

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Havva Nur SAĞLAM

**MARUL İRİ DAMAR HASTALIĞI (LETTUCE BIG VEIN
DISEASE) VE MARUL MOZAIK VİRÜSÜ (LETTUCE
MOSAIC VIRUS)'NÜN TANILANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA-2017

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MARUL İRİ DAMAR HASTALIĞI (LETTUCE BIG-VEIN DISEASE) VE
MARUL MOZAIK VİRÜSÜ (LETTUCE MOSAIC VIRUS)'NÜN
TANILANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Havva Nur SAĞLAM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu Tez 25/07/2017 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Yard. Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr.Saadettin BALOĞLU
ÜYE

.....
Prof. Dr. M. Ertuğrul GÜLDÜR
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2016-7227**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MARUL İRİ DAMAR HASTALIĞI (LETTUCE BIG-VEIN DISEASE) VE
MARUL MOZAIK VİRÜSÜ (LETTUCE MOSAIC VIRUS)'NÜN
TANILANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Havva Nur SAĞLAM

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

Danışman : Yard. Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU
Yıl: 2017, Sayfa: 73
Jüri : Yard. Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU
: Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU
: Prof. Dr. M. Ertuğrul GÜLDÜR

Bu çalışma 2015-2017 yılları sonbahar ve kış dönemlerinde Adana ve Mersin illerinde yaygın olarak marul yetiştiriciliği yapılan alanlarda Marul iri damar hastalığı (Lettuce big-vein disease, LBVD)'nin saptanması ve bu hastalığa neden olan etmen veya etmen kompleksinin belirlenmesi; Marul mozaik virüsü (*Lettuce mosaic virus*, LMV)'nün tanılanması ve karakterizasyonu amacıyla yürütülmüştür. Arazi çıkışlarında semptomatolojik olarak LBVD (MiLBVV, LBVaV) veya LMV ile enfekteli olduğundan şüphelenilen toplam 160 adet marul bitkisinden örnekleme yapılmış ve ELISA testleri sonucunda, MiLBVV, 53; LMV ise 22 bitkide saptanmıştır. RT-PCR çalışmalarında MiLBVV için MiLBVV(1) ve MiLBVV(2) primer çifti ile Çukurova, Seyhan, Karaisalı, Yakapınar ve Yenice izolatlarından 233 bp; LBVaV'ye özgü VP-248 ve VP-249 primer çifti ile Çukurova, Karaisalı ve Yenice izolatlarından 296 bp; LMV'ye özgü LMV CPR ve LMV CPF primer çifti ile Yakapınar, Yumurtalık ve Yenice'den toplanan marul izolatlarına ait 360 bp büyüklüğünde bandlar elde edilmiştir. Dizi analizleri sonucunda, MiLBVV için, Yenice-1 ve Yenice-2 izolatları aynı grupta yer alırken, Adana'dan alınan izolatlarla Mersin'den alınan izolatlar farklı gruplarda yer almıştır. LBVaV için kullanılan Yüreğir izolatı Suudi Arabistan izolatı ile aynı grupta yer alırken, LMV için kullanılan Yenice-2 izolatı hiçbir ülke izolatı ile aynı grupta yer almamıştır.

Anahtar Kelimeler: Marul, LBVD, LMV, DAS-ELISA, RT-PCR, Dizi Analizi

ABSTRACT

MSc THESIS

THE DETECTION AND CHARACTERIZATION OF LETTUCE BIG-VEIN DISEASE AND LETTUCE MOSAIC VIRUS

Havva Nur SAĞLAM

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU
Year: 2017, Pages: 73
Jury : Asst. Prof. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU
: Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU
: Prof. Dr. M. Ertuğrul GÜLDÜR

This study was conducted for detection of and to investigate of causative agents causing Lettuce big-vein disease (LBVD) and diagnosis and characterization of *Lettuce mosaic virus* (LMV) in the fields where the lettuce cultivation was made extensively in Adana and Mersin provinces in autumn and winter of 2015-2017. A total of 160 lettuce plants suspected to be infected with LBVD (MiLBVV, LBVaV) or LMV were sampled at the field symptomologically. As the result of ELISA tests, MiLBVV and LMV were detected in 53 and 22 plants, respectively. In the RT-PCR studies for MiLBVV, the band a size of 233 bp was obtained by MiLBVV(1)-MiLBVV(2) primer pair for isolates collected from Cukurova, Seyhan, Karaisalı, Yakapınar and Yenice regions; the band a size of 296 bp was obtained for Cukurova, Karaisalı and Yenice isolates by LBVaV specific VP-248 and VP-249 primer pair; a band of 360 bp was observed for isolates collected from Yakapınar, Yumurtalık and Yenice by LMV specific LMV-CPR; LMV-CPF primer pair. As a result of sequence analysis, while Yenice-1 and Yenice-2 isolates of MiLBVV were in the same group, Adana and Mersin isolates of MiLBVV were in different groups. While Yüreğir isolate of LBVaV in the same group with Saudi Arabia isolate, the Yenice-2 isolate used for LMV did not take part any other country isolate.

Key words: Lettuce, LBVD, LMV, DAS-ELISA, RT-PCR, Sequence Analysis.

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Sebzeler, kendine özgü tat ve aromalarıyla beğenilerek tüketilmekte ve güzel görünümüleriyle sofralarımızı süslemekte olup insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Türkiye dünyada sebze üreten önemli ülkeler arasında yer almaktadır. Marul ülkemizde açıkta veya örtü altında yıl boyu yetiştirilebilen yaprağı yenen sebze türlerinden biridir. Türkiye dahil birçok ülkede önemli sebzeler arasında ilk sıralarda yer alan marulda hastalık oluşturan birçok virüs etmeni rapor edilmiştir. Bu yüksek lisans tez çalışması, Adana ve Mersin ili marul üretim alanlarında Marul İri Damar Hastalığı (Lettuce Big-Vein Disease) ve *Lettuce Mosaic Virus*'ün saptanarak bu çalışmada kullanılacak izolatların elde edilmesi, Marul iri damar hastalığına sebep olan etmen virüs veya virüs kompleksinin ortaya konulması, Adana ve Mersin illerinden elde edilen bazı MiLBVV, LBVaV ve LMV izolatlarının moleküler karakterizasyonlarının yapılması amacıyla yürütülmüştür. Bu amaçlar doğrultusunda, virüs ile bulaşık olduğundan şüphelenilen marul bitkilerinden örnekler alınarak, serolojik (DAS-ELISA) ve moleküler (PCR) yöntemler ile testlenmiş ve elde edilen izolatların moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca, bu çalışma sonucunda, toplanan örneklerde bulaşıklık oranının ortaya konulması da mümkün olmuştur. Yapılan arazi çıkışlarında semptomatolojik olarak LBVD ve LMV'nin en az biri ile bulaşık olduğundan şüphelenilen 160 marul bitkisinden yapılan ELISA testleri sonucunda Adana ve Mersin illeri ile marul yetiştiriciliğinin yaygın yapıldığı alanlardan toplanan 160 marul bitkisinden 53 tanesi MiLBVV ve 22 tanesi LMV ile enfekteli bulunmuştur. 10 bitkide ise MiLBVV+LMV karışık enfeksiyonu saptanmıştır. RT-PCR çalışmalarında MiLBVV ve LBVaV'nin ikisinin ortak enfeksiyon gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, MiLBVV'nin tek başına, LBVaV varlığına ya da yokluğuna bağlı olmaksızın iri damar hastalığına neden olduğu gözlenmiştir. Bulunan sonuçlar, LBVD'ye neden olan etmenin MiLBVV olduğunu göstermektedir. MiLBVV dizi belirleme çalışmalarında MiLBVV ile enfekteli marul bitkisinden

