

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**EGE BÖLGESİ ENGINAR ÜRETİM
ALANLARINDA GÖRÜLEN VİRAL
ETMENLERİN BİYOLOJİK, SEROLOJİK VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE SAPTANMASI
ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR**

Müge ERGÜN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Semih ERKAN

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 501.03.01

Sunuş Tarihi: 03.01.2013

Bornova-İZMİR

2013

Zir. Müh. Müge ERGÜN tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan “**Ege Bölgesi Enginar Üretim Alanlarında Görülen Viral Etmenlerin Biyolojik, Serolojik Ve Moleküler Yöntemlerle Saptanması Üzerinde Araştırmalar**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve **03/01/2013** tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Semih ERKAN	
Raportör Üye	: Doç. Dr. Mustafa GÜMÜŞ	
Üye	: Doç. Dr. İbrahim DUMAN	

ÖZET**EGE BÖLGESİ ENGİRAR ÜRETİM ALANLARINDA GÖRÜLEN VİRAL ETMENLERİN BİYOLOJİK, SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE SAPTANMASI ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR**

ERGÜN, Müge

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Semih ERKAN

Ocak 2013, 118 sayfa

Bu çalışma 2011-2012 yıllarında İzmir, Aydın ve Muğla illerinde yoğun olarak enginar yetiştiriciliği yapılan üretim alanlarında enfeksiyon oluşturan viral etmenlerin tanınması ve bulunma durumlarının belirlenmesi amacıyla, İzmir ilinden 64, Aydın ilinden 40 ve Muğla ilinden 16 olmak üzere 120 bitki örneği ile yürütülmüştür.

Alınan enginar örneklerindeki viral etmenlerin tanınmasında serolojik, moleküler ve biyolojik yöntemler kullanılmıştır. Toplanan örnekler ticari tanı kitleri bulunan 8 virüsün tanınması amacıyla DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiş, bu virüslere ek olarak 4 viral etmenin varlığı RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır.

Araştırma kapsamında testlenen toplam 120 örnekte viral enfeksiyon oranının RT-PCR yöntemi ile % 39.17 olduğu, DAS-ELISA yöntemi ile de % 4.17 görülmüştür. İller bazında bakıldığında toplanan örneklerdeki virüslerin bulunma durumunun İzmir ilinde % 35.94 ve Aydın ilinde % 60.00 olduğu tespit edilmiş ve Muğla ilinden alınan örneklerde viral enfeksiyon bulunmadığını saptanmıştır. Çalışmada testlenen örneklerde en yaygın olarak ArLV'nin bulunduğu (% 30.83) ve bunu AYRSV (% 4.17) ve CMV (% 4.17) adlı virüslerinin izlediği görülmüştür. Ayrıca, İzmir ilinden alınan 2 örnekte ArLV+AYRSV karışık enfeksiyonu tespit edilmiştir. Yürütülen DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemlerinin sonuçları değerlendirilerek 25 örnekle biyolojik testler yürütülmüş ve test sonuçları alınan örneklerdeki enfeksiyon oranının % 28 olduğunu göstermiştir.

Elde edilen veriler sonucunda RT-PCR ile izole edilen ArLV ve AYRSV adlı viral etmenler dünyadaki diğer izolatlarla benzerliklerinin karşılaştırılması amacıyla sekanslamaya gönderilmiş, elde edilen nükleotid dizilimleri dünyadaki diğer izolatlarla kıyaslanmıştır. İzole edilen ArLV'nin X87255.1 kodlu izolatla % 86 oranında, AYRSV'nin ise AM087671.2 kodlu izolatla % 92 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Çeşitli programlar kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlarla her iki etmenin belirtilen dünya izolatlarıyla aynı grupta yer aldığı görülmüştür.

Mevcut bilgilerimize göre, bu araştırmadan elde edilen bulgular Ege Bölgesi enginar üretim alanlarında ArLV, AYRSV ve CMV etmenlerinin enginar bitkilerindeki doğal enfeksiyonları konusunda ilk kayıt olma özelliğini taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Enginar, viral enfeksiyonlar, ArLV, AYRSV, CMV

ABSTRACT**THE INVESTIGATIONS ON THE DETERMINATION OF VIRAL AGENTS IN ARTICHOKE PRODUCTION AREAS IN AEGEAN REGION WITH BIOLOGICAL, SEROLOGICAL AND MOLECULAR METHODS**

ERGÜN, Müge

MSc in Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Semih ERKAN

January 2013, 118 pages

This study was conducted to determine the presence and prevalence of viral infections on intensive artichoke production areas in Izmir, Aydın and Muğla provinces in 2011-2012. In order to identify viral agents, 64 samples from Izmir, 40 samples from Aydın and 16 samples from Muğla totally 120 samples were collected from symptomatic and asymptomatic plants and were tested by biological, serological and molecular methods. 8 viral agents were analysed by DAS-ELISA method with using commercial diagnostic kits. In addition to these viruses, 3 presences were investigated by RT-PCR method.

The incidence of viral infections was found 39.17% with RT-PCR method and 4.17% with DAS-ELISA method. In Izmir province infection rate was found as 35.94 % and in Aydın province 60.00 %. The results of detection studies in Muğla province showed that there is no viral infection on samples. Following evaluation of conducted DAS-ELISA and RT-PCR tests, biological tests were carried out with 25 samples. Biological test results showed that infection rate was 28 %.

ArLV was the most prevalent virus (30.83 %) in the samples of our work and followed by AYRSV (4.17 %) and CMV (4.17 %). In addition, mixed infection caused by ArLV+AYRSV were found 2 samples from Izmir province. Mixed infection rate was detected as 3.13 % and the incidence of mixed infections was 2/64.

As a result of obtained data by RT-PCR, detected AYRSV and ArLV isolates sequenced in order to compare similarities with other world isolates. Identified nucleotide sequences were compared with rest of the world's isolates. Isolated ArLV agent was showed 86 % similarity with X87255.1 isolate and AYRSV 92 % with AM087671.2 isolate. Constituted phylogenetic trees with using a variety of programs showed that both isolate were situated in the same group with mentioned world isolates.

According to our knowledge the findings in the present study is the first report about natural infections of artichoke by ArLV, AYRSV and CMV in Aegean Region, Turkey.

Key Words: Artichoke, viral infections, ArLV, AYRSV, CMV

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim süresince her türlü desteğini benden esirgemeyen, her daim yol gösteren sayın hocam Prof. Dr. Semih ERKAN'a, araştırmamın başından sonuna kadar bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve tez çalışmam boyunca bana yardımcı olan Sn. Dr. İsmail Can PAYLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, arazi çalışmalarında bana yardımcı olan Sn. Doç. Dr. Mustafa GÜMÜŞ'e ve Sn. Doç. Dr. İbrahim DUMAN'a ve çalışmalarım süresince benden yardımlarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Her daim yanımda olan ve maddi manevi desteklerini hiç esirgemeyen annem Gülizar ERGÜN, babam Nurettin ERGÜN, kardeşim Onur ERGÜN ve tüm aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Araştırmalarıma mali desteği sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Komisyonu'na (2011 ZRF 041 nolu proje) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ	11
2.1 Enginarda Enfeksiyon Oluşturan Viral Etmenlerin Özellikleri ve Saptanması Üzerine Yürütülen Çalışmalar	11
2.2 Virüs Enfeksiyonlarının Enginar Bitkilerindeki Etkileri Üzerine Yürütülen Araştırmalar	31
2.3 Virüsleri Tanılama Yöntemleri Ve Etkinlikleri Üzerine Yürütülen Çalışmalar	32
3. MATERYAL ve YÖNTEM	38
3.1 Çalışmada Kullanılan Materyal	38
3.1.1 Bitki örnekleri	38
3.1.2 Test bitkileri	41

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.1.3 Serolojik testlerde kullanılan materyal	42
3.1.4 RT-PCR testlerinde kullanılan materyal	43
3.1.5 Çalışmada kullanılan diğer materyal.....	44
3.2 Yöntem	44
3.2.1 Bitkilerdeki belirtilerin incelenmesi.....	44
3.2.2 Biyolojik testler.....	44
3.2.3 Serolojik test (DAS-ELISA) yöntemi	46
3.2.4 Moleküler yöntem (RT-PCR)	47
4. BULGULAR	53
4.1 Bitki Örneklerinde Gözlenen Belirtiler.....	53
4.2 Serolojik Testlerin Sonuçları	56
4.3 Moleküler Testlerin Sonuçları	58
4.3.1 RT-PCR yönteminin sonuçları	58
4.3.2 Dizi Analizi ve filogenetik sınıflandırma çalışmaları	68
4.4 Biyolojik Testlerin Sonuçları	73
4.5 Kullanılan Tanılama Yöntemlerinin Duyarlılık Durumunun Karşılaştırılması.....	80

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.6	Kullanılan Tanılama Yöntemlerinin Sonuçlarının Birlikte Değerlendirilmesi	82
5.	TARTIŞMA	85
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	93
	KAYNAKLAR DİZİNİ.....	96
	ÖZGEÇMİŞ	118
	EKLER	
	EK 1. TNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Kimyasallar	
	EK 2. Alınan Örneklerde Görülen Belirtiler	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Enginar Bitkilerinde Görülen Yaprak Şekilleri.....	3
1.2 Dünyada Yıllara Göre Enginar Üretim Miktarı	5
1.3 Ülkelere Göre Enginar Üretim Miktarı	6
1.4 Dünyada Enginar İhracat Miktarı Ve Değerleri.....	6
3.1 İklim Odasında Yetiştirilen Çeşitli Test Bitkilerinin Çeşitli Dönemlerine Ait Görünümler.....	45
3.2 Test Bitkilerine Mekanik İnokulasyon Uygulaması.....	45
3.3 GeneJet™ Plant RNA Purification Mini Kit Ekstraksiyon Aşamalarından Bazıları	49
4.1 Arazide Yapılan İncelemelerde Bitkilerde Gözlenen Bazı Belirtiler	54
4.2 Arazide Yapılan Makroskobik İncelemelerde Yapraklarda Gözlenen Bazı Belirtiler	54
4.3 Laboratuvarında Yapılan Makroskobik İncelemelerde Gözlenen Bazı Belirtiler	55
4.4 “GeneJet™ Plant RNA Purification Mini Kit” Yöntemiyle Elde Edilen Total Nükleik Asit Görüntüsü	59
4.5 “Silica capture” Yöntemiyle Elde Edilen Total Nükleik Asit Görüntüsü.....	59
4.6 İzmir İlinden Alınan Örneklerle ArLV İçin Uygulanmış Olan RT-PCR Testi Sonucunun Jel Görüntüleme Sisteminde Çekilmiş Görünümlerinden Bazıları.....	61

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.7 Aydın İlinden Alınan Örneklerle ArLV İçin Uygulanmış Olan RT-PCR Testi Sonucunun Jel Görüntüleme Sisteminde Çekilmiş Görünümlerinden Bazıları	62
4.8 AYRSV İçin Uygulanmış Olan RT-PCR Testi Sonucunun Jel Görüntüleme Sisteminde Çekilmiş Görünümlerinden Bazıları	63
4.9 CMV İçin Uygulanmış Olan RT-PCR Testi Sonucunun Jel Görüntüleme Sisteminde Çekilmiş Görünümlerinden Bazıları	64
4.10 TMV İçin Uygulanmış Olan RT-PCR Testi Sonucunun Jel Görüntüleme Sisteminde Çekilmiş Görünümlerinden Bazıları	66
4.11 AILV İçin Uygulanmış Olan RT-PCR Testi Sonucunun Jel Görüntüleme Sisteminde Çekilmiş Görünümlerinden Bazıları	66
4.12 AMCV İçin Uygulanmış Olan RT-PCR Testi Sonucunun Jel Görüntüleme Sisteminde Çekilmiş Görünümlerinden Bazıları	67
4.13 TSWV İçin Uygulanmış Olan RT-PCR Testi Sonucunun Jel Görüntüleme Sisteminde Çekilmiş Görünümlerinden Bazıları	67
4.14 TBRV İçin Uygulanmış Olan RT-PCR Testi Sonucunun Jel Görüntüleme Sisteminde Çekilmiş Görünümlerinden Bazıları	68
4.15 ArLV'nin Nükleotit Kıyaslanması Sonucu Elde Edilen Benzerlik Oranları	69
4.16 Çeşitli Programlar Kullanılarak .ArLV İçin Oluşturulan Filogenetik Ağaçlar	70

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.17 İzole Edilen AYRSV'nin Nükleotit Kıyaslanması Sonucu Elde Edilen Benzerlik Oranları ve En Fazla Benzerlik Gösterdiği AM087671.2 Numaralı İzolat Arasındaki Nükleotid Benzerlik ve Farklılıkları.....	71
4.18 AYRSV Etmeni İçin Oluşturulan Filogenetik Ağaçlar	72
4.19 AYRSV İle Mekanik Olarak İnokule Edilmiş <i>P. vulgaris</i> Bitkilerinin Yapraklarında Gözlenen Bazı Belirtiler	76
4.20 AYRSV İle Mekanik Olarak İnokule Edilmiş <i>P. vulgaris</i> Bitkilerinin Yapraklarında Gözlenen Deformasyonlar	76
4.21 AYRSV İle Mekanik Olarak İnokule Edilmiş <i>P. vulgaris</i> Bitkilerinin Yapraklarında Gözlenen Bazı Lezyonlar	77
4.22 AYRSV İle Mekanik Olarak İnokule Edilmiş Duyarlı Test Bitkilerinin Yapraklarında Gözlenen Bazı Belirtiler	78
4.23 ArLV İle Mekanik Olarak İnokule Edilmiş Duyarlı Test Bitkilerinde Gözlenen Bazı Belirtiler.....	79
4.24 CMV'nin Mekanik İnokulasyonu Sonucu Test Bitkilerinde Gözlenen Belirtilerden Bazıları.....	80
4.25 RT-PCR Yöntemi Sonuçlarına Göre İzmir, Aydın ve Muğla İllerindeki Enfeksiyon Oranı.....	83
4.26 RT-PCR Yöntemi Sonuçlarına Göre İzmir, Aydın ve Muğla İllerindeki Karışık Enfeksiyon (K.E) ve Tek Enfeksiyon (T.E.) Oranı.....	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Son Beş Yılda Dünyada Enginar Üretim Miktarı, Ekim Alanı ve Verim Değerleri.....	4
1.2 Enginar Üretiminde Lider Ülkelerin Ekim Alanı, Üretim Miktarı ve Verim Değerleri.....	5
1.3 Ülkemizde Bölgelere Göre Enginar Üretim Miktarları Ve Yüzdeleri	7
1.4 Türkiye’de Enginar Yetiştirilen İller Ve Üretim Miktarı.....	7
2.1 Enginar Bitkilerinde Hastalık Oluşturan Viral Etmenler Ve Bazı Özellikleri.....	12
3.1 İzmir İlinden Alınan Bitki Örnekleri, Arazi Büyüklükleri Ve Örnek Alınma Tarihleri.....	38
3.2 Aydın İlinden Alınan Bitki Örnekleri, Arazi Büyüklükleri Ve Örnek Alınma Tarihleri	40
3.3 Muğla İlinden Alınan Bitki Örnekleri, Arazi Büyüklükleri Ve Örnek Alınma Tarihleri	41
3.4 Alınan Toplam Örnek Sayısı	41
3.5 Biyolojik Testlerde Kullanılan Test Bitkileri Ve Kullanıldıkları Dönemler.....	42
3.6 Serolojik Testlerin Uygulandığı Viral Etmenler.....	46
3.7 RT-PCR Testlerinde Kullanılan Primerler, Baz Uzunlukları Ve Sıcaklık Döngüleri.....	50
4.1 İzmir İlinden Alınan Örneklerin Kullanıldığı DAS-ELISA Yöntemi İle Saptanan Virüsler.....	56

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.2 Aydın İlinden Alınan Örneklerin Kullanıldığı DAS-ELISA Yönteminin Sonuçları.....	57
4.3 Muğla İlinden Alınan Örneklerde Ticari Kitleri Varolan Etmenlere Karşı Yürütülen DAS-ELISA Testi Sonuçları	57
4.4 Enginar Örneklerinde RT-PCR Yöntemi İle Saptanan Virüsler ve İllere Göre Bulunma Durumları	60
4.5 İzmir, Aydın ve Muğla İllerinden Alınan Örneklerde ArLV ile Enfekteli Olan Örnek Sayısı, Karışık Enfeksiyonlar ve Bulunma Oranları.....	62
4.6 İzmir, Aydın ve Muğla İllerinden Alınan Örneklerde AYRSV ile Enfekteli Olan Örnek Sayısı, Karışık Enfeksiyonlar ve Bulunma Oranları.....	64
4.7 İzmir, Aydın ve Muğla İllerinden Alınan Örneklerde CMV ile Enfekteli Örnek Sayısı ve Bulunma Oranları	65
4.8 Bazı Virüs İzolatlarının Test Bitkilerinde Ortaya Koydukları Belirtiler (TMV, CMV, TBRV, TSWV).....	74
4.9 Bazı Virüs İzolatlarının Test Bitkilerindeki Belirtileri (AILV, ArLV, AVBV, AYRSV, BBWV-1, BBWV-2)	75
4.10 Virüs Tanılama Yöntemlerinin Karşılaştırmalı Sonuçları.....	81
4.11 İllere Göre Alınan Örneklerde Tespit Edilen Viral Etmenler.....	82
4.12 RT-PCR İle Tespit Edilen Virüsler, İzole Edildikleri İller ve Bulunma Durumları.....	83

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μ	Mikron
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
bp	base pair
da	Dekar
g	Gram
ha	Hektar
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
pmol	Pikomol
V	Volt

Açıklama

Kısaltmalar

AARSV	<i>Artichoke Aegean ringspot nepovirus</i>
ACDV	<i>Artichoke curly dwarf potexvirus</i>
AILV	<i>Artichoke Italian latent nepovirus</i>
AMCV	<i>Artichoke mottled crinckle tombusvirus</i>
ArLV	<i>Artichoke latent potyvirus</i>
ArLVM	<i>Artichoke latent carlavirus M</i>
ArLVS	<i>Artichoke latent carlavirus S</i>
AVBV	<i>Artichoke vein banding cheravirus</i>
AYRSV	<i>Artichoke yellow ringspot nepovirus</i>
BBWV	<i>Broad bean wilt fabavirus</i>
BYMV	<i>Bean yellow mosaic potyvirus</i>
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
CMV	Cucumber mosaic cucumovirus

Açıklama

SİMGELER VE KISALTMALAR (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
CMV	<i>Cucumber mosaic cucumovirus</i>
CraV	Cynara virus olarak adlandırılan Cytorhabdovirus
DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich – ELISA
ddNTP	Dideoksinükleotid Tri Fosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid Tri Fosfat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtBr	Ethidium Bromür
EtOH	Ethanol
FAO	Food And Agriculture Organization of the United Nations
IgG	Immunoglobulin G
NaI	Sodyum İyodür
NCBI BLAST	National Center for Biotechnology Information, Basic Local Alignment Search Tool
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVX	<i>Potato X potexvirus</i>
PZSV	<i>Pelargonium zonate spot anulavirus</i>
RNA	Ribonükleik asit
RNAse	Ribonükleaz enzim
rpm	Revolutions per Minute (Dakikadaki devir sayısı)
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction
TAE	Tris-Asetik Asit-EDTA
TBRV	<i>Tomato black ring nepovirus</i>
TICV	<i>Tomato infectious chlorosis crinivirus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic tobamovirus</i>
TNA	Total Nükleik Asit
TRV	<i>Tobacco rattle tobavirus</i>
TSV	<i>Tobacco streak ilarvirus</i>
TSWV	<i>Tomato spotted wilt tospovirus</i>
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu
TuMV	<i>Turnip mosaic potyvirus</i>
USDA	United States Department of Agriculture, Economic Research Service

1. GİRİŞ

Akdeniz havzasında yetiştirilen önemli bitkilerden biri olan enginarın (*Cynara cardunculus* L. subsp. *scolymus* (L.) Hayek) anavatanı kesin olarak bilinmemesine rağmen, yetiştirildiği tüm ülkelerde yabancı formlarının bulunduğu belirtilmektedir. Genel kaniya göre anavatanının Akdeniz havzası olduğu düşünülen enginarın, Kuzey Afrika'nın Akdeniz kıyısında bulunan ülkelerde yabancı formlarına halen rastlanmaktadır (Şimşek, 2006).

Enginar Eski Yunanlılar ve Romalılar devrinde bilinen bir sebzedir. Yabancı enginar formlarından bahseden ilk kayıtlar M.Ö. 300'lü yıllara dayanmaktadır. Theophratus M.Ö. 371-287 yılları arasında çiğ veya haşlanmış olarak tüketilen enginar çiçek tablalarından bahsetmiştir (Ryder et al. 1983; Eser vd., 2006). Ortaçağda enginar kullanımı ile ilgili pek bilgi olmamasına rağmen, 15. yüzyılda enginarın Sicilya ve Nepal'e getirildiğine dair bilgilere rastlanmaktadır. 16. yüzyılda Fransa'ya giren enginar, buradan Almanya ve İngiltere'ye yayılmış ve 17. yüzyılda ise Amerika kıtasına götürülmüştür (Günay, 1993).

Enginar, *Asteraceae* (*Compositae*) familyasında bulunan ve tür ismi *Cynara cardunculus* L. subsp. *scolymus* (L.) Hayek olan bir sebzedir. Çoğu araştırmacıya göre, *C. cardunculus* ve *C. syriaca* türleri enginarın yakın akrabalarıdır. Ancak, *Cynara scolymus*, *C. cardunculus* ve *C. syriaca*'nın birbirleriyle melezlenmesi sonucunda fertil F₁ bireylerin oluşması, bu üç türün aslında aynı türün botanik varyeteleri olduğu görüşünü gündeme getirmiştir (Basnizki, 1979). 1996 yılında yayınlanan bir makale (Rottenberg and Zohary, 1996) ile *Cynara* cinsi içinde yedi farklı yabancı tür bulunduğu, kültür enginarlarının *Cynara cardunculus* ssp. *scolymus* türü olduğu belirtilmiş, Sonnante et al. (2001) ise kültürü yapılan enginarların *C. cardunculus* var. *sylvestris* grubu içinde yer aldığını ifade etmiş ve kültür çeşitlerinin yer aldığı grubun *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* veya *C. scolymus* olarak ifade edilebileceğini açıklamışlardır.

Enginar, genellikle taze ve pişirilerek tüketilen ve insan sağlığı ve beslenmesi açısından son derece önemli olan bir sebzedir. Kendine özgü lezzeti ile birçok sebze ile birlikte pişirilerek yemek, salata, çorba şeklinde özellikle

Akdeniz mutfaklarında kullanılmaktadır. Sirkeli ya da közlenmiş konserveleri ile enginarın yıl boyunca kullanımı da mümkündür. Besin değeri oldukça yüksek olan enginarın, 100 gramı yaklaşık 7.8 g karbonhidrat, 2.3-3 g protein, 0.5-2 g şeker ve 0.2-0.3 g yağ içermektedir. 100 g taze enginarın, bitki ve kültür koşullarına göre değişebilmekle birlikte, % 10-12'si kuru madde ve % 88-90'ı ise sudur (Vural vd., 2000). Ayrıca, 2.4 g lif, 0.8 g kül, 310 mg potasyum (K), 69 mg fosfor (P), 51 mg kalsiyum (Ca), 30 mg sodyum (Na), 11 mg demir (Fe), 1.0 mg niasin (Vitamin B3), 150 mg Vitamin A, 8 mg Vitamin C, 0.7 mg Vitamin B6, 0.08 mg tiamin (Vitamin B1) ve 0.05 mg riboflavin (vitamin B2) içerdiği belirtilmektedir (Bayraktar, 1981; Alp, 2008). Bu besleyici özelliklerinin yanında, enginarın sağlık açısından safra sıvısı oluşumunu teşvik etmesi, kolesterol ve trigliserit seviyelerini düşürmesi, koruyucu kolesterol (HDL) seviyesini arttırması, sindirimi kolaylaştırması ve antioksidan özelliğinin olması gibi yararlı yönleri bulunmaktadır (Bayraktar, 1981).

M.Ö 4. yüzyılda Aristotile tarafından şifa verici olduğu öne sürülen enginarın, 1988 yılında Federal Almanya'da kurul kararıyla ve Fransız Kodeksinin 10. basımında ise tıp alanında kullanılan bitkiler arasında yer aldığı görülmektedir (Mayr and Fröhlich, 1965; Ernst, 1995). Enginarın tıbbi özellikleri arasında idrar söktürücülüğü, böbrek taşı düşürücü etkisi, üre ve kolestrol içeriği ile şeker hastalarına iyi gelmesi, sarılık tedavisinde ve vücuttaki ödemin giderilmesindeki etkileri sayılabilir (Macit ve Şalk, 1970; Bayraktar, 1981; Abak, 1987; Müller et al., 1988; Koçer, 1993; Pelt, 1993). 2003 yılında yayınlanan Wohlmuth adlı araştırmacının makalesinde enginar içeriğinde bulunan kafeik asit, bunun türevleri olan klorejenik asit ve cynarinin yanı sıra, glikozid türevi olan cynaropicrin ile önemli bir tıbbi bitki olduğu ve luteolin içeriği ile antioksidan özelliğe sahip olduğu ifade edilmektedir (Alp, 2008).

Ağırlıklı olarak gıda amaçlı kullanılmasına rağmen enginar kozmetik, içki, yem ve boya sanayinde de kullanılmaktadır (Bayraktar,1981; Abak, 1987; Koçer, 1993). Enginar bitkisinin diğer alanlardaki kullanımı aşağıdaki şekilde özetlenebilir (Tervel et al., 1998; Foti et al., 1999; Nod et al., 1999; Curt et al., 2002; Rabaneda et al., 2003).

- Tarla atığı olarak kalan gövdenin büyükbaş hayvanların besini olarak ve kağıt yapımında selülozik madde olarak kullanımı,
- Tohum ve yapraklarından elde edilen fenolik bileşiklerin antipotoksik, klerifilik, diüretik, hipokolostrometik ve antilipidemik olarak tıbbi alanlarda kullanımı,
- Enerji üretiminde biyokütle olarak kullanımı.

Enginar, yetiştirme ve bakım şartlarının uygunluğuna göre 12-15 yıl verim alınabilen, 2-3 metre boya ulaşabilen çok yıllık otsu bir C3 bitkisidir (Bayraktar, 1981; Bertelsen et al., 1995; Mlayah et al., 1997). Ilık iklimde gelişen enginarın, çok sıcak veya soğuk bölgelerde gelişimi yavaşlamaktadır. Sıcaklık sıfırın altına düştüğünde toprak üstü kısmı donmaktadır. Sıcak havalar ise baş gelişiminde etkilidir. Çok sıcak ve kuru havalarda baş gelişimi tam olmamakta ve tat acılaşmaktadır (Bayraktar, 1981; Vural vd., 1996; Ortega, 2002).

Enginarın morfolojisi sürgün, yaprak ve çiçeklerden oluşan tek yıllık toprak üstü kısım ve her yıl köklerindeki tomurcuklardan yeni bitki oluşturan çok yıllık toprak altı kısmı olarak incelenebilir (Bayraktar, 1981; Eser vd., 2006). Tek yıllık toprak üstü kısım yaklaşık 100-120 cm'e ulaşabilmekte ve bitki tacı yaklaşık 1m²'lik bir alanı kaplayabilmektedir (Alp, 2008). Enginar bileşik yapraklıdır. 50 cm'e kadar uzayabilen ve yaprakların ana damarı gibi görünen sap üzerinde, bazen karşılıklı, bazen almaçlı, bazen de tek parça yaprak oluşturmaktadır (Şekil 1.1). Enginar bitkilerinde görülen yaprak çeşitleri aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Abak, 1987).



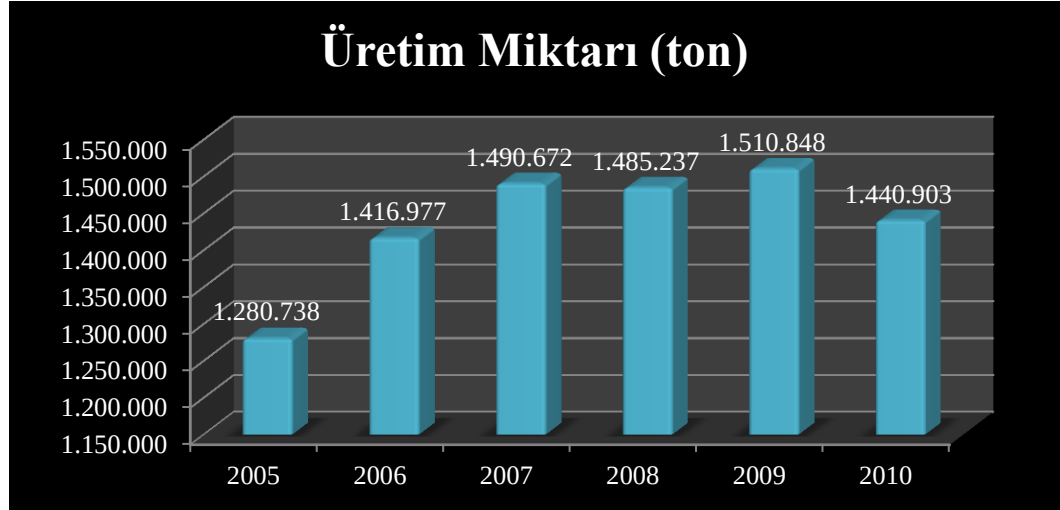
Şekil 1.1 Enginar Bitkilerinde Görülen Yaprak Şekilleri (Abak, 1987)

Enginarın çiçek yapısı erseliktir, ayrıca protandri gözlemlendiği için kendine döllenme çok zor olup sık görülmemektedir (Ryder et al., 1983). Yabancı döllenmeler ve heterozigot yapıya bağlı olarak genetik açılmalar meydana gelmekte, bu da çeşit özelliklerinin kaybına neden olmaktadır. Bu nedenle tohumla üretim oldukça sınırlıdır (Abak, 1987). Bu olumsuz yönlerinin yanında Özellikle genetik steril hatların çaprazlanmasıyla elde edilen hibrit çeşitler, hasat kolaylığı, yüksek verim, soğuk bölgelerde üretim ve toprak kaynaklı patojenlerin önlenmesi gibi avantajlara sahiptir (De Vos, 1992; Morison et al., 2000; Uğur, 2005; Eser vd. 2006). Tüm bu olumlu özelliklere rağmen özellikle Türkiye’de enginar üretiminde sıklıkla kullanılan yöntem klasik vegetatif üretim yöntemidir. Ancak, bu üretimde çoğaltma katsayısı düşüktür. Ayrıca, birçok hastalığın yeni plantasyonlara taşınmasına neden olmaktadır (Ancora, 1986; Rossi and De Paoli, 1994). Tüm bu olumsuzluklar nedeniyle günümüzde *in vitro*-doku kültürü ile enginar üretimi önem kazanmaktadır (Alp, 2008).

Enginar çok yıllık bir bitki olduğundan, üretimde büyük değişimler yerine dengeli değişimler gözlenmektedir. Enginar, ılık iklim sebzesidir. Bu nedenle, kuvvetli soğukların meydana geldiği dönemlerde üretim miktarı azalabilmektedir (Şimşek, 2006). Çizelge 1.1 ve Şekil 1.2’de yıllara göre dünyadaki enginar üretim miktarındaki değişimler gösterilmektedir.

Çizelge 1.1 Son Beş Yılda Dünyada Enginar Üretim Miktarı, Ekim Alanı ve Verim Değerleri (FAO, 2010).

Yıllar	Üretim Miktarı (ton)	Ekim Alanı (ha)	Verim kg/da
2005	1.280.738	125.719	1018.730
2006	1.416.977	130.287	1087.581
2007	1.490.672	132.938	1121.329
2008	1.485.237	129.193	1149.627
2009	1.510.848	131.907	1145.389
2010	1.440.903	124.511	1157.250

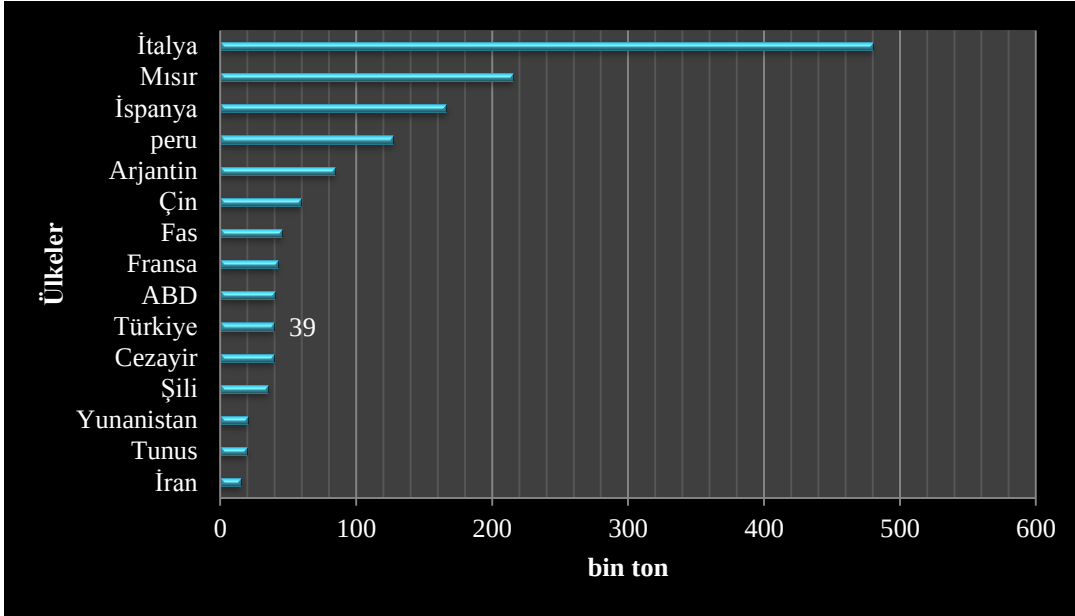


Şekil 1.2 Dünyada Yıllara Göre Enginar Üretim Miktarı (FAO, 2010)

Enginarın kültüre alındığı bölgeler % 85'e yakın bir oranla Akdeniz havzasındaki ülkelerdir. 2010 yılı verilerine göre, dünyada 124.511 ha olan enginar üretim alanının büyük bir kısmı İtalya (% 40.41), İspanya (% 10.60) ve Fransa (% 6.98) arasında dağılım göstermektedir. Ayrıca, Çin, Mısır, Peru ve Şili'de de enginar yetiştiriciliği fazladır (FAO, 2010). Enginar üretiminde, üretim miktarına göre lider ülkelerde ekim alanı, üretim miktarı ve verim değerleri Çizelge 1.2 ve Şekil 1.3'de verilmiştir.

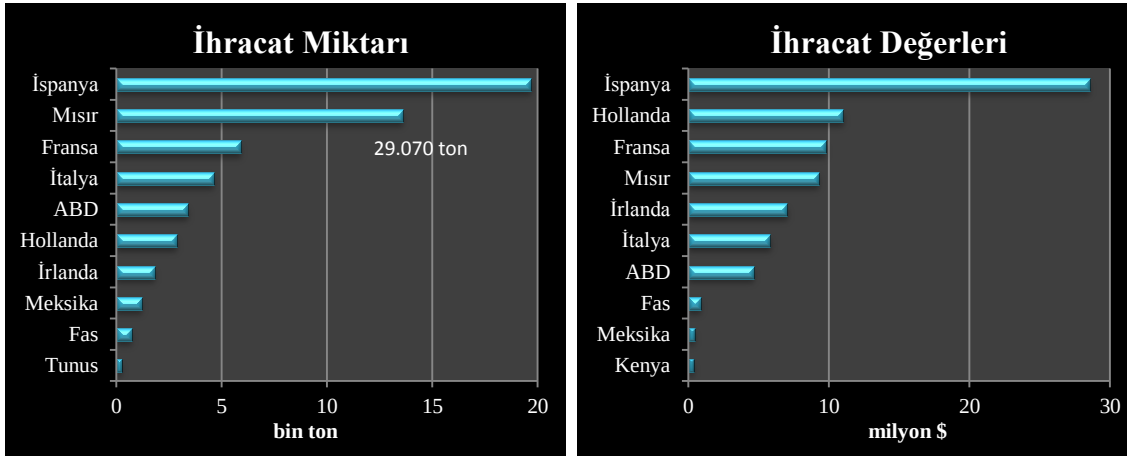
Çizelge 1.2 Enginar Üretiminde Lider Ülkelerin Ekim Alanı, Üretim Miktarı ve Verim Değerleri (FAO, 2010).

Sıra	Ülke	Üretim Miktarı (ton)	Ekim Alanı (ha)	Verim (kg/da)	Sıra	Ülke	Üretim Miktarı (ton)	Ekim Alanı (ha)	Verim (kg/da)
1	İtalya	480.112	50.321	954.10	9	ABD	40.820	2.910	1402.75
2	Mısır	215.534	8.909	2419.28	10	Cezayir	39.200	2.700	1451.85
3	İspanya	166.700	13.200	1262.88	11	Şili	35.000	4.651	752.53
4	Peru	127.503	6.848	1861.90	12	Türkiye	29.070	2.400	1211.25
5	Arjantin	84.800	3.700	2291.89	13	Yunanistan	20.400	2.100	971.43
6	Çin	59.900	9.500	630.53	14	Tunus	19.000	2.400	791.67
7	Fas	45.460	3.710	1225.34	15	İran	15.800	870	1816.09
8	Fransa	42.153	8.690	485.07		Dünya	1.440.903	124.511	1157.25



Şekil 1.3 Ülkelere Göre Enginar Üretim Miktarı (FAO, 2010)

Dünya enginar üretiminde önde gelen ülkelerin ihracat miktarları ve ihracat değerleri Şekil 1.4’te verilmiştir (United States Department of Agriculture, 2007).



Şekil 1.4 Dünyada Enginar İhracat Miktarı ve Değerleri

Ülkemizde Akdeniz iklimi görülen bölgelerde rahatlıkla yetiştirilen enginarın son yıllarda üretimi dengeli olarak artmaktadır (Eser vd., 2006). Ülkemizde enginarın yoğun olarak yetiştirildiği bölgelerin başında Ege Bölgesi gelmekte ve bunu Doğu Marmara Bölgesi izlemektedir. Çizelge 1.3’de enginarın bölgelere göre üretim miktarları ve yüzdeleri verilmiştir (Türkiye İstatistik Kurumu, 2011).

Çizelge 1.3 Ülkemizde Bölgelere Göre Enginar Üretim Miktarları ve Yüzdeleri
(Türkiye İstatistik Kurumu, 2011)

Bölge	Üretim(ton)	Yüzde
Ege	17364	51.89
Doğu Marmara	11455	34.23
Akdeniz	3821	11.42
Batı Anadolu	400	1.20
Batı Marmara	347	1.04
Batı Karadeniz	70	0.21
İstanbul	3	0.01
Toplam	33460	100

Ülkemizde enginar, yaklaşık olarak 2000-2500 ha büyüklüğündeki bir alanda yetiştirilmekte ve son 5 yılın verilerine göre ortalama olarak 35 000-36 500 ton/yıl ürün alınmaktadır. Enginar, ülkemizde yaygın olarak İzmir, Bursa ve Aydın illeri ve çevrelerinde yetiştirilmektedir. Çizelge 4.1’de belirtildiği üzere son yıllarda Antalya, Adana ve Muğla illerinde de yetiştiriciliği yaygınlaşmaktadır (Türkiye İstatistik Kurumu, 2011).

Çizelge 1.4 Türkiye’de Enginar Yetiştirilen İller ve Üretim Miktarı (Türkiye İstatistik Kurumu, 2011).

Sıra	İl	Üretim miktarı (ton)	Sıra	İl	Üretim miktarı (ton)
1	İzmir	10738	11	Ankara	400
2	Bursa	7758	12	Balıkesir	289
3	Aydın	4697	13	Kocaeli	214
4	Antalya	1966	14	Hatay	98
5	Adana	1757	15	Bartın	69
6	Bolu	1620	16	Çanakkale	58
7	Sakarya	1393	17	Bilecik	25
8	Muğla	1216	18	Eskişehir	20
9	Manisa	713	19	İstanbul	3
10	Yalova	425	20	Kastamonu	1

Ülkemizde vegetatif yolla üretim yaygın olduğundan çoğunlukla buna uygun Bayrampaşa ve Sakız enginar çeşitleri yetiştirilmektedir. Son 10 yılda yaygınlaşmaya başlayan tohumla üretim, ağırlıklı olarak konserve ve dondurulmaya yönelik bazı yabancı enginar çeşitlerinin de ülkemize girmesine

öncülük etmiştir. Orta irilikte, konik şekilli ve yeşil renkli başlara sahip erkenci çeşit olan, Opal ve orta irilikte, açık renkli ve konik baş oluşturan Jade çeşitleri ülkemizde tohumla üretilen önemli enginar çeşitlerindendir. Ancak, tohumla üretimi yapılan bu çeşitlerin bölgesel performansları hakkında yeterli veri henüz bulunmamasına rağmen, üretim yapılan parsellerde bitkilerin daha az dip sürgünü oluşturdıkları, plantasyonun üçüncü yılında verimin azaldığı gözlenmiştir (Eser vd., 2006).

Klasik yöntemle üretilmeye uygun Sakız enginarı İzmir’de Balçova, Mordoğan, Çeşme ve Karaburun yöresinde yetiştirilen erkenci, yaprakları düz, başı silindirik (su bardağı) şeklinde fazla sıkı olmayan bir çeşittir. Kasım ayında verime yatmaya başlayan bitkinin hasadı Nisan ayı sonuna kadar devam etmektedir. Taze tüketime uygun çok geniş olmayan çiçek tablası, uzun başları ile orta irilikte sıkı yapıda baş oluşturur. Uzun yıllar aynı plantasyonlarda üretilen çeşit, tek yönlü değişimler göstererek erkencilik özelliğini kaybeder ve morfolojik görüntüsü değişebilir. Bu dönüşüm sonucunda daha küçük ve basık şekilli başları ve parçalı yapraklarıyla “Yerli Tip” adı verilen bir tip oluşur. Oluşan bu yeni tip Nisan ayında verime yatar ve sıcaklığa bağlı olarak hasadı Haziran sonuna kadar devam edebilir. Görünüm olarak Bayrampaşa ve Sakız arası bir görüntüye sahip olmakla birlikte genetik özellikleri Sakız ile aynıdır (Eser vd., 2006).

