internal control”, **Acta Biochim Biophys Sin.** 43 (6):465-471, 2011.

Clark, M.F. and Adams, A.N., “Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses”, **J Gen Virol.** 34:375–383, 1977.

Cohen, S. and Nitzany, F. E., “Identity of viruses affecting cucurbits in Israel”, **Phytopathology** 53: 193-196, 1963.

Culal-Kilic, H., N. Yardimci, S. and Toplu, A., “*Cucumber mosaic virus* and *pepper mild mottle virus* in pepper growing areas in Burdur province, Turkey”, **International Journal of Scientific and Technological Research**, Vol 1, No.1: 50-60, 2015.

Dursunoglu, S. ve Ertunc, F., Ankara ilinde yetiştirilen kabakgillerde görülen hıyar mozaik virüsü izolatlarının serolojik yöntemlerle karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, **Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, s 6, 2003.

Fraile, A., Alonso-Prados, J.L., Aranda, M.A., Bernal, J.J., Malpica, J.M. and Garcia-Arenal, F., “Genetic exchange by recombination or reassortment is infrequent in natural populations of a tripartite RNA virus”, **J. Virol.** 71 (2):934-940, 1997.

Franckı, R.I.B., Mossop, D.W. and Hatta, T., CMI/AAB Description viruses No. 213: 6p. <http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr909.htm>, 1979..

Gallitelli, D., “The ecology of *Cucumber mosaic virus* and sustainable agriculture”. **Virus Res** 71:9–21, 2000.

García-Arenal, F., Palukaitis, P., “*Cucumber mosaic virus*. In: Mahy BWJ, van Regenmortel MHV (eds)”, **Desk encyclopedia fungal virology**, Elsevier, Amsterdam, s 171–176, 2008.

Grieco, F., Alkowni, R., Saponari, M., Savino, V. and Martelli, G.P., “Molecular detections of olive viruses”, **EPPO Bull.** 30 : 469–473, 2000.

Güzel, Ö. and Arlı-Sökmen, M., “Determination of some viruses infecting common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and their incidences in seed lots in Samsun province”, **Journal of Turkish Phytopathology** 32(2), 99-106, 2003.

Haase, A., Richter, J. and Rabenstein, F., “Monoclonal antibodies for detection and serotyping of *Cucumber mosaic virus*”, **Journal of Phytopathology** 127, 129–36, 1989.

Habılı, N. and Franckı, R.I.B., **Virology** 57: 392 Holland, p.258-332, 1974.

Handan, Ç.K. ve Nejla, Y., “Burdur Çine Ovası fasulye alanlarında hıyar mozaik virüs, <http://mehmetakif.dergipark.gov.tr/makufebed/issue/19427/206589>, 2012.

Hsu, H.T., Barzuna, L., Hsu, Y.H., Bliss, W. and Perry, K.L., “Identification and subgrouping of *Cucumber mosaic virus* with mouse monoclonal antibodies”, **Virology** 90:615-620, 2000.

Jacquemond, M., “*Cucumber mosaic virus*. In: Loebenstein G, Lecoq H (eds)”, **Advances in virus research**. Elsevier, USA, pp 440–491, 2012.

Jordan, R.L., Guaragna, M.A., Van Buren, T. and Putnam, M. L., “First report of a new potyvirus, *tricyrtis virus* Y, and *lily virus* X, a *Potexvirus*, in *tricyrtis formosana* in the United States”, **Plant Dis.** 92:648-648, 2008.

Jin-Guang, Y., Feng-Long, W., De-Xin, C., Li-Li, S., Yu-Mei, Q., Zhi-Yong, L., Wen-Chang, Z. And Tai-He, Y., “Development of a one-step immunocapture real-time RT-PCR assay for detection of *Tobacco mosaic virus* in soil”, **Sensors (Basel)**, 16685–16694, 2012

Jun, P., Minjing S., Zihao, X., Junsheng, H., Zaifeng, F., “Detection of *Cucumber mosaic virus* isolates from banana by onestep reverse transcription loop-mediated isothermal amplification”, **Arch Virol.** 157(11):2213-7, 2012.