izole edilen Yakapınar, Yüreğir, Yumurtalık, Yenice-1 ve Yenice-2 izolatları kullanılmıştır. Yenice-1 ve Yenice-2 izolatları aynı grupta yer alırken, Adana'dan alınan izolatlarla Mersin'den alınan izolatlar farklı gruplarda yer almıştır. LBVaV dizi belirleme çalışmalarında LBVaV ile enfekteli marul bitkisinden izole edilen Yüreğir izolatu kullanılmıştır. Yüreğir izolatu, Suudi Arabistan izolatıyla aynı grupta yer almıştır. LMV dizi belirleme çalışmalarında LMV ile enfekteli marul bitkisinden izole edilen Yenice-2 izolatu kullanılmıştır. Yenice-2 izolatu hiçbir ülke izolatu ile aynı grupta yer almamıştır.

Çalışmanın yapıldığı Adana ve Mersin illerinde 100.000 tonun üzerinde üretimi yapılan marul bölge için önemli kışlık sebzelerden biridir. Bu bölgede hastalık ve zararlı etmenleri ekonomik açıdan verimde kayba sebep olmaktadır. Bu etmenler içinde virüsler kimyasal mücadelesi olmaması ve vektörlerin virüsleri taşıması sebebiyle ayrı bir öneme sahiptir. Bu virüslere karşı, yapılacak olan etkili bir vektör mücadelesine ek olarak, virüsten ari tohum ve üretim materyalinin kullanılması, koruyucu kültürel uygulamalar, dayanıklı veya tolerant çeşitlerin tercih edilmesi çok önemlidir.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın yürütülmesinde bana yardımcı ve her zaman destek olan kıymetli danışman hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Muharrem Arap KAMBEROĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Viroloji Laboratuvarı'nda yapmış olduğum tez dahilindeki çalışmalarına yardımlarından dolayı Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU, Doç. Dr. Behçet Kemal ÇAĞLAR, Zir. Müh. Ali GÜNEŞ, Zir. Müh. Eray ATALAY, Zir. Müh. Fatma ŞAFAK, Zir. Müh. Hilal SEVİNDİK, Zir. Müh. Sabire CAN ve Zir. Yük. Müh. Serkan KIZILYAMAÇ'a, ayrıca Mikoloji Laboratuvarı'ndan Sayın Yard. Doç. Dr. D. Soner AKGÜL'e ve Zir. Yük. Müh. Qamar Nawaz AWAN'a teşekkür ederim.

Arazi çalışmalarımnda bilgi ve deneyimleriyle bana yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Ekrem ATAKAN'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında büyük bir destek ile bana yardımcı olan arkadaşım Zir. Müh. Fatime DAŞ'a teşekkür ederim.

Projemin yürütülmesinde çalışmalarına maddi olarak sağlayan Ç.Ü. Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca her zaman olduğu gibi yüksek lisans çalışmalarımnda da maddi ve manevi destek ve kolaylık sağlayan tüm aile fertlerime sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
SİMGELER VE KISALTMALAR	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	9
3. MATERYAL VE METOT.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Çalışma Materyali Hakkında Bilgiler.....	23
3.1.2. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Materyal	24
3.1.3. Total RNA Ekstraksiyonu Çalışmalarında Kullanılan Materyal	24
3.1.4. RT-PCR Çalışmalarında Kullanılan Materyal.....	24
3.1.5. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal.....	26
3.2. Metot	26
3.2.1. Bitkilerin Toplanması ve Muhafaza Edilmesi	26
3.2.2. Serolojik Çalışmalar	27
3.2.2.1. DAS-ELISA Testi.....	27
3.2.3. Total RNA Ekstraksiyonu	28
3.2.3.1. Total RNA Ekstraksiyonu Aşamaları	28
3.2.4. RT-PCR Çalışmaları.....	29
3.2.5. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları.....	31
3.2.6. Dizi Belirleme ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları	32

4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	35
4.1. LBVD ve LMV ile Bulaşık Bitkilerin Saptanması.....	35
4.2. ELISA Çalışmaları	43
4.3. Total RNA Ekstraksiyon Çalışmaları.....	45
4.4. RT-PCR Çalışmaları.....	45
4.5. Dizi Belirleme ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları	49
4.5.1. Marul İri Damar Virüsü (MiLBVV) Dizi Belirleme Çalışması	49
4.5.2. Marul İri Damar Virüsü (LBVaV) Dizi Belirleme Çalışması	53
4.5.3. Marul Mozaik Virüsü (LMV) Dizi Belirleme Çalışması	55
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	67
EKLER	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1.	Dünya’da marul üretimi yapan ülkeler ve üretim (Ton).....	2
Çizelge 1.2.	Türkiye’de marul üretimi (Ton) ve ekilen alan (da)	3
Çizelge 1.3.	Marulun Taksonomisi	4
Çizelge 1.4.	Akdeniz Havzası’nda Marulda virüs hastalıkları	5
Çizelge 3.1.	Örneklerin alındığı yer ve testlenen bitki sayısı	23
Çizelge 3.2.	PCR’da Kullanılan Primer çiftleri ve Moleküler Büyüklüğü.....	25
Çizelge 3.3.	Arazi çıkışlarında aranan semptomlar.....	27
Çizelge 3.4.	RT-PCR çalışmalarında kullanılan virüs izolatları ve alındığı il.....	30
Çizelge 3.5.	MiLBVV, LBVaV ve LMV için uygun sıcaklıklar.....	31
Çizelge 4.1.	Arazi çıkışı yapılan alanlar ve MiLBVV veya LMV ile enfekteli olan Marul Bitkileri.....	44
Çizelge 4.2.	Çizelge 4.2. MiLBVV(1)-MiLBVV(2) Primer Çifti ile Elde Edilen İzolatların Dünyada Yer alan Diğer İzolatlarla Benzerlik Oranı	51
Çizelge 4.3.	Cps1-Cpas1 Primer Çifti ile Elde Edilen İzolatların Dünyada Yer alan Diğer İzolatlarla Benzerlik Oranı	53
Çizelge 4.4.	LBVaV CPF-LBVaV CPR Primer Çifti ile Elde Edilen İzolatların Dünyada Yer alan Diğer İzolatlarla Benzerlik Oranı.....	55
Çizelge 4.5.	LMV CPF-LMV CPR Primer Çifti ile Elde Edilen İzolatların Dünyada Yer alan Diğer İzolatlarla Benzerlik Oranı	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1.	Dizi Belirleme ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları.....	33
Şekil 4.1.	Marul yaprağında deformasyon ve gevrekleşme (Adana Merkez/MiLBVV enfeksiyonu).....	36
Şekil 4.2.	Marul Marul yaprağında damar genişlemesi (Yenice/MiLBVV+LBVaV enfeksiyonu).	37
Şekil 4.3.	Yaprakta damar açılması (Karaisalı/MiLBVV+LBVaV enfeksiyonu)	37
Şekil 4.4.	Yaprakta kabarcıklaşma (Çukurova/ MiLBVV enfeksiyonu)	38
Şekil 4.5.	Marulda gelişme geriliği (Seyhan/MiLBVV enfeksiyonu).....	38
Şekil 4.6.	Marul yaprağında kabarcıklaşma (Seyhan/MiLBVV enfeksiyonu).....	39
Şekil 4.7.	LBVD ile bulaşık marul bitkisinin araziden bir görüntüsü	39
Şekil 4.8.	Yaprakta sararma, kabarcıklaşma ve nekroz (Karaisalı/MiLBVV enfeksiyonu)	40
Şekil 4.9.	Gelişmede gerileme (Karaisalı/MiLBVV enfeksiyonu)	40
Şekil 4.10.	Marul bitkisinde gelişmede azalma ve baş gelişiminde bozulma (Yakapınar/LMV+MiLBVV karışık enfeksiyonu)	41
Şekil 4.11.	Marulda gelişmede azalma, sararma ve nekroz (Tarsus/LMV)	42
Şekil 4.12.	Marul yaprağının büyütülmüş hali (Karaisalı/MiLBVV enfeksiyonu).....	42
Şekil 4.13.	Baş oluşturamamış bir bitkinin arazide görüntüsü (LBVD enfeksiyonu).....	43
Şekil 4.14.	MiLBVV'nin 2 nolu primer çifti ile yapılan RT-PCR bandları.....	46
Şekil 4.15.	MiLBVV'nin 4 nolu primer çifti ile yapılan RT-PCR bandları.....	46
Şekil 4.16.	LBVaV'nin beş nolu primer çiftiyle yapılan RT-PCR bandları	47
Şekil 4.17.	LMV'nin 8 nolu primer çifti ile yapılan RT-PCR bandları	48