Bayrampaşa enginarı ise baş özelliği bakımından Sakıza göre oldukça farklıdır, iri top şeklinde sıkı-ağır (150-250 g) bir baş oluşturur. Antosiyan içeriği fazla olan çeşit mor renkli başlara sahiptir. Geççi bir çeşittir, Mayıs-Haziran aylarında olgunlaşır ve hasat edilir, taze tüketimin yanında konservelik olarak da kullanıma uygundur. Ülkemizde yoğun olarak Marmara Bölgesi’nde İstanbul ve Bursa çevrelerinde yetiştirilir. Parçalı yaprakları ve oldukça kalın damarlarıyla Sakız çeşidinden kolaylıkla ayrılır. Son yıllarda özellikle konserve edilmeye uygun küçük başa sahip çeşitler ülkemizde de yetiştirilmeye başlanmıştır (Eser vd., 2006).

Enginar, çok yıllık bir bitki olduğundan birçok biyotik ve abiyotik faktörden etkilenmektedir. Enginar topraktan fazla besin maddesi kaldırdığı için bitkilerde besin elementi eksiklikleri sıklıkla görülmektedir. Sulama düzensizliği

ve yüksek sıcaklık baş oluşumunu etkileyen en önemli abiyotik faktörlerin başında gelmektedir (Bayraktar, 1981; Bertelsen et al., 1995; Şahan, 2008).

Enginarlarda birçok hastalık etmeni verim kaybına neden olabilmektedir. Enginarlarda görülen önemli bakteriyel hastalıklar arasında yaş çürüklük hastalığı (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) ve bakteriyel brakte lekeli hastalığı (*Xanthomonas cynarae*) bulunmaktadır (Trebaol et al., 2000). Fungal hastalıklar ise oldukça fazladır. Kurşuni küf (*Botrytis cinerea*), Ascochyta yaprak lekeli hastalığı (*Ascochyta hortorum*) (INRA, 2009), Yanıklık (*Sclerotium rolfsii*), Cercospora yaprak lekeli hastalığı (*Cercospora obscura*), Kök çürüklüğü (*Phytophthora megasperma*), Kök ve gövde çürüklüğü (*Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*) ve solgunluk (*Verticillium dahliae*) (Horst, 2008) fungal hastalıklara örnek olarak verilebilir.

Enginarlarda ekonomik zarara neden olan zararlılardan bazıları ise *Platyptilia carduidactyla* (Lepidoptera: Pterophoridae), *Vanessa cardui* (Lepidoptera: Nymphalidae), salyangoz ve sümüksü böcekler, bazı *Coleoptera* bireyleri, tarla fareleri, tarla sincapları ve yaprak bitleridir (Bertelsen et al., 1995).

Kültür bitkilerinin üretiminde nicel ve nitel biçimde ürün kayıplarına neden olan faktörler arasında viral kaynaklı etmenlerin ayrı bir önemi vardır. Bu etmenlere karşı diğer patojen gruplarının önlenmesi için sıkça başvurulmuş kimyasal savaş yönteminin uygulanamaması ve diğer kontrol yöntemlerinin de üretici tarafından yeterli düzeyde bilinmemesi, virüslerden kaynaklanan kayıpların artmasına neden olmaktadır. Virüs hastalıkları genellikle verim ve kalite üzerine doğrudan olumsuz etki yaptıklarından, gerek iç pazarda gerekse dış pazarda virüsle enfekteli bitkilerden elde edilen ürünlerin değerlendirilmesi de çok güç olmaktadır. Virüs hastalıkları sonucu, aynı anda iki tür kayıp ortaya çıkmaktadır. Bunlardan ilki, virüslerin bitki gelişimi ve verimi üzerine olan doğrudan etkileri; diğeri ise, özellikle vektör ya da yabancı ot gibi taşıyıcı veya barındırıcıların mücadelesinde uygulanan kimyasal madde giderleridir. Bununla beraber virüs hastalıklarının görünme sıklığı ve şiddeti; virüs, konukçu, vektör ve çevre koşulları dörtgeni ilişkisine bağımlı olarak yıllara göre değişkenlik göstermektedir. Virüs hastalıkları, üretimde önemli bir sorun olup, pazar değerini

düşürerek önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Enginarlarda görülen viral etmenlerin oluşturduğu belirtiler genellikle, bodurlaşma, yapraklarda kıvrılma, deformasyon, sararma ve beneklenme şeklinde olabilmektedir.

Son yıllarda üretimi artan enginarda özellikle İzmir ve Aydın illeri çevrelerinde, viral etmenlerden kaynaklanan ürün kayıplarının artmaya başladığı konusunda bilgiler alınmaktadır. Enginar üretiminde dünya lideri olan İtalya, İspanya ve Fransa gibi ülkelerde yapılan birçok çalışma ile, viral etmenlerin verimde büyük azalmalara neden olduğu tespit edilmiş ve hatta birçok viral etmenin Türkiye orjinli olduğu ortaya koyulmuştur. Ülkemize komşu olan ülkelerde bu kadar yaygın görülen viral hastalık etmenlerinin ülkemizde de yaygın olduğu düşünülmektedir. Ancak, ülkemizde enginarlarda görülen viral etmenler ile ilgili bugüne kadar pek fazla araştırma yapılmadığı görülmüştür. Yürütülen bu çalışma ile Ege Bölgesi'nde enginar üretiminin yoğun olarak yapıldığı illerdeki üretim alanlarında virüs hastalıklarının bulunma durumları izlenmiş ve toplanan örneklerdeki viral etmenlerin moleküler, biyolojik ve serolojik olarak tanılanması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bu bilgiler sayesinde Ege Bölgesi'ndeki enginar üretim alanlarında viral etmenlerin dağılımı belirlenmiş ve diğer araştırmalar için önemli bir kaynak oluşturularak literatüre katkı yapılması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

Enginar, % 85'e yakın bir oranda Akdeniz havzasındaki ülkelerde yoğun olarak yetiştirilen çok yıllık bir sebzedir. İtalya, İspanya ve Fransa enginar üretiminde lider ülkeler olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle enginar virüsleriyle ilgili birçok araştırma bu ülkelerde yürütülmüştür. Ülkemizde ise enginar virüsleri ile yürütülen çalışma sayısı çok az ve yüzeyseldir. Bugünkü bilgilerimize göre bu araştırma, Ege Bölgesi'nde enginar virüslerinin saptanması üzerine yürütülen en kapsamlı çalışmadır.

Konu ile ilgili olarak dünya genelinde gerçekleştirilen çalışmalar, enginarda enfeksiyon oluşturan viral etmenlerin özellikleri ve saptanması üzerine yürütülen çalışmalar, virüs enfeksiyonlarının enginar bitkilerindeki etkileri üzerine yürütülen araştırmalar ve virüsleri tanılama yöntemleri ve etkinlikleri üzerine yürütülen çalışmalar şeklinde 3 ana başlık halinde verilmiştir.

2.1. Enginarda Enfeksiyon Oluşturan Viral Etmenlerin Özellikleri ve Saptanması Üzerine Yürütülen Çalışmalar

Enginar virüsleriyle ilgili ilk araştırmalar 1950'lerde başlamış, 1960 ve 1970'lerde ise üst seviyeye ulaşmıştır. 1967 yılında Birinci Uluslararası Enginar Kongresi (1st International Congress on Globe Artichoke-Bari, Italy 1967) düzenlendiğinde enginardan sadece 3 virüs izole edilebilmişti. Bunlar California'dan izole edilen *Artichoke curly dwarf virus*-ACDV (Leach and Oswald, 1950; Morton, 1961), *Artichoke latent virus S-ArLVS* (Costa et al., 1959) ve İtalya'da izole edilen *Artichoke mottled crinkle tombusvirus*-AMCV adlı etmenlerdi (Martelli, 1965; Quacquarelli and Martelli, 1966).

İkinci Uluslararası Enginar Kongresi'nde (2nd International Congress on Globe Artichoke-Bari, Italy 1976) ise Martelli ve Rana (1976) tarafından mevcut listeye 9 virüs daha eklenmiştir. Bunlar arasında *Artichoke Italian latent nepovirus*-AILV, *Artichoke yellow ringspot nepovirus*-AYRSV, *Artichoke degeneration virus*-ADV, *Artichoke latent potyvirus*-ArLV, *Cucumber mosaic cucumovirus*-CMV, *Tobacco streak ilarvirus*-TSV, *Cynara virus*-CraV, *Tobacco*

mosaic tobamovirus-TMV ve *Tobacco rattle tobravirus*-TRV yer almaktadır. 1981’de düzenlenen üçüncü kongrede enginardan izole edilen virüs sayısı 16’ya (Martelli et al., 1981) ve 2000’de ise 23’e çıkmıştır (Gallitelli et al., 2004). Yapılan araştırmalar sonucunda enginar *Cynara scolymus* ve yabani enginar *C. cardunculus*’da enfeksiyon oluşturan 15 genus’a bağlı 24 virüs bulunduğu açıklanmaktadır (Çizelge 2.1) (Gallitelli et al., 2004; DPV, 2012; Erkan ve Ergün, 2012).

Çizelge 2.1 Enginar Bitkilerinde Hastalık Oluşturan Viral Etmenler ve Bazı Özellikleri (Gallitelli et al., 2004; Descriptions of Plant Viruses, 2012; Erkan ve Ergün, 2012).

No	Virüs	Epidemiyoloji	Vektör	Doğal Konukçu	Coğrafi Dağılım	
1	<i>Artichoke Italian latent nepovirus</i>	AILV	Toprak kaynaklı	<i>Longidorus apulus</i>	<i>Cynara scolymus</i>	İtalya, Bulgaristan, Rusya
2	<i>Artichoke mottled crinkle tombusvirus</i>	AMCV	Toprak kaynaklı	Vektörsüz taşınma	<i>Cynara scolymus</i>	İtalya, Fas, Malta, Yunanistan, Tunus
3	<i>Artichoke vein banding cheravirus</i>	AVBV	Toprak kaynaklı	Bilinmiyor	<i>Cynara scolymus</i>	İtalya, Türkiye (*), Fransa (*)
4	<i>Artichoke yellow ringspot nepovirus</i>	AYRSV	Toprak kaynaklı	Bilinmiyor	<i>Cynara scolymus</i> , <i>C. cardunculus</i>	İtalya, Yunanistan
5	<i>Broad bean wilt fabavirus</i>	BBWV	Böcek ile taşınır	Çeşitli Afet Türleri	<i>Cynara scolymus</i>	İtalya, Fransa
6	<i>Cucumber mosaic cucumovirus</i>	CMV	Böcek ile taşınır	Çeşitli Afet Türleri	<i>Cynara scolymus</i> , <i>C. cardunculus</i>	İtalya, Yunanistan, Fransa, Tunus
7	<i>Pelargonium zonate spot anulavirus</i>	PZSV	Böcek ile taşınır	Çeşitli Trips Türleri	<i>Cynara scolymus</i>	İtalya
8	<i>Artichoke Aegean ringspot nepovirus</i>	AARSV	Toprak kaynaklı	Bilinmiyor	<i>Cynara scolymus</i>	Türkiye, Yunanistan
9	<i>Tobacco streak ilarvirus</i>	TSV	Böcek ile taşınır	Çeşitli Trips Türleri	<i>Cynara scolymus</i>	Brezilya
10	<i>Tomato black ring nepovirus</i>	TBRV	Toprak kaynaklı	<i>Longidorus attenuatus</i>	<i>Cynara scolymus</i>	Fransa
11	<i>Tobacco mosaic tobamovirus</i>	TMV	Değme ile taşınır	Bilinmiyor	<i>C. cardunculus</i>	İtalya

Koyu renk yaygın olan virüsleri göstermektedir. *: Henüz tam aydınlatılamamıştır.

Çizelge 2.1 Enginar Bitkilerinde Hastalık Oluşturan Viral Etmenler ve Bazı Özellikleri (Gallitell et al., 2004; Descriptions of Plant Viruses, 2012; Erkan ve Ergün, 2012) (devam)

No	Virüs	Epidemiyoloji	Vektör	Doğal Konukçu	Coğrafik Dağılım	
12	<i>Tobacco rattle tobravirus</i>	TRV	Toprak kaynaklı	<i>Thrichodorus christiei</i>	<i>Cynara scolymus</i>	Brezilya
13	Artichoke curly dwarf potexvirus	ACDV	Bilinmiyor	Bilinmiyor	<i>Cynara scolymus</i>	ABD (California)
14	<i>Potato X potexvirus</i>	PVX	Değme ile taşınır	Bilinmiyor	<i>Cynara scolymus</i>	Tunus
15	Artichoke latent carlavirus M	ArLVM	Böcek ile taşınır	Bilinmiyor	<i>Cynara scolymus</i>	İtalya
16	Artichoke latent carlavirus S	ArLVS	Böcek ile taşınır	Afitler	<i>Cynara scolymus</i> , <i>C. cardunculus</i>	ABD, İtalya, Fas, İspanya (*), Brezilya (*)
17	Adlandırılmamış <i>Carlavirus</i> kabul edilen virüs	Sınıflandırılmamış	Böcek ile taşınır	Bilinmiyor	<i>Cynara scolymus</i>	İtalya
18	<i>Artichoke latent potyvirus</i>	ArLV	Böcek ile taşınır	<i>Myzus persicae</i> , <i>Aphis fabae</i> , <i>Brachycaudus cardui</i>	<i>Cynara scolymus</i> , <i>C. cardunculus</i> , <i>C. syriaca</i>	Akdeniz havzası, Brezilya
19	<i>Bean yellow mosaic potyvirus</i>	BYMV	Böcek ile taşınır	Çeşitli Trips Türleri	<i>Cynara scolymus</i>	İtalya, Yunanistan
20	<i>Turnip mosaic potyvirus</i>	TuMV	Böcek ile taşınır	Çeşitli Trips Türleri	<i>Cynara scolymus</i>	İtalya
21	Artichoke degeneration virus olarak adlandırılan <i>Potyvirus</i>	Sınıflandırılmamış	Böcek ile taşınır (*)	Bilinmiyor	<i>Cynara scolymus</i>	İtalya
22	<i>Tomato infectious chlorosis crinivirus</i>	TICV	Böcek ile taşınır	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	<i>Cynara scolymus</i>	ABD (California)
23	<i>Cynara virus</i> olarak adlandırılan Cytorhabdovirus	CraV	Böcek ile taşınır	Bilinmiyor	<i>Cynara scolymus</i> , <i>C. syriaca</i>	İtalya, İspanya
24	<i>Tomato spotted wilt tospovirus</i>	TSWV	Böcek ile taşınır	Çeşitli Trips Türleri	<i>Cynara scolymus</i>	Arjantin, Avustralya, İtalya, İspanya

Koyu renk yaygın olan virüsleri göstermektedir. *: Henüz tam aydınlatılamamıştır.

Artichoke Italian latent nepovirus-AILV yaklaşık 30 nm çapında köşeli kenarlara sahip, ssRNA içeren, toprakla ve *Longidorus* spp. ile taşınabilen bir virüstür. Bu virüs doğal olarak otsu veya odunsu birçok bitkiyi enfekte edebilmekte özsu ve tohumla kolaylıkla taşınmaktadır (Gallitelli et al., 2004; Description of Plant Viruses, 2012). AILV ilk olarak güney İtalya'da Apulia'da 1970 yılında belirti göstermeyen enginar bitkilerinden (Majorana and Rana, 1970a) ve daha sonra 1971 yılında, yapraklarında parlak klorotik beneklenmeleri takip eden parlak sarı lekeler gösteren hindiba bitkilerinden izole edilmiştir (Vovlas et al., 1971). Ayrıca, bu virüsün, Bulgaristan'da yelpaze yapraklılık benzeri belirti gösteren asma bitkilerinden (Jankulova et al., 1977) ve Yunanistan'da şiddetli yaprak deformasyonu gösteren sardunya bitkilerinden de izole edildiği (Martelli et al., 1977) açıklanmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucu, AILV'nün Apulian ırkının *Longidorus apulus* ile (Roca et al., 1975; Vovlas and Roca, 1975; Rana and Roca, 1976) Greek ırkının ise *L. fasciatus* ile (Roca et al., 1982) taşınabildiği belirlenmiştir. Doğal konukçu dizini oldukça geniş olan etmenin deneysel konukçu dizini 12 dikotiledon familyadan 63 türü içermektedir (Quacquarelli et al., 1976; Savino et al., 1977; Camele et al., 1991).

AILV, enginar bitkilerinde genellikle latenttir. Ancak, ender olarak yapraklarında ılımlı sararma ve gelişme geriliği gösteren bitkilerden de izole edilebilmiştir. Hindiba bitkilerinin yapraklarında virüs parlak sarı lekeler ve klorotik beneklenmelere neden olmaktadır. Ayrıca, virüs enfeksiyonu nedeniyle sardunya bitkilerinde ağır yaprak deformasyonları ve gelişme geriliği görülebilmektedir (Description of Plant Viruses, 2012).

AILV, özsu ile kolaylıkla taşınabilen bir etmendir. Virüsün bazı indikatör test bitkileri ve bu bitkilerde oluşan belirtiler ise kısaca şu şekilde özetlenebilir: *Phaseolus vulgaris* (çalı fasulyesi)'te inokulasyon yapılan yapraklarda klorotik ve nekrotik lezyon oluşumu gözlenir. Etmenin oluşturduğu sistemik belirtiler ise büyüyen uçlarda nekroz oluşumu ve üç yaprakçıklı yapraklarda klorotik ve nekrotik beneklenmeler şeklindedir. *Gomphrena globosa*'da ise nekrotik, beyazımsı halka şeklinde lokal lezyonları, sistemik nekrozlar ve yaprak deformasyonları izler. *Cucumis sativus*'taki belirtiler ise klorotik veya nekrotik lokal lezyonları izleyen ağır sistemik mozaik şeklindedir. Ayrıca, yaprak

deformasyonları ve izolata göre inokulasyonu takip eden 2-3 hafta içerisinde yapraklarda enasyon oluşumu gözlenebilir. *Nicotiana tabacum* cv. White Burley'de inokule edilen yapraklarda klorotik benekler ve nekrotik halkalar oluşur. Sistemik enfeksiyon sonucu ise yapraklarda nekrotik ve klorotik halka lekeler ve çizgi oluşumları görülür (Description of Plant Viruses, 2012).

AILV ve *L. attenuatus* ilişkisi dikkate alınarak yürütülen bir çalışmada, Apulia'da enginar yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı üç ana bölgede sürveyler düzenlenmiş ve 218 tarla, 1973-1974 sonbahar ve kış aylarında incelenmiştir. Bu amaçla rastgele her araziden 4-6 örnek alınmış, bu örneklerin rizosferleri *L. attenuatus* varlığı açısından laboratuvarında incelenmiştir. Aynı bitkilerin yaprakları da AILV varlığının belirlenmesi amacıyla etmenin duyarlı konukçularından biri olan çalı fasulyesi bitkilerine inokule edilmiştir (Rana and Roca, 1973). Bari'den alınan 92 örnekte yürütülen araştırma sonuçlarına göre *L. attenuatus* ve AILV'nün birlikte bulunma durumu % 40, sadece *L. attenuatus* bulunma durumu % 2, sadece AILV bulunma durumu % 33 iken, örneklerin % 25'inde etmene ve vektöre rastlanılmamıştır. Brindisi bölgesinden alınan 39 örnekte ise *L. attenuatus* ve AILV'nün birlikte bulunma durumu % 3, sadece *L. attenuatus* bulunma durumu % 13, sadece AILV bulunma durumu % 21 ve virüs ile nematoda rastlanmayan örnekler % 64'tür. Araştırmanın Foggia'da yürütülen kısmının sonuçları ise 87 örneğin % 1.5'u hem *L. attenuatus* ve AILV ile enfekteli, % 1.5'u sadece *L. attenuatus* ile, % 7'si sadece AILV ile enfekteli olduğunu göstermiştir. Örneklerin % 90'ında ise her iki etmende bulunamamıştır. Yapılan bu çalışma ile AILV enfeksiyonunun *L. attenuatus* popülasyonu ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Roca et al., 1975).

Yürütülen bir çalışmada, AILV ile nematod vektör *L. attenuatus*'un özelleşmiş ilişkileri incelenmiştir. AILV ile enfekteki *Chenopodium quinoa* bitkilerinden alınan bireyler, elektron mikroskopla enine ve boyuna kesitler halinde incelenmiştir. İnceleme sonuçları, AILV'nün, nematodun odontostyle'nin iç yüzeylerine yerleştiğini göstermiştir. Viral partiküllerin gözlendiği bu bölgenin bu virüs için spesifik olduğu belirlenmiştir (Taylor et al., 1976).

Kyriakopoulou (1995) tarafından Yunanistan'da 1995 yılında yapılan çalışmada, Enginar Yamalı Klorotik Bodurlaşma-Artichoke patchy chlorotic stunting-APCS hastalığının özellikle Argos varyatesinin yetiştirildiği Argolis bölgesinde önemli sorun olduğunu belirlenmiştir. İlk olarak 1982 yılında farkedilen hastalığın yıllar ile birlikte yayılımı ve zararı artmıştır. Yapılan çalışmalar, hastalık etmeninin AILV olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu çalışma sırasında Yunanistan'da ilk kez enginarlardan *Broad bean wilt fabavirus-BBWV* izole edilmiştir.

Artichoke mottled crinkle tombusvirus-AMCV, ssRNA içeren, 30 nm çapında, icosahedral bir virüstür (Martelli et al., 1988; Tavazza et al., 1994). Doğal enfeksiyonuna sadece enginarla rastlanmıştır. Bu virüs toprak kaynaklı olup, sağlıklı bitkilere vektör müdahalesi olmadan taşınmaktadır (Gallitelli et al., 2004). Oluşturduğu belirtiler klorotikten soluk yeşile kadar lekelenme, bitki boyunda küçülme, yapraklarda şekil bozukluğu, bodurlaşma ve baş sayısında azalma şeklindedir (Martelli, 1965; Quacquarelli and Martelli, 1966; Pasquini and Barba, 2005). AMCV, toprakta uzun süre canlı kalabilen bir etmendir ve bu nedenle enfekteli toprağa yeni bitki dikimleri ile enfeksiyon yayılmaktadır (Pasquini and Barba, 2005).

AMCV tamamen karakterize edilmiş ilk enginar virüsü olma özelliğine sahiptir (Quacquarelli and Martelli, 1966; Martelli et al., 1981). Akdeniz havzasında epidemik olduğu düşünülen etmen Güney İtalya (Martelli, 1965), Fas (Fischer and Lockhart, 1974a), Malta (Martelli et al., 1976) ve Tunus'ta (Rana and Cherif, 1981) yapraklarında şiddetli şekil bozukluğu, beneklenme ve kıvrırcıklaşma gibi belirti gösteren bitkilerden izole edilmiştir. Ayrıca, Yunanistan ve güney İtalya'nın bazı bölgelerinde ise belirti göstermeyen bitkilerden de virüsün izole edilebildiği bildirilmektedir (Rana and Kyriakopoulou, 1982).

1994 yılında Roma'da yürütülen bir çalışmada *Tombusvirus* üyesi AMCV'nün genomunun nükleotid dizisi belirlenmiştir. Yapılan çalışma virüsün genomunun 4790 nükleotid uzunluğunda olduğunu göstermiştir. AMCV genomu, beş ORF (open reading frames) kısmı içermektedir (Tavazza et al., 1994).

Geççi enginar çeşidi Romanesco'da virüs bulunma durumlarının belirlenmesi amacıyla İtalya'da yürütülen bir çalışmada, beneklenme, yapraklarında dağılma, şekil bozuklukları, bodurlaşma vb. belirtiler gösteren bitkilerden örnekler alınmış ve örnekler biyolojik, elektron mikroskop ve moleküler yöntemlerle testlenmiştir. Araştırmaların sonuçları, % 54 ile en yüksek enfeksiyon oranının AMCV'ne ait olduğunu ve etmenin tek olarak veya karışık enfeksiyon oluşturabildiğini göstermiştir. ArLV ise % 34 düzeyinde enfeksiyon oranı göstermiş ve sadece belirtisiz bitkilerden izole edilmiştir. AILV, % 12 enfeksiyon oranına sahiptir ve genellikle karışık enfeksiyon içinde bulunmaktadır. Ayrıca, bu araştırma ile bitkilerde görülen belirtilerle izole edilen etmenleri ilişkilendirmenin oldukça zor olduğu ve diğer etmenlerle karışık enfeksiyonlar durumunda değişik belirtiler ortaya çıktığı saptanmıştır (Pasquini and Barba, 2005).

Artichoke vein banding cheravirus-AVBV 30 nm çapında köşeli kenarlı, ssRNA içeren bir virüstür ve özsu ile kolaylıkla taşınabilmektedir. Virüsün vektörleri bilinmemektedir. Kısmen geniş bir konukçu dizisine sahip olduğu düşünülen etmenin, deneysel olarak 7 dikotiledon familyadan 20 türü enfekte edebildiği belirtilmektedir. Bu virüsün doğal enfeksiyonu ise sadece enginarda rapor edilmiştir (Gallitelli et al., 2004; Description of Plant Viruses, 2012).

AVBV'nün *C. amaranticolor* ve *C. quinoa* test bitkilerinde oluşturduğu belirtiler, küçük klorotik veya nekrotik lokal lezyonları izleyen sistemik mozaik ve apikal nekrozlar şeklinde tanımlanabilir. Virüs *P. vulgaris*'te (çalı fasulyesi) ise toplu iğne büyüklüğünde nekrotik lokal lezyonlar, sistemik mozaik ve üç yaprakçıklı yapraklarda şekil bozuklukluğu oluşumuna neden olmaktadır (Description of Plant Viruses, 2012).

Gallitelli et al. (1978 ve 1984) tarafından tanımlanan AVBV ilk olarak, Apulia'da Türkiye kökenli enginar çeşitleri Bayrampaşa ve Sakız'dan izole edilmiştir. Enfeksiyon bu iki türde ve İtalyan çeşidi Mazzaferrata'da yaprak damarlarında hafif klorotik renk değişimlerine neden olmaktadır (Gallitelli et al., 2004).

30 nm çapında, ssRNA içeren *Artichoke yellow ringspot nepovirus*-AYRSV, zsu ile birçok otsu konukçuya kolaylıkla taşınabilmektedir. Özellikle tütünde tohum ile taşınabilmekte, *N. clevelandii*'yi de polenle enfekte edebilmektedir. Virüsün bilinen bir vektörü yoktur (Gallitelli et al., 2004; Description of Plant Viruses, 2012).

AYRSV ilk olarak Yunanistan'da yapraklarında parlak sarı lekeler, halka lekeler ve çizgi desenleri gösteren bitkilerden izole edilmiştir (Kyriakopoulou and Bem, 1973). Daha sonra Sicilya'da dikkat çekici sarı halka lekeler ve çizgi desenleri gösteren yabani enginar (*C. cardunculus* cv. Bianco Avorio) yapraklarından virüsün izole edildiği açıklanmaktadır (Rana et al., 1978).

AYRSV'nin doğal konukçu dizini ekonomik değeri yüksek olan 6 kültür bitkisini (enginar, yabani enginar, tütün, bakla, fasulye ve hıyar) içeren 14 familyadan 35 bitki türünü kapsamaktadır. Ayrıca, virüs 30 yabani bitki türünü de enfekte edebilmektedir (Kyriakopoulou et al., 1985; Avgelis and Vovlas, 1989; Avgelis et al., 1992). Yunanistan'da yürütülen bir çalışmada etmenin, enginar ve ttndeki enfeksiyonların yüksek düzeyde ekonomik kayıplara neden olduğu, fasulye ve baklada potansiyel tehdit oluşturduğu ancak yüksek sıklıkta enfeksiyon ortaya çıkışı ve ağır belirti oluşumu durumlarında özellikle baklada ekonomik açıdan önemli olabileceği açıklanmaktadır (Kyriakopoulou et al., 1985). Deneyssel olarak virüsün konukçu dizini ise 11 dikotiledon familyadan 56 türü içermektedir (Rana et al., 1980).

1972 yılında AYRSV Yunanistan'da ilk kez Argolis'te yerel tüysüz çeşit olan Argitiki'de tespit edilmiştir. Virüs bu çeşitte parlak sarı veya klorotik halka lekeler, değişen çaplarda çizgi desenleri, bölümler veya tüm bitkide sararan dokunun nekrozunu izleyen belirtilere neden olmaktadır. Ayrıca, bitkinin verimi ve boyutlarında azalma grldğu gözlenmiştir (Kyriakopoulou and Bem, 1973).

1976 yılında Rana et al. (1978) tarafından yürütülen çalışma ile İtalya'da tipik sarı veya klorotik simptomlar gösteren enginarlar ve yabani enginarlardan AYRSV izole edilmiştir. Bu virüs İtalya'da bu iki bitkide daha önce izole edilmemiştir.

1980 yılında AYRSV enfekteli enginar bitkilerinin bulunduğu arazinin birkaç kilometre uzağındaki tütün (*Nicotiana tabacum* L. cv. Black of Argos) tarlalarında, AYRSV'nün tek olarak ve TMV ile karışık enfeksiyon şeklinde oluşturduğu iki önemli hastalığa rastlanmıştır (Kyriakopoulou, 1981).

1981 yılında ise AYRSV, Argolis'te bu kez enginar yetiştirme alanlarından oldukça uzak mesafedeki tütün tarlalarından tekrar izole edilmiştir (Kyriakopoulou et al., 1985). Ayrıca, Nauplion bölgesinde AYRSV enfekteli enginar tarlalarına bitişik kloroz gösteren fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) tarlalarından 1980 yılında ve ağır beneklenme, mozaik ve cüceleşme gösteren bakla bitkilerinden (*Vicia faba* L. var. major Harz.) 1982 yılında izole edilmiştir (Kyriakopoulou et al., 1985).

Rana et al. tarafından yapılan çalışmalarla ise, AYRSV'nin özsu ile mekanik olarak kolaylıkla taşınabildiği, *Myzus persicae* kullanılarak yürütülen çalışmaların sonuçları ise etmenin afitlerle taşınmadığını kanıtlamıştır (Rana et al., 1980).

1985 yılında AYRSV'nin vektörlerinin belirlenmesi amacıyla *Myzus persicae*, *Hyperomyzus lactucae* ve birkaç bitki paraziti nematod ile yürütülen bir çalışmanın sonucunda *M. persicae* ve *H. lactucae* ile yürütülen testler, non-persitent, semipersitent veya persistent olarak negatif sonuç vermiştir. Nematod ile taşınma çalışmaları ise iki kısımda yürütülmüştür. İlk olarak AYRSV semptomu gösteren bitkilerin rizosferinden dikkatlice örnekler toplanmıştır. İkinci olarak, toplanan *Longidorus fasciatus*, *Xiphinema pachtaicum*, *Trichodorus* spp., *Paratrichodorus tunisiensis* ve *Paratrichodorus* spp. türleri sağlıklı test bitkilerinin sulama suyuna karıştırılmış ve bitkiler biyolojik indeksleme ve IEM ile incelenmiştir. Geniş çaplı yürütülen test sonuçları etmenin nematodla taşınmadığını göstermiştir. Elde edilen veriler, AYRSV'nin *nepovirus* olmasına rağmen nematod kökenli bir vektörü olmadığı ve virüsün doğal yayılma ve dağılımında tohum ve polenle taşınmanın önemli rol oynadığı hipotezini desteklemektedir (Kyriakopoulou et al., 1985).

Maliogka et al. (2006) yapraklarında sarı çizgiler ve nekrotik küçük lekeler gösteren soğan bitkileri ile yaptıkları bir çalışmada, yaklaşık 25 nm çapında köşeli

kenarları olan bir virüs izole etmişler ve bu virüsün mekanik olarak *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Leguminosae* ve *Solanaceae* familyasına bağlı 28 indikatör bitki türüne inokule edilebileceğini belirlemişlerdir. Enfektekteli *Nicotiana benthamiana* dokularında yürütülen sitopatolojik incelemeler sonucunda, AYRSV'ne ait sitoplazmik kalıntılar oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Çalışma kapsamında testlenen 44 bitki türünün 28'inin etmene duyarlı olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, etmenin soğan tohumlarında taşınma oranının % 20 olduğunu saptamışlardır.

Broad bean wilt fabavirus-BBWV 25 nm çapında, ssRNA içeren izometrik partiküllere sahiptir. Konukçu dizini geniş olan virüs 14 dikotiledon familyadan 43 türü enfekte edebilmektedir. Özsu ile kolaylıkla taşınan bu virüs non-persistent olarak *Myzus persicae*, *Aphis craccivora* ve *Macrosiphum euphorbiae* ile yüksek oranda taşınabilmektedir (Description of Plant Viruses, 2012).

Etmenin indikatör bitkilere mekanik inokulasyonu ile *Vicia faba* bitkilerinde sistemik enfeksiyon görülmekte ve enfeksiyon sonucu görülen belirtiler arasında mozaik, şekil bozukluğu, gelişme geriliği, solgunluk ve ölüm bulunmaktadır. *C. quinoa* bitkilerinde ise inokule edilen yapraklarda inokulasyonu izleyen 4-6 gün içinde 4-5 mm çapında klorotik lokal lezyonlar oluşmaktadır. Ayrıca, klorotik beneklenme, apikal nekrozlar ve sistemik kloroz oluşumu da görülmektedir (Description of Plant Viruses, 2012). *G. globosa* veya *C. quinoa* bitkileri ArLV ile BBWV enfeksiyonunu ayırmak için kullanılabilir. Bu iki bitkide ArLV lokal enfeksiyon oluştururken, BBWV sistemik enfeksiyona neden olmaktadır (Gallitell, et al., 2004).

BBWV enginarda ilk olarak güney İtalya'da ArLV ile birlikte, nadiren de CraV ve *Bean yellow mosaic bymovirus* (BYMV) ile birlikte Castellammare çeşidine ait bitkilerden 1978 yılında izole edilmiştir (Russo and Rana, 1978). BBWV genellikle diğer virüslerle karışık enfeksiyon şeklinde görülmektedir (Rana and Martelli, 1983).

Rana et al. (1987) tarafından yürütülen çalışmada etmen, Locale di Mola çeşidinin fidelerine mekanik olarak inokule edilmiş, bitkilerde Russo ve Rana

(1978)'nin etmeni izole ettiği bitkilerdekine benzer simptomlar oluşmuştur. Bu simptomlar sarı beneklenme, mozaik ve çizgi oluşumudur (Rana et al., 1987). Etmen aynı zamanda Yunanistan'da da izole edilmiştir (Kyriakopoulou, 1995). Fransa'da Camus de Bretagne çeşidinde yürütölen bir çalışmada etmen ile enfeksiyon oranının % 40-70 olduğu ve enfeksiyon sonucunda, her enginar bitkisinde oluşan baş sayısı ve başların ağırlığının azaldığı belirlenmiştir (Migliori et al., 1987).

Cucumber mosaic cucumovirus-CMV 29 nm çapında, dört parçalı genoma sahip ssRNA içeren icosahedral partiköllö bir etmendir (Francki, 1979; Description of Plant Viruses, 2012). Viröř tüm dñya genelinde oldukça geniş konukçu dizinine sahiptir. Non-persistent olarak 60'dan fazla yaprak biti türöyle, en az 10 küsküt türöyle ve tohumla taşınabilmektedir. Yapılan alışmalar CMV'nin domates tohumlarında %0.2 (Richardson, 1990) ve % 8 oranında (Park and Cha, 2002) taşındığını göstermiştir. Ayrıca, viröş özsü ile de kolaylıkla taşınabilmektedir (Description of Plant Viruses, 2012). CMV'nin belirtileri bitki türüne, gelişim dönemine, sıcaklığa ve viröş ırkına göre değişim göstermekle birlikte, genel belirtiler genç yapraklarda kloroz, yapraklarda daralma, şiddetli kıvrılma, büyüme noktalarında yanmalar ve bitki ölümleri şeklindeyir (Fulton, 1950; Kaper and Waterworth, 1981; Yang et al, 1993). CMV ile enfekteli bitkilerde verim % 23-47 oranında azalmaktadır (Wilson, 1983).

CMV'nin indikatör test bitkilerinde oluşturduğu belirtiler ise şu şekildedir. *C. amaranticolor* ve *C. quinoa*'da sistemik enfeksiyon oluşurmıyan viröş, nekrotik veya klorotik lokal lezyon oluşumuna neden olur. *Cucumis sativus*'ta ve *Cucurbita moschata* (Zucchini kabağı)'da ise sistemik enfeksiyon sonucu mozaik oluşumuna ve inokule edilen çeşidin duyarlılığına göre büyümenin yavaşlamasına neden olmaktadır. *N. tabacum*, *N. glutinosa* ve *N. clevelandii*'de ise inokule edilen yapraklarda belirti oluşumu gözlenmez, sarı/yeşil sistemik mozaik veya halka leke oluşumu görölür (Description of Plant Viruses, 2012).

CMV ilk olarak kuzey İtalya'da beneklenme gösteren yabancı enginar bitkilerinden Lisa (1971) adlı araştırıcı tarafından izole edilmiştir. Araştırıcı etmenle devam ettiği araştırmalarında viröşü *Myzus persicae* ile yabancı enginar

fidelerine taşıyabilmiştir. Yabani enginarlardan alınan izolat, enginarlarda belirti oluşturmamıştır. Fransa (Migliori et al., 1984) ve güney İtalya (Paradies et al., 2000)'da ArLV veya TSWV ile karışık enfeksiyon oluşturan subgroup II'ye ait CMV straini, izole edildiği bitkilerde ağır gelişme geriliği, yaprak anormalileri ve nekroz belirtilerine neden olmuştur. 1990 yılında Tunus'ta gerçekleştirilen bir araştırmada, enginarda CMV enfeksiyonu olduğu kanıtlanmıştır (Chabbou and Cherif, 1990).

Artichoke Aegean ringspot nepovirus-AARSV köşeli kenarlı ve yaklaşık 30nm çapında izometrik partiküller ve ssRNA içeren tipik bir *nepovirus*tür. AARSV ilk olarak Türkiye'deki belirti göstermeyen bitkilerden 1982 yılında izole edilmiş (Kyriakopoulou and Bem, 1982), ardından Rana et al. tarafından 1985 yılında Yunanistan'da sarı lekeler, ılımlı beneklenme gösteren Black ve Argitiki çeşitlerine ait enginar bitkilerinde saptanmış ve *Raspberry ringspot nepovirus*-RpRSV'ün serotipi olarak tanımlanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalar Yunan ve Türk izolatlarının serolojik olarak oldukça yakın olduğunu, ancak RpRSV-S ve RpRSV-E ile uzaktan ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır (Rana et al., 1985).

Her 4 izolatla yürütülen moleküler çalışmaların sonuçları Yunan ve Türk izolatının % 73 oranında homolog dizilimlere sahip olduğunu ancak RpRSV-E ile bu oranın % 7'de kaldığını ortaya çıkarmıştır (Robinson and Clark, 1987). Bu çalışmaların ışığında etmenin ayrı bir tür olduğu belirlenmiş günümüzdeki ismi Murant et al. (1996) tarafından verilmiştir. Vektörü bilinmeyen etmenin (Roca et al., 1986) kısmen geniş deneysel konukçu dizini 7 dikotiledon familyaya bağlı 22 tür olarak belirlenmiştir (Rana et al., 1985).

Tobacco mosaic tobamovirus-TMV yaklaşık 300 nm uzunluğunda, 18 nm çapında düz, çubuk şeklinde, ssRNA içeren bir virüstür (van Regenmortel, 1981). 1886 yılında Mayer tarafından keşfedilmiş ilk bitki virüsüdür. Bitki artıklarında 100 yıla kadar virülensini koruyabilmesi nedeniyle oldukça stabildir. Topraktaki enfekteli bitki kök kalıntıları ve tohum primer inokulum kaynağıdır (Taylor et al., 1961). Tohumla taşınma oranı domateslerde % 94'lere ulaşabilmektedir (Juretić, 1978; Walkey, 1991). Ayrıca, özsu, aşılama, kültürel bakım işlemleri, bitkilerin birbirine teması, ısırıcı çiğneciye böcek türleriyle de yüksek oranda taşınabilir.

Konukçu dizini oldukça geniş olan etmen genellikle sistemik olarak bitkinin her kısmında bulunabilmektedir (Neergaard, 1988).

Virüsün test bitkilerine mekanik inokulasyonu sonucu, *N. tabacum* cv. Turkish, *N. tabacum* cv. Samsun, *N. tabacum* cv. White Burley ve *N. tabacum* cv. Xanthi’de inokulasyonu takip eden 3-4 gün içinde genç yapraklar sistemik olarak etkilenmekte, damarlarda renk açılmaları ve mozaik oluşumu görülmektedir. Yapraklarda şekil bozukluğu ve kabarcıklanma virüs nedeniyle oluşmaktadır. *N. glutinosa*, *N. tabacum* cv. Samsun NN, *N. tabacum* cv. Xanthi NN, *N. tabacum* cv. Xanthi-nc, *C. amaranticolor*, *C. quinoa* ve *P. vulgaris*’te ise 28°C’nin altında lokal enfeksiyonlar oluşmakta ve sistemik enfeksiyon görülmemektedir (Description of Plant Viruses, 2012).

TMV enginarda Lisa (1971) tarafından *C. cardunculus* bitkilerinden İtalya’da izole edilmiş ve yapılan çalışmalarla serolojik olarak TMV’nün bugünlerde ToMV olarak adlandırdığımız domates ırkına benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Brunt, 1986). Bu nedenle enginardan izole edilen bu virüsün Gallitelli et al. (2004)’a göre ToMV olarak sınıflandırılması gerekmektedir.