Kaper, J.M., and Tousignant, M.E., “*Cucumber mosaic virus* associated RNA 5. role of host plant and helper strain in determining amount of associated RNA 5 with virions”, **Virology** 80:186-195, 1977.

Karanfil, A. and Korkmaz, S., “Çanakkale ili börülce üretim alanlarında hıyar mozaik virüsü (*Cucumber mosaic virus*; CMV)’nün tespiti ve kılıf protein genine göre moleküler karakterizasyonu”, **Bitki Koruma Bülteni** 57(3) 293 – 304, 2017.

Kobori, T., Osaki, T. and Ohki, S.T., “*Cucumber mosaic virus* establishes systemic infection at an increased temperature following viral entrance into the phloem pathway of *tetragonia expansa*”, **Phytopathology** 93:1445-1451.

Koç, G. and Fidan, H., “An evergreen host for *Cucumber mosaic virus* (CMV) in Turkey: *Polygala myrtifolia*”, **Derim** 34(1), pp.29-36, 2017.

Kosaka, Y., and Fukunishi, T., “Multiple inoculation with three attenuated viruses for the control of cucumber virus disease”, **Plant Disease** 81:733-738, 1997.

Kouassi, N.K., Wendy, M., Boonham, N. and Smith, J., “Development of a diagnostic protocol for *Cucumber mosaic virus* for screening banana (*Musa spp.*) planting material in Ivory Coast”, **Proceedings of international conference on banana and plantain in Africa. Acta Hort** 879:547–552, 2010.

Köklü, G. and Yilmaz, Ö., “Occurrence of cucurbit viruses on field-grown melon and watermelon in the Thrace region of Turkey”, **Phytoprotection** 87(3), pp.123-130, 2006.

Lin, N.S., Hsu, Y.H. and Hsu, H.T., “Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes”, **Phytopathology** 80:824-828, 1990.

Martelli, G.P., “New classification of plant viruses”, **Course on integrated pest management of mediterranean fruit crops in IAM-B (Chiam)** p.1-36, 2003.

Mehmet, A.S., Cemile, A., “Occurrence of *Cucumber mosaic virus* infecting parsley (*Petroselinum crispum*) in Turkey”, **Not Bot Hort Agrobot Cluj**. 39(1):30-33, 2011.

Mi-Kyeong, K., Hae-Ryun, K., Su-Heon, L. and Hong-Soo, C., “Characteristics of *Cucumber mosaic virus* isolated from *Zea mays* in Korea”, **Plant Pathol. J.** 27(4) : 372-377, 2011.

Moreno, A. and Fereres, A., “Virus diseases in lettuce in the mediterranean basin in: Loebenstein, G, Lecoq H (eds)”, **Advances in virus research, Elsevier**, USA. pp:247-288, 2012.

Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N. and Notomi, T., “Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation”, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 289:150–154, 2001.

Müge, E., Semih, E. and İsmail, C. P., “*Cucumber mosaic virus* in globe artichoke in Turkey”, **Canadian Journal of Plant Pathology** 35:4, 514-517., 2013.

N. Bald-Blumea., J.H.W. Bergervoetb, E. Maissa., “Development of a molecular assay for the detection of *Cucumber mosaic virus* and the discrimination of its subgroups I and II”, **J Virol Methods** 243:35-43, 2017.

Nouri, S., Arevalo, R., Falk, B.W. and Groves, R.L., “Genetic structure and molecular variability of *Cucumber mosaic virüs* isolates in the United States”, **PLoS One** 9:e96582, 2014.

Ozaslan, M., Aytekin, T., Bas, B., Kilic, I.H., Afacan, I.D. and Dag, D.S., “Virus diseases of cucurbits in Gaziantep, Turkey”, **Plant Pathology Journal** 5(1), pp.24-27, 2006.

Ozaslan, M., Bas, B., Aytekin, T. and Sigirci, Z., “Identification of pepper viruses by das-elisa assays in Gaziantep-Turkey”, **Plant Pathology Journal** 5(1), pp.11-14, 2006.