Şekil 4.18. MiLBVV(1)-MiLBVV(2) primer çifti ile saptanan MiLBVV izolatlarının (2- MiLBVV 1 E 10.ab1, 4- MiLBVV 1 F10.ab1, 6- MiLBVV 1 G10.ab1, 11- MiLBVV 2 H 10.ab1) filogenetik soyağacı (Bootstrap 1000 tekrarlamalı)	50
Şekil 4.19. Cps1-Cpas1 primer çifti ile saptanan MiLBVV izolatlarının (2- Cps1 F11.ab1, 4- Cps1 G11.ab1, 11- Cps1 H 1011.ab1) filogenetik soyağacı (Bootstrap 1000 tekrarlamalı).....	52
Şekil 4.20. VP 248-VP 249 primer çifti ile saptanan LBVaV izolatının (4- VP 248 A12.ab1) filogenetik soyağacı (Bootstrap 1000 tekrarlamalı).....	54
Şekil 4.21. LMV-CPF, LMV-CPR primer çifti ile saptanan LMV izolatının (12- LMV-CPF F12.ab1) filogenetik soyağacı (Bootstrap 1000 tekrarlamalı).....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	: Adenin
BiMV	: <i>Bidens mosaic virus</i>
BCMV	: <i>Bean common mosaic virus</i>
BLAST	: Basic local alignment search tool
bp	: Base Pair (Baz çifti)
°C	: Santigrat derece
cDNA	: Complementary deoxyribonucleic acid
CMV	: <i>Cucumber mosaic virus</i>
CP	: Kılıf protein
DNA	: Deoksiribonükleik asid
dsDNA	: Double stranded (çift iplikli) DNA
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FAO	: Food and Agriculture Organisation
g	: Gram
G	: Guanin
GRSV	: <i>Ground nut ringspot virus</i>
LBVaV	: <i>Lettuce Big-Vein associated Virus</i>
LBVD	: Lettuce Big-Vein Disease
LeMoV	: <i>Lettuce mottle virus</i>
LMV	: <i>Lettuce mosaic virus</i>
MiLBVV	: <i>Mirafiori lettuce big-vein virus</i>
mg	: Miligram
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
M	: Molarite
M-MLV	: Moloney Murine Leukaemia Virus

mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
PBS	: Phosphate buffered saline (Fosfat tuz tampon çözeltisi)
pH	: Çözeltinin asitlik bazlık seviyesi
PVP	: Polyvinylpirrolidone
pmol/µl	: Pikomol/Mikrolitre
RNA	: Ribonükleik asit
RNasin	: Ribonükleaz inhibitörü
rpm	: Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
RT	: Reverse Transcriptase
RT-PCR	: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
ssDNA	: Single Stranded DNA (Tek iplikli DNA)
S	: Sitozin
TAE	: Tris Acetate EDTA Buffer
TBE	: Tris Borate EDTA Buffer
TCSV	: <i>Tomato chlorotic spot virus</i>
T	: Timin
TSWV	: <i>Tomato spotted wilt virus</i>
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
W/V	: Ağırlık/Hacim

1. GİRİŞ

Sebzeler, kendine özgü tat ve aromalarıyla beğenilerek tüketilmekte ve güzel görünümüleriyle sofralarımızı süslemekte olup insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir (Abak ve ark, 2010). Türkiye dünyada sebze üreten önemli ülkeler arasında yer almaktadır. Hazırlanan bir rapora göre, Türkiye'nin dünyada çok sayıda sebze türünün üretiminde ilk beş ülke içerisinde yer aldığı ve en yüksek verimin, iklimin avantajlı olması ve seracılık bölgesi olması sebebiyle Akdeniz Bölgesi olduğu bildirilmiştir (Anonymous, 2013).

Marul, soğuk hava koşullarına kısmen dayanıklı, nemli hava koşullarına ihtiyaç duyan tek yıllık serin ve ılıman iklimlerde yetişebilen bir sebze türüdür. Yetiştirme periyodu iki-üç ay gibi kısa bir süre olduğu için Türkiye'nin tüm bölgelerinde yetiştirilebilir (Anonymous, 2007). Islah edilmiş marul çeşitlerinde açıkta ve örtü altında yıl boyunca üretim yapılabilmektedir (Anonymous, 2011).

Marul dünya çapında yetiştirilen ve dünyada tüketilen en önemli sebzelerden biridir. Dünyada 2014 yılı verilerine göre; Çin 14.000.000 ton üretimle 1. sırada yer almakta olup bunu sırasıyla 3.875.520 tonla A.B.D., 1.075.000 tonla Hindistan, 870.200 tonla İspanya, 570.000 tonla İran, 543.000 tonla Japonya, 419.066 tonla Türkiye, 335.337 tonla Meksika ve 324.324 tonla İspanya takip etmektedir. Türkiye dünya marul üretiminde 419.066 tonla 7. sırada yer almaktadır (Çizelge 1.1.) (FAO, 2015).