Artichoke latent potyvirus-ArLV, 730 nm uzunluğunda, ssRNA içeren bir virüstür (van Regenmortel, 2000; Gallitelli et al., 2004). Non-persitent olarak *Myzus persicae*, *Brachycaudus cardui* ve *Aphis fabae* ile taşınabilmektedir (Rana et al., 1982). Yapılan araştırmalar virüsün tohumla taşınmadığını göstermiştir (Lumia et al., 2003). Virüsün doğal konukçuları oldukça sınırlıdır. *C. scolymus*, *C. cardunculus*, *C. syriaca* ve *Petunia hybrida* doğal konukçularından bazılarıdır (Plant Viruses Online, 2012).

California’da varlığı ilk kez Costa et al. (1959) tarafından ortaya konan etmen, Tunus’ta 1964 yılında (Marrou and Mehani, 1964), 1974’te Fas’ta (Fischer and Lockhart, 1974b) ve İtalya Sardinya’da 1977 yılında (Foddai et al., 1977) belirti göstermeyen enginar bitkilerinden izole edilmiştir.

ArLV, Akdeniz havzasındaki üretim alanlarında ekonomik öneme sahip ve geniş alana yayılmış bir etmendir. Etmen ile yapılan araştırmalar, yaprak bitleriyle

taşınmanın hızlı oluşu ve vegetatif yöntemle üretim sonucu enfeksiyon oranının oldukça yüksek olduğunu göstermiştir (Rana and Russo, 1980; Ortega et al., 2000; Pasquini and Barba, 2003).

Duyarlı test bitkilerine virüsün mekanik inokulasyonu sonucunda *G. globosa* bitkilerinde kırmızı halkalar şeklinde lokal lezyonlar görülmektedir. *D. stramonium*'da sistemik beneklenmelere neden olan etmen, *C. quinoa* ve *C. amaranticolor*'da nekrotik lokal lezyon oluşumuna ve *N. benthamiana* ve *N. clevelandii*'de ağır sistemik mozaik meydana gelmesine neden olmaktadır (Plant Viruses Online, 2012).

Sardinia-İtalya'da yürütülen bir çalışmada enginarlardan bir latent virüs izole edilmiştir. Etmenin arıtılmamış enginar özsuunda *in vitro*'da dayanıklılığı 20-30 saat, seyreltme son noktası 10^{-3} ile 10^{-4} ve sıcaklıkla inaktivasyon noktası 55-60°C olarak belirlenmiştir. Elektron mikroskopla yapılan incelemelerle etmenin iplik şeklinde 730 nm uzunluğunda olduğu, enfekteli *N. benthamiana* yapraklarından alınan çok ince kesitlerde helezon şeklinde sitoplazmik inklüzyon cisimcikleri olduğu görülmüştür. Yürütülen biyolojik testlerde ise virüsün *G. globosa* ve *C. amaranticolor*'da karakteristik lokal lezyonlara ve *N. benthamiana*'da sistemik belirtilere neden olduğu saptanmıştır (Foddai et al., 1977).

ArLV (Rana et al., 1982) ve AYRSV (Rana et al., 1983) adlı virüslerin coğrafik yayılımını belirlemek amacıyla yürütülen çalışmalarda, İzmir çevresinden belirti göstermeyen enginar bitkileri ve Yunanistan'da sarı mozaik ve lekeler ya da ılımlı beneklenme (Kyriakopoulou and Bem, 1982) gösteren Black ve Argitiki çeşitlerine ait enginar bitkileri biyolojik indeksleme ile testlenmiştir. *C. amaranticolor* ve *C. quinoa* bitkilerinde görülen belirtiler AILV ve AVBV virüslerinininkilere benzemesine rağmen yürütülen çift yönlü agar difüzyonu testleri bu etmenler için negatif sonuç vermiştir. Uygulanan mikropresipitin testleri ile az miktarda *Raspberry ringspot nepovirus*-RpRSV'nün iki ırkına (RpRSV-S ve RpRSV-E (Harrison, 1958; Cadman, 1960) ait az miktarda antiserum elde edilmiştir. ArLV ve AYRSV ise izole edilmemiştir (Rana et al., 1985).

Ortega et al. (2005) tarafından İspanya’da enginar üretim alanlarında görülen viral kaynaklı üretim problemleri ve enfeksiyon oluşturan viral etmenlerin belirlenmesi amacıyla yürütülen bir çalışmada, indikatör bitki, seroloji ve elektron mikroskop yöntemleri kullanılmıştır. Araştırma sonuçları İspanya’da üretim alanlarında görülen en yaygın virüsün ArLV olduğunu göstermiştir. TSWV, CMV ve *Artichoke French latent fabavirus* (AFLV) ise izole edilen diğer etmenler olmuştur. Ayrıca elektron mikroskop ile daha önceden enginarda varlığı tespit edilmiş benzer bazı partiküllere de rastlanmıştır.

Tomato spotted wilt tospovirus-TSWV küresel, membran ile sarılı, yaklaşık 80-120 nm çapında, ssRNA içeren bir virüstür. Özsu ile kolaylıkla taşınabilen bu virüsün, asıl yayılma şekli tripslerle olmaktadır. Birçok *Thripidae* bireyi, etmeni persitent olarak taşıyabilmektedir. En önemli türler ise *Thrips tabaci*, *Frankliniella occidentalis*, *F. fusca* ve *F. schultzei*’dir (Description of Plant Viruses, 2012).

Virüsün tanınması için duyarlı test bitkileri, *Petunia hybrida*, *N. tabacum* cv. Samsun NN, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *C. sativus*, *Vinca rosea* ve *Tropaeolum majus*’tur. *P. hybrida*’da inokulasyondan 2-4 gün sonra lokal nekrotik lezyonlar oluşur. *N. tabacum* cv. Samsun NN, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*’da lokal nekrotik lezyonları sistemik nekrozlar ve yaprak deformasyonları izler. *C. sativus* bitkilerinde ise inokulasyonu takip eden 4-5 gün içinde kotiledonlarda nekrotik merkezli lokal klorotik benekler oluşur. *V. rosea*’da, inokulasyondan 10-14 gün sonra lokal siyah benekler, sistemik mozaik ve deformasyon oluşumu gözlenir. *T. majus*’ta inokulasyondan 8-12 gün sonra sistemik mozaik belirtileri, inokule edilen yapraklar haricinde oluşur. İnokule edilen yapraklarda belirti görülmez (Description of Plant Viruses, 2012).

TSWV enginarda ilk kez Arjantin’de yapraklarında sararma ve kuruma görülen bitkilerden izole edilmiştir (Gracia and Feldman, 1978). Virüs ayrıca 1981 yılında Avustralya’da da izole edilmiştir (Martelli et al., 1981). TSWV ile enfekteli enginar bitkilerinde, ağır bodurlaşma, genel kloroz, baş saplarında bozulmalar, iç ve dış pullarda bir veya birden fazla nekrotik kısımlar gibi belirtiler gözlenmektedir (Vovlas and Laforteza, 1994; Camele and Rana, 1999).

Apulia’da yürütülen çalışmaların sonuçları, TSWV enfeksiyonunun hastalık şiddetinin yüksek oluşu ve özellikle enfekteli enginar bitkilerinden duyarlı diğer kültür bitkilerine tripsler ile taşınması nedeniyle önemli ekonomik kayıplara neden olduğunu göstermiştir (Gallitelli et al., 2004).

2005 yılında Basilicata ve Apulia Güney İtalya’daki hibrit enginar çeşitleri ile yürütülen bir çalışmada, mekanik inokulasyon ve elektron mikroskop ile TSWV, ArLV ve TuMV varlığı aranmıştır. Test sonuçları TSWV’ün tekli enfeksiyonu veya ArLV-TSWV karışık enfeksiyonu bulunduğunu göstermiştir (Camele and Rana, 2005).

Şubat 2005-Kasım 2007 yıllarında Yunanistan’da Argolida ve Komotini’de TSWV ile enfekteli tütün ve marul alanlarının yakınındaki arazilerde virüs benzeri belirtiler gösteren enginarlardan örnekler toplanmıştır. Bu bölgelerde hastalık oranı sırasıyla % 3-7 arasında bulunmuş ve belirti gösteren bitkilerden alınan yapraklar, poliklonal antikorlarla TSWV, CMV ve TuMV için DAS-ELISA’ya tabi tutulmuştur. Klorotik ve/veya nekrotik halkalar, yapraklarda çizgi şekilleri ve ılımlıdan şiddetliye kadar gelişme gerilemesi gösteren bitkiler TSWV ile enfekteli bulunmuştur. Uygulanan RT-PCR testleri sonucunda elde edilen fragmentler ise diğer TSWV izolatları ile % 94-96 oranında benzerlik göstermiştir. Bu çalışma ile enginarlarda enfeksiyon oluşturduğu bilinen (Gallitelli et al., 2004) TSWV’nün, Yunanistan’da tespit edilen ilk doğal enfeksiyonu olarak literatüre girmiştir (Lotos et al., 2009).

Pelargonium zonate spot anulavirus-PZSV küresel benzeri, 25-35 nm çapında, ssRNA içeren bir virüstür. Gallitelli tarafından tanımlanan (1983) bu virüs, Apulia’da bodurlaşma ve yapraklarda klorotik beneklenme gösteren enginarlardan izole edilmiştir (Rana and Martelli, 1983).

Tobacco streak ilarvirus-TSV, 26-35 nm çapında isometrik partiküller içerir. Enginarda sadece Brezilya’da bodur kalmış bitkiler ve şekil bozukluğu gösteren yapraklardan 1971 yılında izole edilmiştir (Costa and Tasaka, 1971).

Tobacco rattle tobnavirus-TRV, 25 nm kalınlığında, 200x55 nm boyutlara sahiptir. Enginar da ilk kez 1969 yılında Chagas et al. ve 1972 yılında Chagas ve Silberschmidt tarafından, Brezilya'da parlak sarı renklenmeler gösteren yapraklardan izole edilmiştir. Mekanik inokulasyonla fidelere taşınamayan etmen *Trichodorus christiei* ile taşınabilmektedir (Salomão, 1976). Fransa'da ArLV ve BBWV ile karışık enfeksiyon halinde bulunan izolat (Migliori and Marzin, 1985) ise *T. primitivus* ile taşınmaktadır (Gallitelli et al., 2004).

Artichoke curly dwarf potexvirus-ACDV iplik şeklinde, 582x15 nm boyutlarında, oldukça az karakterize edilmiş bir virüstür. 2004 yılında Adams et al. tarafından *Potexvirus* genusu içerisinde sınıflandırılmıştır. California'da yapraklarında şekil bozukluğu, yayılmış damar nekrozları, gecikmiş baş gelişimi ve düşük kaliteli ürün alınan bitkilerden izole edilmiştir (Leach and Oswald, 1950; Morton, 1961).

ACDV, vektörü henüz bilinmeyen ancak hastalıklı bitkiden üretim materyali alınmasıyla yeni dikim alanlarına bulaşabilen bir etmendir. ACDV ile enfekteli bulunan tüm bitkilerin aynı zamanda bitkide belirti oluşumuna neden olmayan ArLV ile de enfekteli bulunmuştur. ACDV'nin hastalık etiolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, tarlada doğal konukçusunun enginar olduğu, deneysel olarak ise *Asteraceae* familyası bireylerinden bazılarını enfekte edebildiği belirlenmiştir (University of California Agriculture & Natural Resources, 2012).

515 x 13 nm boyutlarda, ipliksi bir virüs olan *Potato X potexvirus* -PVX, ssRNA içerir. Özsu ve mekanik temasla taşınabilen etmen 16 familyayı enfekte edebilmektedir (Description of Plant Viruses, 2012). Enginar da ilk kez mozaik, yaprak deformasyonu ve yaprak ayalarında azalma belirtileri gösteren bitkilerden 1989 yılında Tunus'ta izole edilmiştir (Chabbouh, 1989).

Tunus'ta Kairouan bölgesinde mozaik, gerilemiş gelişme ve ağır yaprak deformasyonu görülen enginarlardan, konukçu test bitkilerine yapılan mekanik inokulasyonlar pozitif sonuç vermiş ancak o güne kadar Tunus'ta kaydedilen iki enginar virüsü ArLV ve AMCV'den farklı belirtiler gözlenmiştir (Marrou and Mehani, 1964; Rana and Cherif, 1981). PVX antiserumu ile yürütülen Lateks

agglutinasyon testleri, etmenin PVX olduğunu göstermiş ayrıca yapılan sitopatolojik incelemeler de etmenin PVX olduğunu kanıtlamıştır. Yapılan bu çalışma, PVX'in enginaradaki doğal enfeksiyonunun ilk kaydı olarak literatüre geçmiştir (Chabbouh et al., 1990).

Artichoke latent virus M-ArLVM yaklaşık 697 nm boyunda, ssRNA içeren bir virüstür. Mekanik olarak test bitkilerine taşınmaz ve enfekte ettiği enginar bitkilerinde simptom oluşturmaz (Gallitelli et al., 2004). Apulia'da AILV, AMCV ve ArLV'ün bir veya daha fazlasıyla karışık enfeksiyon halinde 1989 yılında izole edilmiştir (Di Franco et al., 1989).

Artichoke latent virus S-ArLVS büyük ihtimalle ilk kez belirti göstermeyen California enginar bitkilerinden izole edilmiştir (Costa et al., 1959). Daha sonra 1970 yılında Apulia'da (Majorana and Rana, 1970b) ve 1974 yılında Fas'ta (Fischer and Lockhart, 1974b) belirti göstermeyen bitkilerden izole edilmiştir.

Bean yellow mosaic potyvirus-BYMV ilk olarak Apulia'da aynı zamanda ArLV ile enfekteli, yaprak damarlarında sararma, sarı beneklenme ve çizgi şeklinde belirtiler gösteren enginar bitkilerinde (Russo and Rana, 1978) ve Yunanistan'da (Rana and Kyriakopoulou, 1980) izole edilmiştir.

Turnip mosaic potyvirus-TuMV'ün enginar izolatu yaklaşık 730 nm uzunluğunda partiküllere sahiptir. İlk olarak güney İtalya'da belirti göstermeyen ve aynı zamanda ArLV ile enfekteli olan enginar bitkilerinden izole edilmiştir (Foddai et al., 1993). Enginarda TuMV enfeksiyonu yoğunluğu ve ekonomik zararı bilinmemektedir.

California'da enginar ve *Nicotiana glauca*, *Picris echidorea* yabancı otlarından *Tomato infectious chlorosis crinivirus*-TICV izole edilmiştir. Enginardaki belirtileri tanımlanamamış olan etmen, *Trialeurodes vaporariorum* ile taşınmaktadır (Gallitelli et al., 2004).

Cynara virus (CraV), 170-260 nm x 60-65 nm boyutlarında, zarflı ve basil formunda, endoplasmik retikülümde yerleşen bir etmendir (Peña-Iglesias et al.,

1972; Russo et al., 1975; Rana et al., 1988). *Cytorhabdovirus* genusuna ait olduğu kabul edilen etmen, tüm özelliklerinin net olarak bilinmemesi nedeniyle herhangi bir familyaya atanmamıştır (Walker et al., 2000).

İlk olarak İspanya'da dejenere olmuş enginarlardan izole edilen etmen (Peña-Iglesias et al., 1972), daha sonra 1975 yılında *C. scolymus* ve *C. syriaca*'dan Apulia'da izole edilmiştir (Russo et al., 1975). Yapılan çalışmalarla CraV, her zaman karışık enfeksiyonlar şeklinde izole edilmiştir. 1972 yılında, İspanya'da Peña-Iglesias et al. tarafından tanımlanamayan bir *potyvirus*'le (bugünlerde ArLV olabileceği düşünülmektedir), Apulia'da iplikli bir partikül (ArLV veya BYMV) ve izometrik partiküllerle (AILV veya BBWV) (Russo et al., 1975) birlikte izole edilmiştir.

Cynara virus 1988 yılında Rana et al. tarafından yürütülen çalışmada, güney İtalya'daki belirti göstermeyen enginar bitkilerinden, duyarlı konukçu bitkisi *Nicotiana langsdorffii* ve ArLV'nin eliminasyonu için ArLV bağışıklık serumu kullanılarak izole edilmiştir. Cynara virus, birçok *Solanaceae* bitkisini enfekte edebilmektedir. Yürütülen bu çalışma ile, termal inaktivasyon noktası 40-45°C, seyreltme son noktası 10^{-2} ve 10^{-5} olarak belirlenmiştir.

Artichoke degeneration virus-ADV, iplik şeklinde hesaplanan uzunluğu 585 nm'dir. Elde olan veriler etmenin sınıflandırılması, özellikleri, epidemiyolojisinin belirlenmesi için oldukça yetersizdir. ACDV'den farklı bir virüs olduğu deneysel olarak doğrulanmayan etmen, 1972 yılında cüceleşme, beneklenme, kıvrılma ve kıvrıcıklaşma gösteren bitkilerden Peña-Iglesias ve Ayuso-Gonzales tarafından izole edilmiştir.

Apulia'da *in vitro* meristem uç kültürü ile yetiştirilen, belirti göstermeyen cvs. Terom ve Romanesco bitkilerinden iplik şeklinde bir partikül izole edilmiştir. Henüz net olarak tanımlanamayan bu yeni virüsün biyolojik, fizikokimyasal ve sitopatolojik özellikleri etmenin *Carlavirus* genusunun bir üyesi olduğunu düşündürmektedir (Rana et al., 1989). Özsu ile taşınma kabiliyeti, genom büyüklüğü, kılıf proteininin alt birim büyüklüğü ve partikül büyüklükleri yönünden ArLVM'den farklı bir virüs olduğu belirlenmiştir. Virüsün

karakterizasyonu henüz tamamlanmamış olup, taksonomik ataması henüz yapılmamıştır (Gallitelli et al., 2004). Serolojik olarak uzaktan *Carnation latent carlavirus* ve *Poplar mosaic carlavirus* ile akraba olmasına rağmen, Artichoke latent virus S'in de içinde bulunduğu *carlavirus*lerin diğer bir grubuna üye değildir. Etmenin neden olduğu sitolojik değişimler, bozulan organellerden kaynaklanan kompleks sitoplazmik inkluzyonlar, lipid damlacıkları ve membranlardaki birikimler şeklindedir (Di Franco et al., 1989).

1986 yılında İtalya'da sağlıklı görünen, belirtisiz enginar bitkilerinde ArLV, AILV, AMCV ve BBWV varlığını araştırmak amacıyla, *in vitro*'da meristem kültürüyle yetiştirilen Terom ve Romanesco enginar çeşitleriyle yürütülen araştırmada, alınan örnekler biyolojik, fizikokimyasal ve serolojik olarak incelenmiştir. Biyolojik indeksleme sonuçları yukarıda belirtilen etmenler için negatif sonuç verirken, *C. amaranticolor*'u lokal olarak, *N. benthamiana*'yı ise sistemik olarak enfekte eden iplik şeklinde partiküllere sahip yeni bir etmen izole edilmiştir. Yürütülen hücrel inkluzyon ve sitopatoloji çalışmalarıyla, RNA içeren 12 x 664 nm boyutlarındaki partikülün *carlavirus* grubuna ait olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca etmen serolojik olarak *Poplar mosaic carlavirus* (PopMV) ile yakın ilişki göstermektedir. Yapılan incelemeler sonucunda *Compositae* familyasında enfeksiyon oluşturan iplik şeklinde virüsler ile ilgili çok az yayına ulaşılmış (Costa et al., 1959; Majorana and Rana, 1970b; Peña-Iglesias and Ayuso-Gonzales, 1972) ve bu yayınlardaki bilgiler oldukça sınırlı olduğu için izole edilen bu yeni etmenle karşılaştırma yapılamamıştır (Rana et al., 1989).

2011 yılında Ciuffo et al. tarafından Liguria, Sardinia ve Latium bölgelerinde belirti gösteren veya göstermeyen enginar bitkilerinden alınan örneklerle, *Potyvirus* bireylerini tespit etmek için kullanılan primerler ile RT-PCR'lar yürütülmüş ve 700 bp'lik fragmentler elde edilmiştir. Yürütülen kıyaslama çalışmalarında, fragment dizilimlerinin % 98 oranında *Ranunculus latent potyvirus*-RaLV ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Daha sonra yürütülen DAS-ELISA çalışmaları da etmenin RaLV olduğunu göstermiştir. cDNA kütüphanesinden elde edilen 5,5 kb'lık bölge ve 500 bp'lik NIa fragmenti ise %80 oranında ArLV ile benzerlik göstermiştir.

2.2. Virüs Enfeksiyonlarının Enginar Bitkilerindeki Etkileri Üzerine Yürütülen Araştırmalar

Virüs enfeksiyonlarının bitkinin gelişmesi ve verimi üzerine zararlı etkileri vardır. Ancak, enginar bitkilerinde virüslerin ortaya koyduğu kayıplar konusundaki çalışmaların sayısı pek fazla değildir ve yapılan araştırmalar az sayıdaki virüs üzerinde yoğunlaşmış şekildedir. Morton (1961)'un belirttiği üzere, ACDV California'da enginar bitkilerinde pazarlanabilir baş verimini % 25 oranında azaltmaktadır. ACDV enfeksiyonu sonucunda bitkide büyüme ve vigorda azalma, gelişme geriliği, yapraklarda şekil bozukluğu, koyu nekrotik lekeler görülebilmektedir. Etmen bitkide yaklaşık % 40 oranında verim düşüşüne neden olmaktadır. (University of California Agriculture & Natural Resources, 2012).

BBWV, CMV ve TBRV adlı virüslerin enginar bitkilerinde tekli enfeksiyon oluşturduğu cv. Camus de Bretagne çeşidine ait bitkilerde baş ağırlıklarında sırasıyla % 11, % 15 ve % 19 azalma ve her bitkinin oluşturduğu baş sayısında sırasıyla % 19, % 29 ve % 42 düşüş olduğu görülmüştür (Migliori et al., 1987).

ArLV, enginar bitkilerinde latenttir. Aslında, ilk başlarda ArLV enfeksiyonunun enginarın verimine etkisi olmadığı düşünülmekteydi. Ancak, yapılan son çalışmalar, etmenin bitki üzerinde doğrudan bir etkisinin olduğunu göstermiştir (Gallitelli et al., 2004). Bitki gelişmesinde önemli bir düşüşün yanında enfeksiyon, bodurlaşma ve yapraklarda sarı beneklenmelere neden olmaktadır. Özellikle diğer virüslerle karışık enfeksiyon oluşturmaları sonucu baş oluşumu ve baş büyüklüğünü azaltarak direk verim düşüşüne neden olmaktadır (Camele et al., 1999).

Fransa ve İtalya'da Camus de Bretagne, Spinoso Sardo, Brindisino çeşitleri ve bazı hibrit çeşitler (Talpiot, H137 ve H044) ile yürütülen karşılaştırmalı çalışmalarda, bir veya iki virüsle yapay olarak enfekte edilen bitkilerde ArLV'ün, pazarlanabilir baş sayısı ve büyüklüğünde önemli azalmalara, başlarda zamanından önce açılmalara, pulcuklarda renk kırılmalarına ve baş saplarında kısalmalara neden olduğu görülmüştür. Geç hasatla birlikte verim kaybı % 38-53

olarak belirlenmiştir (Foddai et al., 1983a, 1983b; Migliori et al., 1987; Rana et al., 1992; Camele et al., 1999).

ArLV enfeksiyonunun enginar başı üretimine olan etkilerini saptamak amacıyla Rana et al. (1992) üç yıl süren bir çalışma yürütmüştür. Virüsten ari ve ArLV ile enfekteli “Brindisino” çeşidinin *in vitro* üretim yapılmış ve üç yıl boyunca bitkiler tarlada izlenmiş, etmenin bitkilere etkilerini belirlenmek amaçlanmıştır. Araştırma sonuçları enfeksiyonun yapraklarda ve braktelerde renk değişimlerine, baş açılımı ve baş sapının kısalmasına, ilk hasadın ertelenmesine, verimde büyük düşüslere ve baş genişliğinde azalmalara neden olduğunu göstermiştir.

1993 yılında ArLV ve BBWV-FA straininin tek veya karışık enfeksiyonlarının yapay olarak denendiği bir araştırmada, enfeksiyonların bitki vigorunda (yaprak uzunluğu, dal yüksekliği) ve kuru ağırlıkta azalmalara, kuru madde oranında artışa, hasat periyodunun uzamasına ve baş oluşumunda önemli düşüslere neden olduğunu belirlenmiştir. Ayrıca, verimdeki düşüşte, bitki tür özellikleri ve virüs enfeksiyon tipinin önemli derecede etkili olduğu saptanmıştır. Özellikle ArLV ve BBWV-FA karışık enfeksiyonu verimde önemli azalmaya neden olmaktadır (Manzanares et al., 1993).

2.3. Virüsleri Tanılama Yöntemleri ve Etkinlikleri Üzerine Yürütülen Çalışmalar

Enginarda bir veya birden fazla virüsün oluşturduğu karışık enfeksiyonlar oldukça yaygındır ve bu da belirtiye dayalı tanıyı oldukça zorlaştırmaktadır. Ayrıca, tek bir etmenle bulaşık olsalar bile çoğu bitki belirgin belirti oluşturmaz. Enfeksiyonların çoğu latenttir ve simptom oluşumu çeşit reaksiyonları, çevre koşulları, kültürel işlemler ve bitki yaşından etkilenmektedir.

Otsu indikatör bitkilerin tanı için kullanımı, enginar virüslerinin ortak konukçulara sahip olması ve aynı konukçada benzer belirtiler oluşturmaları nedeniyle çok tercih edilmemektedir. Tanının güvenilir olabilmesi için daha geniş konukçu dizini ile çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır ki bu da oldukça zaman alan

bir iştir ve yüksek işgücü, uygun alan ve kontrollü çevre koşulları gerektirmektedir. Bu nedenle otsu test bitkilerinin kullanımı serolojik ve moleküler teknikler ve malzemelerinin tam olarak yeterli olmadığı bazı viral etmenlerle sınırlıdır.

Tanılamada kullanılan serolojik yöntemler genellikle agar jel difüzyon testi ve ELISA'dır (Migliori et al., 1989; Foddai et al., 1992). Agar jel difüzyon testlerinde, enginar özsuynun hızlıca okside olması, örneklerdeki virüs konsantrasyonun çok düşük düzeylerde bulunması gibi dezavantajlar nedeniyle ELISA kullanımı daha güvenilir ve yaygındır.

1991 yılında ArLV ile yürütülen bir çalışmada, indirekt Dot-ELISA ile DAS-ELISA yöntemleri kıyaslanmış, indirekt Dot-ELISA yönteminin DAS-ELISA'dan daha duyarlı ve daha ekonomik olduğu belirlenmiştir. Bu amaçla enfekteli Spinoso Sardo çeşidi enginar bitkilerinin yapraklarından izole edilen antijen, seyreltilerek nitrosellüloz (NC) ve poliviniliden diflorit (PVDF) membranlara benek şeklinde bırakılmıştır. Bloklamadan sonra membranlar alkaline fosfataz konjugatı içinde tavşanda anti-ArLV IgG ve sonra keçide anti-tavşan IgG'da inkübe edilmiştir. Daha sonra substrat uygulanmış ve çökeltinin rengi incelenmiştir. DAS-ELISA bilindiği şekilde uygulanmıştır. Dot-ELISA ile elde edilen minimum partikül, NC'de enfekteli özsuynun 1/2000 seyreltme ile 125 pg saflaştırılmış virüs ve PVDF'de 1/4000 seyreltme ile 83.3 pg saflaştırılmış virüs iken DAS-ELISA'da bu oran 1/1000 seyreltme ile 50 ng saflaştırılmış virüs şeklindedir (Cugusi et al., 1994).

Elektron mikroskop teknikleri ise, dokularda yeterli yükseklikte konsantrasyonlarda bulunan virüslerin (AMCV, TMV, ...) tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır (Milne and Luisoni, 1977). EM teknikleri günümüzde oldukça gelişmiştir. Özellikle altın ile kaplanan antikorlar, ön tanı için kullanılabilir. Bu yeni teknikler sayesinde, cins veya tür düzeyinde sitopatolojik değişiklikler, ince bölünmüş dokular sayesinde kolaylıkla gözlenebilmektedir (Martelli and Russo, 1977, 1984). ISEM ise daha düşük konsantrasyonlarda virüs içeren örneklerle de başarılı şekilde uygulanabilmektedir (Derrick, 1973).

Diğer virüs türlerinde olduğu gibi, enginar virüslerinin de hızlı, ekonomik ve güvenilir olarak tanımlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu isteklere uygun biçimde cevap veren nükleik asit temelli testler, virüsün nükleik asidini çoğaltabilmek için radyoaktif olmayan metodların bulunmasından sonra hızlıca yayılmıştır. Enginar karışık enfeksiyonların sıklıkla görüldüğü bir bitki türüdür ve enfeksiyona neden olan virüsleri tanımlayabilecek polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), tanılamada önemli kullanım potansiyeli sunar. Grieco ve Gallitelli (1999) enfekteli enginar özsu örnekleri kullanarak 3 çift spesifik primerle RT-PCR testleri yürütmüşler ve farklı cinslere ait 3 virüsün bağımsız genom dizilimlerinin amplifikasyonu için bir yöntem tanımlamışlardır. Tek testle her virüsün eş zamanlı ve spesifik tanımlanmasına izin veren bu protokol, spesifik amplifikasyon için oldukça önemli bir faktör olan first strand cDNA sentezinde antisens primerler bir viral RNA kalıbını kullanır. Yüksek spesifikliğin sağlanabilmesi için, strain düzeyinde bile bu primerler aynı takson üyeleri arasında büyük farklılıklar gösteren genom bölgelerinden seçilir (Gallitelli et al., 2004).

Yukarıda belirtilen 3 çift primerle yürütülmüş Multiplex RT-PCR ile, karışık veya tek enfeksiyon halinde bulunan ArLV, AMCV ve AILV'ün tanımlanması çalışmasında, AMCV enfeksiyonu tespit edilemezken, ArLV ve AILV karışık enfeksiyon halinde tespit edilmiştir. Her örnek Multiplex RT-PCR haricinde hibridizasyon ve biyolojik testlere tabi tutulmuş ve sonuçların birbirine paralel olduğu gözlenmiştir (Grieco and Gallitelli, 1999).

Grieco ve Gallitelli (1999)'nin tanımladığı bu prosedürün çeşitli avantajları olsa da enginar bitki öz suyunda karışık enfeksiyonların tanımlanması sorununun tamamen üstesinden gelememektedir. Örneğin, duyarlılık limiti rapor edilen diğer virüslere göre düşüktür. Diğer bir önemli faktör de bitki öz suyu konsantrasyonudur. Amplifiye edilmiş kısımlar sadece bitki öz suyunun reaksiyona eklenmeden önce seyreltildiği durumlarda görülmüştür. Daha yoğun konsantrasyonlarda reaksiyon oluşmamıştır. Ayrıca çalışma, enginar virüslerinin diğer konukçulara oranla bitki öz suyunda daha az yoğunlukta bulunması nedeniyle karışık enfeksiyonlarda tanı duyarlılığını düşürdüğü düşüncesini açığa çıkarmıştır.

Karışık enfeksiyonlarda cDNA sentezi sırasında viral etmenlerin aynı primerle reaksiyona sokulması sonucunda konsantrasyonların düştüğü sanılmaktadır. Özellikle farklı taksonomik grupların birlikte enfeksiyonu sonucunda etmen konsantrasyonu değişmektedir. Bu da testin duyarlılığının azalmasına neden olmaktadır. Tüm bunlara ek olarak, bu çalışma ile AILV konsantrasyonunun, AMCV konsantrasyonundan on kat fazla olmadığı durumlarda, AILV varlığının maskelendiği saptanmıştır. Henüz bilinmeyen bir nedenden dolayı RT-PCR, AILV üzerinde öncelikle AMCV ve ArLV amplifikasyonunu gerçekleştirmektedir. Yukarıda sözü edilen bu çalışma, enginarda farklı virüslerin aynı anda tespiti için yürütülen ilk Multiplex RT-PCR çalışmasıdır (Grieco and Gallitelli, 1999).

Lumia et al. (2003) tarafından ArLV'nin duyarlı ve güvenilir tespiti için yürütülen bir araştırmada Romanesco çeşidi enginarlardan farklı vejetatif dönemlerde arazilerden örnekler alınmıştır. Alınan bu örnekler RT-PCR ve moleküler hibridizasyon testlerine tabi tutulmuştur. Ayrıca bu çalışmada ArLV'nin güvenilir tanısı için yeni primer de tasarlamıştır. Tasarlanan primer ile yürütülen RT-PCR sonucu elde edilen ampikon sekansı, gen bankasındaki izolatlarla %87 oranında benzerlik göstermiştir. Yürütülen çalışmanın sonuçlarına bakılacak olursa, üretim sezonunda (Kasım-Ocak) alınan örneklerde enfeksiyon belirleme oranı her iki teknikte de % 83 olmuştur. Baş üretim sezonunda (Mart) hibridizasyonun duyarlılığı azalmaya başlamış ve viral etmen tespit oranı % 70'lere gerilemiştir. Vejetatif dönemin sonunda ise % 40'a kadar düşmüştür. RT-PCR ise her vejetatif dönemde etmeni başarı ile tespit etmiştir. Çalışma sonuçları, hibridizasyon tekniğinin başarısının büyük oranda yaprak örneklerinin kalitesine bağlı olduğunu göstermiştir.

Çalışmada RNA ekstraksiyonu için kullanılan ticari kit (Rneasy Plant Mini Kit-Qiagen), oldukça duyarlı bulunmuş, işlem süresini kısaltmış ve enginarda bulunan RT-PCR inhibitörlerini herhangi ek bir çalışmaya gerek olmadan elimine etmiştir. Ticari kit ile yapılan RNA ekstraksiyonunun, diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre daha etkili olduğu belirlenmiştir (Lumia et al., 2003; Pasquini and Barba, 2003).

Pasquini et al. (2004) tarafından yürütülen enginarlarda sıklıkla enfeksiyon oluşturan ve kontrolü sağlıklı üretim materyali seçimine dayanan ArLV'nin güvenilir tanısı için, one-step RT-PCR ve DNA problarıyla doku imprint hibridizasyon gibi moleküler yöntemlerin yanında ELISA testleri de kullanılmıştır. *In vivo* ve *in vitro* geçi enginar çeşitlerinde RT-PCR ve ELISA en güvenilir yöntemler olarak belirlenmiştir. Ayrıca, bu tarlalarda yapılan survey sırasında AMCV, AILV, TSWV, CMV ve Inpatiens necrotic spot tospovirus-INSV de izole edilmiştir.

RT-PCR spesifik nükleik asitlerin oldukça duyarlı biçimde çoğaltılmasına dayanan bir yöntemdir. Virüs ve viroidlerin tanımlanmasında sıklıkla kullanılan bu yöntemin başarısı ve güvenilirliği, bitki dokularından ekstrakte edilen nükleik asitlerin miktarı ve kalitesine bağlıdır (Sipahioğlu et al., 2006).

Bitki içerisinde bulunan, fenol, polifenol ve polisakkaritler, PCR yönteminin duyarlılığını etkilemekte ve yanlış negatif sonuçlara neden olabilmektedir (Wilde et al., 1990; Cieřlińska, 2004). Lee et al.'un 2004 yılında yürüttüğü bir çalışmada, bitki dokularında yoğun miktarlarda bulunan fenol, polifenol ve polisakkaritlerin bitki özsuğunun renginin koyulaşmasına neden olduğunu ve nükleik asit ekstraksiyonunu negatif yönde etkilediğini farketmişler ve sodyum sülfite kullanarak bitki özsuğunun renklerinin koyulaşmasını önlemeye çalışmışlardır. Sodyum sülfite ile ekstrakte edilen bitkilerden yüksek kalitede nükleik asit elde edilebilmiştir.

Hücrelerin zarar görmesinin ardından fenolik bileşikler açığa çıkıp kolaylıkla oksitlenirler. Okside olan bu fenolikler enzim aktivitesini azaltır (Compton and Preece., 1986; Laukkanen et al., 1999). Fenolik bileşiklerin inhibitörlerinden bazıları, siyanür, karbonmonoksit, merkaptobenzotiazol, dimercapto propanol, benzoik asit, potasyum siyanür, sodyum ve potasyum klorür, 2-mercapto ethanol, 2-merkaptobenzotiazol ve sistein'dir (Vamos-Vigyazo, 1981). Yürütülen diğer bir çalışma sitrik asit, askorbik asit veya polyvinyl pyrrolidone (PVP)'un da inhibitör olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Toth et al., 1994). Özellikle PVP'nin hidrojen bağlarıyla polifenol bileşiklerinin bağlayarak sentezlenmelerini yavaşlattığı saptanmıştır (Figueiredo et al., 2000).

Yürütülen bir çalışma ile özellikle RNA virüsleri ile çalışırken, reverse transkripsiyonun aşırı duyarlılığı nedeniyle amplifikasyon reaksiyonlarında yer alan maddelerin engelleyici veya düzenleyici özelliklerinin ortaya çıkması testin duyarlılığı üzerinde oldukça etkili bulunmuştur (Wilde et al., 1990). Mac Kenzie et al. (1997) hazır ticari engelleyiciler ile bu bileşikler inaktive etme çalışmalarını yürütmüş ve silica capture yönteminin bu konuda oldukça başarılı olduğunu belirtmişlerdir. RNA ekstraksiyonunda sıklıkla kullanılan yöntemlerden biri olan “Silica capture” yöntemi, içerdiği Guanidine thiocyanate ve mercaptoethanol sayesinde hem bitkilerdeki fenolik bileşiklerin inaktivasyonunu hızlandırmakta, hem de izole edilen RNA parçaları ve PCR ürünlerinin parçalanmasını minimize etmektedir. Böylelikle ekstrakte edilen örnekler, bozulmadan üzerinde tekrar çalışılabilecek durumda uzun sürede saklanabilmektedir (Cieślińska, 2004; Sipahioğlu et al., 2006; Sipahioğlu et al., 2007).

RT-PCR birçok avantaja sahip olmasına karşın, örnek özsuyunun konsantrasyonu, özsudaki virüs konsantrasyonu, seyreltme oranındaki belirsizlikler, düşük duyarlılık sınırları, enginar virüslerinin tanılanmasında nadiren de olsa bazı istenmeyen sonuçlara neden olabilmektedir. Bu nedenle amplikonların ayrıntılı şekilde belirlenmesi ve karakterizasyonu için işlem sonrasında jel elektroforezi, Southern blotting, sekanslama gibi tekniklere ihtiyaç duyulabildiği belirtilmektedir (Gallitelli et al., 2004). Örnek sayısının fazla olduğu durumlar ve sertifikasyon amaçlı testlerde Dot blotting tekniğinin kullanımının daha uygun olacağı düşünülmektedir (Saldarelli et al., 1996; Repetto et al., 1997).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Çalışmada Kullanılan Materyal

3.1.1 Bitki örnekleri

Araştırmada kullanılan bitki materyali, Ege Bölgesi'nde yoğun olarak enginar yetiştiriciliği yapılan İzmir, Aydın ve Muğla illerinin üretim açısından önem taşıyan ilçelerinden alınmıştır.

Arazi büyüklükleri, ulaşım, zaman ve bütçe koşulları dikkate alınarak yapılan planlamaya göre, bu illerdeki yetiştirme alanlarındaki simptom taşıyan ve taşımayan enginar bitkilerinden yeterli sayıda bitki örnekleri toplanmış ve bu örnekler kullanılıncaya kadar laboratuvarında -20°C'de saklanmıştır. Bitki örneklerinin alındığı yer, görülen simptomlar gibi diğer bazı özellikler de kayıt edilmiş ve fotoğraflanmıştır. Çalışmada kullanılan örneklerin alındığı iller ve örnek alınan arazilerin büyüklükleri aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.1, 3.2, 3.3).