Ozdemir, S. and Erilmez, S., “First report of alfalfa mosaic virus and *Cucumber mosaic virus* in pepino in Turkey”, **Journal of Plant Pathology** 94(suppl.), S.4.91., 2012.

Perry, K.L., Zhang, L. and Palukaitis, P., “Amino acid changes in the coat protein of *Cucumber Mosaic Virus* differentially affect transmission by the *Aphididae Myzus persicae* and *Aphis gossypii*”, **Virology** 242: 204-210, 1998.

Roossinck, M.J., Zhang, L. and Hellwald, K.H., “Rearrangements in the 50 nontranslated region and phylogenetic analyses of *Cucumber mosaic virus* RNA3 indicate radial evolution of three subgroups”, **J Virol** 73: 6752–6758, 1999..

Rossinck, M.J., “*Cucumber mosaic virus*, A Model for RNA virus evolution”, **Molecular Plant Pathology** 2(2): 59-63, 2001.

Sevik, M.A., “Natural occurrence of cucumber mosaic virus infecting broccoli in Turkey”, **VirusDis.** 28: 218, 2017.

Sevik, M. A. and M. Arli-Sokmen., “Viruses infecting cucurbits in Samsun, Turkey”, **Plant Pathology Journal** 87 (4): 341-344, 2003.

Sevil, N., Nemat, S.B., Farshad, R. and Hamid, R.Z., “Phylogenetic analysis of new isolates of *Cucumber mosaic virus* from Iran on the basis of different genomic regions”, **The plant pathology journal** 28(4):381-389, 2012.

Shaoning, C., Hao, G., Xiaoming, W., Jishuang, C. and Weimin, Z., “Multiplex RT-PCR detection of *Cucumber mosaic virus* subgroups and *Tobamoviruses* infecting tomato using 18S rRNA as an internal control”, **Acta Biochim. Biophys. Sin.** 43: 465–471, 2011.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S., “MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0.”, **Molecular Biology and Evolution** 30:2725-2729, 2013.

Unlu, S. and Guldur, M.E., “Şanlıurfa ilinde biberlerde zararlı olan hıyar mozayik virüsü (CMV)'nün ELISA yöntemiyle saptanması”, **HUBAK I. Bilimsel Araştırmalar Sempozyumu, Şanlıurfa**, 45s, 2004.

Varveri, C. and Boutsika, K., “Characterization of *Cucumber mosaic virus* isolates in Greece”, **Journal of Plant Pathology** 48, 95–100, 1999.

Yanming, Y., Kyung, K.S. and Anderson, E.J., “Seed transmission of *Cucumber mosaic virus* in spinach”, ***Phytopathology*** 87:924-931, 1997.

Yu, C., Wu, J. and Zhou, X., “Detection and subgrouping of *Cucumber mosaic virus* isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR”, ***J Virol Methods*** 123:155–161, 2005.

Zein, H.S., and Miyatake, K., “ Development of rapid, specific and sensitive detection of *Cucumber mosaic virus*”, ***Afr. J. Biotechnol.*** 8:751–759, 2009.

Zitter, T.A., and J.F. Murphy., “*Cucumber mosaic virus*”, ***The Plant Health Instructor***, DOI: 10.1094/PHI-I-2009-0518-01, 2009.

EKLER

EK-A

DAS-ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. Yıkama Tampon Çözeltisi (Washing Buffer) (PBST) pH: 7.4

- NaCl..... 8,0 gr
- KH_2PO_4 0,2 gr
- Na_2HPO_4 1,15 gr
- KCl..... 0,2 gr
- Tween-20.....0,5 ml

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH, 0.1 M NaOH veya 0.1 M HCl ile ayarlanmış ve +4 °C’de saklanmıştır.

2. Kaplama Tampon Çözeltisi (Coating Buffer) pH: 9.6

- Na_2CO_31,59 gr
- NaHCO_32,93 gr
- NaN_30,2 gr
- Bromocresol purple.....5 mg

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre suda eritilip pH ayarlanmış ve +4 °C’de saklanmıştır.