Çizelge 1.1. Dünya’da marul üretimi yapan ülkeler ve üretim miktarları (Ton)
(FAO, 2015)

Ülkeler	Üretim (Ton)
Çin	14.000.000
Amerika	3.875.520
Hindistan	1.075.000
İspanya	870.200
İran	570.000
Japonya	543.000
Türkiye	419.066
Meksika	335.337
İtalya	324.324

Türkiye’de 2016 yılı verilerine göre 94.341 da alanda 179.712 ton kıvrıcık marul, 103.901 da alanda 233.662 ton göbekli marul ve 23.274 da alanda 65.068 ton aysberg marul üretimi yapılmıştır (Çizelge 1.2.). Aynı yıl Adana ilinde 18.215 da alanda 53.603 ton marul üretimi; Mersin ilinde ise, 22.847 da alanda 56.164 ton marul üretimi gerçekleşmiştir (TÜİK, 2017).

Çizelge 1.2. Türkiye’de marul üretimi (Ton) ve ekilen alan (da) (TÜİK, 2017)

Yıl	Kıvırcık Marul		Göbekli Marul		Aysberg Marul	
	Ekilen Alan (da)	Üretim (Ton)	Ekilen Alan (da)	Üretim (Ton)	Ekilen Alan (da)	Üretim (Ton)
2009	87.107	141.569	112.751	233.552	22.852	62.917
2010	79.786	131.952	107.685	226.144	22.423	61.202
2011	83.264	138.466	103.643	217.378	24.522	68.408
2012	86.902	145.019	98.946	205.463	24.691	68.584
2013	89.399	159.971	100.337	212.189	23.503	64.625
2014	87.062	155.179	104.562	230.755	23.633	65.551
2015	87.522	157.981	101.333	225.021	23.122	64.490
2016	94.341	179.712	103.901	233.662	23.274	65.680

Asterales takımı Asteraceae familyasında yer alan marul türleri *Lactuca sativa* var. *longifolia* (Düz Marul), *Lactuca sativa* var. *capitata* (Baş Salata), *Lactuca sativa* var. *crispa* (Kıvırcık Salata) ve *Lactuca sativa* var. *sativa*’dır (Anonymous, 2007) (Çizelge 1.3.).

Birçok marul çeşidi bulunmakla beraber Türkiye’de en çok tüketilen türler arasında geniş yapraklı klasik marul, kırmızı marul ve kıvırcık marul yer almaktadır (Anonymous, 2015).

Çizelge 1.3. Marulun Taksonomisi (Anonymous, 2007)

Takım	Familiya	Türler	Türkçesi
Asterales	Asteraceae	<i>Lactuca sativa</i> var. <i>longifolia</i>	Düz Marul
Asterales	Asteraceae	<i>Lactuca sativa</i> var. <i>capitata</i>	Baş Salata
Asterales	Asteraceae	<i>Lactuca sativa</i> var. <i>crispa</i>	Kıvırcık Salata
Asterales	Asteraceae	<i>Lactuca sativa</i> var. <i>sativa</i>	

Dünyanın bitkisel üretim yapılan tüm alanlarında önemli düzeyde ürün ve kalite kayıplarına yol açan pek çok hastalığın sorumlusu virüslerdir. Virüs hastalıkları nedeniyle kültür bitkilerinde meydana gelen kayıplar bazen ılımlı bazen de felaket derecelerinde ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalarda virüslerin neden olduğu hastalıkların diğer bitki hastalık etmenlerinden daha fazla olduğu ifade edilmektedir (Yardımcı, 2013). Özalp (1964), İzmir’de virüs hastalıklarıyla fazla karşılaştığını, domateslerde bu oranın % 90 ve biberlerde ise % 100’ü bulunduğunu bildirmiştir. Tekinel ve ark (1969), Mersin Bölgesi’nde simptomatolojik olarak virüslerin mevcut olduğunu tesbit etmiş, 1965 yılında biber, patlıcan, marul ve fasulye sebzelerindeki virüslerin simptomatolojik olarak teşhislerini yapmışlardır. Deneme sonunda Mersin Bölgesinde, biberlerde Biber Mozaik Virüsü, Hıyar Mozaik Virüsü ve Patates X Virüsü; patlıcanlarda Hıyar Mozaik Virüsü ve Tütün Mozaik Virüsü; marullarda Marul Mozaik Virüsü ve Domates Lekeli Solgunluk Virüsü saptanmıştır. Fasulyelerde Fasulye Mozaik Virüs 1 ve Fasulye Mozaik Virüs 2’nin bulunduğunu bildirmişlerdir.

Türkiye dahil birçok ülkede önemli sebzeler arasında ilk sıralarda yer alan marulda hastalık oluşturan birçok virüs etmeni rapor edilmiştir (Sertkaya 2015). Akdeniz Havzası'nda marulda hastalık yapan önemli virüsler Çizelge 1.4.'te bildirilmiştir (Moreno ve Fereres, 2012).

Çizelge 1.4. Akdeniz Havzası'nda Marulda virüs hastalıkları

Viral Etmenler	Familya	Cins
<i>Alfalfa Mosaic Virus</i>	Bromoviridae	Alfamovirus
<i>Beet Western Yellows Virus</i>	Luteoviridae	Polerovirus
<i>Broad Bean Wilt Virus</i>	Comoviridae	Fabavirus
<i>Lettuce Big-Vein Disease</i>		
<i>Mirafiori Lettuce Big-Vein Virus</i>	Ophioviridae	Ophiovirus
<i>Lettuce Big-Vein Associated Varicosavirus</i>	Rhabdoviridae	Varicosavirus
<i>Lettuce Mosaic Virus</i>	Potyviriidae	Potyvirus
<i>Lettuce Necrotic Yellows Virus</i>	Rhabdoviridae	Cytorhabdovirus
<i>Tomato Spotted Wilt Virus</i>	Bunyaviridae	Tospovirus
<i>Turnip Mosaic Virus</i>	Potyviriidae	Potyvirus

Bitki virüs hastalıkları, diğer hastalık etmenlerinden farklı olarak kimyasal mücadelesinin olmaması nedeniyle önemli problemlerden biridir. Virüslerin kontrol edilmesi zordur ve vektörleri yıl boyunca mevcuttur. Ayrıca virüsler yaprakların kalitesini doğrudan etkiler ve etkilenmiş bitkilerin satışını engeller. Çevresel koşullara ve kültüre verilen bakım derecesine bağlı olarak virüsler marul bitkilerinde % 100'e varan kayıplardan sorumlu olabilir (Pavan ve ark, 2008).

Çizelge 1.4.'te belirtilen virüsler arasında Marul İri-Damar Hastalığı (*Lettuce Big-Vein Disease*, LBVD) ve Marul Mozaik Virüsü (*Lettuce Mosaic*

Virus, LMV) Adana ve Mersin illerinde marul yetiştiriciliği yapılan alanlarda yaygın gözlenmesinden dolayı bu tez çalışmasının konusunu oluşturmuştur.

İri damar virüsünü, marulda ilk kez 1934 yılında Jagger ve Chandler Kaliforniya’da bildirmiştir (Maccarone, 2013; Sasaya ve ark, 2013; Pavan ve ark, 2008). LBVD, ticari marul üretimi yapılan bölgelerde büyük problemdir. Hastalık, dünyada özellikle Avustralya, Avrupa, Brezilya ve Yeni Zelanda bölgelerinde ve subtropik bölgelerde yüksek rakımda ortaya çıkmaktadır (Maccarone, 2013).