Çizelge 3.1 İzmir İlinden Alınan Bitki Örnekleri, Arazi Büyüklükleri ve Örnek Alınma Tarihleri

Örnek No	Alındığı Bölge	Arazi Büyüklüğü (da)	Alındığı Tarih
İ-1	Bayındır	3	26.04.2011
İ-2	Urla/Nohutalan	2	26.04.2011
İ-3	Urla/Nohutalan	1	26.04.2011
İ-4	Urla/Nohutalan	1	26.04.2011
İ-5	Urla/Nohutalan	1	26.04.2011
İ-6	Urla/Nohutalan	1	26.04.2011
İ-7	Urla/Nohutalan	1	26.04.2011
İ-8	Çeşme/Ildırı	3	26.04.2011
İ-9	Çeşme/Ildırı	2	26.04.2011
İ-10	Çeşme/Ildırı	3	26.04.2011
İ-11	Çeşme/Ildırı	2	26.04.2011
İ-12	Çeşme/Ildırı	2	26.04.2011
İ-13	Çeşme/Ildırı	2	26.04.2011
İ-14	Çeşme/Ildırı	3	26.04.2011
İ-15	Çeşme/Ildırı	3	26.04.2011
İ-16	Çeşme/Ildırı	3	26.04.2011
İ-17	Çeşme/Ildırı	3	26.04.2011
İ-18	Çeşme/Ildırı	2	26.04.2011
İ-19	Çeşme/Ildırı	2	26.04.2011

Çizelge 3.1 İzmir İlinden Alınan Bitki Örnekleri, Arazi Büyüklükleri ve Örnek Alınma Tarihleri (devamı)

Örnek No	Alındığı Bölge	Arazi Büyüklüğü (da)	Alındığı Tarih
İ-20	Çeşme/Ildırı	3	26.04.2011
İ-21	Çeşme/Ildırı	3	26.04.2011
İ-22	Çeşme/Ildırı	3	26.04.2011
İ-23	Çeşme/Ildırı	3	26.04.2011
İ-24	Çeşme/Ildırı	3	26.04.2011
İ-25	Çeşme/Ildırı	2	26.04.2011
İ-26	Çeşme/Ildırı	3	26.04.2011
İ-27	Çeşme/Banyöz	2	26.04.2011
İ-28	Çeşme/Banyöz	3	26.04.2011
İ-29	Çeşme/Banyöz	2	26.04.2011
İ-30	Çeşme/Banyöz	3	26.04.2011
İ-31	Urla	3	26.04.2011
İ-32	Urla	2	26.04.2011
İ-33	Urla	3	26.04.2011
İ-34	Urla	3	26.04.2011
İ-35	Urla	2	26.04.2011
İ-36	Urla/Balıklıova	2	12.01.2012
İ-37	Urla/Balıklıova	2	12.01.2012
İ-38	Urla/Balıklıova	3	12.01.2012
İ-39	Urla/Balıklıova	3	12.01.2012
İ-40	Urla/Balıklıova	1.5	12.01.2012
İ-41	Urla/Balıklıova	2	12.01.2012
İ-42	Balıklıova-Ildırı arası	3	12.01.2012
İ-43	Balıklıova-Ildırı arası	2	12.01.2012
İ-44	Balıklıova-Ildırı arası	2	12.01.2012
İ-45	Balıklıova-Ildırı arası	2.5	12.01.2012
İ-46	Balıklıova-Ildırı arası	2	12.01.2012
İ-47	Çeşme/Ildırı	2	12.01.2012
İ-48	Çeşme/Ildırı	3	12.01.2012
İ-49	Çeşme/Ildırı	3	12.01.2012
İ-50	Çeşme/Ildırı	2	12.01.2012
İ-51	Çeşme/Ildırı	2.5	12.01.2012
İ-52	Urla	2	12.01.2012
İ-53	Urla	2	12.01.2012
İ-54	Urla	3	12.01.2012
İ-55	Urla	2	12.01.2012
İ-56	Urla	1.5	12.01.2012
İ-57	Urla	2.5	12.01.2012
İ-58	Urla	2	12.01.2012
İ-59	Urla	2	12.01.2012
İ-60	Urla	2.5	12.01.2012
İ-61	Urla	1.5	12.01.2012
İ-62	Urla	1.5	12.01.2012
İ-63	Urla	2	12.01.2012
İ-64	İzmir	2	12.01.2012
Toplam		147 da	

Çizelge 3.2 Aydın İlinden Alınan Bitki Örnekleri, Arazi Büyüklükleri ve Örnek Alınma Tarihleri

Örnek No	Alındığı Bölge	Arazi Büyüklüğü (da)	Alındığı Tarih
A-1	Merkez	3	03.04.2012
A-2	Merkez	3	03.04.2012
A-3	Merkez	5	03.04.2012
A-4	Merkez	4	03.04.2012
A-5	Merkez	6	03.04.2012
A-6	Aydın Çıkışı Menderes	6	03.04.2012
A-7	Aydın Çıkışı Menderes	6	03.04.2012
A-8	Aydın Çıkışı Menderes	5	03.04.2012
A-9	Göhlisar	4	03.04.2012
A-10	Göhlisar	4	03.04.2012
A-11	Göhlisar	3	03.04.2012
A-12	Göhlisar	3	03.04.2012
A-13	Göhlisar	3	03.04.2012
A-14	Göhlisar	4	03.04.2012
A-15	Göhlisar	4	03.04.2012
A-16	Göhlisar	4	03.04.2012
A-17	Göhlisar	3	03.04.2012
A-18	Göhlisar	4	03.04.2012
A-19	Göhlisar	5	03.04.2012
A-20	Göhlisar	4	03.04.2012
A-21	Göhlisar	3	03.04.2012
A-22	Göhlisar	3	03.04.2012
A-23	Göhlisar	2	03.04.2012
A-24	Göhlisar	3	03.04.2012
A-25	Göhlisar	3	03.04.2012
A-26	Göhlisar	4	03.04.2012
A-27	Göhlisar	4	03.04.2012
A-28	Göhlisar	4	03.04.2012
A-29	Göhlisar	3	03.04.2012
A-30	Göhlisar	2	03.04.2012
A-31	Göhlisar	4	03.04.2012
A-32	Göhlisar	4	03.04.2012
A-33	Göhlisar	5	03.04.2012
A-34	Göhlisar	3	03.04.2012
A-35	Göhlisar	4	03.04.2012
A-36	Göhlisar	5	03.04.2012
A-37	Göhlisar	4	03.04.2012
A-38	Göhlisar	3	03.04.2012
A-39	Göhlisar	5	03.04.2012
A-40	Göhlisar	2	03.04.2012
Toplam		153 da	

Çizelge 3.3 Muğla İlinden Alınan Bitki Örnekleri, Arazi Büyüklükleri ve Örnek Alınma Tarihleri

Örnek No	Arazi Büyüklüğü (da)	Alındığı Tarih
M-1	2	14.02.2012
M-2	1	14.02.2012
M-3	2	14.02.2012
M-4	2	14.02.2012
M-5	1	14.02.2012
M-6	1.5	14.02.2012
M-7	2	14.02.2012
M-8	2	14.02.2012
M-9	3	14.02.2012
M-10	2	14.02.2012
M-11	1	14.02.2012
M-12	2	14.02.2012
M-13	2	14.02.2012
M-14	1,5	14.02.2012
M-15	2	14.02.2012
M-16	1	14.02.2012
Toplam	28 da	

Yukarıdaki çizelgelerde görüldüğü üzere İzmir iline bağlı üç ilçedeki (Bayındır, Çeşme ve Urla) yaklaşık 147 da alandan 64 örnek, Aydın iline bağlı üç ilçedeki (Merkez, Menderes ve Gölhisar) toplam 153 da'lık alandan 40 örnek ve Muğla'daki 28 da alandan 16 örnek alınmıştır (Çizelge 3.1, 3.2, 3.3, 3.4).

Çizelge 3.4 Alınan Toplam Örnek Sayısı

İl	Alınan Örnek Sayısı
Aydın	40
İzmir	64
Muğla	16
Toplam	120

3.1.2 Test bitkileri

Virüslerin tanılanmasına yardımcı olmak amacıyla mekanik inokulasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan test bitkileri Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji iklim odası ve serasında yetiştirilmiştir. Bu amaçla önce virüslerin tanılanmasında kullanılacak olan test bitki setleri oluşturulmuştur. Bu bitkilerin bilimsel isimleri, familyaları, kullanılacakları

dönem Çizelge 3.5.'te verilmiştir (Noordam, 1973; Gümüş, 1998; Descriptions of Plant Viruses, 2012).

Çizelge 3.5 Biyolojik Testlerde Kullanılan Test Bitkileri Ve Kullanıldıkları Dönemler

Bilimsel Adı	Türkçe Adı	Familiya	Dönem
<i>Chenopodium quinoa</i> Quin.	Akkaz ayağı	<i>Chenopodiaceae</i>	6 yapraklı evre
<i>C. amaranticolor</i> Coste & Reyn.	Kaz ayağı	<i>Chenopodiaceae</i>	6 yapraklı evre
<i>Cucumis sativus</i> L.	Hıyar	<i>Cucurbitaceae</i>	2 kotiledonlu evre
<i>Cucurbita moschata</i> Poir	Kabak	<i>Cucurbitaceae</i>	2 kotiledonlu evre
<i>Datura stramonium</i> L.	Şeytan elması	<i>Solanaceae</i>	2 yapraklı evre
<i>Gomphrena globosa</i> L.	Hanım düğmesi	<i>Amaranthaceae</i>	4-8 yapraklı evre
<i>Lycopersicon esculentum</i> L.	Domates	<i>Solanaceae</i>	2-4 yapraklı evre
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun	Tütün	<i>Solanaceae</i>	4 yapraklı evre
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun NN	Tütün	<i>Solanaceae</i>	4 yapraklı evre
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. White Burley	Tütün	<i>Solanaceae</i>	4 yapraklı evre
<i>Nicotiana tabacum</i> cvs. Xanthi	Tütün	<i>Solanaceae</i>	4 yapraklı evre
<i>N. benthamiana</i>	Tütün	<i>Solanaceae</i>	4 yapraklı evre
<i>N. clevelandii</i>	Tütün	<i>Solanaceae</i>	4 yapraklı evre
<i>N. glutinosa</i>	Tütün	<i>Solanaceae</i>	4 yapraklı evre
<i>N. rustica</i>	Tütün	<i>Solanaceae</i>	4 yapraklı evre
<i>N. sylvestris</i>	Tütün	<i>Solanaceae</i>	4 yapraklı evre
<i>Petunia hybrida</i>	Petunya	<i>Solanaceae</i>	4 yapraklı evre
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fasulye	<i>Fabaceae</i>	2 kotiledonlu evre

3.1.3 Serolojik testlerde kullanılan materyal

Çalışmada ticari kitleri var olan virüsler için uygulanacak DAS-ELISA yönteminde çeşitli firmalardan temin edilen tanı kitleri ve reagentleri (antiserumlar, pozitif ve negatif örnekler ile kaplama, ekstraksiyon, konjugat, substrat ve yıkama çözeltileri), ELISA tabakları, otomatik pipetler, pipet uçları ve ELISA reader kullanılmıştır.

DAS-ELISA testlerinde Bioreba AG, Agdia Inc. ve Loewe Biochemica GmbH firmalarına ait ticari tanı kitleri, solüsyon ve çözeltiler ile Nunc F96 Maxisorp microplateler kullanılmıştır.

Test sonuçlarının değerlendirilmesinde ise Titertek Multiskan Plus MK II marka ELISA okuyucusu kullanılmış ve bu cihazda 405 nm dalga boyunda okumalar gerçekleştirilmiştir.

3.1.4 RT-PCR testlerinde kullanılan materyal

3.1.4.1 Total nükleik asit ekstraksiyonu aşamasında kullanılan materyal

Çalışmada RNA ekstraksiyonu iki farklı yöntemle yapılmıştır. Bu amaçla kullanılan kimyasallar Ek 1’de verilmiştir.

Ayrıca ekstraksiyon aşamasında, steril havan ve havan elleri, eppendorf tüpleri, ayarlanabilir mikropipetler ve pipet uçları, Sigma D37520 marka santrifüj, ETG MBT 250 marka blok ısıtıcı ve -30°C’ye kadar soğutma kapasitesine sahip derin dondurucular kullanılmıştır.

3.1.4.2 cDNA sentezi aşamasında kullanılan materyal

Materyal olarak daha önce hazırlanmış olan TNA örnekleri, Fermentas marka cDNA sentez kiti, Heidolph Unimax 2010 çalkalayıcı, ETG MBT 250 marka blok ısıtıcı ve Nüve ES500 inkübatör kullanılmıştır.

3.1.4.3 RT-PCR testlerinde kullanılan materyal

RT-PCR testlerinde, Fermentas marka solüsyonlar ve çözeltiler, eppendorf marka PCR tüpleri, PE Applied Biosystems Gene Amp PCR Systems 9700 marka thermocycler ve viral etmenlere spesifik primerler (Çizelge 3.7) materyal olarak kullanılmıştır.

3.1.4.4 Coğaltılmış PCR ürünlerinin analizinde kullanılan materyal

Consort E815 marka güç kaynağı, Owl A2 ve Owl B1 marka jel elektroforez düzeneği, örneklerin ve jellerin hazırlanmasında ve boyanmasında kullanılan kimyasallar, çözeltiler, DNA ladder ve 6x loading buffer materyal olarak kullanılmış, tüm jel fotoğrafları DNR Bio-Imaging Systems Minibis Pro marka jel görüntüleme cihazında çekilmiştir.

3.1.5 Çalışmada kullanılan diğer materyal

Çalışmanın çeşitli aşamalarında ayrıca, Binder inkübatör, Bioreba AG örnek ezme makinası, Elga saf su makinası, Elga ultra saf su makinası, Heidolph tüp karıştırıcı, Heidolph Unimax 2010 çalkalayıcı, HI 9321 pH metre, Memmert marka etüv, Nüve ES 500 soğutmalı inkubatör, Sartorius hassas terazi, Scotsman buz makinası, Sigma mikrosantrifuj, Sigma marka santrifuj, Systec 2540 otoklav, manyetik karıştırıcı ve mikrodalga fırın kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bitkilerdeki belirtilerin incelenmesi

Çalışmada kullanılan bitki örnekleri hem arazide örnek alınışı sırasında hem de laboratuvarda görsel olarak incelenmiştir. Asimetri oluşumu, damar bantlaşması, damarlarda renk açılması, gelişme geriliği, klorotik leke, meşe yapraklılık, mozaik, pürüzlenme, sararma, şekil bozukluğu gibi belirtiler gözlenen bitkiler ve belirsiz bitkiler daha sonra yapılan çalışmalarda kullanılmıştır.

3.2.2 Biyolojik testler

3.2.2.1 Test bitkilerinin yetiştirilmesi

Biyolojik testlerde kullanılacak test bitkileri 4000-6000 lüks ışık şiddeti, 16 saat/gün aydınlanma periyodu ve 20-24°C sıcaklık değerine sahip olan iklim odasında yetiştirilmiştir (Nogay, 1983; Matthews, 1991). Test bitkilerinin tohumları, 1:1:1 toprak, gübre ve kum karışımı içeren plastik ya da kil küvetlere ekilmiştir. Yeni çıkan bitkiler, görülebilecek hastalık ve zararlılara karşı insektisit ve fungusitlerle ilaçlanmış ve gerekli önlemler alınmıştır (Şekil 3.1). Uygun gelişme dönemindeki fideler 10 cm çaplı küçük boy saksılara şaşırtılmış ve daha sonra inokule edilmiştir.



Şekil 3.1 İklim Odasında Yetiştirilen Çeşitli Test Bitkilerinin Çeşitli Dönemlerine Ait Görünümler

3.2.2.2 Test bitkilerinin mekanik olarak inokulasyonu

Bitki materyalinden alınan 1-5 g ağırlıktaki örneğe %0.1 sodyum sülfite içeren 0,01 M fosfat tamponu (pH=7.0) kullanılarak (1/5; g/v) hazırlanan ekstraktlar belirlenmiş test bitkilerine mekanik inokulasyon yöntemi kullanılarak inokule edilmiştir. Penetrasyonun kolaylaşması için ekstraktlara celite ilave edilmiş ve cam spatül ile test bitkilerine inokulasyonlar yapılmıştır (Şekil 3.2). İnokulasyonu takip eden 1-2 dakika sonunda test bitkilerinin yaprakları çeşme suyuyla yıkanmıştır. Belirti oluşumları her gün izlenmiş ve oluşan belirti tipi fotoğraflanarak kaydedilmiştir (Yorgancı, 1975; Nogay, 1983; Matthews, 1991).



Şekil 3.2 Test Bitkilerine Mekanik İnokulasyon Uygulaması

3.2.3 Serolojik test (DAS-ELISA) yöntemi

Örneklerdeki viral etmenlerin varlığının tespiti amacıyla ticari ELISA kiti bulunan etmenler için DAS-ELISA testi uygulanmıştır. Aydın'dan 40, İzmir'den 64 ve Muğla'dan 16 olmak üzere toplam 120 örneğe Çizelge 3.6'da görülen viral etmenler için DAS-ELISA uygulanmıştır.

Çizelge 3.6 Serolojik Testlerin Uygulandığı Viral Etmenler

Viral Etmenler
BBWV
CMV
PVX
RpRSV-ch
RpRSV-g
TBRV
TMV
TSWV
TuMV

DAS-ELISA testleri Clark ve Adams (1977) ve Erkan vd. (1995)'nin belirttiği şekilde aşağıdaki aşamalarla gerçekleştirilmiştir:

1. ELISA tabaklarındaki her kuyucuğa 1:1000 (Bioreba AG), 1:100 (Loewe Biochemica GmbH) ve 1:200 (Agdia Inc.) oranında kaplama tamponunda seyreltilmiş IgG'den 200 µl eklenerek 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir.
2. ELISA tabakları yıkama tamponu ile 4 kez yıkanmış ve her yıkamada, kuyucuklar yıkama tamponu ile doluyken 3 dakika beklenmiştir.
3. Ekstraksiyon tamponu ile ekstraktları çıkarılan bitki örnekleri, pozitif ve negatif kontroller her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde eklenmiş ve 4°C'de bir gece inkübe edilmiştir.
4. 2. maddede anlatılan şekilde yıkama işlemi tekrarlanmıştır.
5. Konjugat tamponu içerisinde 1:1000 (Bioreba AG), 1:100 (Loewe Biochemica GmbH) ve 1:200 (Agdia Inc.) oranında seyreltilen

konjuge edilmiş IgG, her bir kuyucuğa 200 µl eklenerek 37°C’de 4 saat inkübe edilmiştir.

6. 2. maddede anlatılan şekilde yıkama işlemi tekrarlanmıştır.
7. Substrat tamponuna 1mg/ml olacak şekilde eklenen para nitro fenil fosfat (pNPP) her bir kuyucuğa 200 µl konularak oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

Sonuçlar Erkan vd. (1995)’ye göre iki şekilde değerlendirilmiştir:

- Sarı renk oluşumu gözlenip, kaydedilmiş,
- ELISA reader ile tabaklar 405 nm boyunda spektrofotometrik olarak okunup, sağlıklı kontrolün 2 katı absorbans değerine sahip olan örnekler enfekteli olarak kabul edilmiştir.

3.2.4 Moleküler yöntem (RT-PCR)

3.2.4.1 Total nükleik asit (TNA) ekstraksiyonu

Çalışmanın bu aşamasında, 2 yöntem kullanılarak total nükleik asit ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Kullanılan ilk yöntem Foissac et al. (2001)’ın “silica capture” yöntemidir. Diğer yöntem ise Fermentas firmasına ait “GeneJet™ Plant RNA Purification Mini Kit”dir. Alınan her örneğin iki yöntemle de TNA’ları çıkarılmış ve yöntemlerin etkinliği de araştırılmıştır.

İlk yöntem olan “silica capture” için araziden alınıp kullanılıncaya kadar -20°C’de saklanan bitki örneklerinden yaklaşık 100 mg alınarak %1 oranında mercapto-ethanol içeren “grinding buffer” ile steril örnek poşetleri içerisinde ekstrakte edilmiştir. Homojenizasyondan sonra eppendorf tüplerine alınan bu ekstraktlar 70°C’de 10 dakika inkübe edildikten sonra 5 dakika buzda bekletilmiştir. 14.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilen ekstraktların üst fazından 300 µl alınarak steril eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Tüplere 150 µl ethanol, 300 µl 6M NaI, 25 µl silica süspansiyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 6.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilen tüplerin üst fazı atılmış, tüpün dip kısmındaki silica partiküllerinin

yıkaması için 500 µl yıkama tampon çözeltisi eklenmiştir. Yıkama işlemi iki kez tekrarlanmış, yıkamadan sonra silica partikülleri içeren tüplere 150 µl RNase'dan arı steril su eklenip 70°C'de 4 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilen tüplerin üst fazından 145 µl alınarak steril tüplere aktarılmış ve elde edilen TNA'lar kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır (Foissac et al., 2001).

TNA ekstraksiyonu için kullanılan diğer yöntem ise üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). Kit içeriği Ek 1'de verilmiştir. Uygulanan protokol ise şu şekildedir. 100 mg donmuş bitki örneği steril plastik poşetlerde ezilmiş ve üzerine 500 µl "Plant RNA Lysis Solution" ilave edilmiştir. Elde edilen ekstrakt 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve tüpler 56°C'de 3 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen üst fazın yaklaşık 450-500 µl'si steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Her tüpe 250 µl %96'lık ethanol eklenmiş ve pipetaj ile karıştırılmıştır. Ardından hazırlanan karışım "pürifikasyon kolonu içeren koleksiyon tüpleri"ne aktarılmıştır. 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüjden sonra, devir daim solüsyonu atılmış ve aynı koleksiyon tüpüne 700 µl "Washing Buffer 1-WB1" solüsyonu eklenmiştir. Her tüp 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş, devirdaim solüsyonu ve koleksiyon tüpü atılarak pürifikasyon kolonu yeni bir koleksiyon tüpüne aktarılmıştır. Her tüpe 500 µl "Washing Buffer 2-WB2" eklenmiş ve 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş, devirdaim solüsyonu atılmıştır. Tekrar 500 µl WB2 eklenmiş ve 11.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Devirdaim solüsyonu atılmış, ardından pürifikasyon kolonu 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpü ve devir daim solüsyonu atılmış, pürifikasyon kolonu RNase'dan arı 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne koyulmuştur. Pürifikasyon kolonuna 50 µl RNase'dan arı steril saf su eklenmiş ve kolon 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş, elde edilen sıvı faz kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.3 GeneJet™ Plant RNA Purification Mini Kit Ekstraksiyon Aşamalarından Bazıları

3.2.4.2 Komplementer DNA (cDNA) sentezi

TNA ekstraksiyonları yapılmış örneklerle Fermentas firmasından temin edilen cDNA sentez kitleri kullanılarak cDNA elde edilmiştir. Bu amaçla firmanın önerdiği prosedür şu şekilde uygulanmıştır:

Eppendorf tüplerinin içerisine 0,1–5 µg total RNA, 1 µl random hexamer primer konulmuş ve DEPC su ile 12 µl'ye tamamlanmıştır. 70°C'de 5 dakika inkübasyondan sonra tüpler buza koyulmuş ve içlerine sırayla, 4 µl 5X reaction buffer, 1 µl Ribolock Ribonuclease inhibitor, 2 µl 10mM dNTP mix eklenmiştir. Her tüpe uygulanan 3-5 saniye kısa süreli santrifüjün ardından 25°C'de 5 dakika inkübasyon uygulanmış ve tüplerin içine 1 µl M-MuLV reverse transcriptase eklenerek toplam 20 µl hacme ulaşılmıştır. Karışıma daha sonra 25°C'de 10 dakika, 42°C'de 60 dakika ve 70 °C'de 10 dakika inkübasyon uygulanarak cDNA sentez aşaması tamamlanmıştır.

3.2.4.3 Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

RT-PCR yöntemi kullanılan kimyasalların temin edildiği Fermentas firmasının önerdiği prosedüre göre 50 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Testlerde kullanılan etmene özgü primerleri baz uzunlukları ve döngüler Çizelge 3.7'de verilmiştir.

RT-PCR için steril PCR tüplerine 25 µl 2x PCR master mix, 1 µl primer 1, 1 µl primer 2, 2 µl cDNA ve 21 µl nuclease free su eklenmiştir. Ardından tüpler PCR cihazına yerleştirilerek test edilecek virüs için spesifik olan program uygulanmıştır (Candresse et al., 1995). Kontaminasyon olasılığını saptamak amacıyla da nükleik asit eklemekten sadece karışımın yer aldığı bir tüp (kontrol) de PCR programında çoğaltma işlemine alınmıştır.

Çizelge 3.7 RT-PCR Testlerinde Kullanılan Primerler, Baz Uzunlukları Ve Sıcaklık Döngüleri

Hedef Virüs / Primer	Primer Dizilimi	Baz Uzunluğu	PCR Döngüleri
AILV-AI3 AILV-AI4	GGT CTG GGG TGC CCG TGG CG ATT CAC TAG TCC CTA TTT AG (Grieco and Gallitelli, 1999)	760 bp	1 X 94°C 2 dk 35 X (94°C 1 dk / 52°C 1 dk / 72°C 1 dk) 1 X 72°C 10 dk
AMCV-AM3 AMCV-AM2	CTC GGA CTT TCG TCA GGA AGT TTG AA ATG GCA ATG GTA AAG AGA AA (Grieco and Gallitelli, 1999)	1350bp	1 X 94°C 2 dk 35 X (94°C 1 dk / 52°C 1 dk / 72°C 1 dk) 1 X 72°C 10 dk
ArLV5BL ArLV3BL	GAT CTA GCG ATA CAC ATG CAC AAC C CGC TCA AGC TCT CGA ACT AAC TGA AC (Lumia et al., 2003)	300 bp	1 X (95°C 3 dk) 35 X (94°C 1 dk / 58°C 1 dk / 72°C 1 dk) 1 X 72°C 7 dk
AYRSV up11 AYRSVd12	GAA CGC AAC ATC GGA GA GCT CCA CAA AGT GAC TTG (Maliogka et al., 2006)	530 bp	1 X 94°C 2 dk 40 X (95°C 30 sn / 57°C 30 sn / 72°C 20 sn) 1 X 72°C 4 dk
CMV- F CMV- R	GTA GAC ATC TGT GAC GCG A GCG CGA AAC AAG CTT CTT ATC (De Blas et al., 1994; Samurtienè and Navalinskienè, 2008)	540 bp	1 X 94°C 4 dk 40 X (94°C 1 dk / 52°C 2 dk / 72°C 2 dk) 1 X 72°C 10 dk
TBRV-1 TBRV-2	ATG GGA GAA GTG CTG G AAT CTT TTT GTG TCC AAC A (Le Gall et al., 1995)	333 bp	1 X (92°C 1 dk.) 35 X (92°C 1 dk / 42 °C 1dk / 72°C 2 dk.) 1 X (72°C 10 dk.)
TMV-1 TMV-2	GAC CTG ACA AAAATG GAG AAG ATC GAA AGCGGA CAGAAA CCC GCT (Silva et al., 2008)	422 bp	1 X (94°C 2 dk.) 35 X (94°C 30 sn / 62 °C 45 sn / 72°C 60 sn.) 1 X (72°C 5 dk.)
TSWV-F TSWV-R	AAT TGC CTT GCA ACC AAT TC ATC AGT CGA AAT GGT CGG CA (Mumford et al., 1994)	276 bp	1 X (94°C 5 dk.) 30 X (94°C 60sn. / 55°C 60 sn. / 72°C 60 sn) 1 X (72°C 10 dk.)

3.2.4.4 Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel hazırlanmasında ve koşum sırasında elektroforez tanklarında kullanılan 1X TAE tamponu, stok 50X TAE'den seyreltilerek kullanılmıştır. Stok 50X TAE tamponu hazırlanmasında kullanılan kimyasallar Ek 1'de verilmiştir. Hazırlanan stok çözeltiden 20 ml alınarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmış ve 1X TAE hazırlanmıştır.

Jel hazırlanma aşaması, 1.5 g agaroz, 100 ml 1X TAE içerisine eklenmiş ve mikrodalga fırında 3.5 dakika tutulması şeklinde yürütölmüştür.

Elektroforez koşumu yatay düzenekte 100 V'da 60 dakika süreyle, 1X TAE çözeltisi içinde uygulanmıştır. Jele yüklenmeden örnekler 6X loading dye ile karıştırılmış (2 µl loading dye-10 µl örnek) ve ilk kuyucuğa 12 µl DNA ladder yüklenmiştir.

3.2.4.5 Jel görüntöleme cihazında sonuçların değerlendirilmesi

Ethidium bromide ile boyanan jel, DNR Bio-Imaging marka Jel Dokümantasyon ve Analiz Sistemi ile fotoğrafı çekilerek kayıt edilmiştir.

3.2.4.6 Dizi analizleri ve filogenetik sınıflandırma çalışmaları

DNA örneklerindeki baz dizilerinin sırasını ortaya çıkarmak için kullanılan genetik şifreleme yöntemine DNA dizi analizi denir. Günümüzde genel olarak DNA dizi analizlerinde birbirinden farklı iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan ilki kimyasal kırılma yöntemi (Maxam and Gilbert, 1977) diğeri ise zincir sonlama yöntemidir (Sanger et al., 1977).

Bu araştırmada da uygulanan Sanger-Coulson Zincir Sonlama Yöntemi, enzimatik DNA sentezine dayanan, günümüzde DNA dizi analizi için en sık kullanılan yöntemdir. Yöntemde, dizilenecek DNA ipliği, yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılır. Ayrıca, DNA polimeraz, dNTP'lerin yanı sıra deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'ler substrat olarak

kullanılmaktadır. Sentezlenen DNA'ya bir ddNTP bağlanması, 3' ucunda OH bulunmaması nedeniyle sentezi durdurur. Dizi analizi yapılırken, dört ayrı reaksiyon karışımı oluşturulur. Her bir reaksiyon karışımı DNA zinciri, primer, A, T, G ve C ve ayrıca her reaksiyon karışımına zincirin sonlanması için farklı bir ddNTP içerir. Her reaksiyondaki çok az miktarlarda kullanılan modifiye nükleotit yeni zincir sentezini rastgele sonlandırarak bir dizi DNA fragmenti elde edilmesini sağlar. Sonuçta elde edilen DNA fragmentlerine agarose jel'de elektroforez uygulanır ve tespit edilen parçacıklar reaksiyon karışımına eklenen ddNTP'lerin tipine göre okunur (Klug and Cummings, 2000). Günümüzde bu yöntem gelişmiş bir kapiller sisteme uyarlanmıştır. Boya terminasyon işaretleme yöntemi, farklı bazlarda sonlanan DNA dizilerine floresan işaretli boyalar iliştilmesine dayanır. Elektroforez işlemi, örnekler bir kapillerden geçilirken uygulanır. Bu sırada floresan boyalar CCD (Charge-coupled device-Elektromanyetik simge algılayan kamera) ile okunur. Floresan yoğunluğunun ölçülmesi ve yorumlanması sonucu DNA baz dizilimi saptanmış olup, kromotogram şeklinde görüntülenebilir (Fidan, 2010).

Çalışmadaki dizi analizleri İontek firmasından hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir (IONTEK, 2012).

RT-PCR çalışmaları tamamlanan ve elektroforez sonrası beklenen büyüklükte fragmentler gözlenen örnekler dizi analizi için İontek firmasına gönderilmiştir. Elde edilen dizileme sonuçları NCBI BLAST'ta (National Center for Biotechnology Information, 2012) dünya izolatlarıyla kıyaslanmış, benzer izolatların ClustalW2-Multiple Sequence Alignment (European Bioinformatics Institute, 2012) ve MEGA 5.10 (Tamura et al., 2011; Noveriza et al., 2012) programı kullanılarak çoklu dizi hizalamaları gerçekleştirilmiş ve filogenetik ağaçları çizilmiştir.

4. BULGULAR

Araştırma kapsamında özellikle son yıllarda ülkemizde üretimi artan enginarde viral enfeksiyonların Ege Bölgesi'ndeki bulunma durumunun belirlenmesi amacıyla yürütülen arazi çalışmaları sonucunda İzmir, Aydın ve Muğla illerine bağlı üçer ilçeden alınan toplam 120 örnek, arazide ve laboratuvarda görsel olarak incelenmiş ve daha sonra, serolojik ve moleküler testlere tabi tutulmuştur.

4.1 Bitki Örneklerinde Gözlenen Belirtiler

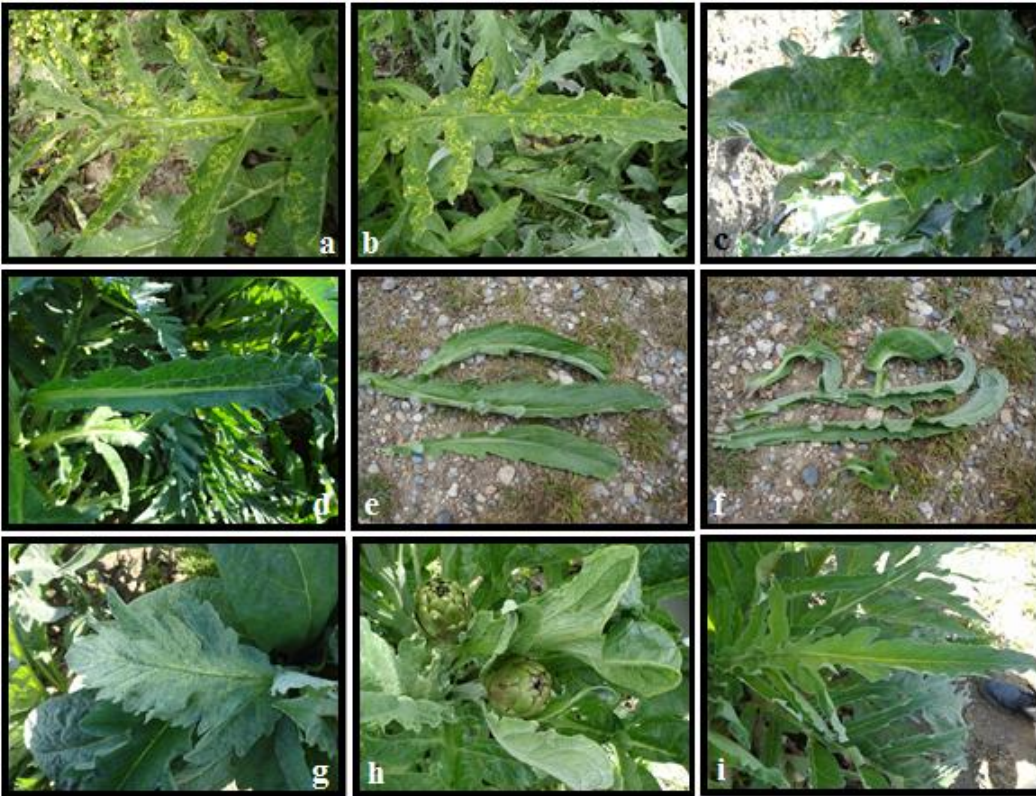
Survey çalışmaları sırasında İzmir, Aydın ve Muğla illeri ve ilçelerinde yoğun olarak enginar yetiştiriciliği yapılan üretim alanlarından 120 adet bitki örneği alınmıştır. Survey çalışmaları sırasında üretim alanları gezilerek viral etmenlerin oluşturduklarına benzer semptomların gözlemlendiği veya gözlenemediği üretim alanları belirlenmiştir. Üretim alanlarındaki her bitki makroskobik olarak incelenmiş ve belirti olan veya belirti bulunmayan bitkilerden örnekler alınmıştır.

Araştırma kapsamında alınan örneklerde arazide ve laboratuvarda yapılan görsel incelemeler sonucunda, bitkilerde genel olarak cüceleşme, gelişme geriliği, baş oluşmaması (Şekil 4.1a), anormal veya küçük baş oluşumu (Şekil 4.1c, d), baş saplarında kısılma (Şekil 4.1f), sararma ve aşırı yaprak oluşumu şeklinde belirtiler bulunduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, yapraklarda mozaik (Şekil 4.2c), kabarcıklı mozaik, beneklenme, sararma, klorotik lekeler, meşe yapraklılık (Şekil 4.2a, b, g), damarlarda kalınlaşma (Şekil 4.2h), yaprak yüzeyinde pürüzlenmeler, kıvrılma/bükülme ve küçülmeler, yaprak ayasında daralmalar (Şekil 4.2d, e, f), asimetri oluşumları ve şekil bozuklukları gibi semptomların olduğu saptanmıştır (Şekil 4.1, 4.2, 4.3). Yapılan bu semptomatolojik incelemeler diğer tanılama yöntemleri için sadece bir ön basamak oluşturmuştur. Diğer yandan, bu gözlemler daha sonra yürütülecek olan tanılama yöntemlerinin seçimi ve sonuçların değerlendirilmesinde göz önünde tutulmuştur.



Şekil 4.1 Arazide Yapılan İncelemelerde Bitkilerde Gözlenen Bazı Belirtiler

- a) Baş Oluşumu Yok b) Cücelik c) Küçük Baş Oluşumu d) Küçük Baş Oluşumu e) Küçük Baş Oluşumu ve Asimetri f) Baş Sapında Kısılma



Şekil 4.2 Arazide Yapılan Makroskobik İncelemelerde Yapraklarda Gözlenen Bazı Belirtiler

- a-b) Meşe Yapraklılık c) Mozaik d-e-f) Yapraklarda Daralmalar, Şekil Bozuklukları g) Meşe Yapraklılık h) Damarlarda Kalınlaşma ve Şekil Bozuklukları i) Damarlarda Renk Açılması ve Sararma



Şekil 4.3 Laboratuvarında Yapılan Makroskobik İncelemelerde Gözlenen Bazı Belirtiler

a-b-c) Mozaik, d) Klorotik Lekeler, e-f) Klorotik Lekeler ve Sararma, g) Meşe Yapraklılık h) Asimetri ve Mozaik ı) Gelişme Geriliği, Cücelik ve Şekil Bozukluğu

Gözlenen bu belirtilerin viral etmenlerden kaynaklanabileceği gibi, diğer patojenler veya etkenler tarafından oluşturulabileceği de bilinmektedir. Alınan örneklerde yürütülen serolojik ve moleküler testlerin sonuçları hiç belirti göstermeyen ya da virüs türüne ait tipik belirtileri gösteren bir kısım örneklerde virüs enfeksiyonlarının görülebildiğini ortaya çıkarmıştır.

Çalışmada kullanılan tüm örneklerde gözlenen belirtiler ve izole edilen viral etmenler ayrıntılı olarak Ek 2’de verilmiştir.

4.2 Serolojik Testlerin Sonuçları

Enginarda virüs enfeksiyonlarının saptanması amacıyla çalışma kapsamında üç ilden alınan örneklere ticari tanı kitleri olan BBWV, CMV, PVX, RpRSV-ch, RpRSV-g, TBRV, TMV, TSWV ve TuMV adlı 9 etmen için DAS-ELISA yöntemi uygulanmıştır. Araştırma kapsamında İzmir ilinden alınan 64 örnek, Aydın ilinden alınan 40 örnek ve Muğla ilinden alınan 16 örneğin tümü serolojik yöntemle test edilmiştir.

İzmir'den alınan 64 örnek, Aydın'dan alınan 40 örnek ve Muğla'dan alınan 16 örnek olmak üzere toplam 120 örneğin her birine uygulanan DAS-ELISA yöntemi ile elde edilen sonuçlar il bazında Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.1 İzmir İlinden Alınan Örneklerde DAS-ELISA Yöntemi İle Saptanan Virüsler

Virüs Adı	Testlenen Toplam Örnek Sayısı	Enfekteli Bulunan Örnek Sayısı	Sağlıklı Bulunan Örnek Sayısı	Bulunma Durumu (%)
BBWV	64	0	64	0
CMV	64	5	59	7.82
PVX	64	0	64	0
RpRSV-ch	64	0	64	0
RpRSV-g	64	0	64	0
TBRV	64	0	64	0
TMV	64	0	64	0
TSWV	64	0	64	0
TuMV	64	0	64	0
Toplam	64	5	59	7.82

Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere, İzmir ili ve ilçelerinden alınan 64 örneğin DAS-ELISA yöntemi ile testlenmesi sonucunda, 5 örnekte CMV enfeksiyonunun olduğu tespit edilmiştir. İzmir ilinde CMV enfeksiyonunun bulunma durumu %7.82 olarak belirlenmiştir. Yürütülen testler sonucunda, örneklerde BBWV, PVX, RpRSV-ch, RpRSV-g, TBRV, TMV, TSWV ve TuMV enfeksiyonlarının bulunmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.2 Aydın İlinden Alınan Örneklerin Kullanıldığı DAS-ELISA Yönteminin Sonuçları

Virüs Adı	Testlenen Toplam Örnek Sayısı	Enfekteli Bulunan Örnek Sayısı	Sağlıklı Bulunan Örnek Sayısı	Bulunma Durumu (%)
BBWV	40	0	40	0
CMV	40	0	40	0
PVX	40	0	40	0
RpRSV-ch	40	0	40	0
RpRSV-g	40	0	40	0
TBRV	40	0	40	0
TMV	40	0	40	0
TSWV	40	0	40	0
TuMV	40	0	40	0
Toplam	40	0	40	0

Aydın ili ve ilçelerinden alınan 40 örneğe yukarıda belirtilen etmenlerin varlığı yönünden uygulanan DAS-ELISA yöntemi sonuçları, bu ilden toplanan örneklerde virüs enfeksiyonu olmadığını göstermiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.3 Muğla İlinden Alınan Örneklerde Ticari Kitleri Varolan Etmenlere Karşı Yürütülen DAS-ELISA Testi Sonuçları

Virüs Adı	Testlenen Toplam Örnek Sayısı	Enfekteli Bulunan Örnek Sayısı	Sağlıklı Bulunan Örnek Sayısı	Bulunma Durumu (%)
BBWV	16	0	16	0
CMV	16	0	16	0
PVX	16	0	16	0
RpRSV-ch	16	0	16	0
RpRSV-g	16	0	16	0
TBRV	16	0	16	0
TMV	16	0	16	0
TSWV	16	0	16	0
TuMV	16	0	16	0
Toplam	16	0	16	0

Çizelge 4.3'te belirtildiği üzere Muğla ili ve ilçelerinden alınan 16 örnekte DAS-ELISA yöntemi sonuçlarına göre, viral enfeksiyon olmadığı belirlenmiştir.

Tüm veriler dikkate alınarak yapılan genel değerlendirme sonucunda, 2011 ve 2012 yılları arasında belirtilen üç ilden alınan 120 örnekteki virüs enfeksiyonu bulunma oranı DAS-ELISA yöntemi ile % 4.17 olarak bulunmuştur. Aydın ve

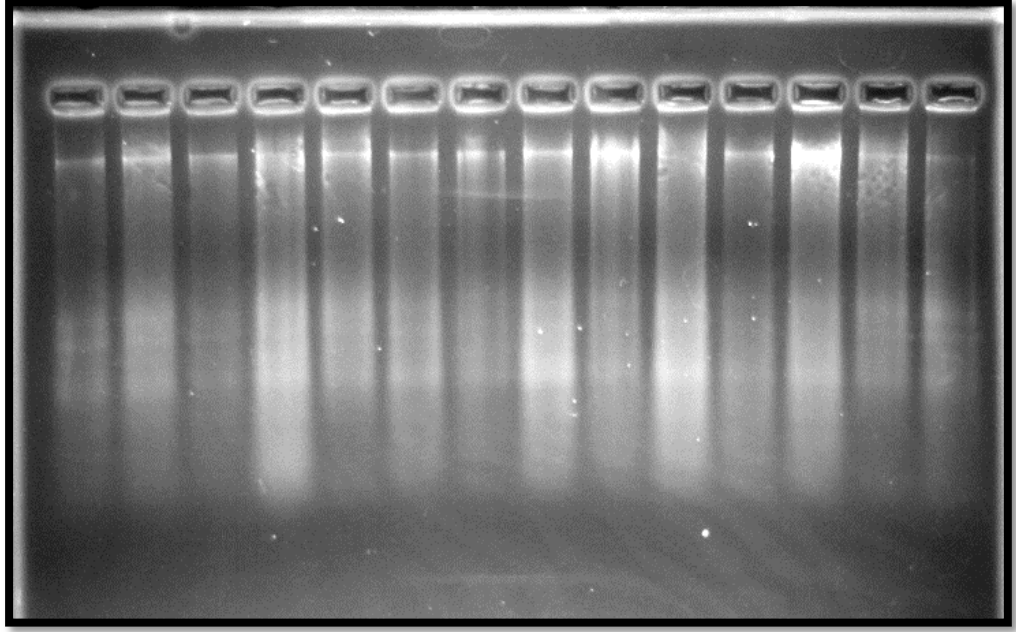
Muğla illerinden toplanan örneklerde viral enfeksiyon tespit edilmezken, İzmir ilinden alınan 64 örnekte % 7.82 oranında virüs enfeksiyonu olduğu belirlenmiştir. Ticari tanı kiti var olan 9 viral etmenin enfeksiyonlarının saptanması amacıyla yürütülen DAS-ELISA testi sonuçları, İzmir ilinden toplanan örneklerde yalnızca CMV enfeksiyonunun bulunduğunu göstermiştir.