3. Ekstraksiyon Tampon Çözeltisi (Sample Extration Buffer) pH:7.2-7.4

4. Konjugat Tampon Çözeltisi (Enzyme Conjugate Buffer) pH: 7.4

- TRIS.....2,40gr
- NaCl.....8 gr
- PVP K25(MW 24000).....20 gr

EK-A (Devam)

- Tween 20..... 40 mg
- KCL..... 40 mg
- NaN_3 40 mg

1 litre PBST içerisine 2 gr BSA ve 40 mg Congo Red ilave edilerek pH ayarlanıp +4 °C'de saklanmıştır.

5. Substrat Tampon özeltisi (Substrat Buffer) pH:9.8

Diethanolamine..... 97 ml

NaN_30,2 gr

97 ml Diethanolamine 1 litre saf su içerine ilave edildikten sonra 0,2 gr NaN_3 eklenmiş ve pH: 9.8'e ayarlanmıştır. Çözelti +4 °C'de saklanmış ve kullanılmadan önce pH kontrol edilmiştir.

EK-B

Agaroz Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

1. TAE Tampon Çözeltisi (10mM Tris, 5mM Sodium acetate, 0,5 mM EDT (pH: 8.3)

1X TAE buffer hazırlamak için 1.211 gr Tris-Base, 0.680 gr sodium acetate ve 0.186 gr EDTA 900 ml saf su içerisinde eritilmiştir. Çözeltinin pH' ı 8,3 olarak ayarlandıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

2. Farklı konsatrasyonlarda agaroz jel hazırlamak için;

% 1,5' lik agaroz jel için 150 mg agaroz 100 ml 1x TAE içerisinde

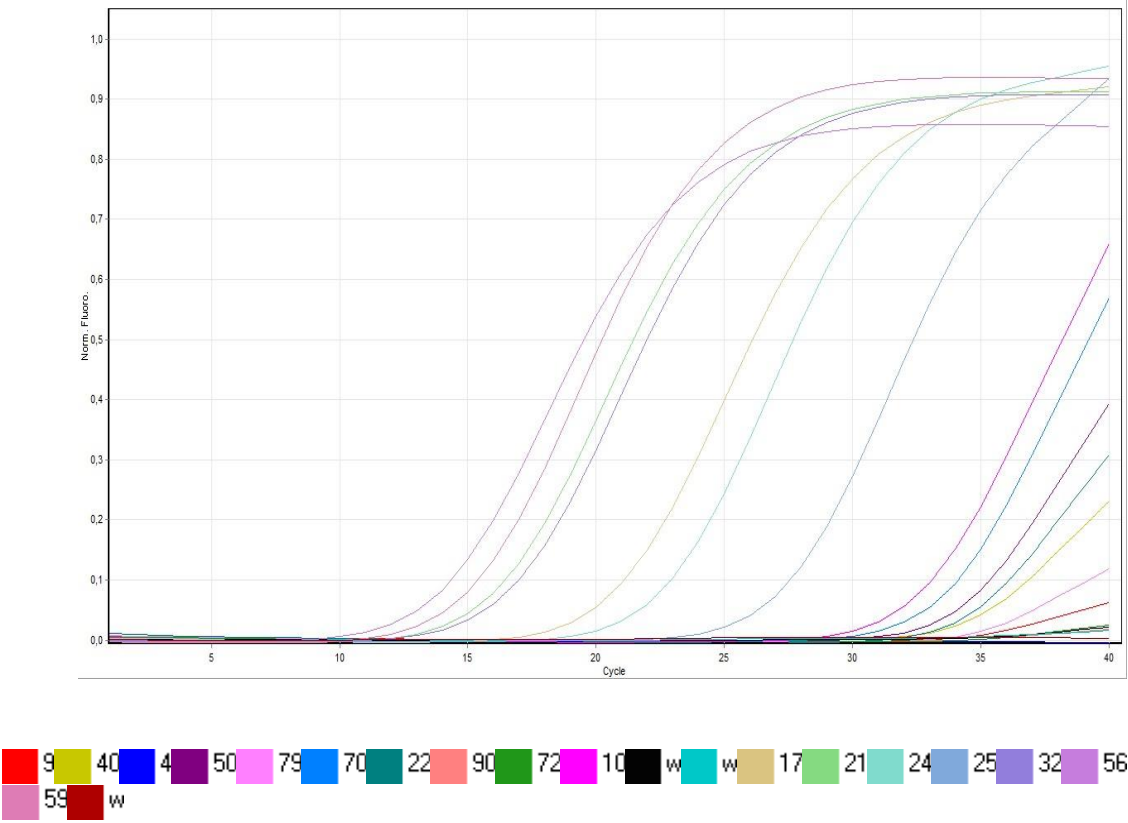
% 2' lik agaroz jel için 200 mg agaroz 100 ml 1x TAE içerisinde