İri damar hastalığı, şu anda marulun yetiştirildiği her yerde önemli viral hastalıklardan biridir. Hastalığın ekonomik önemi tipik semptomatolojisinin sebep olduğu kayıplarla ilişkilidir: yaprak damarlarında klorotik açılmayı takiben yaprak deformasyonu, olgunlaşmada gecikme, baş büyüklüğünün azalması ya da baş oluşumunun yokluğu. Bu sebeple enfekteli marul bitkileri ürün kalitesi ve verime etkisi nedeniyle genellikle pazarlanamamaktadır (Araya ve ark, 2011).

İri damar hastalığı, serin nemli topraklarda yaygındır ve rotasyon olmadan sürekli marul üretimi ile artmaktadır (Hayes ve ark, 2006). LBVD kompleks iki virüsle ilişkilidir, *Lettuce Big-Vein associated Virus* (LBVaV; Varicosavirus cinsi) ve *Miraflori Lettuce Big-Vein Virus* (MiLBVV; Ophiovirus cinsi). *Olpidium brassicae* ilk kez 1939’da Fry tarafından tarif edilmiş ve marul iri damar hastalığıyla 1958 yılında ilk kez ilişkilendirilmiştir. 1961 yılında marul iri damar hastalığının aşısıyla taşındığı ilk kez rapor edilmiş ve bu hastalığa virüsün neden olduğu önerilmiştir. Campbell ve Grogan 1963 yılında *O. brassicae*’nın virüs vektörü olarak marulda iri damar hastalığına neden olduğunu ileri sürmüştür. Bununla birlikte Sahtiyancı farklı konukçu aralıklarına göre aslında virüs taşınmasından sorumlu 2 ayrı *Olpidium* türü olduğunu, turpgillerde enfeksiyona neden olan türün *O. brassicae* ve turpgillerde enfeksiyona neden olmayan türün *O. virulentus* olduğunu ileri sürmüşlerdir (Maccarone, 2013).

Olpidium flagellalı, karasal mantarlara en yakın akraba organizmadır (Sekimoto ve ark, 2011). *O. brassicae* obligat, kökü infekteleyen, yaygın bir fungal patojendir. Bitki virüslerinin geniş konukçu aralığında önemli bir vektörüdür

(Hartwright ve ark 2010). İki virüs benzer boyutta kılıf proteinlere sahiptir, ancak morfolojileri farklıdır ve serolojik olarak birbiriyle ilişkili değildir (Roggero ve ark 2003).

Marul iri damar hastalığı, marul üretimini yıllarca etkilemiştir. Ancak, günümüzde birçok çalışmada etmeni olarak rapor edilen *Mirafiori Lettuce Big-Vein Virus* (MiLBVV) (Ophiovirus cinsi) ancak son yıllarda tespit edilmiştir. Buna rağmen, bu hastalığın etmeni olan virüs veya virüsler hakkında yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilmiştir.

Daha önceki çalışmalarda, bu viral etmen *Lettuce Big-Vein Virus* olarak biliniyor ve isimlendiriliyordu. LBVD'nin etmeni olarak değişik çalışmalarda farklı bildirimler mevcuttur. Bu bildirimler, ortak enfeksiyon; sadece *Mirafiori Lettuce Big-Vein Virus*; hem *Mirafiori Lettuce Big-Vein Virus* tek başına hem de *Lettuce Big-Vein associated Virus* ile karışık enfeksiyon şeklinde görülmektedir.

İran'da MiLBVV ve LBVaV, LBVD ile ilişkili bulunmuştur. Marul tarlalarından toplanılan örneklerin testleri sonucunda LBVaV ve MiLBVV'nin her ikisi için pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Aynı şekilde Brezilya'da, Avustralya'da ve İspanya'da her iki virüsün LBVD'ye sebep olduğu bildirilmiştir (Alemzadeh ve Izadpanah 2012, Pavan ve ark 2008, Fletcher ve ark 2005, Navarro ve ark 2004). Kaliforniya'da marul üretim alanlarında LBVD'ye MiLBVV ve MiLBVV/LBVaV karışık enfeksiyonlarının sebep olduğu rapor edilmiş, LBVaV enfeksiyonu tek başına hiçbir bitkide saptanmamıştır (Hayes ve ark 2006).

Şili'de MiLBVV'nin BVD'ye neden olan etmen olduğu bildirilmiş ve MiLBVV enfeksiyonunun çıkışında LBVaV'nin herhangi bir rolünün olmadığı saptanmıştır (Araya ve ark 2011). Aynı şekilde Arjantin'de, Japonya'da ve Fransa'da *Mirafiori lettuce big vein virus*'ün iri damar hastalığına neden olan etmen olduğu rapor edilmiştir (Barcala Tabarozzi ve ark 2010, Sasaya ve ark 2008, Roggero ve ark 2003).

Suudi Arabistan'da yapılan bir çalışmada LBVaV'nin, MiLBVV'nin ve LBVaV+MiLBVV'nin her ikisinin LBVD'ye sebep olduğu saptanmıştır. Aynı

şekilde İran'ın Tahran Bölgesi'nde ve İtalya'da LBVaV'nin, MiLBVV'nin ve LBVaV+MiLBVV'nin her ikisinin LBVD'ye sebep olduğu bildirilmiştir (AL-Saleh ve ark 2015, Heidari ve ark 2010, Roggero ve ark 2003).

Bu tez çalışması dahilinde diğer bir virüs olan Marul Mozaik Virüsü dünya çapında bulunan, tohum ve yaprak bitiyle non-persistent taşınan potyvirus cinsinde yer alan bir virüstür. LMV, küçülme, düzgün baş oluşturmama ve bazen nekrotik tepkiler içeren oldukça çeşitli semptomlara sebep olmaktadır. Diğer potyvirusler gibi LMV etkin bir şekilde özellikle *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae* ve *Acyrtosiphon scariolae* bari. yaprak bitleriyle non persistent taşınmaktadır. Duyarlı marul çeşitlerinde ani epidemiler gelişebilmekte ve % 80-100'e varan kayıplara sebep olmaktadır. Tohumla taşınma LMV'nin yayılmasında en önemli faktör olan yayılma, enfekteli tohumlar yoluyla tohumluklardan ve ayrıca araziye yakın enfekteli marul bitkilerinden kaynaklanabilmektedir (Pavan ve ark, 2008).

Bu yüksek lisans tez çalışması: Adana ve Mersin ili marul üretim alanlarında LBVD ve LMV'nin saptanarak bu çalışmada kullanılacak izolatların elde edilmesi, marul iri damar hastalığına sebep olan etmen virüs veya virüs kompleksinin ortaya konulması, Adana ve Mersin illerinden elde edilen bazı MiLBVV, LBVaV ve LMV izolatlarının moleküler karakterizasyonlarının yapılması amacıyla yürütülmüştür. Bu amaçlar doğrultusunda, virüs ile bulaşık olduğundan şüphelenilen marul bitkilerinden örnekler alınarak, serolojik (DAS-ELISA) ve moleküler (PCR) yöntemler ile testlenmiş ve elde edilen izolatların moleküler karakterizasyonu yapılmıştır.