4.3 Moleküler Testlerin Sonuçları

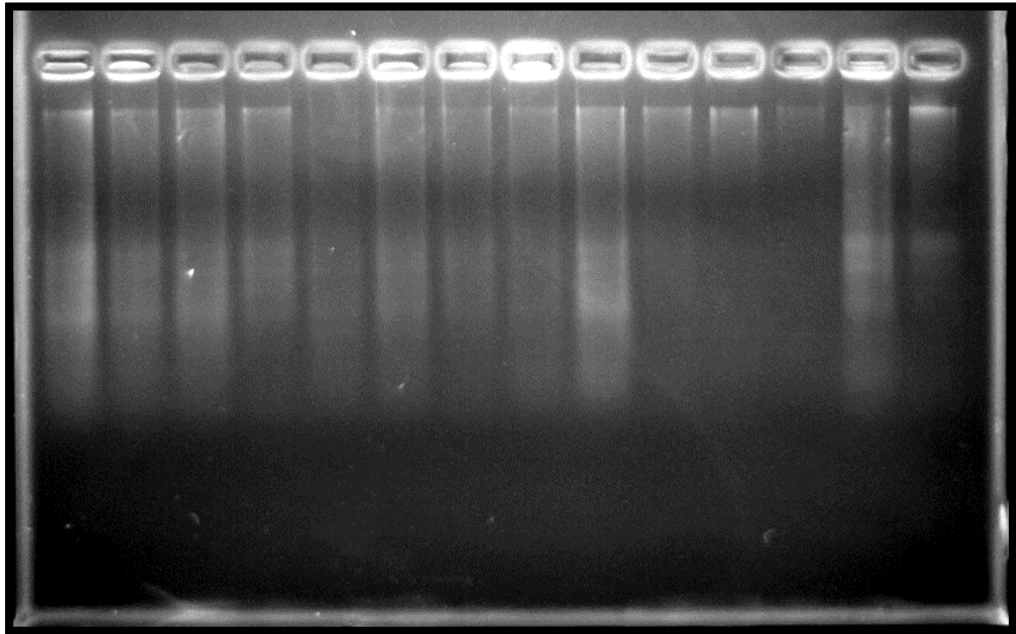
4.3.1 RT-PCR yönteminin sonuçları

Enginar bitkilerinde enfeksiyon oluşturan virüslerin çoğu için ticari ELISA tanı kiti bulunmadığından, araziden alınan 120 örnek Akdeniz havzası ve yurdumuza komşu ülkelerde yapılan araştırmalarda sıklıkla saptanan 8 etmene karşı (Gallitelli et al., 2004) spesifik primerler kullanılarak RT-PCR yöntemi ile testlenmiştir. Bu yöntemle testlenen viral etmenler arasında AILV, AMCV, ArLV, AYRSV, CMV, TBRV, TMV ve TSWV yer almıştır.

Çalışma sırasında farklı iki tip TNA ekstraksiyon yöntemi kullanılmış olup, her örneğin TNA'sı iki yöntemle de izole edilmiş ve ayrı ayrı PCR çalışmaları yürütülmüştür. Her iki yöntemin etkinliklerinin birbirine paralellik gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.4 ve 4.5).



Şekil 4.4 “GeneJet™ Plant RNA Purification Mini Kit” Yöntemiyle Elde Edilen Total Nükleik Asit Görüntüsü



Şekil 4.5 “Silica capture” Yöntemiyle Elde Edilen Total Nükleik Asit Görüntüsü

AILV, AMCV, ArLV, AYRSV, CMV, TBRV, TMV ve TSWV adlı etmenlerin varlığının belirlenmesi amacıyla İzmir, Aydın, ve Muğla illerinden ve ilçelerinden alınan örneklerle yürütülen RT-PCR çalışmaları sonucunda, sırasıyla 760 bp, 1350 bp, 300 bp, 530 bp, 540 bp, 333 bp, 422 bp ve 276 bp'de beklenen bant oluşumları aranmış ve bant oluşumu gösteren örneklerin pozitif olduğu sonucuna varılmıştır. RT-PCR çalışmaları sonucunda pozitif bulunan örnek sayısı, illere göre bulunma durumları ve karışık enfeksiyonlar Çizelge 4.4-4.7 ve Çizelge 5.1'de verilmiştir.

Çalışma kapsamında üç ilden toplanan örneklerde AILV, AMCV, ArLV, AYRSV, CMV, TBRV, TMV ve TSWV adlı etmenlerin varlığını belirlemek amacıyla yapılan RT-PCR yönteminin sonuçları Çizelge 4.4'te açıklanmıştır.

Çizelge 4.4 Enginar Örneklerinde RT-PCR Yöntemi İle Saptanan Virüsler ve İllere Göre Bulunma Durumları

	İZMİR			AYDIN			MUĞLA		
	Enfekteli Örnek	Sağlıklı Örnek	Bulunma Oranı (%)	Enfekteli Örnek	Sağlıklı Örnek	Bulunma Oranı (%)	Enfekteli Örnek	Sağlıklı Örnek	Bulunma Oranı (%)
AILV	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMCV	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ArLV	13	51	20.32	24	16	60	0	0	0
AYRSV	5	59	7.82	0	0	0	0	0	0
CMV	5	59	7.82	0	0	0	0	0	0
TBRV	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TMV	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TSWV	0	0	0	0	0	0	0	0	0

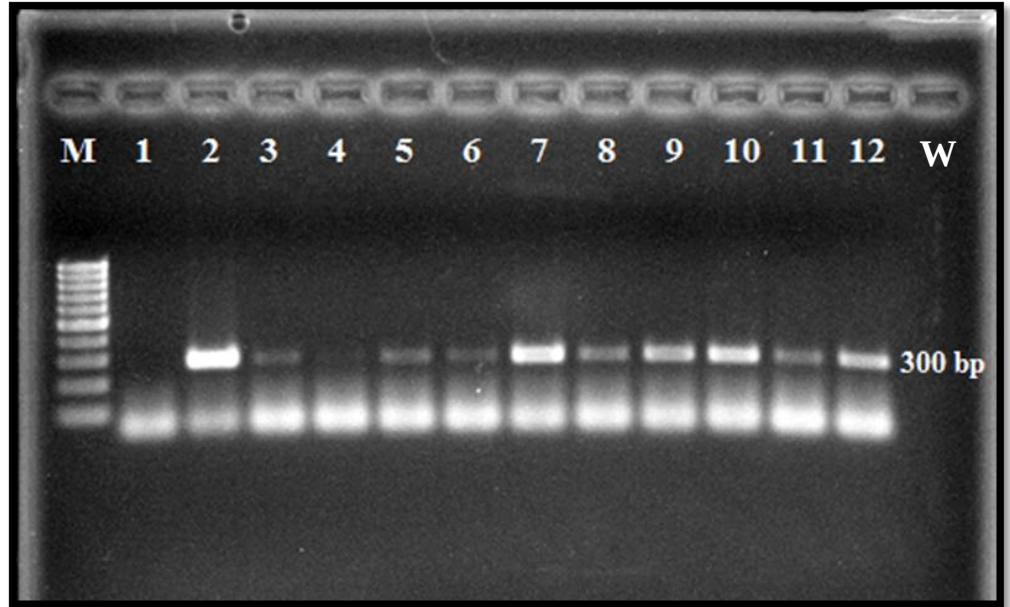
Çizelge 4.4'te belirtildiği üzere, Aydın ili ve ilçelerinden alınan 40 örnekle yürütülen RT-PCR testi sonuçları enginar örneklerinde % 60 oranında viral enfeksiyon olduğunu göstermiştir. Spesifik 8 primer çifti ile yürütülen RT-PCR testleri sonucunda, bu ilden alınan örneklerde sadece ArLV enfeksiyonunun olduğu belirlenmiştir.

İzmir ili ve ilçelerinden alınan 64 örnekte 8 viral etmen için spesifik primerlerle yapılan RT-PCR yöntemi sonuçları, örneklerde viral enfeksiyon bulunma oranının % 35.94 olduğunu göstermiştir. Elde edilen bulgular, bu ilden

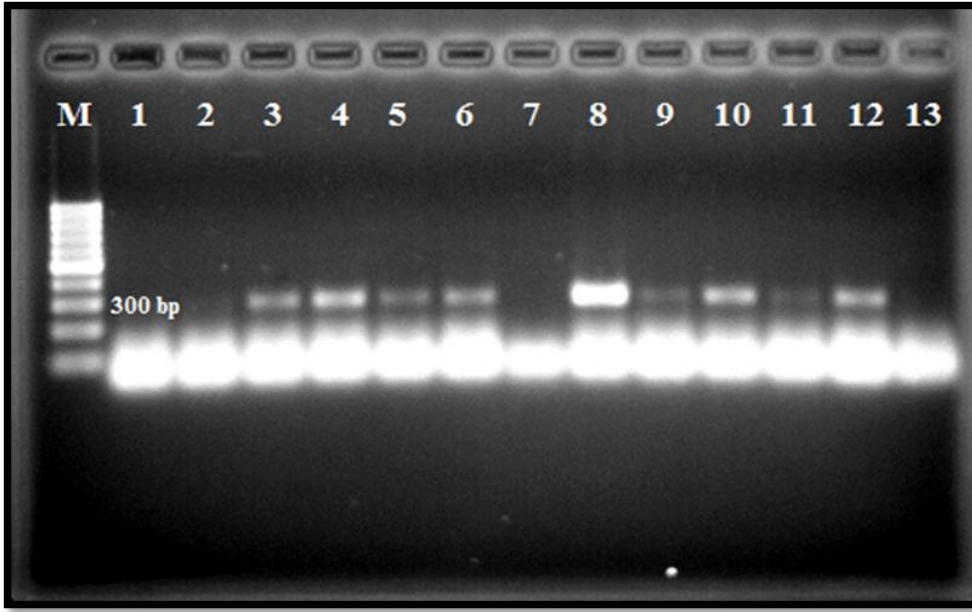
alınan örneklerde ArLV (% 20.32), AYRSV (% 7.82) ve CMV (% 7.82) enfeksiyonlarının mevcut olduğunu ortaya koymuştur (Çizelge 4.4).

Muğla'dan alınan 16 örnekte AILV, AMCV, ArLV, AYRSV, CMV, TMV, TBRV ve TSWV adlı viral etmenlerin varlığı açısından RT-PCR yöntemi ile yapılan çalışmalarda herhangi bir viral enfeksiyonunun bulunduğu tespit edilememiştir (Çizelge 4.4).

ArLV varlığının tespit edilmesi için 120 örnekle yürütülen RT-PCR çalışmaları sonucunda, 37 örnek enfekteli bulunmuş, beklenen bantlar 300 bp'de gözlenmiştir (Şekil 4.6, 4.7).



Şekil 4.6 İzmir İlinden Alınan Örneklere ArLV İçin Uygulanmış Olan RT-PCR Testi Sonucunun Jel Görüntüleme Sisteminde Çekilmiş Görünümlerinden Bazıları M: 100 bp DNA ladder 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12: ArLV İle Enfekteli Örnekler W: Su Kontrol



Şekil 4.7 Aydın İlinden Alınan Örneklerle ArLV İçin Uygulanmış Olan RT-PCR Testi Sonucunun Jel Görüntüleme Sisteminde Çekilmiş Görünümlerinden Bazıları M: 100 bp DNA ladder 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12: ArLV İle Enfekteli Örnekler 13: Negatif Kontrol

ArLV ile enfekteli bulunan 37 örneğin 24 tanesi Aydın ve ilçelerinden ve 13 tanesi İzmir ve ilçelerinden alınan enginar örneklerine aittir. RT-PCR testleri sonucunda ArLV ile enfekteli bulunan örnek sayısı, karışık enfeksiyonlar ve bulunma oranları Çizelge 4.5’de gösterilmektedir.

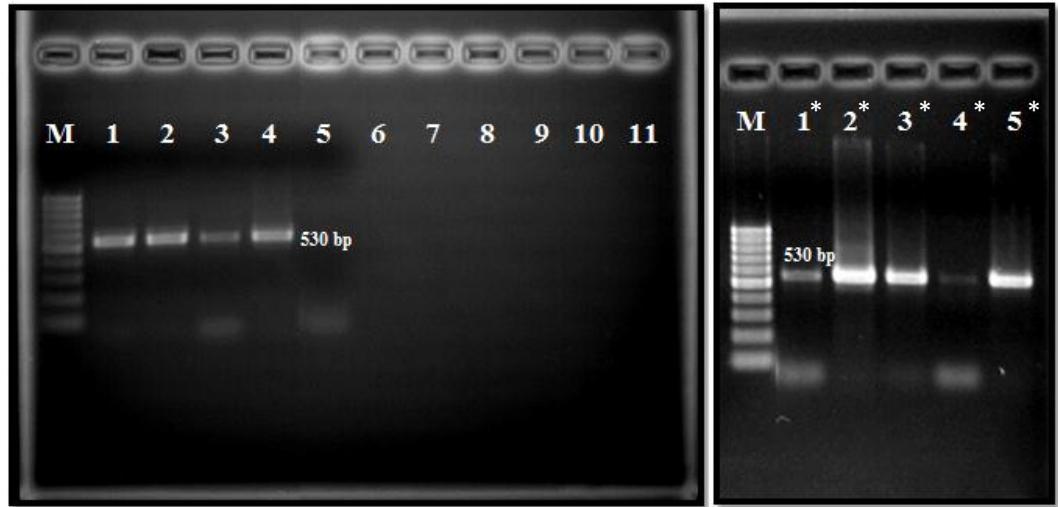
Çizelge 4.5 İzmir, Aydın ve Muğla İllerinden Alınan Örneklerde ArLV ile Enfekteli Olan Örnek Sayısı, Karışık Enfeksiyonlar ve Bulunma Oranları

	Enfekteli Örnek Sayısı	Bulunma Oranı (%)
ArLV	35	29.17
ArLV+AYRSV	2	1.67
Toplam Enfekteli Örnek Sayısı	37	30.83
Toplam Sağlıklı Örnek Sayısı	83	69.17
Toplam	120	100

Çizelge 4.5’te belirtildiği üzere, 120 örnekte yürütülen RT-PCR çalışmaları sonuçları, her üç ilde enfekteli bulunan 37 örneğin 2 tanesinde ArLV ve AYRSV’nin birlikte bulunduğunu ve 35 örnekte ise ArLV’nin tekli

enfeksiyonunun olduğunu göstermiştir. Karışık enfeksiyonlar sadece İzmir ilinden alınan örneklerde gözlenmiştir. Yapılan değerlendirme sonuçları ile, İzmir'den alınan örneklerde toplam ArLV'nin bulunma oranı % 20.32 (karışık enfeksiyon oranı % 3.13; tek enfeksiyon oranı % 17.19) iken, Aydın ilinden alınan örneklerde % 60 oranında ArLV enfeksiyonu bulunduğu tespit edilmiştir.

Her üç ilden alınan örneklerde AYRSV'nin varlığını tespit etmek için yürütülen RT-PCR testlerinde yalnızca İzmir'den alınan 5 örnekte 530 bp'de beklenen bantlar olduğu gözlenirken (Şekil 4.8), Aydın ve Muğla'dan toplanan örneklerde virüs enfeksiyonu tespit edilmemiştir. Çalışma sonuçları İzmir'den alınan 2 örnekte AYRSV ve ArLV adlı etmenlerin karışık enfeksiyonu olduğunu ve 3 örneğin ise sadece AYRSV ile enfekteli bulunduğunu ortaya çıkarmıştır (Çizelge 4.6).



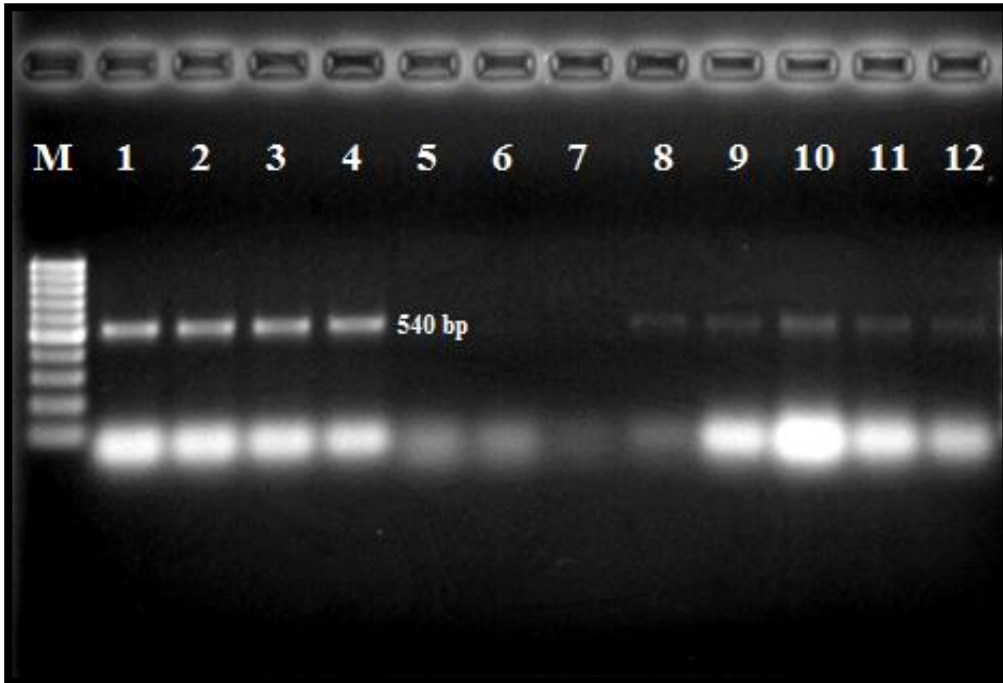
Şekil 4.8 AYRSV İçin Uygulanmış Olan RT-PCR Testi Sonucunun Jel Görüntüleme Sisteminde Çekilmiş Görünümlerinden Bazıları M: 100 bp DNA Ladder 1, 1*, 2, 2*, 3, 3*, 4, 4*: AYRSV ile enfekteli örnekler 11: Su Kontrol

Çizelge 4.6 İzmir, Aydın ve Muğla İllerinden Alınan Örneklerde AYRSV ile Enfekteli Olan Örnek Sayısı, Karışık Enfeksiyonlar ve Bulunma Oranları

	Enfekteli Örnek Sayısı	Bulunma Oranı (%)
AYRSV	3	2.50
ArLV+AYRSV	2	1.67
Toplam Enfekteli Örnek Sayısı	5	4.17
Toplam Sağlıklı Örnek Sayısı	115	95.83
Toplam	120	100

Çizelge 4.6'daki veriler değerlendirildiğinde, AYRSV'nin İzmir ve çevresinde bulunma oranı % 7.82 olarak saptanmıştır. Bu oran içinde karışık enfeksiyon düzeyi ise % 3.13'tür.

CMV'nin varlığının saptanması amacıyla yürütülen RT-PCR testleri sonucunda, İzmir'den alınan 5 örnekte 540 bp'de beklenen bant oluşumları gözlenmiştir (Çizelge 4.7; Şekil 4.9). Elde edilen bu verilerin DAS-ELISA testleri sonuçları ile paralellik gösterdiği görülmüştür.



Şekil 4.9 CMV İçin Uygulanmış Olan RT-PCR Testi Sonucunun Jel Görüntüleme Sisteminde Çekilmiş Görünümlerinden Bazıları M: 100 bp DNA Ladder 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 12: Pozitif Örnekler

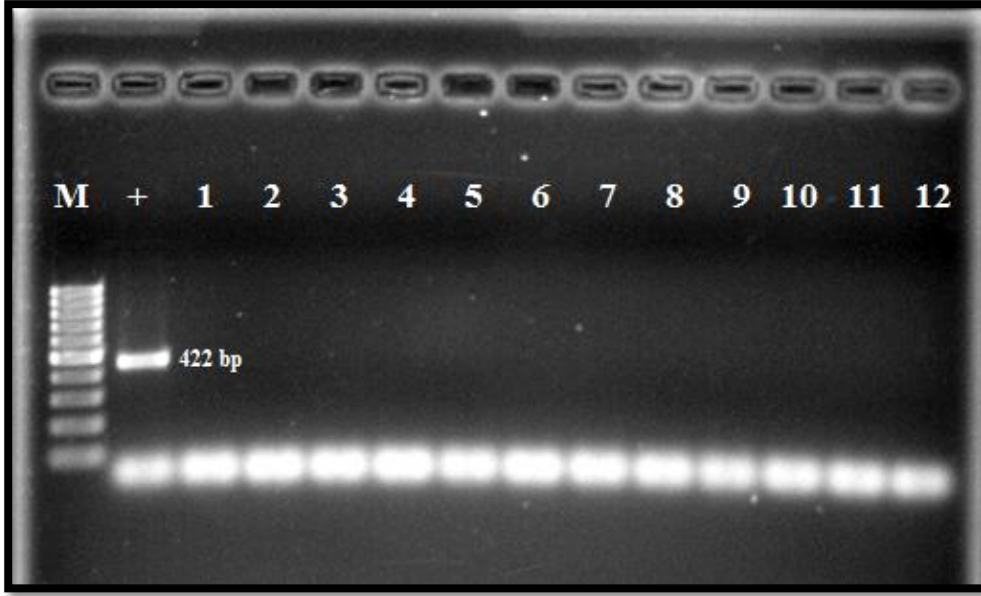
CMV ile enfekteli bulunan 5 örnek İzmir ve ilçelerinden alınan örneklerden olup ve CMV'nin örneklerde tekli enfeksiyon şeklinde bulunduğu görülmüştür (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 İzmir, Aydın ve Muğla İllerinden Alınan Örneklerde CMV ile Enfekteli Örnek Sayısı ve Bulunma Oranları

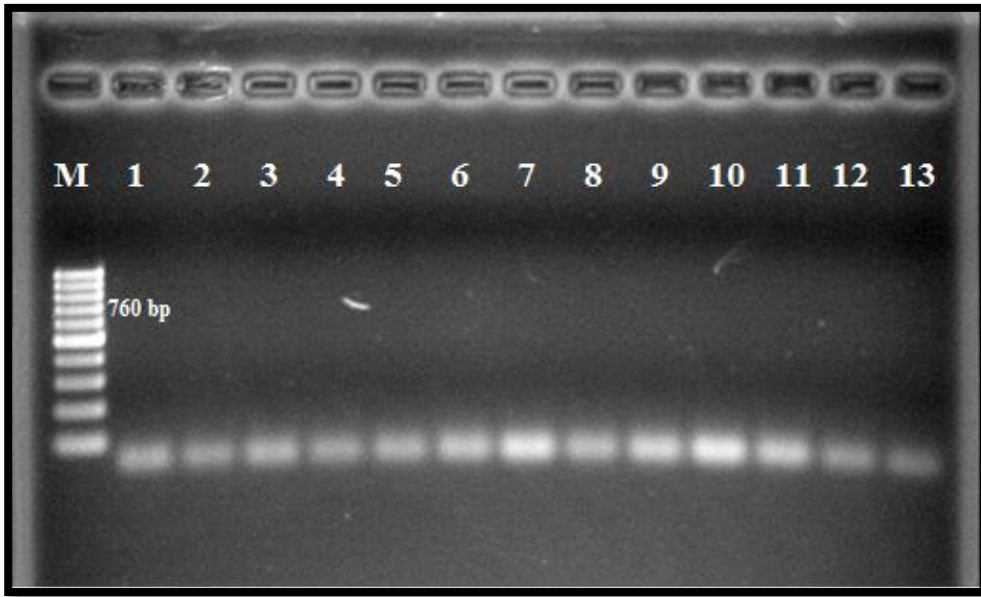
	Enfekteli Örnek Sayısı	Bulunma Oranı (%)
CMV	5	4.17
Toplam Enfekteli Örnek Sayısı	5	4.17
Toplam Sağlıklı Örnek Sayısı	115	95.83
Toplam	120	100

Çizelge 4.7 incelendiğinde her üç ilden alınan 120 örnekte CMV enfeksiyonunun bulunma oranı % 4.17 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). İzmir ili tek olarak değerlendirildiğinde enfeksiyon oranı % 7.82 olarak bulunmuştur.

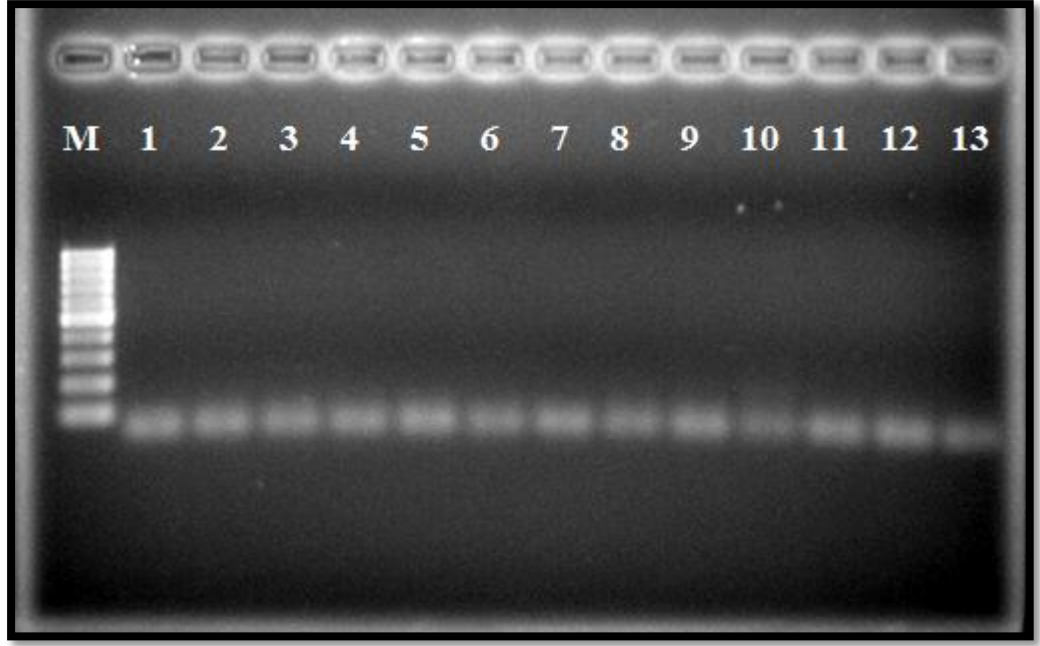
AILV, AMCV, TBRV, TMV ve TSWV varlığının saptanması için yürütülen RT-PCR çalışmalarının sonuçları, etmenlere spesifik bant oluşumları görülmediğinden negatif olarak bulunmuştur. Her viral etmen için spesifik primerlerle uygulanan RT-PCR sonuçları Çizelge 4.4'te ve jel dökümantasyon cihazında çekilen jel görüntüleri Şekil 4.10-4.14'de verilmiştir.



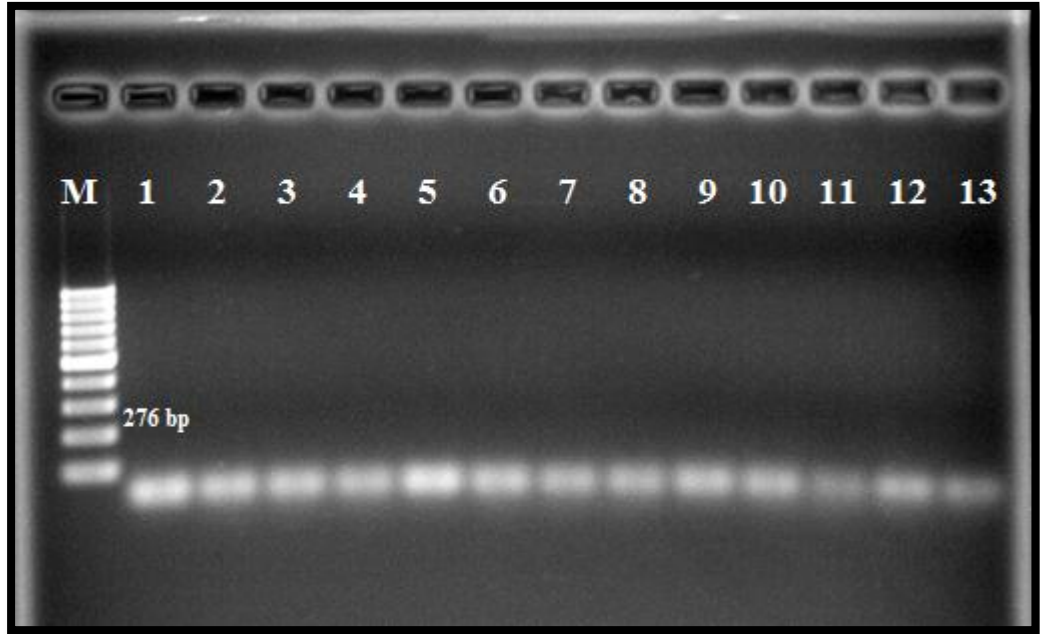
Şekil 4.10 TMV İçin Uygulanmış Olan RT-PCR Testi Sonucunun Jel Görüntüleme Sisteminde Çekilmiş Görünümlerinden Bazıları +: Pozitif Kontrol 1-12: Örnekler



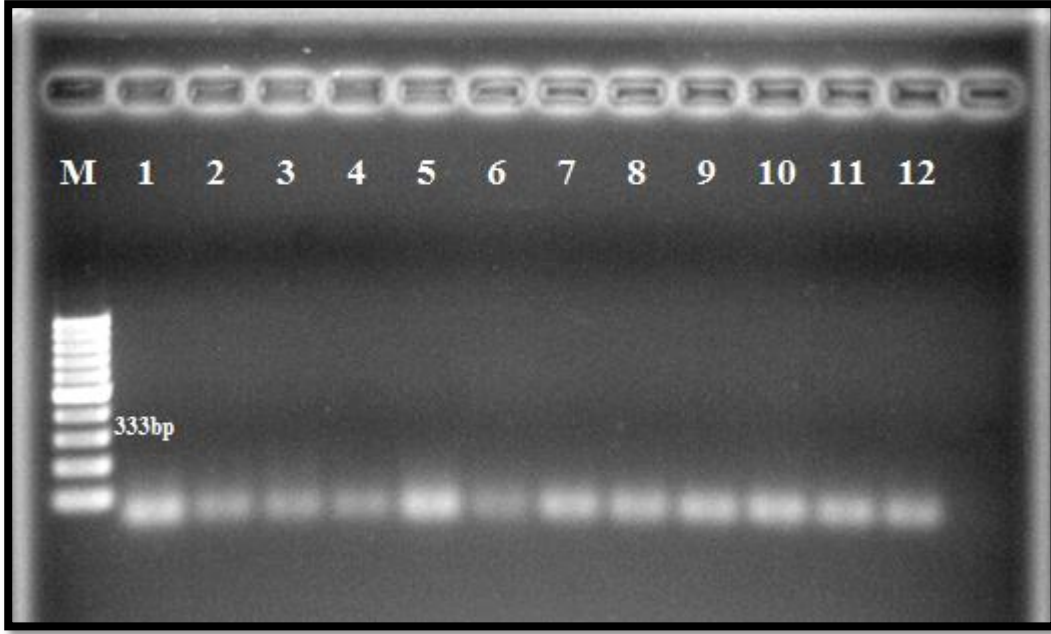
Şekil 4.11 AILV İçin Uygulanmış Olan RT-PCR Testi Sonucunun Jel Görüntüleme Sisteminde Çekilmiş Görünümlerinden Bazıları 1-13: Örnekler



Şekil 4.12 AMCV İçin Uygulanmış Olan RT-PCR Testi Sonucunun Jel Görüntüleme Sisteminde Çekilmiş Görünümlerinden Bazıları 1-13: Örnekler



Şekil 4.13 TSWV İçin Uygulanmış Olan RT-PCR Testi Sonucunun Jel Görüntüleme Sisteminde Çekilmiş Görünümlerinden Bazıları 1-13: Örnekler



Şekil 4.14 TBRV İçin Uygulanmış Olan RT-PCR Testi Sonucunun Jel Görüntüleme Sisteminde Çekilmiş Görünümlerinden Bazıları 1-13: Örnekler

4.3.2 Dizi analizi ve filogenetik sınıflandırma çalışmaları

RT-PCR çalışmalarında izole edilen ArLV ve AYRSV adlı etmenlerin kullanılan primerlere göre çoğaltılan özgül bir bölgesinin nükleotid dizilimleri (sekans) belirlenmiştir. Bu amaçla İontek firmasına gönderilen ürünlerden elde edilen nükleotid dizilimlerinin, dünyadaki diğer izolatlarla olan nükleotid benzerlikleri NCBI BLAST (The National Center for Biotechnology Information-Basic Local Alignment Search Tool) kullanılarak incelenmiştir (NCBI, 2012). NCBI BLAST sınıflandırma soy ağaçları, ClustalW2 ve MEGA 5.10 ile oluşturulan soyağaçları aşağıdaki şekillerde verilmiştir (Şekil 4.15-4.18).

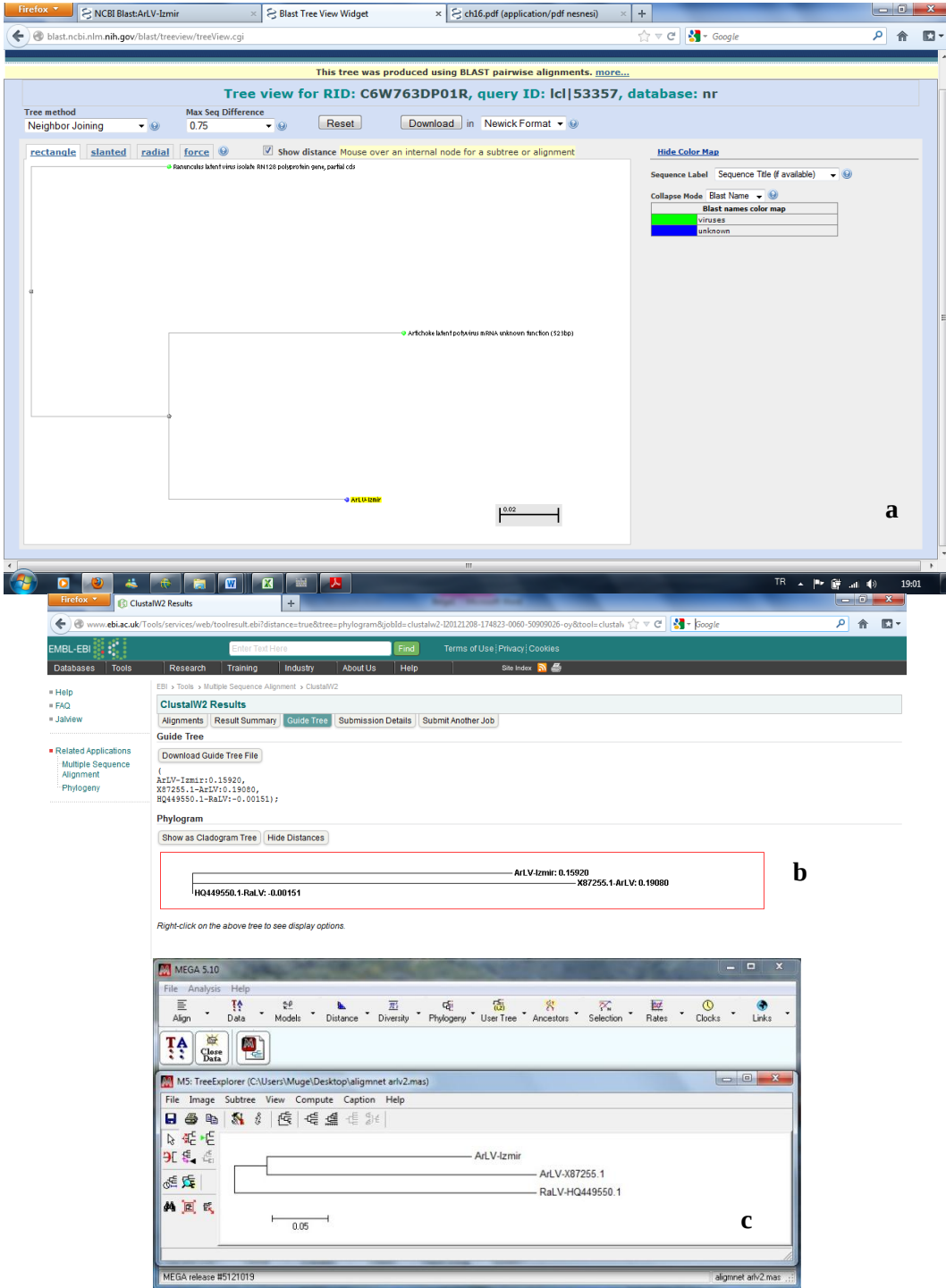
Kullanılan spesifik ArLV primerinin çoğalttığı bölgenin nükleotid dizilimi, NCBI BLAST ile dünya izolatlarıyla karşılaştırıldığında % 86 oranında X87255.1 kodlu “Artichoke latent potyvirus mRNA unknown function (523bp)” izolatu ile benzerlik göstermiştir. Aşağıdaki şekillerde kıyaslama sonuçları ve filogenetik ağaçlar gösterilmiştir (Şekil 4.15, 4.16).



Şekil 4.15 ArLV'nin Nükleotit Kıyaslanması Sonucu Elde Edilen Benzerlik Oranları

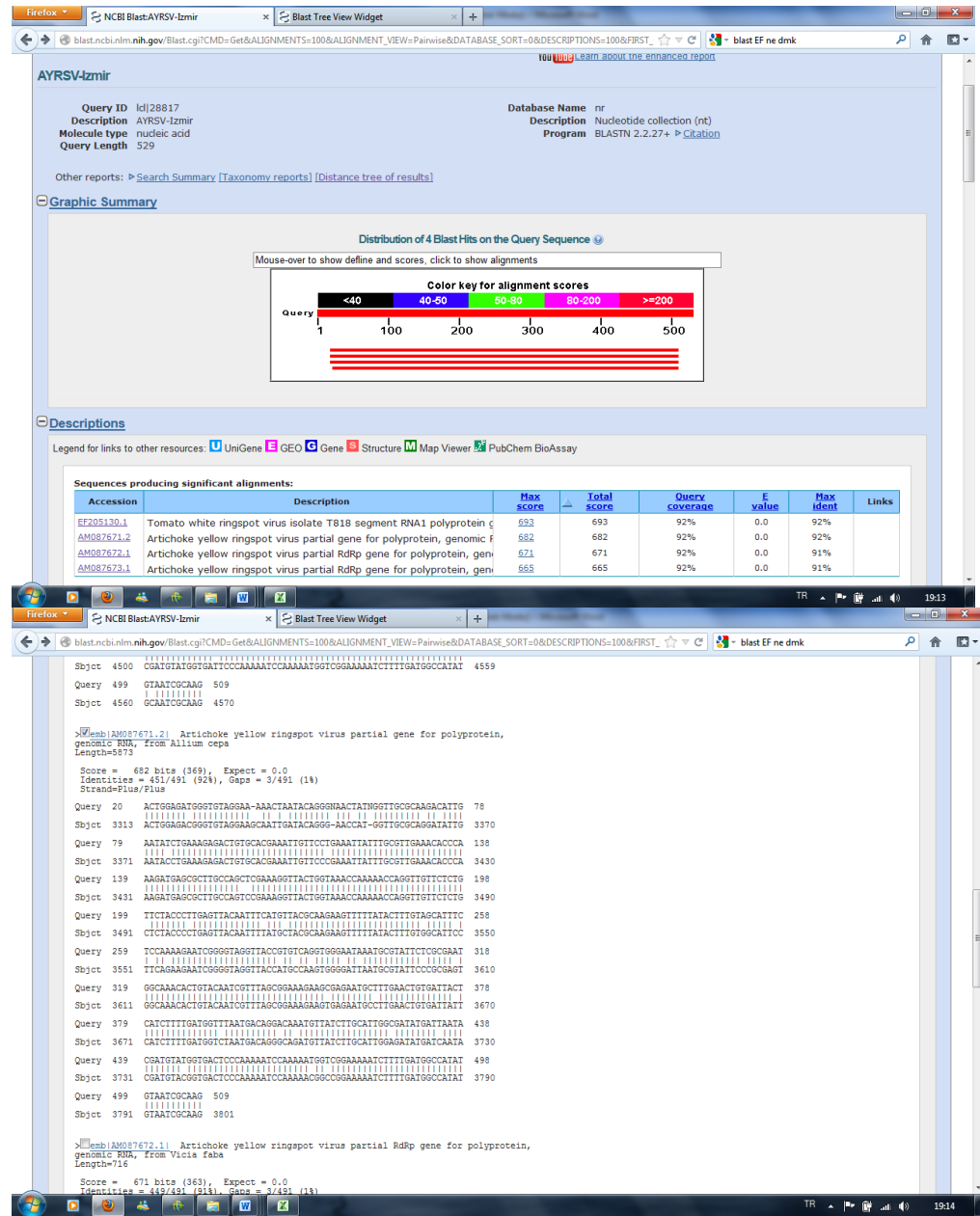
Şekil 4.14'te görüldüğü üzere, örneklerin mRNA'sına özgü spesifik primerlerle ArLV etmeninin varlığı nükleotid düzeyinde belirlenmiş ve tek nükleotit farklılıklarının belirlenmesi ile de izolatların benzerlik ve farklılıkları ortaya konulmuştur. Buradan elde edilen sekanslar, ClustalW2 ve Mega 5.10 programlarına yüklenerek çoklu dizi hizalamalarının ardından soy ağacı eldesinde kullanılmıştır (Şekil 4.15). Soy ağacı (filogenetik ağaç), eldeki izolatın dünyadaki diğer izolatlarla ve birbirleriyle benzerliklerini ortaya koymaktadır. ArLV için

yürütülen çalışmada, İzmir’den izole edilen ve sekanslamaya gönderilen etmen ArLV-Izmir olarak adlandırılmış ve her üç yöntemle çizilen filogenetik ağaçlarda gen bankasına X87255.1 kodu ile kayıtlı “Artichoke latent potyvirus mRNA unknown function (523bp)” izolatu ile aynı grupta yer almıştır.