3. Ethidium Bromide

10 mg ethidium bromide 1 ml saf su içerisinde ependorf tüpünde eritilmiştir. Daha sonra bu ana stoktan 30 µl alınarak 100 ml saf su içerisine ilave edilmiştir.

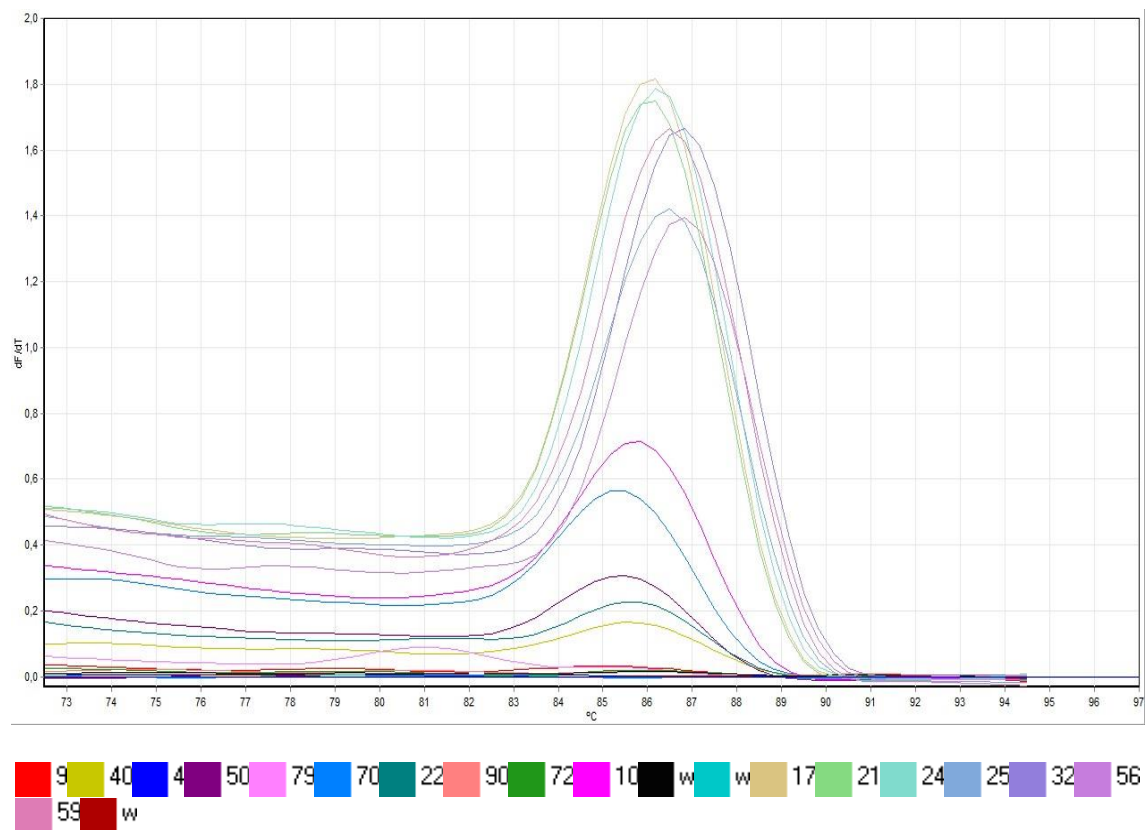
EK-C

Cycling A.Green(Extraction samples)