Ayrıca, bu çalışma sonucunda, toplanan örneklerde testlenen virüsler ile bulaşıklık oranının ortaya konulması da mümkün olmuştur.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Marul İri Damar Hastalığı (*Mirafiori Lettuce Big-Vein Virus/Lettuce Big-Vein associated Virus*): MiLBVV, negative-sense single-stranded RNA genomuna sahip, Ophioviridae familyası üyesi Ophiovirus cinsi bir RNA virüsüdür (Luna ve ark 2013, Hiraguri ve ark 2013).

Alan (2012), Adana, Mersin, Osmaniye, Hatay ve Kahramanmaraş illeri ile çevresinde yapılan bir çalışmada, arazi çıkışlarında simptomatolojik olarak toplanan 808 marul örneğinden, 380 bitkide (% 47) MiLBVV ve 82 bitkide (% 10.1) LMV enfeksiyonu saptamıştır. Ayrıca, 21 bitkide (% 2,59) MiLBVV+LMV ve 1 bitkide (% 0,12) MiLBVV+CMV karışık enfeksiyonları bildirilmiştir.

Alemzadeh ve Izadpanah (2012), İran'da MiLBVV ve LBVaV'yi LBVD ile ilişkili bulmuşlardır. Her iki virüsün marulda bulunması açık alanda ve sera koşullarında marul köklerinde *Olpidium brassicae* fungusunun zoosporangia ve dayanıklı sporlarının varlığı ile ilişkilendirilmiştir. Fars, Tahran ve Kohguiluyeh-Boyer Ahmad illerinden iri damar hastalığının karakteristik simptomları gözlenen marul tarlalarından marul kökünün birikintileriyle beraber toprak örnekleri toplamışlardır. Sera koşulları altında marul tohumu ekilerek, gelişen simptomlar ve *Olpidium* benzeri yapılar için gözlemlenmiş ve MiLBVV ve LBVaV için iki ay sonra PCR ile testlenmiştir. Fungal yapılar kök segmentlerinde ışık mikroskobu ile gözlemlenmiştir. Marul tohumu ekiminden iki ay sonra big-vein'den etkilenmiş bitkilerle marul tarlasından toplanan toprakta LBVaV ve MiLBVV için tüm fideler pozitif bulunmuştur, bu da her iki virüsün toprakta taşındığını göstermektedir.

AL-Saleh ve ark (2015), yaptıkları çalışmada, Riyadh bölgesinde açık alanda yetiştirilen marul bitkilerini incelemiş ve yaklaşık % 40'ında damar açılması, bodurluk, yapraklarda deformasyon ve ana damarlarda kalınlaşmanın da dahil olduğu virüs benzeri simptomları gözlemişlerdir. Dört alandan, 19 numune (17 simptom taşıyan ve iki simptomsuz) toplamışlar ve total RNA ekstraksiyonu yaparak, LBVaV ve MiLBVV'ye spesifik primerler ile RT-PCR'a tabi

tutmuşlardır. Ayrıca, *Olpidium brassicae*'nin varlığı, ışık mikroskobu kullanılarak tüm semptom gösteren marul bitkilerinin köklerinde doğrulanmıştır. Sonuçlar, 17 marul örneğinin 16'sının LBVaV ile, 9'unun MiLBVV ile ve 8'inin ise hem LBVaV hem de MiLBVV ile enfekteli olduğunu göstermiştir. İki semptomsuz örneğin her iki virüs için negatif olduğu tespit edilmiştir. Farklı bitkilerden ekstrakte edilen iki PCR ürününü sekanslama için rastgele seçmişler ve analizler LBVaV' nin her iki sekansının İspanya izolatu ile % 98, Japonya izolatu ile % 99 oranında benzerlik olduğunu göstermiştir. İki MiLBVV izolatının ise, İspanya izolatu (AY366418) ile % 99 aminoasit, % 99 nükleotid benzerliği gösterdiğini saptamışlardır.

Araya ve ark (2011), Şili'de enfekteli bitkilerde semptom yoğunluğu ve protein ve viral RNA birikimi arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Açık alan ya da seradan doğal enfekteli marul bitkileri, semptomatolojilerine göre hafif, orta, şiddetli ve semptomsuz olarak sınıflandırılmıştır. Kılıf protein birikimi double antibody sandwich/enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) ile değerlendirilmiş ve RNA seviyeleri semi-quantitative RT-PCR ve quantitative RT-PCR ile çalışılmıştır. Bu hastalıkla ilişkili farklı semptom şiddeti gösteren marul bitkileri arasında iki virüs için, virüs kılıf protein birikimi farklı bulunmamıştır. Benzer şekilde MiLBVV-RNA 3 ya da LBVaV-RNA 2 miktarı çeşitli iri damar hastalığı şiddet derece ölçekleri için farklı bulunmamıştır ($p>0.05$). Bu, semptom şiddetinin iri damarla hastalanmış marul bitkileri tarafından konukçu bitkide iri damar hastalığıyla ilişkili virüslerin birikimini belirtmediğini önermektedir. Bu nedenle hafif semptom gösteren marul bitkilerinin daha şiddetli semptom gösteren bitkilere göre muhakkak daha düşük virüs seviyelerinde mevcut olmadığı saptanmıştır.

Döken ve ark (1993), Erzurum'da Yedikule, Royal, Sluis, Salinas, Das-1011, Romulus MF, Goolguard ve Great Lakes-118 marul çeşitlerinde semptomatolojik olarak tanısı yapılan marul iri damar virüs hastalığının yaygın

olarak ortaya çıktığını gözlemlemişlerdir. Marul iri damar virüs hastalığı etmeninin (*Lettuce big-vein virus*, LBVV), vektörü olarak bilinen *Olpidium brassicae* fungusu enfekteli marul köklerinden izole edilmiştir. Bu amaçla, marul iri damar virüs hastalığı ile enfekteli bitki köklerinden elde edilen fungus zoospor süspansiyonu sağlıklı marul fidelerinin kök bölgesine ilave edilerek hastalık taşınmış ve orijinal simptomlar inokulasyondan bir ay sonra elde edilmiştir.

Erzurum Bölgesinin sert kış koşulları altında LBVV'nin, *Olpidium brassicae* dinlenme sporlarıyla birlikte toprakta kök kalıntılarında kışladığı saptanmıştır (Döken ve ark 1994).

Cirsium arvense (Köy göçüren) sadece *O. brassicae*'nin konukçusu iken, *Carduus nutans* (Deve diken), *Cichorium intybus* (Beyaz hindiba) ve *Taraxacum officinale* (Kara hindiba) hem *lettuce big-vein virus* hem de *O. brassicae* vektörünün konukçusu olarak saptanmıştır (Demirci ve ark 1995).

Fletcher ve ark (2005), yaptıkları virüs surveylerinde *Mirafiori lettuce big-vein virus*'ün sebep olduğu LBVD'yi, genellikle LBVaV ile birlikte marulda en yaygın hastalık olarak saptamışlardır. Diğer mevcut virüsler; *Lettuce necrotic yellows virus* (LNYV), *Beet western yellows virus* (BWYV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) ve *Lettuce mosaic virus* (LMV) olarak belirlenmiştir. Surveylerde *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) ya da *Tobacco necrosis virus* (TNV) saptanmamıştır. LBVD'nin fungal vektörü *O. brassicae*'nin kontrolü, hastalığın yönetiminde önemli bir faktördür. Bu hastalığın kontrolünde fungusidler kullanılarak denemeler yapılmıştır.