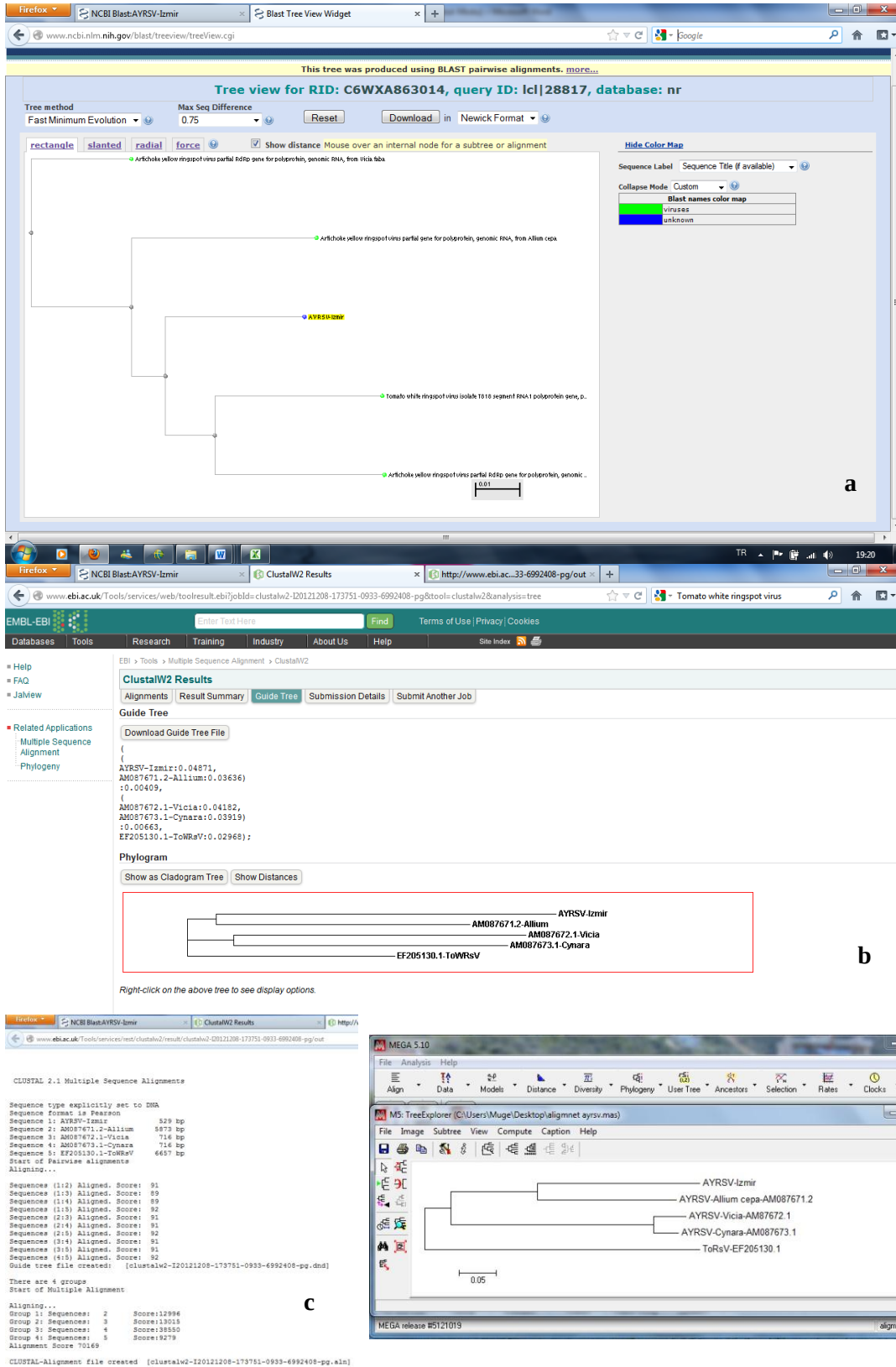


Şekil 4.16 Çeşitli Programlar Kullanılarak .ArLV İçin Oluşturulan Filogenetik Ağaçlar a) ArLV için NCBI BLAST Sınıflandırmasını Gösteren Soyağacı b) ClustalW2’de Oluşturulan Filogenetik Ağaç c) MEGA 5.10 Programında Oluşturulan Filogenetik Ağaç

Spesifik AYRSV primeri ile yürütülen RT-PCR’lardan elde edilen ürünlerin sekanslanmasıyla elde edilen nükleotid dizilerinin NCBI BLAST kullanılarak dünya izolatlarıyla karşılaştırılmaları sonucunda, elde edilen izolatın % 92 oranında AM087671.2 kodu ile kayıtlı “Artichoke yellow ringspot virus partial gene for polyprotein, genomic RNA from *Allium cepa*” izolatı ile benzer olduğu görülmüştür. NCBI BLAST karşılaştırmaları (Şekil 4.17) ve elde edilen filogenetik ağaçlar aşağıdaki şekillerde verilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.17 İzole Edilen AYRSV’nin Nükleotid Kıyaslanması Sonucu Elde Edilen Benzerlik Oranları ve En Fazla Benzerlik Gösterdiği AM087671.2 Numaralı İzolat Arasındaki Nükleotid Benzerlik ve Farklılıkları



Şekil 4.18 AYRSV Etmeni İçin Oluşturulan Filogenetik Ağaçlar a) AYRSV için NCBI BLAST Sınıflandırmasını Gösteren Soyağacı b) ClustalW2 Programı Kullanılarak Yürütülen Çoklu Dizi Hizalaması Raporu c) ClustalW2’de Oluşturulan Filogenetik Ağaç d) MEGA 5.10 Programında Oluşturulan Filogenetik Ağaç

Kullanılan genomik RNA'dan kısmı poliprotein genine ait spesifik AYRSV primeri ile çoğaltılan izolatın, sekanslamanın ardından NCBI BLAST ile dünyadaki izolatlarla nükleotid düzeyinde benzerlikleri saptanmıştır. AYRSV-Izmir olarak adlandırılan izolatın nükleotid dizilimleri NCBI BLAST, Clustal W2 ve MEGA 5.10 programında kıyaslanarak filogenetik ağaçlar çizilmiş (Şekil 4.17) ve AYRSV-Izmir en yüksek benzerliği gösteren AM087671.2 numaralı izolat (Şekil 4.17) ile aynı grupta yer almıştır.

4.4 Biyolojik Testlerin Sonuçları

Yürütülen DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemlerinin sonuçlarına göre virüsler ile enfekteli olduğu tespit edilen örnekler gruplandırılmış, her grubu temsil edecek sayıda örnek seçilerek biyolojik testler bu örneklerle yürütülmüştür. Biyolojik testler, tespit edilen virüslere duyarlı olduğu bilinen test bitkilerine uygun gelişme döneminde mekanik inokulasyonların yapılması şeklinde uygulanmıştır.

ArLV ile enfekteli bulunan 37 örnekten 11 tanesi (10 adet ArLV tek enfeksiyonu ve 1 adet ArLV+AYRSV enfeksiyonu), AYRSV ile enfekteli 5 örneğin 4 tanesi (3 adet AYRSV tek enfeksiyonu ve 1 adet ArLV+AYRSV enfeksiyonu), CMV ile enfekteli 4 örnek ve DAS-ELISA ya da RT-PCR yöntemleri sonucunda herhangi bir etmenle enfekteli bulunmamış 5 örnek seçilerek duyarlı test bitkilerine mekanik inokulasyonlar gerçekleştirilmiştir.

Gerçekleştirilen mekanik inokulasyonlar sonucunda test bitkilerinde genel olarak, mozaik, şekil bozuklukları, yaprak deformasyonları, beneklenmeler, klorotik lokal lekeler gibi belirtiler gözlenmiştir. Adı geçen virüslerin duyarlı konukçularına yapılan mekanik inokulasyonları sonucunda gözlenen belirtiler Çizelge 4.8 ve 4.9'de verilmiştir.

Çizelge 4.8 Bazı Virüs İzolatlarının Test Bitkilerinde Ortaya Koydukları Belirtiler
(TMV, CMV, TBRV, TSWV)

TEST BİTKİLERİ	VİRAL ETMENLER			
	TMV	CMV	TBRV	TSWV
<i>Amaranthaceae</i>				
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	0	NLL, KLL	0	-
<i>Chenopodium quinoa</i>	0	NLL, KLL	0	-
<i>Cucurbitaceae</i>				
<i>Cucumis sativus</i>	-	M, BY	-	0
<i>Solanaceae</i>				
<i>N. tabacum</i>	-	La, NL, M, NLe	-	-
<i>Nicotiana clevelandii</i>	-	La, NL, M, NLe	-	0
<i>Nicotiana glutinosa</i>	0	DS, La, NL, M, HaLe	-	0
<i>Nicotiana tabacum</i> cvs. Samsun	0	-	-	-
<i>Nicotiana tabacum</i> cvs. Xanthi	0	-	-	-
<i>Petunia hybrida</i>	-	-	0	0
<i>Fabaceae</i>				
<i>Phaseolus vulgaris</i> (French Bean)	-	NLL	-	-
<i>Tropaeolaceae</i>				
<i>Tropaeolum majus</i>	-	-	-	0
<i>Apocynaceae</i>				
<i>Vinca rosea</i>	-	-	-	0

BY: Büyümede yavaşlama, DS: Damarlarda sararma, HaLe: Halka leke, KLL: Klorotik lokal lezyon, La: Latent, M: Mozaik, NL: Nekrotik lezyon, NLe: Nekrotik lekeler, NLL: Nekrotik lokal lezyon

0: İnokulasyon Sonucunda Belirti Oluşumu Görülmemiştir

-: Literatürde Duyarı Test Bitkisi Olarak Belirtilmemiştir (Gallitelli et al., 2004; Description of Plant Viruses, 2012; Plant Viruses Online, 2012).

Çizelge 4.9 Bazı Virüs İzolatlarının Test Bitkilerindeki Belirtileri (AILV, ArLV, AVBV, AYRSV, BBWV-1, BBWV-2)

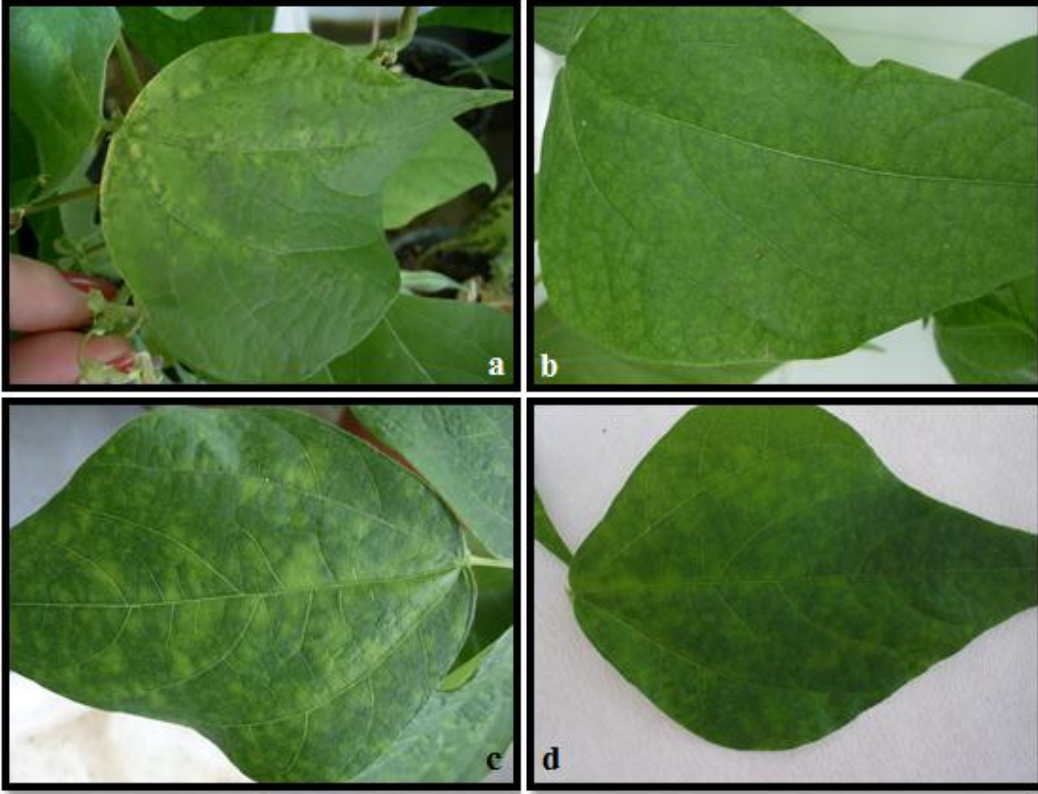
TEST BİTKİLERİ	VİRAL ETMENLER					
	AILV	ArLV	AVBV	AYRSV	BBWV-1	BBWV-2
Amaranthaceae						
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-	NLL	0	-	-	0
<i>Chenopodium quinoa</i>	-	NLL	0	KLL, NLL, SBe, AN	0	0
<i>Gomphrena globosa</i>	0	KırHaL	-	KırLL, SSaHaLe, Ç	-	-
Cucurbitaceae						
<i>Cucumis sativus</i>	0	-	-	KL, M, ŞB, E	-	-
Solanaceae						
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-	-	-	-	-	0
<i>Nicotiana benthamiana</i>	-	SM	-	-	-	-
<i>Nicotiana clevelandii</i>	-	SM	-	-	-	-
<i>Nicotiana tabacum</i>	-	-	-	LKHa, SKHa, Ç, MY	-	-
<i>Petunia hybrida</i>	-	SM, GG	-	-	-	0
Fabaceae						
<i>Phaseolus vulgaris</i> (French bean)	-	-	0	KırNLL, SM, YD	-	-

AN: Apikal nekroz, Ç: Çizgi, E: Enasyon, GG: Gelişme geriliği, KırHaL: Kırmızımsı halka şeklinde lezyonlar, KırLL: Kırmızımsı lokal lezyon, KırNLL: Kırmızımsı nekrotik lokal lezyonlar, KL: Klorotik lezyon, KLL: Klorotik lokal lezyon, LKHa: Lokal klorotik halkalar, M: Mozaik, MY: Meşe yapraklılık, NLL: Nekrotik lokal lezyon, SBe: Sistemik beneklenme, SKHa: Sistemik klorotik halkalar, SM: Sistemik Mozaik, SSaHaLe: Sistemik sarı halka lekeler, ŞB: Şekil Bozukluğu, YD: Yaprak deformasyonu

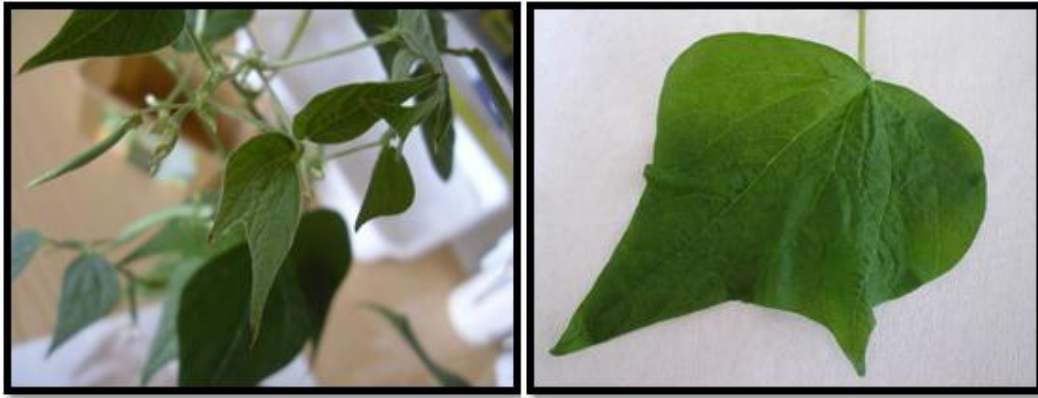
0: İnokulasyon Sonucunda Belirti Oluşumu Görülmemiştir

-: Literatürde Duyarı Test Bitkisi Olarak Belirtilmemiştir (Gallitelli et al., 2004; Description of Plant Viruses, 2012; Plant Viruses Online, 2012).

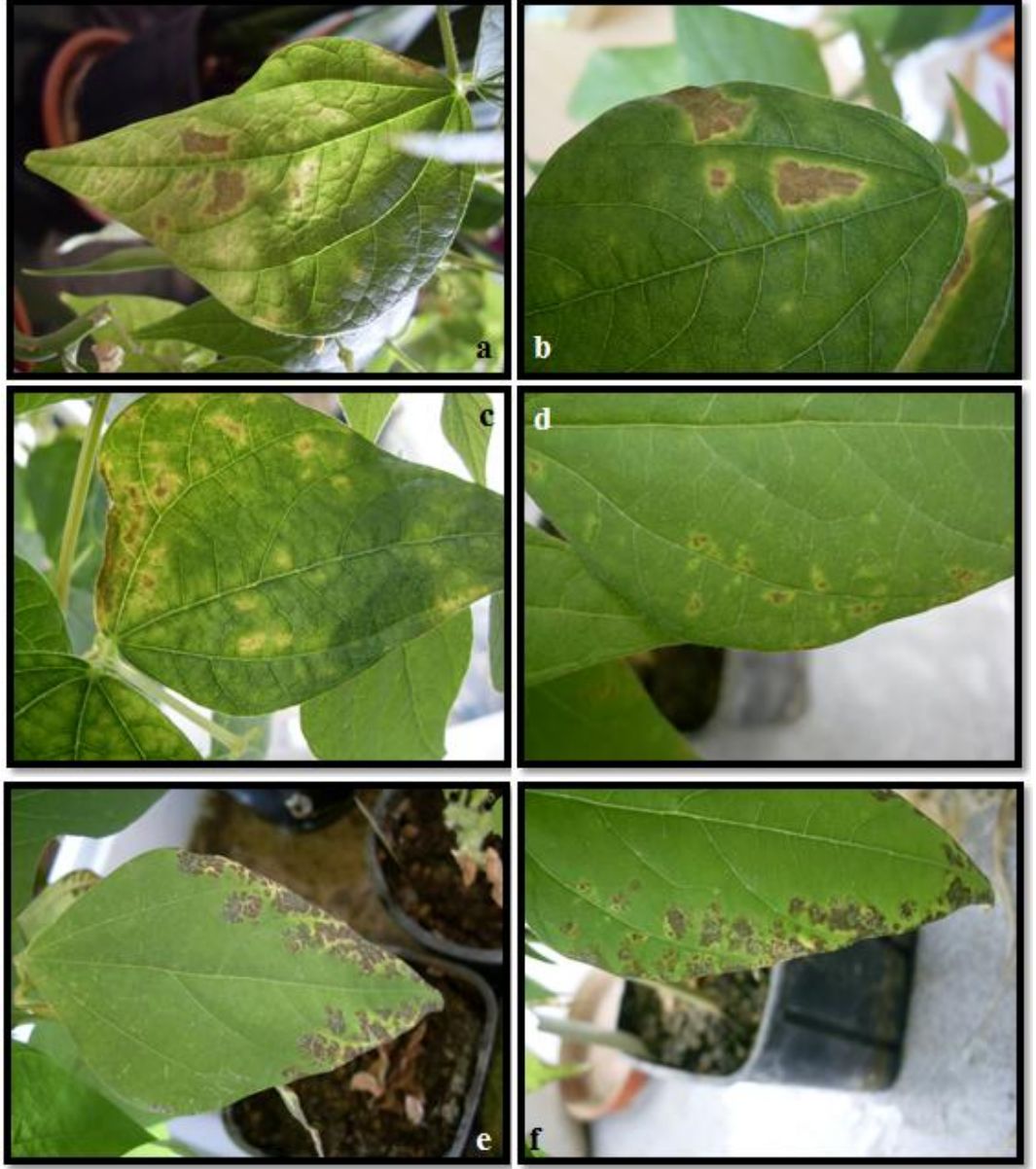
AYRSV izolatları ile mekanik olarak inokule edilen *C. quinoa* bitkilerinde klorotik lokal lezyonlar, sistemik beneklenme ve uç nekrozları görülürken, *P. vulgaris*'te (çalı fasulyesi) ise kırmızımsı nekrotik lokal lezyonlar, sistemik mozaik ve yaprak deformasyonları gözlenmiştir (Şekil 4.19-4.22).



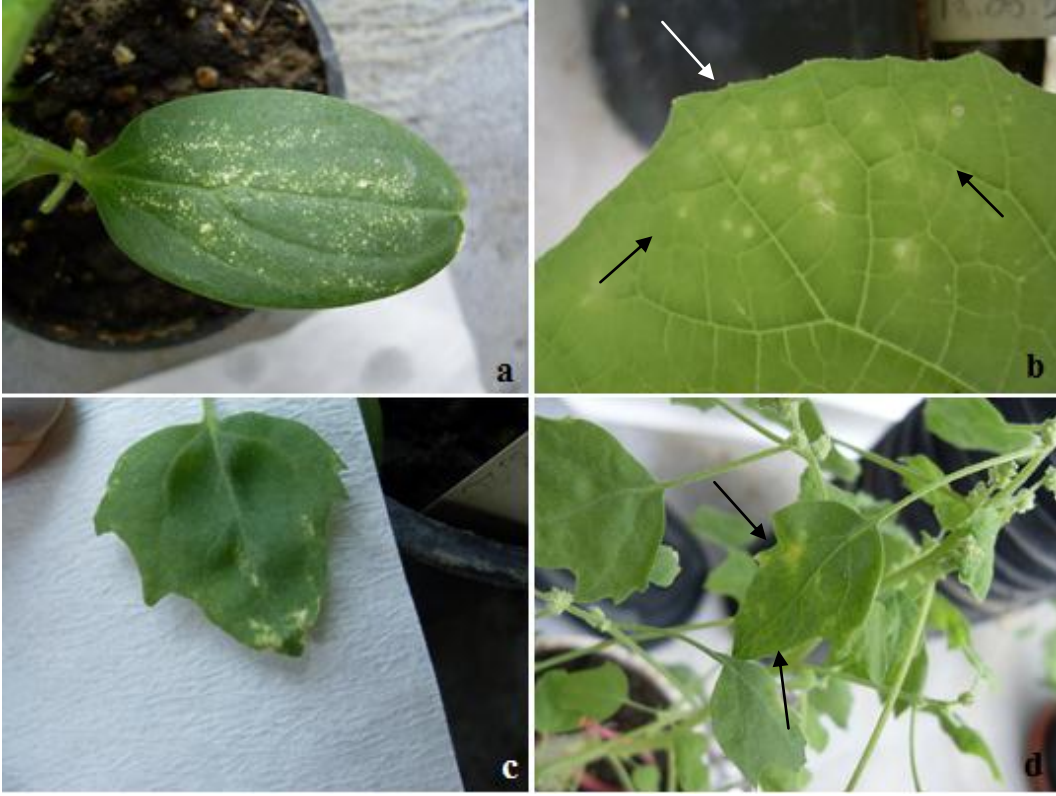
Şekil 4.19 AYRSV İle Mekanik Olarak İnokule Edilmiş *P. vulgaris* Bitkilerinin Yapraklarında Gözlenen Bazı Belirtiler a) Mozaik ve Yaprak Deformasyonu b-c-d) Mozaik Belirtileri



Şekil 4.20 AYRSV İle Mekanik Olarak İnokule Edilmiş *P. vulgaris* Bitkilerinin Yapraklarında Gözlenen Deformasyonlar

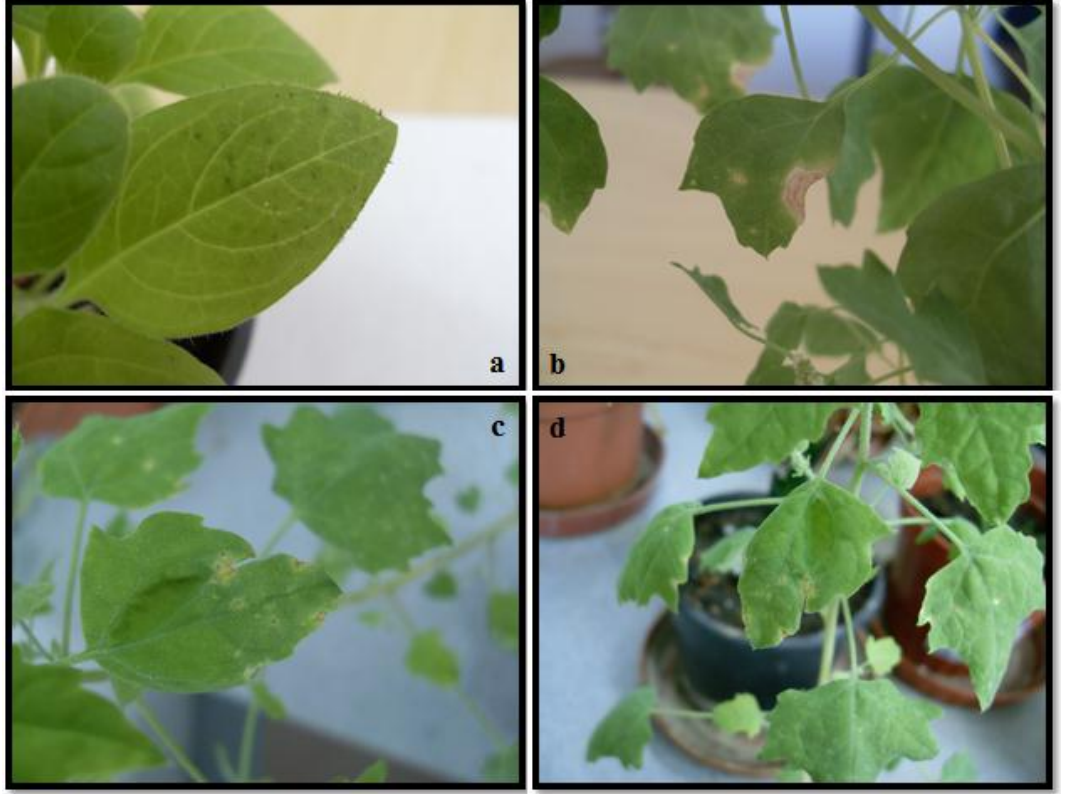


Şekil 4.21 AYRSV İle Mekanik Olarak İnokule Edilmiş *P. vulgaris* Bitkilerinin Yapraklarında Gözlenen Bazı Lezyonlar a-b-c-d-e) Kırmızımsı Nekrotik Lokal Lezyonlar



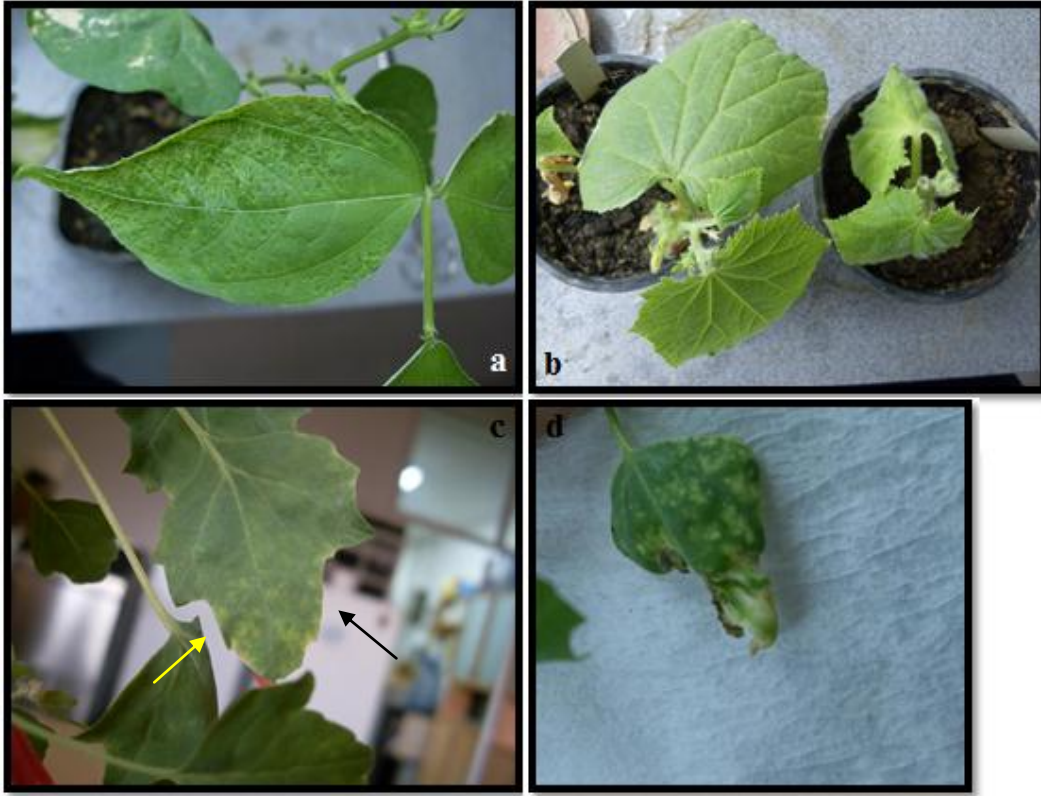
Şekil 4.22 AYRSV İle Mekanik Olarak İnoküle Edilmiş Duyarlı Test Bitkilerinin Yapraklarında Gözlenen Bazı Belirtiler a) *C. sativus* Kotiledon Yapraklardaki Klorotik Lekeler b) *C. sativus* Yapraklarında Klorotik Lekeler c-d) *C. quinoa* Bitkilerinde Klorotik Lokal Lezyonlar

ArLV ile enfekteli örneklerle hazırlanan ekstraktların duyarlı test bitkilerine inokulasyonları sonucu, *P. hybrida* bitkilerinde sistemik mozaik, beneklenme ve gelişme geriliği gözlenirken, *C. quinoa* ve *C. amaranticolor*'da nekrotik lokal lezyon oluşumları dikkati çekmiştir. *N. benthamiana* ve *N. clevelandii*'de ise sistemik mozaik göze çarpan belirtiler olmuştur (Şekil 4.23).



Şekil 4.23 ArLV İle Mekanik Olarak İnoküle Edilmiş Duyarlı Test Bitkilerinde Gözlenen Bazı Belirtiler a) *P. hybrida* Yapraklarında Beneklenmeler b) *C. quinoa* Yapraklarında Görülen Nekrotik Lokal Lezyonlar c-d) *C. quinoa* Yapraklarında Nekrotik Lokal Lekeler

CMV ile enfekteli örneklerin mekanik inokulasyonu sonucu, *C. amaranticolor* ve *C. quinoa*'da klorotik lokal lezyon oluşumları, *C. sativus*'ta sistemik mozaik ve gelişme geriliği, *N. glutinosa*'da mozaik belirtileri, *P. vulgaris*'te toplu iğne başı gibi nekrotik lezyon oluşumu ve *N. tabacum*'da ise sistemik mozaik, şekil bozukluğu ve klorotik lezyon oluşumları gözlenmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24 CMV'nin Mekanik İnokulasyonu Sonucu Test Bitkilerinde Gözlenen Belirtilerden Bazıları a) *P. vulgaris* Yapraklarında Toplu İğne Başı Büyüklüğünde Nekrotik Lokal Lezyon Oluşumu b) *C. sativus* Bitkilerinde Gelişme Geriliği c-d) *C. quinoa* Bitkilerinde Klorotik Lokal Lezyon Oluşumu

4.5 Kullanılan Tanılama Yöntemlerinin Duyarlılık Durumunun Karşılaştırılması

Örneklerle yürütülen deneme sonuçları göz önünde tutularak virüs tanılama yöntemlerinin duyarlılık durumlarının değerlendirilmesi yapılmıştır. İzmir, Aydın ve Muğla illerinden toplanan örnekleri temsil edecek şekilde örneklerin alındığı arazi büyüklükleri dikkate alınarak seçilen sağlıklı ve enfekteli örneklerde kullanılan virüs tanılama yöntemlerinin 25 örnek baz alınarak yapılan karşılaştırmalı sonuçları ve başarı oranları Çizelge 4.10'de verilmiştir. Her 4 yöntemle testlenen (ELISA, RT-PCR, test bitkilerine mekanik inokulasyon ve simptomatoloji) 25 örneğin 6 tanesinde (A-4, İ-27, İ-38, M-1, M-6 ve M-10) görsel belirti bulunmasına rağmen hiçbir viral enfeksiyon olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca, 12 örnekte görsel belirti olmamasına rağmen viral enfeksiyon saptanmıştır.

Çizelge 4.10 Virüs Tanılama Yöntemlerinin Karşılaştırmalı Sonuçları

No	Örnek Adı	DAS-ELISA	RT-PCR	Mekanik İnokulasyon	Simptomatoloji
1	A-3	-	+	+	-
2	A-4	-	-	-	X
3	A-11	-	+	-	-
4	A-12	-	+	-	-
5	A-16	-	+	-	-
6	A-20	-	+	+	+
7	A-22	-	+	-	-
8	A-23	-	+	-	-
9	İ-8	+	+	-	+
10	İ-9	-	+	+	+
11	İ-12	+	+	-	-
12	İ-17	+	+	-	+
13	İ-22	-	+	+	+
14	İ-24	+	+	+	+
15	İ-27	-	-	-	X
16	İ-36	-	+	+	-
17	İ-38	-	-	-	X
18	İ-39	-	+	+	-
19	İ-43	-	+	+	-
20	İ-49	-	+	+	-
21	İ-53	+	+	+	+
22	İ-63	-	+	-	-
23	M-1	-	-	-	X
24	M-6	-	-	-	X
25	M-10	-	-	-	X
Viral Etmenlerin Saptanmasındaki Başarı Oranı		5/25 % 20	25/25 % 100	10/25 % 40	7/25 % 28

+ : Viral Enfeksiyon Tespit Edilen Örnek; - : Adı Geçen Test İle Enfeksiyon Saptanmayan Örnek,
X : Belirti Göstermesine Rağmen Virüs Saptanmayan Örnek

Yapılan değerlendirmelerde tanılama RT-PCR yöntemi kullanımının %100'e yakın bir oranda, test bitkilerine mekanik inokulasyonu yönteminin % 40 oranında ve simptomatoloji ile tanılama yönteminin % 28 oranında başarılı olduğu görülmüştür.

DAS-ELISA testinin uygulandığı 25 örneğin ise 5 tanesi (% 20) enfekteli olarak bulunmuştur. Ancak, DAS-ELISA testinin değerlendirilmesi yapılırken göz önünde tutulması gereken bir husus da, günümüz koşullarında çoğu enginar virüsünün ticari ELISA tanı kiti bulunmaması ve dolayısıyla her etmene uygulanamaması konusudur. AILV, AMCV, ArLV ve AYRSV etmenleri DAS-ELISA'ya tabi tutulamamış, diğer etmenler için uygulamalar yapılmıştır. ELISA ile tespit edilen 5 CMV enfeksiyonu, RT-PCR ile de aynı oranda tespit edilmiştir.

4.6 Kullanılan Tanılama Yöntemlerinin Sonuçlarının Birlikte Değerlendirilmesi

Araştırma kapsamında İzmir, Aydın, Muğla illeri ve ilçelerinden alınan 120 örnekte virüs varlığının saptanması amacıyla yürütülen görsel symptom incelemesi, biyolojik, moleküler ve serolojik testlerin sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde enfeksiyon oranının % 39.17 olduğu görülmüştür. Enfekteli bulunan 47 örneğin 2 adedinde karışık enfeksiyon olduğu saptanmıştır. Alınan örneklerde karışık enfeksiyon oranı % 1.67 olarak bulunmuştur. RT-PCR ve DAS-ELISA testleri sonuçları bir arada ve özet halinde Çizelge 4.11’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11 İllere Göre Alınan Örneklerde Tespit Edilen Viral Etmenler

Örneklerin Alındığı İller	Toplam Örnek Sayısı	RT-PCR											
		Enfekteli Örnek Sayısı	AILV	AMCV	ArLV	AYRSV	ArLV+AYRSV	CMV	TBRV	TSWV	TMV	BBWV	PVX
Aydın	40	24	0	0	24	0	0	0	0	0	0	0	0
İzmir	64	21	0	0	11	3	2	5	0	0	0	0	0
Muğla	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toplam	120	45	0	0	35	3	2	5	0	0	0	0	0

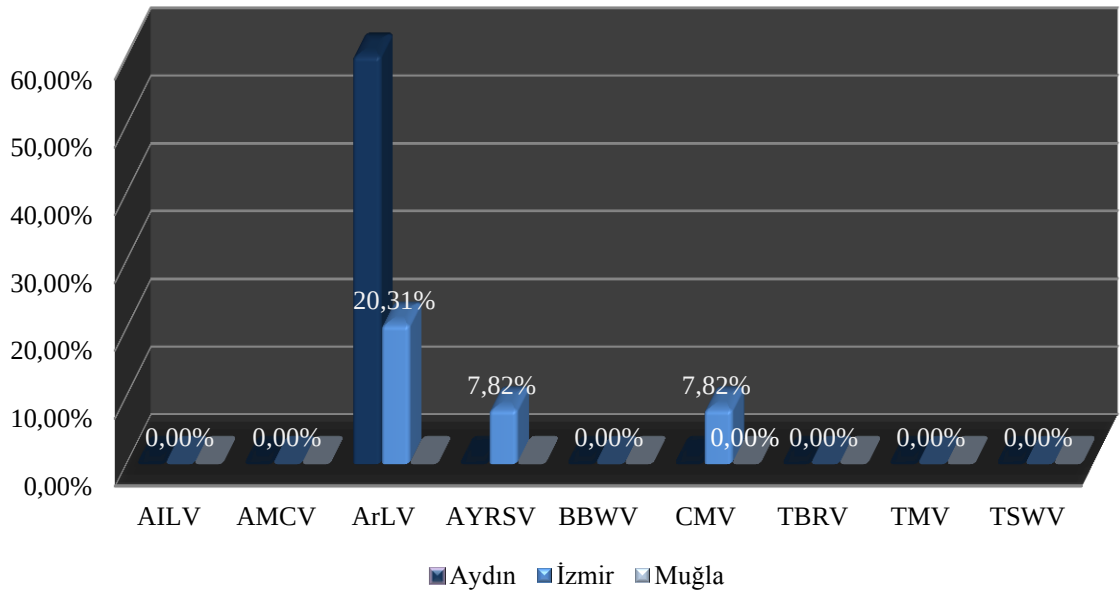
Örneklerin Alındığı İller	Toplam Örnek Sayısı	DAS-ELISA										
		Enfekteli Örnek Sayısı	CMV	TBRV	TSWV	TMV	BBWV	PVX	RpRSV-ch	RpRSV-g	TuMV	
Aydın	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
İzmir	64	5	5	0	0	0	0	0	5	0	0	
Muğla	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Toplam	120	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	

Araştırma kapsamında üretim alanlarından alınıp, değişik yöntemlerle testlenen örneklerde yaygın olarak görülen viral etmen ArLV olarak

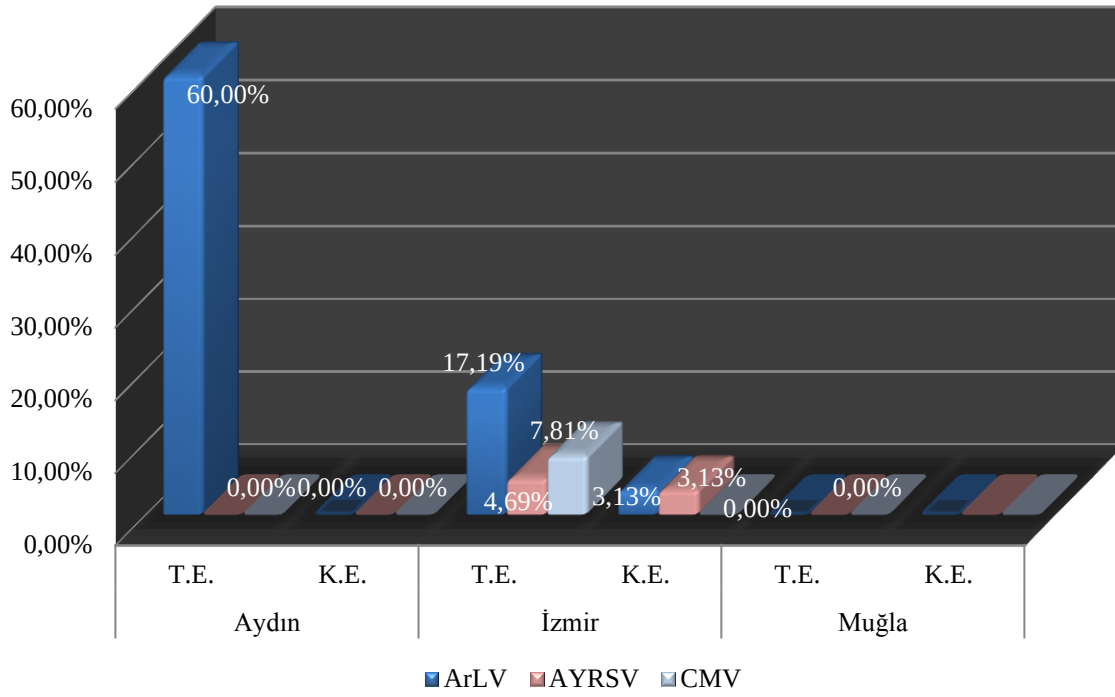
belirlenmiştir. Bunu AYRSV ve CMV izlemektedir. İzmir’den alınan 64 örneğin 11 adedinde ArLV tek enfeksiyonu, 3 adedinde AYRSV tek enfeksiyonu, 5 adedinde CMV tek enfeksiyonu ve 2 tanesinde ArLV+AYRSV karışık enfeksiyonu izole edilmiştir. İzmir ilinden alınan örneklerde karışık enfeksiyon görülme sıklığı 2/64 (% 3.13)’tür. Aydın’dan alınan 40 örneğin 24’ü ArLV ile enfekteli bulunmuştur. Aydın ilinden alınan örneklerde karışık enfeksiyona rastlanmamıştır. Muğla’dan alınan örneklerde ise herhangi bir viral enfeksiyon saptanmamıştır (Çizelge 4.12; Şekil 4.25 ve 4.26).