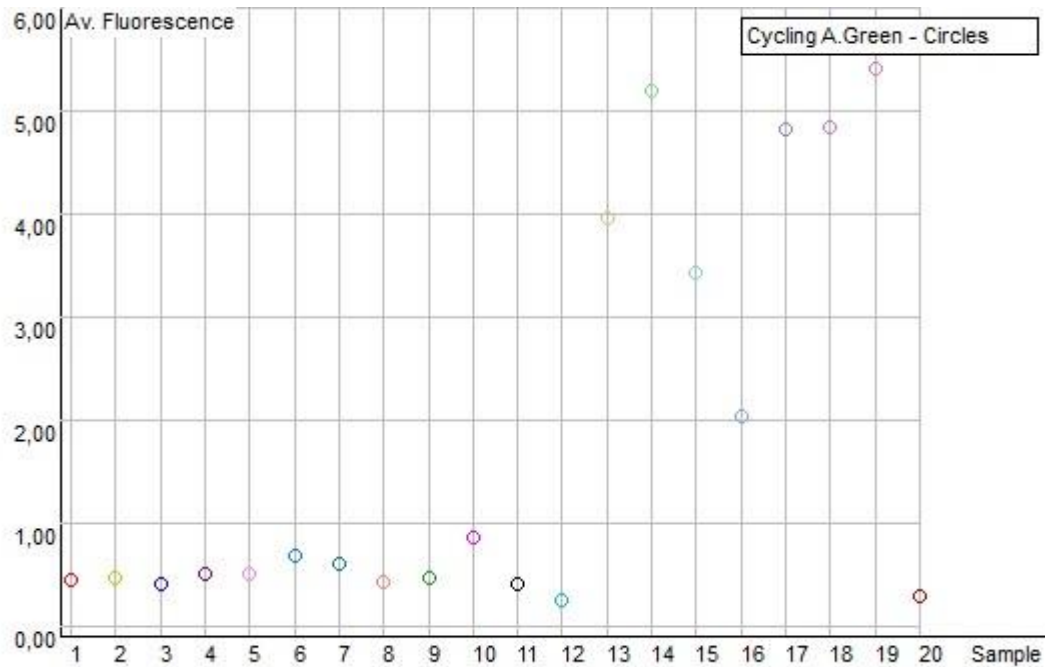
EK-Ç

Melt A.Green(extraction samples)



EK-D

Concentration data for Cycling A.Green(EXTRACTION SAMPLES)



1		9
2		40
3		4
4		50
5		79
6		70
7		22
8		90
9		72
10		10
11		w
12		w
13		17
14		21
15		24
16		25
17		32
18		56
19		59
20		w

EK-E

Elde edilen CMV dizileri aşağıdadır:

>CMV-21

ATCTGAATCAACCAGTGCCGGTCGTAACCGCCGACGTCGTCCGCGTCGCGG
TTCCCGCTCCGCTTCCTCCTCCGCGGATGCTAATTTTAGAGTCCTGTCGCAAC
AGCTTTCGCGACTTAATAAGACGTTAGCAGCTGGTCGTCCAACCTATTAACCA
CCCAACCTTTGTGGGTAGTGAGCGTTGTAAACCTGGGTACACGTTCACTTCT
ATTACCCTGAAGCCACCAAAAATAGACAAGGGGTCTTATTATGGCAAAAGG
TTGTTGCTTCCTGATTCAGTCACGGATTTTCGATAAGAAGCTTGTTTCGCGCA
TTCAAATTCGAGTTAATCCTTTGCCGAAATTTGATTCTACCGTGTGGGTAAC
GGTCCGTAAAGTTCCAGCCTCCTCGGACCTGTCCGTTGCCGCCATCTCTGCT
ATGTTTGCGGACGGAGCCTCACCGGTACTGGTTTATCAGTATGCCGCATCTG
GAGTCCAAGCCAACAATAAATTGTTGTATGATCTTTCGGCGATGCGCGCTGA
TATTGGTGACATGAGAAAGTACGCCGTACTCGTGTATTCAAAAGACGATGC
ACTCGAGACGGATGAGCTGGTACTTCATGTTGACATTGAGCACCAACGCAT
TCCCACATTAGGGGTGTTCCCAGTTTGAATCCGTGTTCTCCCAGAACCCTCC
TTCTGATTTCTGTAGAGGGAGCTGAGTTGGTAGTGTTG