Fujii ve ark (2003), Marul iri damar hastalığının olduğu bir alanda simptom ifadesi ve hastalığa bağlı iki virüs (*Lettuce Big-Vein Virus* ve *Mirafiori Lettuce Virus*) arasındaki ilişkiyi toplam 60 marul (*Lactuca sativa* L.) çeşidinde incelemişlerdir. Her iki virüs tüm marul çeşitlerinde tespit edilmiştir. Kıvrıkcık tipte simptom ifadesine direnç derecesi özellikle *Mirafiori lettuce virus*'ün tespit edildiği dereceyle ilişkili bulunmuştur. Yağlı, cos, kök ve kırmızı yaprak tiplerinde

her iki virüs erken dönemlerde saptanırken, hasatta az belirti görülmüş veya hiç belirti görülmemiştir.

Hayes ve ark (2006), ABD’de yaptıkları çalışmada Great Lakes 65, Pavane, Margarita ve *Lactuca virosa* marul çeşitlerini IVT 280 aşlanmış sera denemelerinde iri damar görülme oranı ve virüs enfeksiyonu açısından değerlendirmişlerdir. Ayrıca marul örnekleri Kaliforniya’da arazilerden toplanarak ve simptom şiddeti sınıflandırılarak virüs enfeksiyonu açısından değerlendirilmiştir. Reverse transcription-polymerase chain reaction ve nükleotid sekansı, MiLBVV ve LBVaV ile enfeksiyonu ve viral izolatlar arasındaki sekans çeşitliliğini belirlemek için kullanılmıştır. Kaliforniya üretim alanlarında MiLBVV ve MiLBVV/LBVaV enfeksiyonları iri damar simptomuna bağlı bulunmuş ve izolatlar ise Avrupa ve Japonya’da bulunanlarla yakından ilişkili bulunmuştur. Kısmi iri damar direnci Margarita ve Pavane çeşitlerinde tanımlanmış; buna rağmen MiLBVV enfeksiyonu simptomsuz bitkilerde saptanmıştır. *L. virosa* IVT 280’in MiLBVV ve LBVaV’ye karşı duyarsız olduğu önerilerek simptomsuz ve virüssüz olduğu görülmüştür.

Lot ve ark (2002), iri damar hastalığının etiyolojisinde ikinci toprak kökenli virus, Ophiovirus cinsi, *Mirafiori Lettuce big-vein virus*’ü genelde iri damardan etkilenmiş marulda buldukları için LBVaV’nin rolünü sorgulamışlardır. LBVaV ve MiLBVV’ye spesifik antiserumlar kullanarak ELISA ile saptanabilen ve ayırtedilebilen LBVaV ve MiLBVV kök ekstraktlarıyla ya da *O. brassicae* zoosporlarıyla mekanik inokulasyon yöntemini kullanarak maruldan marula taşınma yeteneğini ve iri damar hastalığının sebebini test etmişlerdir. Her iki virüs maruldan otsu konukçulara ve maruldan marula mekanik olarak bulaşmıştır. LBVaV *O. brassicae* ile taşınmış ancak bu virüsle enfekteli marul asla belirti göstermemiştir. MiLBVV aynı şekilde taşınmış ve sadece bu virüsle enfekteli marul LBVaV varlığına ya da yokluğuna bakılmaksızın sürekli iri damar simptomları göstermiştir. Tekrarlanan mekanik taşınmayla, her iki virüs izolatu vektör olma yeteneğini kaybetmiş ve MiLBVV de iri damar simptomlarına neden

olan yeteneğini kaybetmiş olarak saptanmıştır. *O. brassicae*'nin dinlenme sporlarından yeniden elde edilmesi 1990'da MiLBVV'nin daha önce direk olarak var olduğunu göstermektedir.

Natsuaki ve ark (2002), iri damar belirtileri olan marulda (*Lactuca sativa* L.) sırayla *Tobacco stunt virus* ve *Tulip mild mottle mosaic virus* (As-TMMMV) antiserumu kullanarak Western blot analysis ile 2 bant tespit etmişlerdir. Bir bant *Mirafiori lettuce virus* (MiLV) antiserumuna As-TMMMV'den daha duyarlı tepki vermiştir. Hastalıklı bitkilerde *Lettuce big-vein virus* benzeri çubuk şekilli parçacıkların yanı sıra immunogold etiketlemede As-TMMMV'li ipliksi Ophiovirus benzeri partiküller (LBV-O) gözlemlenmiştir. LBV-O Japonya'da ilk kez MiLV olarak tanımlanmıştır.

Navarro ve ark (2005), İspanyol marul bitkileri arasında konukçu olarak iri damar hastalığıyla ilişkili iki virüs için; LBVaV ve MiLBVV, sıklıkla meydana gelen 10 konukçu ot türünün potansiyel rolünü incelemişlerdir. Sonuçlar her iki virüsün analiz edilen otlar arasında saptanan tek duyarlı tür *Sonchus oleraceus* (Adi eşek marulu) bitkilerini enfekteleyebildiğini göstermiştir. Saptanan *S. oleraceus* bitkilerinden LBVaV ve MiLBVV izolatlarının kılıf protein genlerinin dizileri ayrılmıştır. Filogenetik çalışmalar ot izolatları ve İspanyol marulunun kılıf protein dizileri arasında çok yakın bir ilişki ortaya koymuştur. Dahası, her iki virüsün vektörü fungus *O. brassicae* yoluyla marul enfeksiyonunun kaynağı olarak rol oynayabilen *S. oleraceus*'u göstermişlerdir.

Sanches ve ark (2008), LBVaV ve MiLBVV'yi Brezilya'da iri damar hastalığına sebep olan karışık enfeksiyonda bulmuşlardır. Yaptıkları çalışmada, Brezilya'da meydana gelen iri damar hastalığıyla ilgili daha fazla bilgi vermek amacıyla, Sao Paulo'da marul üretilen bölgelerden toplanan üç MiLBVV ve dört LBVaV izolatlarının kılıf protein genini sekanslamışlar ve dünyanın farklı bölgelerinde bulunanlarla karşılaştırmışlardır. 2004-2005 sezonunda Mogi das Cruzes, Campinas, Bauru ve Sao Paulo'dan toplanan semptomatik yaşlı marul yapraklarından elde edilen total RNA'lar kullanılarak, MiLBVV CP1/CP2 ve

MiLBVV CP2/CP3; LBVaV CP1/CP2 ve LBVaV CP3/CP4 primer çiftleri ile tek aşamalı RT-PCR analizi yapmışlardır. Maruldan toplanan LBVaV Brezilya izolatlarının kılıf protein genlerinin kısmi analizleri diğer LBVaV izolatlarıyla % 93 aminoasit sekans benzerliği göstermiştir. MiLBVV kılıf protein sekansları arasındaki genetik çeşitlilik, aminoasit sekans dizilimi % 91-100 arasında değişen LBVaV kılıf protein sekanslarıyla karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur. MiLBVV'nin Brezilya izolatları kılıf protein geninde bir RsaI restriksiyon kısmıyla A alt grubuna ait olduğu, LBVaV ve MiLBVV'nin Brezilya izolatlarının olası bir orijin için belirti göstermediği saptanmıştır. Sao Paulo ve diğer ülkelerden izole edilen LBVaV izolatları KP genlerinin nükleotid ve aminoasit dizilerindeki çeşitlilik düşük bulunmuştur. Her ne kadar, Japon LBVaV izolatları aynı grupta yer almasına rağmen, izolatlar ile coğrafik bölgeler arasında bir paralellik bulunamamıştır. Bu sonuçlar Hayes'in sonuçlarıyla uyumlu olup, virüsün biyolojik özelliklerini koruma yeteneği, özel coğrafik alanlara adaptasyondan daha güçlü bulunmuştur. MiLBVV KP geni izolatlarının nükleotid ve aminoasit dizileri değişkenliği, LBVaV izolatlarının değişkenliğinden daha yüksek bulunmuştur. MiLBVV nükleotid dizisi çeşitliliğini anlamının, gelecekte Brezilya'da iri damar hastalığını araştırmak için bir katkı sağlayabileceği bildirilmiştir.