Çizelge 4.12 RT-PCR İle Tespit Edilen Virüsler, İzole Edildikleri İller Ve Bulunma Durumları

	AYDIN			İZMİR			MUĞLA		
	Tek E.	Karışık E.	Sağlıklı Örnek	Tek E.	Karışık E.	Sağlıklı Örnek	Tek E.	Karışık E.	Sağlıklı Örnek
AILV	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMCV	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ArLV	24	0	16	11	2	51	0	0	0
AYRSV	0	0	0	3	2	59	0	0	0
CMV	0	0	0	5	0	59	0	0	0
TBRV	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TMV	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TSWV	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 4.25 RT-PCR Yöntemi Sonuçlarına Göre İzmir, Aydın ve Muğla İllerindeki Enfeksiyon Oranı



Şekil 4.26 RT-PCR Yöntemi Sonuçlarına Göre İzmir, Aydın ve Muğla İllerindeki Karışık Enfeksiyon (K.E) ve Tek Enfeksiyon (T.E.) Oranı

5. TARTIŞMA

Üretimi yapılan birçok kültür bitkisinde olduğu gibi, enginar da verimi etkileyen birçok hastalık ve zararlı mevcuttur. Türkiye enginar üretimine son derece uygun ekolojik koşullara sahip olmasına rağmen, verim kaybına neden olan viral etmenler ile ilgili çok az sayıda çalışma yürütülmüştür.

Araştırma kapsamında son yıllarda ülkemizde üretimi artan enginarın özellikle İzmir ve Aydın illeri çevrelerinde viral etmenlerden kaynaklanan ürün kayıplarının arttığı yönünde alınan bilgiler üzerine, 2011-2012 yıllarında İzmir, Aydın, Muğla illeri ve ilçelerindeki enginar yetiştiriciliği yapılan alanlardan alınan örneklerde enfeksiyon oluşturan viral etmenlerin simptomatolojik, biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler ile tanıları yapılmış ve örneklerde viral etmenlerin bulunma durumları her il için ayrı ayrı belirlenmiştir (Çizelge 4.11, 4.12; Şekil 4.25, 4.26).

Araştırma için üretim alanlarından alınan 120 örnek ilk olarak arazide ve laboratuvar da simptomatolojik olarak incelenmiş ve bitkilerde yaygın olarak cüceleşme, gelişme geriliği, anormal/küçük baş oluşumu veya hiç baş oluşmaması, baş saplarında kısalmalar, sararma, aşırı yaprak oluşumu; bitki yapraklarında mozaik, beneklenme, sararma ve klorotik lekeler, meşe yapraklılık, damarlarda kalınlaşma, yaprak yüzeyinde pürüzlenme, asimetri oluşumu ve şekil bozuklukları gibi belirtiler gözlenmiştir (Şekil 4.1, 4.2, 4.3) Virüs benzeri belirti gösteren veya göstermeyen örneklerle daha sonra yürütülen serolojik, moleküler ve biyolojik test sonuçları, bitkilerde görülen belirtilerin virüslerden kaynaklanmış olabileceği gibi, diğer bitki patojenleri veya etkenler tarafından da oluşturulmuş olabileceğini de ortaya koymuştur. Bununla birlikte, simptomatolojik olarak virüs benzeri belirti göstermeyen örneklerde de latent virüs enfeksiyonları olabileceği yapılan çalışmalar sırasında saptanmıştır. Örneklerde yürütülen simptomatolojik gözlemlerin bazı durumlarda yetersiz kaldığı ancak, diğer tanılama yöntemleri için ön basamak oluşturabileceği gözlenmiştir.

Araştırma kapsamında enfekteli bulunan örneklerden seçilen 25 örnek ile yürütülen biyolojik test sonucunda test bitkilerinde gözlenen simptomlar, önceki

yıllarda bu konuda gerçekleştirilen araştırmaların bulguları ile büyük ölçüde paralellik göstermiştir (Neergaard, 1972; Gallitelli et al., 2004; Descriptions of Plant Viruses, 2012; Plant Viruses Online, 2012). Duyarlı test bitkilerine gerçekleştirilen mekanik inokulasyonlar sonucunda bitkilerde genel olarak, mozaik, şekil bozuklukları, deformasyonlar, beneklenmeler, klorotik lekeler vb. belirtiler gözlenmiştir.

DAS-ELISA ve RT-PCR ile AYRSV ile enfekteli olduğu belirlenen 4 örneğin *C. quinoa*, *G. globosa*, *C. sativus*, *N. glutinosa*, *N. tabacum* ve *P. vulgaris* bitkilerine inokulasyonları sonucunda oluşan belirtiler daha önceki çalışmalarda gözlenen belirtiler ile paralellik göstermektedir (Şekil 4.19-4.22) (Gallitelli et al., 2004; Descriptions of Plant Viruses, 2012; Plant Viruses Online, 2012).

ArLV ile enfekteli bulunan 11 örneğin *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *G. globosa*, *P. hybrida* ve *P. vulgaris* bitkilerine inokulasyonu sonucu bitkilerde gözlenen belirtiler (Şekil 4.23), literatürdeki veriler ile paralellik göstermesine rağmen, AYRSV ile karışık enfeksiyon halinde bulunan bitkilerde literatür bilgilerinden sapma olabileceği düşünülmektedir (Gallitelli et al., 2004; Descriptions of Plant Viruses, 2012; Plant Viruses Online, 2012).

CMV enfeksiyonu tespit edilen 3 örneğin *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *C. sativus*, *N. tabacum*, *N. clevelandii*, *N. glutinosa* ve *P. vulgaris*'e mekanik inokulasyonları sonucu literatürdekine benzer belirti oluşumları gözlenmiştir (Şekil 4.24) (Gallitelli et al., 2004; Descriptions of Plant Viruses, 2012; Plant Viruses Online, 2012).

Enginar, bir veya birden fazla virüsün karışık enfeksiyonlarının yaygın olarak görüldüğü bir bitki türüdür ve bu da belirtiyeye dayalı tanıyı oldukça zorlaştırmaktadır. Enginarda çoğu enfeksiyon latent oluşmakta ve bitki tek bir viral etmenle enfekteli bile olsa, çoğu kez bitkide net belirti oluşamamaktadır. Simptom oluşumu çeşit reaksiyonları, çevre koşulları, kültürel işlemler ve bitki yaşından etkilenmektedir (Gallitelli et al., 2004).

Bu nedenle, enginarda otsu indikatör bitkilerin kesin tanı için kullanımı, enginarda enfeksiyon oluşturan viral etmenlerin ortak konukçulara sahip olması, latent enfeksiyonlar ve aynı konukçuda benzer belirti oluşumları nedeniyle tercih edilmemektedir. Güvenilir tanı için konukçu dizininin geniş tutulması, uygun ortam ve çevre koşullarının hazırlanması gerekmektedir. Enginar virüslerinde otsu test bitkisi kullanımının bu gibi nedenlerden dolayı, diğer tanı tekniklerinin tam olarak yeterli olmadığı bazı viral etmenlerle sınırlı kaldığı belirtilmektedir (Gallitelli et al., 2004).

Ayrıca, biyolojik testlerin, sera ve iklim odası gibi kontrollü alanlara ihtiyaç duyması, belirti oluşumunun zaman alması, bitki özsuyuna geçebilen bazı virüs inhibitörlerinin indikatör bitkilerde belirti oluşumunu engellemesi, virüs konsantrasyonunun düşük olması nedeniyle belirti oluşmaması veya çok geç oluşması gibi birçok dezavantajı, araştırmacıları daha pratik ve kısa süreli tanılama yöntemi arayışı içerisine sokmuştur (Ball, 1974).

Araştırma kapsamında serolojik yöntem olarak kullanılan DAS-ELISA testi, antikör temelli bir yöntem olup 1977 yılında Clark ve Adams tarafından bitki virolojisine tanıtılmış ve bitki virüslerinin rutin tespitinde güvenilir ve hızlı bir yöntem haline gelmiştir (Portsmann and Kiessig, 1992). DAS-ELISA indirekt ELISA'dan daha spesifik olmasına rağmen, DAS-ELISA'nın çeşitli izolatları tespit edememe riski bulunduğu belirtilmektedir (Koenig, 1981). ELISA enginarda enfeksiyon oluşturan viral etmenlerin tespiti için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Ancak, enginarda enfeksiyon oluşturan her etmen için ticari tanı kitinin bulunmaması kullanımını sınırlandırmaktadır. Araştırma kapsamında enginar bitkilerinde enfeksiyon oluşturan ve ticari tanı kiti bulunan 8 etmen için DAS-ELISA testi uygulanmış, CMV hariç diğerleri negatif sonuç vermiştir. DAS-ELISA yöntemi ile örneklerde virüs bulunma oranı % 4.17 olarak belirlenmiştir.

Belirtilen sorunlara çözüm getirebilmek için enginar virüslerini hızlı, ekonomik ve güvenilir olarak tanılayabilecek bir yönteme ihtiyaç duyulmaktadır. Nükleik asit temelli yöntemler tanılamada önemli bir kullanım potansiyeli sunmaktadır. Yapılan çalışmalar, PCR yönteminin ELISA'ya oranla iki kat daha

güvenilir olduğunu ortaya çıkarmıştır (Jacobi et al., 1998). Yürütülen bir çalışmada (Paylan, 2011), farklı türlere ait tohumlar her üç yöntemle (DAS-ELISA, RT-PCR, mekanik inokulasyon) testlenmiş ve RT-PCR yönteminin virüs enfeksiyonlarını saptama oranı %100 olarak bulunurken, DAS-ELISA’da bu oran %96 olmuş, mekanik inokulasyonun tanılama başarısı ise %95 olarak saptanmıştır.

RT-PCR yönteminin bu başarısı spesifik nükleik asitlerin duyarlı şekilde çoğaltılmasına ve bitki dokularından ekstrakte edilen nükleik asit miktarı ve kalitesine bağlıdır (Sipahioğlu et al., 2006). Ekstraksiyon aşaması RT-PCR’ın güvenilirliği ve spesifikliğini etkileyen en önemli faktörlerin başında gelmektedir. Enginar yüksek oranda fenolik asitler, flavanoid ve antioksidan özellik gösteren birçok madde içermektedir (Izquierdio et.al., 2001; Hausler et al., 2002; Mulinacci et al., 2004; Curadi et al., 2005; Katırcıoğlu A., 2008). Ekstraksiyon aşamasında hücrelerin zarar görmesiyle açığa çıkan bu fenolik bileşikler, izole edilen nükleik asit kalitesi ve miktarını etkilemektedir (Compton et al., 1986; Laukkanen et al., 1999). Bu etkileri engellemek amacıyla bu çalışmada “silica capture (Foissac et al., 2001)” ve Fermentas marka ticari RNA izolasyon kiti “GeneJet™ Plant RNA Purification Mini Kit” RNA ekstraksiyon yöntemi olarak kullanılmıştır.

Bu amaçla her iki yöntemle de ekstrakte edilen örnekler ayrı değerlendirilmiş ve kullanılan her iki yöntem de oldukça duyarlı bulunmuştur (Şekil 4.4-4.8). Daha önce Lumia et al. (2003) ve Pasquini ve Barba’nın (2003) başka bir ticari firmaya ait ekstraksiyon kiti ile yürüttüğü çalışma sonuçlarına benzer şekilde “GeneJet™ Plant RNA Purification Mini Kit” de işlem süresini kısaltmış ve inhibitörleri herhangi bir ek çalışmaya gerek olmadan elimine etmiştir.

İzole edilen spesifik bir DNA parçasının *in vitro* koşullarda, kısa zincirli oligonükleotid primerler ve *Taq* DNA polimeraz enzimi yardımıyla kopyalanması şeklinde de tanımlanan PCR ile virüsün bitkideki varlığı gen düzeyinde belirlenebilmektedir. Çalışma kapsamında alınan tüm örnekler, Akdeniz havzası ve yurdumuza komşu ülkelerde sıklıkla izole edildiği belirtilen 8 etmene karşı (Gallitelli et al., 2004) spesifik primerler kullanılarak RT-PCR ile testlenmiştir.

Uygulanan RT-PCR testleri sonucunda İzmir, Aydın ve Muğla illeri ve ilçelerinde örneklerde virüs enfeksiyonu oranının % 39.17 olduğu belirlenmiştir. Bu oran iller bazında tek tek değerlendirildiğinde İzmir ilinde enfeksiyon oranı % 35.94 ve Aydın ilinde enfeksiyon oranı % 60.00 olarak tespit edilmiştir. Muğla’da ise hiçbir viral enfeksiyon tespit edilmemiştir (Çizelge 4.12; Şekil 4.25 ve 4.26).

Çalışma sonuçları, enfeksiyon oluşturma oranı en yüksek etmenin ArLV (%30.83) olduğunu göstermiştir. ArLV, non-persistent olarak *Myzus persicae*, *Brachycaudus cardui* ve *Aphis fabae* ile taşınabilen bir potyvirus türüdür (Rana et al., 1982; van Regenmortel, 2000; Gallitelli et al., 2004). Tohumla taşınmadığı belirtilen etmen (Lumia et al., 2003), özsu ile kolaylıkla taşınabilmektedir. Araştırma kapsamında ArLV izole edilen örneklerin birçoğunun aynı tarladan veya bitişigindeki üretim alanlarından alınmış olduğu tespit edilmiştir. Enginar ülkemizde vegetatif üretim yöntemi olan dip sürgünleri şeklinde üretilmektedir. Çoğaltma katsayısı düşük olan bu üretim şeklinin birçok hastalığın yeni plantasyonlara taşınmasına neden olduğu daha önce yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Ancora, 1986; Rossi and De Paoli, 1994). Akdeniz havzasındaki ülkelerdeki üretim alanlarında ekonomik öneme sahip ve geniş alana yayılmış bir etmen olduğu bilinen ArLV, özellikle yaprak bitleri ve klasik üretim yöntemi olan vegetatif üretim ile oldukça yüksek enfeksiyon oranına sahip olmakta ve hızla yayılmaktadır (Rana and Russo, 1980; Ortega et al., 2000; Pasquini and Barba, 2003). Bu problemin önüne geçilmesi için virüsten ari üretim materyali kullanımının önemi hakkında yürütülen çalışmalarda, enginar bitkilerinin *in vitro* kültürde üretimi ve termoterapi uygulamalarına dikkat çekilmiştir (Marras et al., 1982; Pecaüt et al., 1985; Gallitelli et al., 2004). Meristem kültürü virüsten ari üretim materyali eldesinde daha etkili bir yöntem olmakla birlikte, Brindisino, Violetto di Provenza ve Catanese erkenci çeşitleriyle yürütülen bir çalışmada meristem kültürü ile üretilen bitkilerin çiçeklenme zamanlarının değiştiğini ve erkenci özelliğini kaybettiğini ortaya koymuştur (Peña-Iglesias and Ayuso-Gonzales, 1974; 1982, Harbaoui et al., 1982). Ayrıca, meristem kültürü ile üretimde ArLV eliminasyonunun sağlandığı (Pasquini et al., 2003; Papanice et al., 2004) görülmüştür.

Çalışma kapsamında alınan ve yürütülen tanılama testleri sonucunda ArLV ile enfekteli olduğu belirlenen örneklerden bazıları literatürdekine benzer şekilde belirti göstermeyen bitkilerdir (Costa et al., 1959; Marrou and Mehani, 1964; Fischer and Lockhart, 1974b; Foddai et al., 1977). ArLV enfeksiyonu tespit edilen bazı bitkilerde ise klorotik leke oluşumları, pürüzlenme, küçük baş oluşumları, damar kalınlaşmaları ve yaprak ayalarında daralma gibi belirtiler de gözlenmiştir. Ancak, bu belirti oluşumlarına abiyotik faktörlerin neden olabileceği gibi, belirtilerin çalışma kapsamında testlenen 12 viral etmen haricindeki virüslerden veya diğer biyotik faktörlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, daha önce Gallitelli et al. (2004)'un belirttiği üzere, karışık enfeksiyon bulunan bitkilerde bazı farklı belirti oluşumları gözlenebilmektedir.

AYRSV izole edilen bitkilerde sıklıkla görülen belirtiler parlak sarı veya klorotik halka lekeler (Şekil 4.2a, b), klorotik çizgi ve lekeler (Şekil 4.3d, e, f), meşe yapraklılık (Şekil 4.2a, b, g) ve şekil bozukluğu (Şekil 4.2e, f, h ve Şekil 4.3i) şeklindedir. Araştırma kapsamında AYRSV izole edilen bitkilerde gözlenen belirtiler daha önce Kyriakopoulou and Bem (1973) ve Rana et al. (1978) tarafından tanımlanan belirtilere paralellik göstermektedir. Ancak, ArLV ile karışık enfeksiyon durumunda bulunan iki örnekte sözü edilen belirtiler görülmemiş sadece mozaik oluşumu kaydedilmiştir (Şekil 4.2c, Şekil 4.3c). Bu da enginarda belirtilere dayalı tanının oldukça yanıltıcı olabileceğini düşündürmektedir.

CMV'nin izole edildiği bitkilerde daha önce belirlenmiş (Lisa, 1971; Migliori et al., 1984) belirtilere benzer şekilde beneklenme, şekil bozukluğu (Şekil 4.2d ve Şekil 4.3h) ve mozaik (Şekil 4.3a, b) belirtileri gözlenmiştir.

Çalışmada kapsamında RT-PCR ve etmene spesifik primerler ile izole edilen ArLV ve AYRSV izolatları, ülkemizde yeni tespit edilen virüslerdir. Bu nedenle izolatların nükleotid dizilerinin belirlenmesi, dünya izolatlarıyla karşılaştırılması ve filogenetik ağaç oluşturulması için çalışmalar yürütülmüştür. Bu amaçla izolatlar İontek firmasına gönderilerek nükleotid dizilerinin belirlenmesi sağlanmıştır. PCR ürünlerinden elde edilen bu sekanslar NCBI gibi gen bankalarındaki diğer izolatlarla benzerlik-farklılık açısından kıyaslanabilmektedir.

Bu şekilde benzerlik oranları belirlenen izolatlar arasındaki akrabalık ve farklılıkların ortaya koyulması açısından soy ağaçları çıkarılmaktadır (Fidan, 2010).

Bu çalışmada izole edilen ArLV izolatları sekanslama için İontek firmasına gönderilmiş, elde edilen nükleotid dizilimleri NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information, 2012) kullanılarak, dünyadaki izolatlarla kıyaslanmıştır. X87255.1 kodlu "Artichoke latent potyvirus mRNA unknown function (523 bp)" ile %86 oranında benzerlik gösteren izolatlar, değişik programlar kullanılarak yapılan filogenetik sınıflandırmalara tabi tutulmuştur. Üretilen filogenetik ağaçlarda izolatlar, BLAST sonucunda benzerlik oranı yüksek olan X87255.1 "Artichoke latent potyvirus mRNA unknown function (523 bp)" ile aynı grupta, HQ449550.1 kodlu "Ranunculus latent virus isolate RN128 polyprotein gene, partial cds" izolat ile farklı grupta yer almıştır.

İzmir'den izole edilen diğer bir etmen olan AYRSV için, spesifik primerin çoğalttığı bölgenin gen dizilimini belirlemek amacıyla sekanslama yapılmıştır. İzolat %92 oranında AM087671.2 "Artichoke yellow ringspot partial gene for polyprotein genomic RNA, from *Allium cepa*" izolatıyla ve %91 oranında *Vicia faba* (AM087672.1) ve *Cynara scolymus* (AM087673.1) ile benzerlik göstermiştir. Yapılan filogenetik ağaç çalışmalarıyla İzmir'den izole edilen etmen *Allium cepa* izolatıyla aynı grupta yer alırken, *C. scolymus* ve *V. faba* izolatları başka bir grupta yer almıştır.

Virüs enfeksiyonların çeşitli kültür bitkilerinde neden oldukları zararlarla ilgili pek çok araştırma yapılmış olmasına karşın, viral etmenlerin enginar bitkisinde neden olduğu verim ve ekonomik kayıplar ile ilgili bilgiler henüz yeterli değildir. Dünya genelinde yapılan çalışmalar, daha çok enginarın konukçuluk ettiği viral etmenlerin belirlenmesine yöneliktir. Enginar bitkilerinde 15 genus'a bağlı 24 viral etmen belirlenmiş olsa da neden oldukları verim kayıpları ile ilgili araştırmalar ArLV üzerine yoğunlaşmış olup (Foddai et al., 1983a, 1983b; Migliori et al., 1987; Rana et al., 1992; Manzanares et al., 1993; Camele et al., 1999), ACDV (University of California Agriculture & Natural Resources, 2012), BBWV (Migliori et al., 1987; Manzanares et al., 1993), CMV

ve TBRV (Migliori et al., 1987) enfeksiyonlarının etkileri ile ilgili yapılmış birkaç çalışma ile sınırlanmıştır. Ülkemizde ise doğrudan enginar virüslerine yönelik yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

2011 ve 2012 yılları arasında yürütülen bu çalışmanın tamamlanması ile Ege Bölgesi enginar üretim alanlarında enfeksiyon oluşturan viral etmenler ve bulunma oranları belirlenmiştir. Türkiye’de enginar virüsleri hakkında yürütülen ilk kapsamlı çalışma olan bu araştırma ile enginarda enfeksiyon oluşturan viral etmenlerin ülkemizdeki durumları hakkında önemli bir açığın kapatılmasında ilk adım atılmış ve literatüre katkı yapılmıştır. Bu araştırma sonuçlarının gelecekte yapılacak olan araştırmalara yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Bu araştırmada elde edilen bulgular, bazı viral etmenlerin ülkemizdeki varlığına ilişkin ilk gösterge olmuştur. Örneklerden izole edilen ArLV, AYRSV ve CMV doğal enfeksiyonları, mevcut bilgilerimize göre Ege Bölgesi’nde ve Türkiye’de adı geçen virüsler için ilk kayıt olma özelliği taşımaktadır.

Çalışma kapsamında ülkemizde varlığı ilk kez saptanan viral etmenler sekanslamaya tabi tutularak primerlerin çoğalttığı kısımların genom yapıları belirlenmiş, dünyadaki benzer izolatlarla karşılaştırılmış, filogenetik ağaçlar yardımıyla da benzerlikleri belirlenmiştir.

Araştırma sonuçları 2011-2012 yılları arasında İzmir, Aydın ve Muğla illerinden alınan örneklerle ait verilerdir. Ekolojik faktörler, tarladaki vektör ve yabancı ot popülasyonlarına göre hastalık oranlarının her yıl değişiklik gösterebileceği göz önünde tutulmalıdır. Araştırma süresince enfekteli bulunan örneklerin genellikle aynı tarladan olduğu veya çok yakın tarlalardan olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeninin klasik dip sürgünü üretim yöntemi olduğu düşünülmektedir.

Araştırma sonuçları, enginarda karışık enfeksiyonların görülebildiği ve bu durumun bitkide oluşan belirtileri ve verime etkilerini değiştirebildiği düşüncelerini kanıtlar nitelikte sonuçlar ortaya koymuştur.

Çalışmada enginar virüslerinin tanılanmasında DAS-ELISA ve RT-PCR gibi güvenilir, hassas ve hızlı yöntemler kullanılmıştır. Kullanılan prosedürler,

primerler gibi bazı bilgiler viral enfeksiyonların tespitinde yöntem seçimi için referans oluşturabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada tanılama amacıyla kullanılan DAS-ELISA yöntemi, enginarda hastalık oluşturan her viral etmene ait ticari antiserumların bulunmaması ve örnek alınma zamanına bağlı olarak bitkide virüs konsantrasyonlarının değişmesi nedeniyle, enginar virüslerinin teşhisinde rutin kullanımını sınırlamaktadır.

RT-PCR ise birçok viral etmen gibi enginar virüslerinin de tanısında duyarlı ve güvenilir bir yöntem olarak belirlenmiştir. RT-PCR testleriyle denemelerle belirlenen pozitif örneklerin tamamı saptanarak %100 oranında başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlandırılan bu araştırma, RT-PCR yönteminin enginar virüslerinin tanılanmasında duyarlı ve güvenli bir yöntem olduğunu belirten çalışmaları destekler sonuçlar vermiştir. Biyolojik ve serolojik testlerle saptanamayan bazı enfeksiyonların RT-PCR ile tanılanması moleküler yöntemlerin etkinliğinin yüksekliğini vurgulamaktadır. Ancak, çok sayıda kimyasal madde, alet ve ekipmanlara gereksinimi, test aşamalarının yoğunluğu ve pahalı oluşu RT-PCR kullanımını kısıtlamaktadır.

Araştırmadan elde edilen sonuçların değerlendirilmesi ile şu önerilerin yapılması uygun görülmüştür:

- ✓ Enginar ülkemizde giderek üretimi artan bir sebzedir. Viral enfeksiyonların bitkilerde neden olduğu verim kayıpları hakkında net veriler bulunmamaktadır. Bu konuda araştırmacılar teşvik edilmelidir.
- ✓ Enginar genellikle klasik vejetatif çoğaltma yöntemiyle üretilen bir bitkidir. Enginarda enfeksiyon oluşturan birçok etmenin bu şekilde yeni üretim alanlarına taşınabileceği göz ardı edilmemelidir.
- ✓ Hastalıktan ari üretim materyali kullanımının enfeksiyonlardan korunmadaki en önemli faktör olduğunun kabul edilmesi ve üretim materyallerinin hastalık etmenleri açısından yeterli ve güvenli biçimde kontrollerinin yapılması gerekmektedir.