>CMV-24

ATCTGAATCAACCAGTGCCGGTCGTAACCGCCGACGTCGTCCGCGTCGCGG
TTCCCGCTCCGCTTCCTCCTCCGCGGATGCTAATTTTAGAGTCCTGTCGCAAC
AGCTTTCGCGACTTAATAAGACGTTAGCAGCTGGTCGTCCAACCTATTAACCA
CCCAACCTTTGTGGGTAGTGAGCGTTGTAAACCTGGGTACACGTTCACTTCT
ATTACCCTGAAGCCACCAAAAATAGACAAGGGGTCTTATTATGGCAAAAGG
TTGTTGCTTCCTGATTCAGTCACGGATTTTCGATAAGAAGCTTGTTTCGCGCA
TTCAAATTCGAGTTAATCCTTTGCCGAAATTTGATTCTACCGTGTGGGTAAC
GGTCCGTAAAGTTCCAGCCTCCTCGGACCTGTCCGTTGCCGCCATCTCTGCT
ATGTTTGCGGACGGAGCCTCACCGGTACTGGTTTATCAGTATGCCGCATCTG
GAGTCCAAGCCAACAATAAATTGTTGTATGATCTTTCGGCGATGCGCGCTGA
TATTGGTGACATGAGAAAGTACGCCGTACTCGTGTATTCAAAAGACGATGC
ACTCGAGACGGATGAGCTGGTACTTCATGTTGACATTGAGCACCAACGCAT
TCCCACATTAGGGGTGTTCCCAGTTTGAATCCGTGTTCTCCCAGAACCCTCC
TTCCGATTTCTGTAGAGGGAGCTGAGTTGGTAGTGTTG

>CMV-32

TGAGTCGAGTCGAGTCATGGACAAATCTGAATCAACCAGTGCTGGTCGTAA
CCGCCGTCGTCGTCCGCGTCGCGGTTCCCGCTCCGCTTCCTCCTCCGCGGAT
GCTACGTTTAGAGTCTTGTCGCAACAGCTTTCGCGACTTAATAAGACGTTAG
CAGCTGGTCGTCTACTATTAACCAACCAACCTTTGTGGGTAGTGAGCGCTG
TAGACCTGGATACACGTTACATCGATTACCCTGAAGCCACCGAAAATAGA
CCGTGGGTCTTATTATGGTAAAAGGTTGTCGCTTCCTGATTCAGTCACTGAG

EK-E (Devam)

TTCGATAAGAAGCTTGTTTTGCGCGCATTCAAATTCGAGTTAATCCTTTGCCGA
AATTTGATTCTACCGTGTGGGTGACGGTCCGTAAAGTTCCTGCCTCCTCGGA
CCTGTCCGTTGCCGCCATCTCTGCTATGTTTCGCGGACGGAGCCTCACCGGTA
CTGGTTTATCAGTACGCCGCATCCGGAGTCCAAGCTAACAACAACTGTTGC
ATGATCTTTCGGCGATGCGCGCTGATATTGGTGACATGAGAAAGTACGCCG
TACTCGTGTATTCAAAAGACGATGCGCTCGAGACGGATGAACTAGTACTTC
ATGTCGACATTGAGCACCAACGTATTCCCACATCTGGGGTGCTCCCAGTTTG
AACTCGTGTTTTCCAGAACCCTCCCTCCGATTTCTGTGGCGGGAGCTGAGTT
GGCAGTGTTG

ÖZ GEÇMİŞ

Atayar MAZENOV 28.04.1993 tarihinde Kırgızistan'ın Karakol şehrinde dünyaya geldi. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini Karakol'un 1'inci ortaokulunda tamamladı. Liseden sonra 2011 yılında Kırgızistan-Türkiye Manas Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nü kazandı. 2016 yılında okulunu bitirdikten sonra, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi Bitkisel Üretim ve Teknoloji bölümünde yüksek lisansı başladı.