- ✓ Tespit edilen virüslerin yayılmasında ve taşınmasında etkili olan vektör böcekler ve yabancı otların yok edilmesi enfeksiyonların önlenmesinde diğer önemli bir faktördür. Ayrıca vektör böcekler ve yabancı otların virüs-vektör-konukçu ilişkilerinin belirlenmesi üzerine daha detaylı çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.
- ✓ Enginarda enfeksiyon oluşturan birçok viral etmenin ticari tanı kiti bulunmaması, DAS-ELISA yönteminin tanıda kullanımını kısıtlamaktadır. Ayrıca, yüksek fenolik madde içerikleri ve virüs konsantrasyonunun bitkinin çeşitli dönemlerinde büyük değişikliklere uğraması DAS-ELISA'nın etkinliğini azaltmaktadır.
- ✓ Yapılan bu çalışmada RT-PCR'ın güvenilir ve duyarlı olduğu bir kez daha belirlenmiştir. Enginar virüslerinin tanılanmasında DAS-ELISA yönteminden ziyade RT-PCR gibi yüksek duyarlılıklı moleküler yöntemlerin tercih edilmesi önerilmektedir.
- ✓ Çeşitli moleküler teknikler kullanılarak ülkemizde bulunan virüs izolatları ırk düzeyinde tanılanmalı, genetik yapıları ve dünya izolatlarıyla aralarındaki genomik farklılıklar belirlenmelidir.
- ✓ Yapılan survey çalışmaları sırasında, üreticilerin özellikle viral etmenlerin oluşturduğu hastalıkları tanımadıkları tespit edilmiştir. Bu nedenle virüs hastalıkları, mücadele ve önlem olanakları hakkında üreticilere yönelik eğitim çalışmalarının yapılması önemlidir.
- ✓ Ülkemizde konu ile ilgili çalışmalara devam edilmesi, bu kapsamda olası yeni virüs, vektör ve konukçuların bulunması ve bilinen viral etmenlerin epidemiyolojilerinin tanımlanmasına yönelik araştırmaların artırılması gerekmektedir.
- ✓ Elde edilen bu bulgular, bu yönde çalışma yapan dünyanın farklı bölgelerinden diğer bilim insanları ile paylaşılarak yeni projelerin üretilmesine olanak sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abak, K.**, 1987, Enginar ve Kuşkonmaz Yetiştiriciliği, TAV Yay., Yalova, 64s.
- Adams, M.J., Antoniw, J.F., Bar-Joseph, M., Brunt, A.A., Candresse, T., Foster, G.D., Martelli, G.P., Milne, R.G. and Fauquet, C.M.**, 2004, The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology* **149**:1045-1060.
- Alp, H.A.**, 2008, Enginarda Doku Kültürü Koşullarının İyileştirilmesine Yönelik Çalışmalar. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Bornova-İzmir, 82 s.
- Ancora, G.**, 1986, Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 2: Crops, 1 Berlin, p. 471-484.
- Angelis, A.D. and Vovlas, C.**, 1989, Artichoke yellow ringspot nepovirus naturally infecting cucumber in Crete. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **95**: 177-184.
- Angelis, A.D., Katis, N. and Grammatikaki, G.**, 1992, Broad bean wrinkly seed caused by artichoke yellow ringspot nepovirus. *Annals of Applied Biology* **121**: 133-142.
- Ball, E.M.**, 1974, Serological Tests for Identification of Plant Viruses. The American Phytopathological Society, Plant Virology Committee, Minesota. 31p.
- Basnizki, J.**, 1979, Research on growth physiology of the artichoke. Estratto da Atti 3° Congresso Internazionale Du Stud. Carciofo, 27-30, Bari.
- Bayraktar, K.**, 1981, Sebze Yetiştirme, Cilt III. Kültür Sebzeleri, E.Ü.Z.F. Yayınları, No: 169, İzmir.
- Bertelsen, D., Dismukes, R., Harwood, J., Somwaru, A. and Zepp, G.**, 1995, Globe artichokes: An economic assessment of the possibility of providing multiple-peril crop, Office of Risk Management-U.S Department of Agriculture: Prepared by The Economic Research Service, 1-29.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Brunt, A.A.**, 1986, Tomato mosaic virus. In: Van Regenmortel M.H.V., Fraenkel-Conrat H. (eds). The Plant Viruses. The Rod-shaped Plant Viruses, pp. 181-204. Plenum Press, New York.
- Cadman, C.H.**, 1960, Studies on the relationship between soil-borne viruses of the ringspot type occurring in Britain and continental Europe. *Virology* **11**:653-664.
- Camele, I. and Rana, G.L.**, 1999, Rinvenimento di infezioni del Tospovirus della bronzatura del pomodoro (TSWV) in due composite coltivate in Basilicata. *Journal of Plant Pathology* **81**: 229.
- Camele, I. and Rana, G.L.**, 2005, New Outbreaks of *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV) Infections on Globe Artichoke in Basilicata and Apulia. *ACTA Hort.* **681**: 593-595. Proc. IV th Intern. Congr. On Artichoke.
- Camele, I., Candido, V., Rana, G.L. and Palumbo, M.**, 1999, Effetti morfologici e produttivi dell'infezione del potyvirus latente del carciofo. *Petria* **9**: 43-52.
- Camele, I., Nuzzaci, M., Rana, G.L. and Kyriakopoulou, P.E.**, 1991, *Papaver rhoeas* L., a host of two pathogenic viruses of cultivated plants. *Petria* **1**: 111-115.
- Candresse, T., Lanneau, T., Revers, F., Grasseau, N., Macquare, G., German, S., Malinowsky, T. and Dunez, J.**, 1995, An Immunocapture PCR Assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of apple chlorotic leaf spot virus. *Acta Horticulture*, **386**:136-147.
- Chabbouh, N. and Cherif, C.**, 1990, Outbreaks and new records. Tunisia. Cucumber mosaic virus in artichoke. *FAO Plant Protection Bulletin* **35**: 52-53.
- Chabbouh, N.**, 1989, Mise en évidence de quatre virus présents sur l'artichaut en Tunisie. *Annales de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie* **62**: 3-14.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chabbouh, N., Cherif, C. and Martelli, G.P.,** 1990, Natural Infections of Artichoke by Potato Virus X in Tunisia. *J. Phytopathology*, **129**: 257-260.
- Chagas, C.M. and Silberschmidt, K.M.,** 1972, Virus da faixa amarela da alcachofra: ocorrência, transmissão mecânica e propriedades físicas. *Biologico* **38**: 35-40.
- Chagas, C.M., Flores, M. and Carner, J.,** 1969, Una nova doença de vírus da alcachofra no Estado de São Paulo. *Biologico* **35**: 271-274.
- Cieślińska, M.,** 2004, Detection of Strawberry mottle virus (SMoV) using RT-PCR-Comparison of two RNA extraction methods. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, Vol. **12**, 2004:17-22.
- Ciuffo, M., Testa, M., Lenzi, R. and Turina, M.,** 2011, Ranunculus latent virus: a strain of artichoke latent virus or a new macluravirus infecting artichoke?. *Arc. Virol.* DOI 10.1007/s00705-011-0949-4.
- Clark, M.F. and Adams, A.N.,** 1977, Characteristic of Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Plant Viruses. *J. Gen. Virol.*, **34**: 475-483.
- Compton, M.E. and Preece, J.E.,** 1986, Exudation and explant establishment. *NS Int. Assn. Plant Tissue Culture* **50**: 9-18.
- Costa A.S., Duffus J.E., Morton D., Yarwood C.E. and Bardin R.,** 1959. A latent virus of California artichokes. *Phytopathology* **49**: 49-53.
- Costa, A.S. and Tasaka, H.,** 1971, Enfezamento e malformação foliar de alcachofra inducido pelo vírus da necrose branca do fumo. *Biologico* **37**: 176-179.
- Costa, A.S., Duffus, J.E., Morton, D., Yarwood, C.E. and Bardin, R.,** 1959, A latent virus of California artichokes. *Phytopathology*, **49**: 49-53.
- Cugusi, M., Foddai, A. and Idini, G.,** 1994, Detection of Artichoke Latent Virus by an Indirect Dot-ELISA. *J. Phytopathology*, **132**: 265-272.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Curadi, M., Picciarelli, P., Lorenzi, R., Graifenberg, A. and Ceccarelli, N.,** 2005, Antioxidant activity and phenolic compounds in the edible parts of early and late Italian artichoke (*Cynara scolymus* L.) varieties. *Ital. J. Food Sci.*, **17**:33-44.
- Curt, M.D., Sanchez, G. and Fernandez, J.,** 2002, The potential of *Cynara cardunculus* L. for seed oil production in a perennial cultivation system, *Biomass and Bioenergy*, **23**:33-46.
- De Blas C, Borza MJ, Saiz M And Romero, J.,** 1994, Broad Spectrum Detection Of Cucumber Mosaic Virus (CMV) Using The Polymerase Chain Reaction. *Journal Of Phytopathology* **141**: 323–329.
- De Vos, N.E.,** 1992, Artichoke production in California. *Hort Technology* **2** (4): 438-444.
- Derrick, K.S.,** 1973, Quantitative assay for plant viruses using serologic specific electron microscopy. *Virology*, **56**: 652-653.
- Descriptions of Plant Viruses, “DPV Name Index”,**
<http://www.dpvweb.net/dpv/dpvnameidx.php> (Erişim Tarihi: 10 Haziran 2012).
- Di Franco, A., Gallitelli, D., Vovlas, C. and Martelli, G.P.,** 1989, Partial Characterization of Artichoke Virus M. *J. Phytopathology*, **127**: 265-273.
- Erkan, S. ve Ergün, M.,** 2012, Enginarada Görülen Virüs Hastalıkları. *Hasad Bitkisel Üretim*, **27(320)**:82-89.
- Erkan, S., Gümüş, M., Türküsay, H. ve Duman, İ.,** 1995, Sanayi Domatesi Çeşitlerine Ait Tohum Örneklerinde Tohum Kaynaklı Bazı Hastalık Etmenlerinin Bulunma Durumunun Saptanması Üzerinde Araştırmalar.
- Ernst, E.,** 1995, Die Artischocke: eine Heilpflanze mit Geschichte und Zukunftsperspektive. *Naturamed* 1995, **10**:1 – 4
- Eser, B., İlbi, H. ve Uğur, A.,** 2006, Enginar Yetiştiriciliği, Hasat Yayıncılık Ltd. Şti., Ekim 2006, s. 7.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- European Bioinformatics Institute**, “ClustalW2-Multiple Sequence Alignment”,
<http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=clustalw2>
 (Erişim Tarihi: 20 Kasım 2012).
- Fidan, H.**, 2010, Sarımsak, Soğan ve Pırasadaki Virüs Hastalıklarının Saptanması ve Taşköprü 56 Sarımsak Tipinin En Yaygın Virüse Karşı Reaksiyonunun Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enst. Doktora Tezi, Adana, 163 sayfa.
- Figueiredo, S.F.L., Albarello, N. and Viana, V.R.C.**, 2000, Micropropagation of *Rollinia Mucosa* (Jacq.) Baill. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* **37**:471-475, July-August 2001.
- Fischer, H.V. and Lockhart, B.E.**, 1974a, Occurrence in Morocco of a virus disease of artichoke related to artichoke mottled crinkle. *Plant Disease Reporter* **58**:1117-1120.
- Fischer, H.V. and Lockhart, B.E.**, 1974b, A Moroccan isolate of Artichoke latent virus. *Plant Disease Reporter* **58**: 1123-1126.
- Foddai, A., Corda, P. and Idini G.**, 1983a, Influenza del potyvirus latente del carciofo spinoso sardo sulla produttività delle piante in pieno campo. I. Risultati relativi al primo anno di impianto. *Rivista di Patologia Vegetale* **19**: 29-35.
- Foddai, A., Corda, P. and Idini, G.**, 1983b, Influenza del potyvirus latente del carciofo spinoso sardo sulla produttività delle piante in pieno campo. II. Risultati relativi al secondo anno di impianto. *Annali della Facoltà di Agraria dell'Università di Sassari* **30**: 37-43.
- Foddai, A., Cugusi, M. and Idini, G.**, 1993, Artichoke (*Cynara scolymus* L.): a new host for turnip mosaic virus. *Phytopathologia Mediterranea* **32**: 247-248.
- Foddai, A., Marras, F. and Idini, G.**, 1977, Presenza di un “*Potyvirus*” sul Carciofo (*Cynara scolymus* L.) in Sardegna. *Annali della Facoltà di Agraria dell'Università di Sassari* **25**: 398-407.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Foddai, A., Marras, F. and Idini, G.,** 1992, Il saggio immunoenzimatico (ELISA) per la diagnosi del Potyvirus latente del carciofo. *Rivista di Patologia Vegetale* **18** (S. IV): 103-107.
- Foissac, X., Savalle-Dumas, L., Gentit, P., Dulucq, M.J., Candresse, T.,** 2001, Polivalent detection of Fruit tree Tricho, Capillo and research Number 45:33-35.
- FAO,** 2010,. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> (Erişim Tarihi: 08 Haziran 2012).
- Foti, S., Mauromicale, G., Raccia, S.A., Fallico, B., Fanella, F. and Maccarone, E.,** 1999, Possible alternative utilization of *Cynara Cardunculus*, *Industrial Crops and Products*, **10**:219-228.
- Francki, R.I.B.,** 1979, Cucumber Mosaic Virus. *C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses* No: 213 (No:1 revised), 6 p.
- Fulton, J.P.,** 1950, Studies on Strains of Cucumber Virus I from Spinach, *Phytopathology*, **40**:729-436p.
- Gallitelli, D.,** 1983, Pelargonium zonate spot virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, N. 272.
- Gallitelli, D., Rana, G.L. and Di Franco, A,** 1978, Il virus della scolorazione perinervale del carciofo. *Phytopathologia Mediterranea* **17**: 1-7.
- Gallitelli, D., Rana, G.L. and Di Franco, A,** 1984, Artichoke vein bading virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, N. 285.
- Gallitelli, D., Rana, G.L., Vovlas, C. and Martelli, G.P.,** 2004, Viruses of Globe Artichoke: An Overview, *Journal of Plant Pathology*, **86**:(4, Special Issue), 267-281.
- Gracia, O. and Feldman, J.M.,** 1978, Natural infection of Artichoke by tomato spotted wilt virus. *Plant Disease Reporter* **62**: 1076-1077.
- Grieco, F. and Gallitelli, D.,** 1999, Multiplex Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Applied to Virus Detection In Globe Artichoke. *J. Phytopathology*, **147**: 183-185.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gümüş, M.**, 1998, İzmir İlinde Biberlerdeki Viral Hastalık Etmenlerinin ve Oranlarının Saptanması ve Bazı Biber Çeşitlerinin Bu Virüslere Reaksiyonların Belirlenmesi Üzerine Araştırmalar, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Ziraat fak., Bornova, İzmir, 1998.
- Günay, A.**, 1993, Özel Sebze Yetistirciliği, 5, 90-97.
- Harbaoui, Y., Samijn, G., Welvaert, W. and Debergh, P.**, 1982, Assainissement viral de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) par la culture in vitro d'apex méristématiques. *Phytopathologia Mediterranea* **21**: 15-19.
- Harrison, B.D.**, 1958, Further studies on raspberry ringspot and tomato black ring soil-borne viruses that affect raspberry. *Ann. Appl. Biol.* **46**:571-584.
- Hausler, M., Ganzera, M., Abel, G., Popp, M. and Stuppner, H.**, 2002, Determination of caffeoylquinic acids and flavonoids in *Cynara scolymus* L. by high performance liquid chromatography. *Chromatographia*, **56**:407-411.
- Horst, R.K.**, 2008, Westcott's Plant Disease Handbook, 7th Edition. Springer Verlag. 729 pp.
- INRA**, 2011,. <http://www.inra.fr/> (Erişim tarihi: Ekim 2011)
- Iontek**, 2012, <http://www.iontek.com.tr/> (Erişim Tarihi: 20.11.2012).
- Izquerdio, A.G., Gil, M.I., Conesa, M.A. and Ferreres, F.**, 2001, Innovative Food Science & Emerging Technologies **1**:75-202.
- Jacobi, V., Bachand, G.D., Hamelin, R.C. and Castello, J.D.**, 1998, Development of A Multiplex Immunocapture RT-PCR Assay for Detection and Differentiation of Tomato and Tobacco Mosaic Tobamoviruses. *Journal of Virological Methods* **74**: 164-178.
- Jankulova, M., Savino, V., Gallitelli, D., Quacquarelli, A. and Martelli, G.P.**, 1977, Isolation of artichoke Italian latent virus from Grapevine in Bulgaria. In: *Proceedings of the 6th Meeting of ICVG, Cordova* 1976, 143-147.
- Juretić, N.**, 1978, Tomato mosaic virus infection of glasshouse tomato crops in Yugoslavia. *Acta Bot. Croat.* , **29**:17-26.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kaper, J.M and Waterworth, H.M.**, 1981, Cucumoviruses, Hand Book of Plant Virus Infections, Holland, 257-33p.
- Katırcıoğlu, Atabek, A.**, 2008, *Cynara scolymus* L.'un fitoterapideki kullanımı üzerine araştırmalar. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 71 sayfa, Ankara.
- Klug, S.W. and Cummings, W.R.**, 2000, Concept of Genetics. Prentice Hall, New Jersey, 745 pp.
- Koçer G.**, 1993, Sakız Enginar Çeşitinde (*Cynara scolymus* L. Cv. Sakız) Verim Dağılımına, Bitki Yaşı, Uyandırma Suyu Veriliş Zamanı ve GA3 Uygulamalarının Etkilerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Doktora Tezi. E.Ü. Ziraat Fakültesi.
- Koenig, R.**, 1981, Indirect ELISA Methods for the Broad Specificity Detection of Plant Viruses. *Journal of General Virology* **55**, 53-62.
- Kyriakopoulou, P.E. and Bem, F.P.**, 1973, Some virus diseases of cultivated plants noticed in Greece in the years 1971 and 1972. In: *Proceedings of the 1st Symposium of Geotechnical Research, Athens 1973*, 409-418.
- Kyriakopoulou, P.E. and Bem, F.P.**, 1982, Artichoke Marathon yellow blotch, a new virus disease of artichoke. *Benaki Phytopathology Institute Annual Report 1982*: 90-91.
- Kyriakopoulou, P.E.**, 1981, Two new virus diseases of tobacco due to artichoke yellow ringspot virus, alone and in mixed infection with tobacco mosaic virus. In *Abstracts of Panhellenic Congress of Geotechnical Research, Halkidiki*, pp. 120-121.
- Kyriakopoulou, P.E.**, 1995, Artichoke Italian latent virus causes artichoke patchy chlorotic stunting disease. *Annals of Applied Biology* **127**: 489-497.
- Kyriakopoulou, P.E., Rana, G.L. and Roca, F.**, 1985, Geographical distribution, natural host range, pollen and seed transmissibility of artichoke yellow ringspot virus. *Annales de l'Institute Phytopathologique Benaki* **14**: 139-155.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Laukkanen, H., Häggman, H., Kontunen-Soppela, S. and Hohtola, A.,** 1999, Tissue browning of in vitro cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. *Physiologica Plantarum* **106**: 337-343.
- Le Gall, O., Candresse, T. and Dunez, J.,** 1995, Transfer of the 31 non-translated region of grapevine chrome mosaic virus RNA-1 by recombination to tomato black ring virus RNA-2 in pseudorecombinant isolates. *Journal of General Virology*, **76**: 1285-1289.
- Leach L.D. and Oswald J.W.,** 1950, Curly dwarf, a virus disease of globe artichoke. *Phytopathology* **40**: 967-968.
- Lee, S.H., Kim, H.R., Kim J.H. and Kim, J.S.,** 2004, Improvement of RT-PCR sensitivity for fruit tree viruses by Small-scale dsRNA extraction and sodium sulfite. *Plant Pathology J.*:**20** (2) 142-146.
- Lisa, V.,** 1971, Two viruses naturally infecting cultivated cardoon (*Cynara cardunculus* L.). *Phytopathologia Mediterranea* **10**: 231-237.
- Lotos, L., Efthimiou, K., Chatzivassiliou, E.K., Dimou, D. and Katis, N.I.,** 2009, First Report of Tomato spotted wilt virus in Globe Artichoke In Greece. *Journal of Plant Pathology*, **91**(4, Supplement): S4.97.
- Lumia, V., Pasquini, G. and Barba, M.,** 2003, Sensitive Detection of Artichoke Latent Virus In Globe Artichoke Field Samples by One-Step RT-PCR or Tissue Imprint Hybridization. *J. Phytopathology*, **151**: 477-479.
- Macit, F. ve Şalk A.,** 1970, Enginar. E.Ü. Ziraat Fakültesi Teknik.No.14.
- MacKenzie, D.J, Mclean, M.A., Mukerji, S. and Green, M.,** 1997, Improved RNA extraction from woody plants for detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease*, **81**(2):222-226.
- Majorana, G. and Rana, G.L.,** 1970a, Un nuovo virus latente isolato da carciofo in Puglia. *Phytopathologia Mediterranea* **9**:193-196.
- Majorana, G. and Rana, G.L.,** 1970b, A latent virus of artichoke belonging to potato virus S group. *Phytopathologia Mediterranea* **9**: 200-202.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Maliogka, V.I., Dovas, C.I., Lesemann, D.E., Winter, S. and Katis, N.I.,** 2006, Molecular Identification, Reverse-Transcription-Polymerase Chain Reaction Detection, Host Reactions, and Specific Cytopathology of Artichoke yellow ringspot virus Infecting Onion Crops. *Phytopathology*, **96**(6): 622-629.
- Manzanares, M.J., Corre, J., Le Saint, J.P. and Herve, Y.,** 1993, Effects of artichoke latent virus and broad bean wilt virus isolate FA on components of growth and yield of globe artichoke. *Plant Pathology*, **42**:378-388.
- Marras, F., Foddai, A. and Fiori M.,** 1982, Possibilità di risanamento del carciofo da infezioni virali mediante coltura *in vitro* di apici meristematici. In: *Atti Giornate Fitopatologiche, Sorrento 1982*, 151-158.
- Marrou, J. and Mehani, S.,** 1964, Etude d'un virus parasite de l'artichaut. *Comptes Rendues de l'Académie d'Agriculture de France* **50**: 1051-1064.
- Martelli, G.P. and Rana, G.L.,** 1976, Viruses and virus diseases of globe artichoke and cardoon. In: *Nuovi Studi sul Carciofo. Atti del 2° Congresso Internazionale di Studi sul Carciofo, Bari 1973*, 811-830.
- Martelli, G.P. and Russo, M.,** 1977, Rhabdoviruses of Plants. In: Maramorosch K. (ed.), *The Atlas of Insect and Plant Viruses*, pp. 181-213. Academic Press, New York, USA.
- Martelli, G.P. and Russo, M.,** 1984, The use of thin sectioning for visualization and identification of Plant Viruses. *Methods in Virology* **8**: 143-224.
- Martelli, G.P.,** 1965, L'arricciamento maculato del carciofo. *Phytopathologia mediterranea* **4**, 58-60.
- Martelli, G.P., Gallitelli, D. and Russo, M.,** 1988, Tombusviruses. In *The Plant Viruses. Ill. Polyhedral Virions with Monopartite RNA Genomes*, pp. 13-72. Edited by R. Koenig. New York: Plenum Press.
- Martelli, G.P., Rana, G.L. and Savino, V.,** 1977, Artichoke Italian latent virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* 176.
- Martelli, G.P., Russo, M. and Rana, G.L.,** 1976, Occurrence of Artichoke mottled crinkle virus in Malta. *Plant Disease Reporter* **60**: 130-133.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Martelli, G.P., Russo, M. and Rana, G.L.,** 1981, A survey of the virological problems of *Cynara* species. In: *Atti del 3° Congresso Internazionale di Studi sul Carciofo, Bari 1981*, 895-927.
- Matthews, R.E.F.,** 1991, Plant Virology, 3rd ed., Acad. Pres, New York, 897 pp.
- Maxam, A. and Gilbert, W.,** 1977, A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **74**: 560-4.
- Mayr, A. and Fröhlich, E.,** 1965, Zwei Jahrtausende Artischocke, *Cynara scolymus*. *Oesterr. Apoth. Ztg.* 1965, **19**, 468 – 471
- Migliori, A. and Marzin, H.,** 1985, Présence du tobacco rattle virus (TRV) dans les cultures d'artichaut en France. *Agronomie* **5**: 549-552.
- Migliori, A., Fouville, D. and Rana, G.L.,** 1989, Detection du virus latent de l'artichaut (ALV) et du virus du fletrissement de la fève (BBWV), souche FA, par le test ELISA. *PHM-Revue Horticole* **299**: 59-64.
- Migliori, A., Homo, E., Corre, J., Marzin, H., Legal, V. and Curvale, J.-P.,** 1987, Repartition, fréquence et nuisibilité des virus chez l'artichaut en Bretagne. *PHM-Revue Horticole* **247**:29-36.
- Migliori, A., Lot, H., Pécaut, P., Duteil, M. and Rouzé-Jouan, J.,** 1984, Les virus de l'artichaut. I. Mise en evidence de trois virus dans les cultures françaises d'artichaut. *Agronomie* **4**:257-268.
- Milne, R.G. and Luisoni, R.,** 1977, Rapid immune electron microscopy of virus preparations. *Methods in Virology* **6**: 265-281.
- Mlayah, B.B., Lopez, S. and Delmas, M,** 1997, Oil and paper pulp from *Cynara Cardunculus*: Preliminary results, *Industrial Crops and Products*, **6**, 233-236.
- Morison, N., Vaissiere, BE., Martin, F., Pecaut, P. and Cambon, G.,** 2000, Pollination of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by honey bees (*Apis mellifera* L.) to produce hybrid seed under enclosure. *APIDOLOGIE*.
- Morton D.J.,** 1961, Host range and properties of the globe Artichoke curly dwarf virus. *Phytopathology* **51**: 731-734.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mulinacci, N., Prucher, D., Peruzzi, M., Romani, A., Pinelli, P. and Giaccherini, C.**, 2004, Commercial and laboratory extracts from artichoke leaves estimation of caffwoyl esters and flavonoidic compounds content. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**:349-357.
- Mumford, R.A., Barker, I. and Wood, K.R.**, 1994, The Detection of Tomato Spotted Wilt Virus Using The Polymerase Chain Reaction. *J. Virol. Methods*, **46**: 303- 311.
- Murant, A.F., Jones, A.T., Martelli, G.P. and Stace-Smith, R.**, 1996, Nepoviruses: general properties, diseases and virus identification. In: Harrison B.D., Murant A.F. (eds). *The Plant Viruses: Polyhedral Virions and Bipartite RNA Genomes*, pp. 99-137. Plenum Press, New York, USA.
- Müller, A., Diemann, E. and Sassenberg, P.**, 1988, Chromium contents in medicinal plants used for treating diabetes mellitus type II. *Naturwissenschaften* **75** (3) 155-156.
- National Center for Biotechnology Information**, 2012,. “Basic Local Alignment Search Tool” <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> (Erişim Tarihi: 20 Kasım 2012).
- Neergaard, P.**, 1972, International and National Cooperation in Seed Health Testing and Certification. *Proc.Int. Seed Test.Ass.* **37**: 117-138.
- Neergaard, P.**, 1988, *Seed Pathology Vol. I and II*, MacMillan Pres, Hong Hong, XXV+1191p.
- Nod, C., Hieltoff, A. and Ganger, C.**, 1999, Globe artichoke: An economic assessment of the possibility of providing multiple-peril crop, Office of Risk Management-U.S Department of Agriculture: Prepared by The Economic Research Service, 36-41.
- Nogay, A.**, 1983, Marmara bölgesi cucurbitaceae familyası kültür bitkilerinde görülen virüs hastalıklarının tanılanması, tohumla geçiş durumlarının ve konukçu dizilerinin saptanması üzerinde araştırmalar. (Doktora tezi). Erenköy- İstanbul,120s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Noordam, D.**, 1973, Identification of Plant Viruses, Methods and Experiments, PUDOC, Wageningen, the Netherlands, 208p.
- Noveriza, R., Suastika, G., Hidayat, S.H. and Kartosuwondo, U.**, 2012, *Potyvirus* Associated With Mosaic Disease On Patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.) Plants In Indonesia. *J. ISSAAS*, **18** (1), 131-146.
- Ortega, A.M., Jua`rez, M., Armengol, J. and Jorda, M.C.**, 2000, Viral diseases in artichoke crops in Spain. *IVth International Congress on Artichoke. Valenzano (BA)*, 100.
- Ortega, R.G.**, 2002, Effect of head position and climatic conditions on seed yield of globe artichoke (*Cyanara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori), *Scientia Horticulturae*, **93**, 187-192.
- Ortega, A.M., Juárez, M., Jordá, M.C. and Armengol, J.**, 2005, Viral Diseases In Artichoke Crops In Spain. *ISHS ACTA Horticulturae 681 IV. International Congress on Artichoke*. ISSN: 0567-7572, Italy.
- Papanice, M.A., Campanale, A. Bottalico, G., Sumerano, P. and Gallitelli, D.**, 2004, Produzione di germoplasma risanato di carciofo Brindisino. *Italus Hortus* **11** (in press).
- Paradies, F., Finetti-Sialer, M., Di Franco, A., and Gallitelli, D.**, 2000, First report on the occurrence of cucumber mosaic virus in artichoke in Italy. *Journal of Plant Path.* **82**:244.
- Park, K and Cha, B.**, 2002, Detection of TMV, ToMV and CMV from tomato seeds and plant. *Research in Plant Disease*, **8 (2)**: 101-106.
- Pasquini, G. and Barba, M.**, 2003, Evidence of viral infections in late artichoke cv. Romanesco. *Acta Hort.* (in press).
- Pasquini, G. and Barba, M.**, 2005, Evidence of Viral Infections in Late Artichoke cv. Romanesco. *Acta Hort.* **681**:597-602.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pasquini, G., Barba, M., Papanice, M. and Gallitelli, D.,** 2003, Produzione di germoplasma di carciofo virus-esente. In: *Atti Giornate Nazionali di Studi sul Carciofo, Vivaismo e strategie di sviluppo del Carciofo, Samassi (Cagliari)* 2003, 60-63.
- Pasquini, G., Lumia, V. and Barba, M.,** 2004, Diagnosis of Artichoke latent virus (ArLV) and Other Relevant Viruses In "Late" Artichoke Germoplasm. *ISHS Acta Horticulturae* **660**: V International Congress on Artichoke ISSN: 0567-7572, Spain.
- Paylan, İ.C.,** 2011, Bazı Sebze Türlerinin Tohumlarındaki Virüslerin Belirlenmesi ve Tohumlardaki Viral Enfeksiyonların İnaktifleştirilmesi Üzerinde Araştırmalar.. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. 147 s., İzmir..
- Pecaut, P.J., Corre, J., Lot, H. and Migliori A.,** 1985, Interet des plantes sains d'artichaut regénérées par la culture in vitro. *PHM- Revue Horticole* **20**: 256.
- Pelt, J.M.,** 1993, Des Legumes, Livre de poche. Fayard (1993).
- Peña-Iglesias, A. and Ayuso-Gonzales, P.,** 1972, Degeneration of Spanish globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) plants. Virus isolation, host range, purification and ultrastructure of infected hosts. *Annales de l'Institut National de Investigaciones Agronomicas* **2**: 89-122.
- Peña-Iglesias, A. and Ayuso-Gonzales, P.,** 1974, The elimination of viruses from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by etiolated meristem tip culture. In: *Proceedings of 19th International Horticulture Congress, Varsaw* 1974, 63.
- Peña-Iglesias, A. and Ayuso-Gonzales, P.,** 1982, The elimination of some globe artichoke viruses by shoot apex culture and in vitro micropropagation of the plant. In: *Proceedings of the 4th Conference of the I.S.H.S. Vegetable Virus Working Group, Wellesbourne* 1982, 47.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Peña-Iglesias, A., Rubio-Huertos, M. and Moreno, S.R.,** 1972, Un virus de tipo bacilliforme en alcachofra (*Cynara scolymus*). *Annales de l'Institut National de Investigaciones Agronomicas* **2**: 123-137.
- Plant Viruses Online,** 2012, "Artichoke latent potyvirus (ArLV)" <http://pvo.bio-mirror.cn/descr040.htm> (Erişim Tarihi: 08 Haziran 2012).
- Porstmann, T. and Kiessig, S.T.,** 1992, Enzyme Immunoassay Techniques, An Overview. *Journal of Immunological Methods* **150**, 5-21.
- Quacquarelli, A. and Martelli, G.P.,** 1966, Ricerche sull'agente dell'arricciamento maculato del carciofo. Ospiti differenziali e proprietà. In: *Proceedings of the 1st Congresso dell'Unione Fitopatologica Mediterranea*, Bari-Napoli 1996, p. 168-177.
- Quacquarelli, A., Rana, G.L. and Martelli, G.P.,** 1976, Weed hosts of plant pathogenic viruses in Apulia. *Agriculturae Conspectus Scientificus* **39**: 651-653.
- Rabaneda, F.S., Jauregui, O., Raventos, R.S.L., Bastida, J., Viladomat, F. and Codina, C.,** 2003, *Journal of Chromatography A*, 1008, 57-72.
- Rana, G.L. and Cherif, C.,** 1981, Occurrence of artichoke mottled crinkle virus in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea* **20**: 179-180.
- Rana, G.L. and Kyriakopoulou, P.E.,** 1980, Bean yellow mosaic virus in artichokes in Greece. In: *Proceedings 5th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*, Patras 1980, 38-40.
- Rana, G.L. and Kyriakopoulou, P.E.,** 1982, Artichoke Italian latent and artichoke mottled crinkle viruses in artichoke in Greece. *Phytopathologia Mediterranea* **22**: 46-48.
- Rana, G.L. and Martelli, G.P.,** 1983, Virosi del carciofo. *Italia Agricola* **120**: 27-38.
- Rana, G.L. and Roca, F.,** 1973, Trasmissione con nematodi del virus italiano latente del Carciofo (AILV). Atti II Congr. Internaz. Studi Carciofo, Bari, Novembre 1973.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rana, G.L. and Roca, F.**, 1976, Trasmissione con nematodi del virus “latente italiano del carciofo” (AILV). In: *Atti del 2° Congresso Internazionale di Studi sul Carciofo, Bari 1973*, 855-858.
- Rana, G.L. and Russo, M.**, 1980, Le virosi del carciofo in Italia: possibilità di prevenzione e lotta. *Atti Giorn. Fitopatol.* **2**, 85-93.
- Rana, G.L., Castrovilli, S., Gallitelli, D. and Kyriakopoulou, P.E.**, 1985, Studies on two serologically distinct raspberry ringspot virus strains from artichoke. *Phytopathologische Zeitschrift* **112**: 222-228.
- Rana, G.L., Di Franco, A. and Galasso, I.**, 1988, Further studies on *Cynara rhabdovirus*. *Journal of Phytopathology* **123**: 147-155.
- Rana, G.L., Elia, A., Nuzzaci, M. and Laforteza, R.**, 1992, Effect of artichoke latent virus infection on the production of Artichoke heads. *Journal of Phytopathology* **135**: 153-159.
- Rana, G.L., Gallitelli, D., Kyriakopoulou, P.E., Russo, M. and Martelli, G.P.**, 1980, Host range and properties of Artichoke yellow ringspot virus. *Annals of Applied Biology* **96**: 177-185.
- Rana, G.L., Kyriakopoulou, P.E., and Martelli, G.P.**, 1983, Artichoke yellow ringspot virus. *C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses*, N. 271.
- Rana, G.L., Migliori, A. and Ragozzino, A.**, 1987, La maculatura gialla del carciofo in Campania e Puglia. *Informatore Fitopatologico* **37**: 41-43.
- Rana, G.L., Piazzolla, P., Laforteza, R. and Greco, N.**, 1989, Characterization of a latent elongated virus from globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.) in Italy. *Journal of Phytopathology* **125**: 289-298.
- Rana, G.L., Rosciglione, B. and Cannizzaro, G.**, 1978, La maculatura anulare gialla del cardo e del carciofo. *Phytopathologia Mediterranea* **17**: 63-64.
- Rana, G.L., Russo, M., Gallitelli, D. and Martelli, G.P.**, 1982, Artichoke latent virus: characterization, ultrastructure, and geographical distribution. *Annals of Applied Biology* **101**: 279-289.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Repetto, A., Cadinu, M., Leoni, S., Gallitelli, D., Saldarelli, P., Barbarossa, L. and Grieco D.,** 1997, Effetto della coltura *in vitro* di apici meristematici sull'ottenimento di piante di carciofo "Spinoso sardo" e "Masedu" esenti da virus. *Notiziario sulla Protezione delle Piante* **7**: 189-195.
- Richardson, M.J.,** 1990, An Annotated List of Seed Borne Diseases. The International Seed Testing Association Zurich, Switzerland.
- Robinson, D.J. and Clark, J.,** 1987, Genome sequence homology among strains of raspberry ringspot nepovirus. *Report of the Scottish Crop Research Institute* 1986: 172.
- Roca, F., Martelli, G.P., Lamberti, F. and Rana, G.L.,** 1975, Distribution of *Longidorus attenuatus* Hooper in Apulian Artichoke fields and its relationship with artichoke Italian latent virus. *Nematologia Mediterranea* **3**: 91-101.
- Roca, F., Rana, G.L. and Kyriakopoulou, P.E.,** 1982, *Longidorus fasciatus* Roca et Lamberti vector of a serologically distinct strain of artichoke Italian latent virus in Greece. *Nematologia Mediterranea* **10**: 65-69.
- Roca, F., Rana, G.L. and Kyriakopoulou, P.E.,** 1986, Studies on *Longidoridae* (Nematoda: Dorylaimida) and raspberry ringspot virus spread in some artichoke fields in Greece. *Nematologia Mediterranea* **14**: 251-256.
- Rossi, V. and De Paoli, G.,** 1994, Micropropagation of artichoke, *L'informatore agrario*, 118-134.
- Rottenberg, A. and Zohary, D.,** 1996, The wild ancestry of the cultivated artichoke. *Genetic Resources & Crop Evolution*. **43** (1): 53-58.
- Russo, M. and Rana, G.L.,** 1978, Occurrence of two legume viruses in Artichoke. *Phytopathologia Mediterranea* **17**: 212-216.
- Russo, M., Martelli, G.P. and Rana, G.L.,** 1975, A rhabdovirus of Cynara in Italy. *Phytopathologische Zeitschrift* **83**: 223-231.
- Ryder, E.J., De Vos, N.E. and Bari, M.A.,** 1983, The Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.) . *Hort. Sci.*, **18**: 646-653.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Saldarelli, P., Barbarossa, L., Grieco, F. and Gallitelli, D.,** 1996, Digoxigenin-labelled riboprobes applied to phytosanitary certification of tomato in Italy. *Plant Disease* **80**: 1343-1346.
- Salomão, T.,** 1976, Soil transmission of artichoke yellow band virus. In: *Studi sul Carciofo. Atti del 2° Congresso Internazionale di Studi sul Carciofo, Bari* 1973, 831-854.
- Samuitienė, M. and Navalinskienė, M.,** 2008, Occurrence of Cucumber Mosaic Cucumovirus On Ornamental Plants In Lithuania. *Zemdirbyste-Agriculture*, **95** (3:135–143).
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.,** 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **74**, 5463-7.
- Savino, V., Gallitelli, D., Jankulova, M. and Rana, G.L.,** 1977, A comparison of four isolates of artichoke Italian latent virus (AILV). *Phytopathologia Mediterranea* **16**: 41-50.
- Silva, R.M., E.R., Souto, J.C., Pedroso, R. Arakava, A.M., Almeida, A. Barboza and Vida, J.,** 2008, Detection and Identification of TMV Infecting Tomato Under Protected Cultivation in Paraná State. *Brazilian Archives of Biology and Technology, An International Journal*, **51**(5):903-909.
- Sipahioğlu, H.M., Ocak, M. and Usta, M.,** 2007, Comparison of Three Conventional Extraction Methods for the Detection of Plant Virus/Viroid RNAs from Heat Dried High-phenolic Host Leaves. *Asian Journal of Plant Sciences* **6** (1):102:107.
- Sipahioğlu, H.M., Usta, M. and Ocak, M.,** 2006, Use of dried high-phenolic laden host leaves for virus and viroid preservation and detection by PCR methods. *J. Virol. Methods*, 2006 Oct; **137** (1): 120-4. Epub 2006 Aug 1.
- Sonnante, G., De Paolis, A., Lattanzio, A. and Perrino, P.,** 2001, Genetic variation in wild and cultivated artichoke revealed by RAPD markers *Genetic Resources and Crop Evolution* **49**: 247–252, 2002.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Şahan, S.**, 2008, Ege Bölgesi'nde Enginarlarda Görülen Hastalıklar. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Lisans Tezi, 21 s., Bornova-İzmir.
- Şimşek, Y.E.**, 2006, C3 Enerji Bitkisi Olan Enginar (*Cynara cardunculus* L.) Sağlarının Pirolyzi ve Biyoyakıt Üretiminin İncelenmesi. Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enst. Doktora Tezi. 163 sayfa. Eskişehir.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S.**, 2011, MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* **28** (10):2731-2739.
- Tavazza, M., Lucioli, A., Calogero, A., Pay, A. and Tavazza, R.**, 1994, Nucleotide sequence, genomic organization and synthesis of infectious transcripts from a full-length clone of artichoke mottle crinkle virus. *J. of General Virology*, **75**:1515-1524.
- Taylor, C.E., Robertson, W.M. and Roca, F.**, 1976, Specific Association of Artichoke Italian Latent Virus with the Odontostylr of Its vector, *Longidorus attenuatus*. *Nematol. Medit.* **4**: 23-30.
- Taylor, R.H., Grogan, R.G. and Kimble, K.A.**, 1961, Transmission of Tobacco Mosaic Virus in Tomato Seed. *Phytopathology*, **51**:837-842.
- Tervel, G., Hieltoff, A. and Ganger, C.**, 1998, Globe artichokes: An economic assessment of the possibility of providing multiple-peril crop, Office of Risk Management-U.S Department of Agriculture: prepared by The Economic Research Service, 36-41.
- Toth, K., Haapala, T. and Hohtola, A.**, 1994, Alleviation of browning in oak explants by chemical pretreatments. *Biologia Plantarum* **36**:511-517.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Trebaol, G., Gardan, L. Manceau, C., Tanguy, J.L., Tirilly, Y. and Boury, S.,** 2000, Genomic and phenotypic characterization of *Xanthomonas cynarae* sp. nov., a new species that causes bacterial bract spot of artichoke (*Cynara scolymus* L.), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**, p. 1471–1478.
- Türkiye İstatistik Kurumu,** 2011, “Bitkisel Üretim İstatistikleri” http://www.tuik.gov.tr/VeriTabanlari.do?ust_id=13&vt_id=36 (Erişim tarihi: 07 Haziran 2012)
- Uğur A.,** 2005, Enginarın Hızlı Çoğaltılmasında Bazı Vegetatif Yöntemlerin Kullanılma İmkânlarının Araştırılması. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. Bornova-İzmir.
- United States Department of Agriculture,** 2007, “Economic Research Service” www.ers.usda.gov/Data/fruitvegphyto/Data/veg-artichoke.xls (Erişim tarihi: 06 Haziran 2012)
- University of California Agriculture & Natural Resources,** 2012, “Statewide Integrated Pest Management Program Online” <http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r6100711.html> (Erişim Tarihi: 16 Ekim 2012).
- Vamos-Vigyazo, L.,** 1981, Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* , **14**: 49-123.
- van Regenmortel, M.H.V.,** 1981, In: E. Kurtsak (ed), Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. Elsevier, North Holland Biomedical Pres, Amsterdam, p. 541.
- van Regenmortel, M.H.V.,** 2000, On the relative merits of italics, Latin and binomial nomenclature in virus taxonomy. *Arch. Virol.* **145**, 433–441.
- Vovlas, C. and Laforteza, R.,** 1994, Il virus dell'avvizzimento maculato del pomodoro su carciofo in Puglia. *Informatore Fitopatologico* **44**: 42-44.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vovlas, C. and Roca, F.**, 1975, Trasmissione con nematodi dell'agente della maculatura anulare clorotica della cicoria, un ceppo del virus latente italiano del carciofo. *Nematologia Mediterranea* **1**: 83-90.
- Vovlas, C., Martelli, G.P. and Quacquarelli, A.**, 1971, Le virosi delle piante ortensi in Puglia. Il complesso delle maculature anulari della cicoria. *Phytopathologia Mediterranea* **10**: 244-254.
- Vural, H., Eşiyok D. ve Duman, İ.**, 2000, Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme). E.Ü. Basım evi, Bornova-İzmir.
- Vural, H., Eşiyok, D. ve Duman, İ.**, 1996, Kültür Sebzeleri, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 394-409.
- Walker, P.J., Benmansour, A., Dietzgen, R., Fang, R.-X., Jackson, A.O., Kurath, G., Leong, J.C., Nadi-Davies, S., Tesh, R.B., Tordo, N.**, 2000, Order *Mononegavirales*. In: Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Wickner R.B. (eds.). *Virus Taxonomy. 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 525-583. Academic Press, San Diego, USA.
- Walkey, D.G.A.**, 1991, *Applied Plant Virology*. Great Britain by St Edmundsbury Press, 338 p.
- Wilde, J., Eiden, J. and Yolken, R.**, 1990, Removal inhibitory substances from human fecal specimen for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. *J. Clin. Microbiol.*, **28**:1300-1307.
- Wilson, A.D.**, 1983, Studies of Two Cucumber Mosaic Virus Isolates from Spinach in the Winter Garden Area of Texas. M.S thesis, Texas A&M Universty, College Station.
- Wohlmuth, H.**, 2003, Botanical Pathways (www.botanicalpathways.com) 10,24

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yang, Y., Correll, J.C., Morelock, T.E., and Anderson, E.J.,** 1993, Characterization of a Seed-Transmitted of Cucumber Mosaic Virus (CMV) Isolate from Spinach (*Spinacia Olerecea*), *Phytopathology*, **83**:1403.
- Yorgancı, Ü.,** 1975, İzmir İlinde Domateslerdeki Virüs Hastalıkları, Yayılma ve Zarar Durumları, Elde Edilen İzolatlarla Biyolojik ve Serolojik Araştırmalar (Doçentlik Tezi). TOAG/127 No'lu Proje Nihai Raporu. Ege Üniv. Ziraat Fak. Bornova-İzmir. 102 s.

ÖZGEÇMİŞ

Araştırmacı 03/09/1988 tarihinde İzmir’de doğdu. İlköğretimini İzmir Dokuz Eylül İlköğretim Okulu ve Bornova Merkez İlköğretim Okulu’nda tamamladı. 2002 yılında İzmir Cem Bakioğlu Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi’nde lise öğrenimine başladı. 2006 yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ziraat Mühendisliği bölümüne girdi. 2008-2010 yılları arasında Ege Üniversitesi Tohum Teknolojisi Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde yarı zamanlı olarak çalıştı. 2010 yılında Bitki Koruma Alt Programından mezun oldu. Aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilimdalı, Fitopatoloji Bilimdalında yüksek lisans eğitimine başladı.

EKLER

Ek 1. “Silica Capture” ve “GeneJet™ Plant RNA Purification Mini Kit”
Yöntemlerinde Kullanılan Kimyasallar

Ek 2. İzmir, Aydın ve Muğla Üretim Alanlarındaki Bitkilerde Gözlenen
Belirtiler

**EK 1. “Silica Capture” ve “GeneJet™ Plant RNA Purification Mini Kit”
Yöntemlerinde Kullanılan Kimyasallar**

“Silica Capture” Yönteminde Kullanılan Kimyasallar

Grinding Buffer

- Guanidine thiocyanate 4 M
- NaOAc 0.2 N (pH:5.2)
- EDTA 25 mM
- KOAc 1M
- PVP-40 2.5% (w/v)
- Mercaptanol

NaI Solüsyonu (6M)

- Na₂SO₃
- NaI

Washing Buffer

- Tris-HCl 110mM (pH:7.5)
- EDTA 5M (0.5 mM)
- NaCl 50mM (0.5M)
- Ethanol 50%

Silica

- Silicon dioxide

**EK 1. “Silica Capture” ve “GeneJet™ Plant RNA Purification Mini Kit”
Yöntemlerinde Kullanılan Kimyasallar (devam)**

**“GeneJet™ Plant RNA Purification Mini Kit” Yönteminde Kullanılan
Kimyasallar**

- Plant RNA Lysis Solution
- DTT- Dithiothreitol
- Washing Buffer Solution 1
- Washing Buffer Solution 2
- Ethanol

**Agarose Jel Hazırlığı ve Elektroforez Aşamasında Kullanılan
Kimyasallar**

50X TAE

- Tris-Base (pH 8.0)
- Glacial acetic acid
- 0.5 M EDTA

EK 2. İzmir, Aydın ve Muğla Üretim Alanlarındaki Bitkilerde Gözlenen Belirtiler

Örnek No	İzmir İlinden Alınan Örneklerde Gözlenen Belirtiler																						İzole Edilen Viral Etmen
	AnB	A	AY	B	BSD	BŞB	Be	C	DK	Da	GG	KaM	K	KİL	KB	Kü	MeY	M	P	SK	S	ŞB	
İ-1												+							+			+	-
İ-2							+	+				+							+			+	-
İ-3								+					+									+	-
İ-4								+						+							+	+	-
i-5														+								+	-
İ-6										+													-
İ-7													+			+							-
İ-8										+			+										CMV
İ-9		+						+						+									AYRSV
İ-10							+	+		+													-
İ-11			+					+					+										-
İ-12							+							+									CMV
İ-13																				+		+	-
İ-14							+			+	+												-
İ-15							+	+	+							+							-
İ-16								+			+			+								+	-
İ-17		+												+								+	CMV
İ-18		+						+			+				+								-
İ-19		+											+										-
İ-20										+			+						+				-
İ-21	+	+											+									+	-
İ-22							+	+						+								+	AYRSV
İ-23					+		+										+	+					AYRSV
İ-24		+											+									+	CMV
İ-25		+				+							+									+	-
İ-26										+				+	+								-
İ-27		+								+				+	+								-
İ-28					+		+										+	+					-
İ-29														+								+	-
İ-30														+		+							ArLV
İ-31								+						+									-
İ-32									+				+									+	-

AnB: Anormal Baş Oluşumu, A: Asimetri Oluşumu, AY: Aşırı Yaprak Oluşumu, B: Baş Oluşumu Yok, BSD: Baş Sapı Deformasyonu, BŞB: Başta Şekil Bozukluğu, Be: Beneklenme, C: Cücelik, DK: Damar Kalınlaşması, Da: Daralma, GG: Gelişme Geriliği, KaM: Kabarcıklı Mozaik, K: Kıvrılma/Bükülme, KİL: Klorotik Lekeler, KB: Küçük Baş Oluşumu, Kü: Küçülme, MeY: Meşe Yapraklılık, M: Mozaik, P: Pürüzlenme, SK: Saptı Kısılma, S: Sararma, ŞB: Şekil Bozukluğu

EK 2. İzmir, Aydın ve Muğla Üretim Alanlarındaki Bitkilerde Gözlenen Belirtiler

Örnek No	Alınan Örneklerde Gözlenen Belirtiler																						İzole Edilen Viral Etmen
	AnB	A	AY	B	BSD	BŞB	Be	C	DK	Da	GG	KaM	K	KİL	KB	Kü	MeY	M	P	SK	S	ŞB	
İ-33							+							+								+	-
İ-34										+													-
İ-35				+						+			+										-
İ-36									+	+				+	+				+				ArLV
İ-37													+	+				+				+	-
İ-38		+																	+				-
İ-39								+										+				+	ArLV
İ-40														+				+					ArLV
İ-41														+				+			+		ArLV
İ-42		+																+					-
İ-43																		+			+	+	ArLV
İ-44								+										+					-
İ-45																		+				+	ArLV
İ-46																		+					-
İ-47																		+					-
İ-48																		+					ArLV, AYRSV
İ-49		+																+					ArLV,AYRSV
İ-50		+									+							+					-
İ-51																		+				+	-
İ-52								+										+					-
İ-53		+							+									+					CMV
İ-54																		+				+	-
İ-55																		+			+	+	ArLV
İ-56																		+				+	-
İ-57																		+				+	-
İ-58																		+				+	-
İ-59													+					+					ArLV
İ-60																		+				+	-
İ-61		+																+					-
İ-62																		+					ArLV
İ-63																		+					ArLV
İ-64																							-

AnB: Anormal Baş Oluşumu, A: Asimetri Oluşumu, AY: Aşırı Yaprak Oluşumu, B: Baş Oluşumu Yok, BSD: Baş Sapı Deformasyonu, BŞB: Başta Şekil Bozukluğu, Be: Beneklenme, C: Cücelik, DK: Damar Kalınlaşması, Da: Daralma, GG: Gelişme Geriliği, KaM: Kabarcıklı Mozaik, K: Kıvrılma/Bükülme, KİL: Klorotik Lekeler, KB: Küçük Baş Oluşumu, Kü: Küçülme, MeY: Meşe Yapraklılık, M: Mozaik, P: Pürüzlenme, SK: Saptı Kısılma, S: Sararma, ŞB: Şekil Bozukluğu

EK 2. İzmir, Aydın ve Muğla Üretim Alanlarındaki Bitkilerde Gözlenen Belirtiler (devam)

Örnek No	Aydın İlinden Alınan Örneklerde Gözlenen Belirtiler																							İzole Edilen Viral Etmen
	AnB	A	AK	B	BSD	BŞB	Be	C	DK	Da	DRA	GG	KaM	K	KİL	KB	Kü	MeY	M	P	SK	S	ŞB	
A-1															+							+	+	ArLV
A-2															+				+					ArLV
A-3																			+			+		ArLV
A-4		+																	+					-
A-5																			+			+		ArLV
A-6															+				+	+				ArLV
A-7															+				+	+				ArLV
A-8															+								+	ArLV
A-9															+			+	+				+	ArLV
A-10															+				+	+				ArLV
A-11															+				+					ArLV
A-12															+				+					ArLV
A-13															+				+					-
A-14		+																	+					-
A-15															+				+					ArLV
A-16																			+					ArLV
A-17															+				+				+	ArLV
A-18																			+	+				ArLV
A-19											+	+							+					-
A-20																		+						ArLV
A-21														+					+					ArLV
A-22																						+		ArLV
A-23																			+					ArLV
A-24															+				+					ArLV
A-25															+				+				+	-
A-26		+									+													ArLV
A-27															+				+					-
A-28																			+			+		-
A-29											+											+		ArLV
A-30											+											+		-
A-31																			+					-

AnB: Anormal Baş Oluşumu, A: Asimetri Oluşumu, AY: Aşırı Yaprak Oluşumu, B: Baş Oluşumu Yok, BSD: Baş Sapı Deformasyonu, BŞB: Başta Şekil Bozukluğu, Be: Beneklenme, C: Cücelik, DK: Damar Kalınlaşması, Da: Daralma, DRA: Damarlarda Renk Açılması, GG: Gelişme Geriliği, KaM: Kabarcıklı Mozaik, K: Kıvrılma/Bükülme, KİL: Klorotik Lekeler, KB: Küçük Baş Oluşumu, Kü: Küçülme, MeY: Meşe Yapraklılık, M: Mozaik, P: Pürüzlenme, SK: Saptı Kısalma, S: Sararma, ŞB: Şekil Bozukluğu

EK 2. İzmir, Aydın ve Muğla Üretim Alanlarındaki Bitkilerde Gözlenen Belirtiler (devam)

Örnek No	Aydın İlinden Alınan Örneklerde Gözlenen Belirtiler																						İzole Edilen Viral Etmen
	AnB	A	AY	B	BSD	BŞB	Be	C	DK	Da	GG	KaM	K	KİL	KB	Kü	MeY	M	P	SK	S	ŞB	
A-32																		+	+			+	-
A-33																		+				+	-
A-34		+																+					-
A-35													+					+					-
A-36		+																+					-
A-37		+																+					-
A-38		+																+			+		ArLV
A-39																		+					ArLV
A-40		+						+										+					-

AnB: Anormal Baş Oluşumu, A: Asimetri Oluşumu, AY: Aşırı Yaprak Oluşumu, B: Baş Oluşumu Yok, BSD: Baş Sapı Deformasyonu, BŞB: Başta Şekil Bozukluğu, Be: Beneklenme, C: Cücelik, DK: Damar Kalınlaşması, Da: Daralma, GG: Gelişme Geriliği, KaM: Kabarcıklı Mozaik, K: Kıvrılma/Bükülme, KİL: Klorotik Lekeler, KB: Küçük Baş Oluşumu, Kü: Küçülme, MeY: Meşe Yapraklılık, M: Mozaik, P: Pürüzlenme, SK: Sapta Kısalma, S: Sararma, ŞB: Şekil Bozukluğu

Örnek No	Muğla İlinden Alınan Örneklerde Gözlenen Belirtiler																					İzole Edilen Viral Etmen	
	AnB	A	AY	B	BSD	BŞB	Be	C	DK	DB	GG	KaM	K	KİL	KB	Kü	MeY	M	P	SK	S		ŞB
M-1		+						+			+											+	-
M-2														+				+					-
M-3														+							+		-
M-4														+								+	-
M-5														+				+					-
M-6																							-
M-7														+							+	+	-
M-8														+							+	+	-
M-9			+										+									+	-
M-10																		+			+		-
M-11														+							+	+	-
M-12		+																+				+	-
M-13										+				+				+					-
M-14														+								+	-
M-15							+							+									-
M-16							+							+							+		-

AnB: Anormal Baş Oluşumu, A: Asimetri Oluşumu, AK: Aşırı Kardeşlenme, B: Baş Oluşumu Yok, BSD: Baş Sapı Deformasyonu, BŞB: Başta Şekil Bozukluğu, Be: Beneklenme, C: Cücelik, DK: Damar Kalınlaşması, DB: Damar Bantlaşması, GG: Gelişme Geriliği, KaM: Kabarcıklı Mozaik, K: Kıvrılma/Bükülme, KİL: Klorotik Lekeler, KB: Küçük Baş Oluşumu, Kü: Küçülme, MeY: Meşe Yapraklılık, M: Mozaik, P: Pürüzlenme, SK: Sapta Kısalma, S: Sararma, ŞB: Şekil Bozukluğu