Sasaya ve ark (2005), *Tobacco stunt virus* ve *Lettuce big-vein virus* arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için 5 TStV ve 3 LBVV izolatının kılıf proteininin (KP) nükleotid sekanslarını belirlemişler ve bunları LBVV'nin dört İspanyol izolatı ve bir Japon izolatıyla kıyaslamışlardır. KP kodlama bölgeleri aynı büyüklükte ve TStV ile LBVV arasındaki nükleotid ve aminoasit sekans benzerlikleri sırasıyla % 95,6-96,5 ve % 97,2-98,7 bulunmuştur. Nükleotid dizilerinin filogenetik analizi TStV'nin LBVV ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir.

Sertkaya (2015), Hatay ilinde 2011-2012 yıllarında yaptıkları çalışmada, ELISA testleriyle, 53 adet marul örneğinden 25 tanesinde LMV (% 47,1), 6'sında MiLBVV (% 11,3) enfeksiyonu saptamışlardır. Ayrıca, *Conyza (Erigeron)*

Canadensis (Şifa otu) ve *Sonchus oleraceus* (Adi eşek marulu) bitkilerinde de, LMV enfeksiyonunun varlığını bildirmişlerdir.

Yılmaz (1981), Akdeniz Bölgesi marul alanlarında Marul mozaik virüsü (*Lettuce mosaic virus: LMV*), ilk olarak 1981 yılında saptanmıştır .

Zelyüt ve Ertunç (2016), Ankara ili marul ekim alanlarında yaptıkları arazi çalışmalarında toplam 324 marul örneğini yaprakları ve kökleri ile beraber toplamışlardır. 324 yaprak örneğini; *Mirafiori lettuce big vein virus* (MiLBVV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) ve *Lettuce mosaic virus* (LMV) etmenlerine karşı DAS-ELISA ile testlemişlerdir. Lettuce big vein virus antiserumunun mevcut olmaması nedeniyle PCR yöntemi ile testlemişlerdir. CMV ve TSWV'yi Ankara ili marul ekim alanlarında saptamamışlardır. 39 örnekte MiLBVV, 25 örnekte LMV, 6 örnekte LBVV etmenlerini tespit etmişler ve 5 örnekte MiLBVV ile LBVV karışık enfeksiyonunu belirlemişlerdir.

Marul Mozaik Virüsü (*Lettuce Mosaic virus*): Candresse ve ark (2007), Potyvirus cinsi üyesi olan Lettuce mosaic virus'ün (LMV) immünolojik değişkenliğini incelemek ve bu virüsün ilk epitop karakterizasyonunu gerçekleştirmek için 19 monoklonal antikor (mAb) içeren bir panel kullanmışlardır. 15 LMV izolatından oluşan bir panele karşı tanınma özgülüğüne dayanarak, mAb'lar yedi reaksiyon grubunda toplanmıştır Yüzey plasmon rezonans analizi, LMV parçacıkları üzerinde, yedi mAb reaksiyon grubu ile korelasyon gösteren en az beş bağımsız tanıma/bağlanma bölgesinin varlığını göstermiştir. Sonuçlar, LMV'nin önemli serolojik değişkenlik gösterdiğini ve LMV epitop yapısına ışık tuttuğunu göstermektedir.

Dinant ve ark (1992), Marul mozaik virüsünün (LMV) marul ve hindibada ekonomik olarak önemli bir virüs olduğunu bildirmişlerdir. Virüs, marul çeşitlerinin tohum alışverişi nedeniyle dünya çapında yayılmıştır. Simptomlar karakteristiktir fakat tanı özellikle marulda zor olabilmektedir, çünkü çok sayıda virüs bu türlerle enfektelelenebilmektedir. Virüsten ari tohum kullanımı, koruyucu

kültürel uygulamalar ve toleranslı çeşitlerin kullanılması titizlikle uygulandığında bunların iyi yöntemler olduğu bildirilmiştir. Tanı ve tespit için ELISA kullanılmıştır. Şimdiye kadar suşlardan g ve mo genlerinin tohum ile bulaşmadığı görülmüştür. Çalışmada yürütülen birkaç virüsent izolatların mo ve g genleri muhtemelen farklı allellik göstermiş ve enfekteli tohumlardaki suşlardan biri genotiplere çok hassas bulunmuş ve tolerantlık göstermiştir. Son moleküler çalışmalarda klonların tespiti ve suşlar arasındaki farklılıklar sunulmuştur. Değerlendirmelerde LMV'nin tanımlanan farklı genlerinin umut verici olduğu saptanmıştır.

Erkan ve ark (2013), İzmir ilinde yaptıkları bir çalışmada, baş oluşmaması, baş dağılması, küçük baş oluşumu ve aşırı kardeşlenme belirtileri gözlenen bitkilerden yapılan ELISA testlerinde; 15 marul örneğinin LMV ve 5 örneğin ise CMV ile enfekteli olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca 5 örnekte de LMV+CMV karışık enfeksiyonu bulunduğunu saptamışlardır.

Fidan ve Türkoğlu (1988), İzmir ili marul yetiştirme alanlarında, 1981-1984 yılları arasında yapılan bir çalışmada, LMV'nin % 5.4 oranında yaygın olduğu, % 8-9 oranında tohumla taşındığı ve *M. persicae*'nin LMV'nin vektörü olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca, bu çalışmada, marul alanlarında LMV kadar yaygın olmamakla beraber, *Broad bean wilt virus* (BBWV) ve *Cucumber mosaic virus* (CMV)'nin de bulunduğu bildirilmiştir .

Jafarpour ve ark (1979), tohum kaynaklı *Bean Common Mosaic Virus* (BCMV) ve *Lettuce Mosaic Virus* (LMV)'ü tanılamak için serolojik metotlar kullanmışlardır. ELISA ile BCMV'yi çiçek ve tohum kısımlarında saptamışlardır. Olgun bezelye tohumunda ise virüs temel olarak embriyoda, küçük miktarda da tohum kılıfında bulunmuştur.

Karanfil ve Korkmaz (2016), marul yetiştiriciliği yapılan Çanakkale, Balıkesir ve Bursa illeri ile ilçelerinde surveyler düzenlemiş ve Marul mozaik virüsü (Lettuce mosaic virus; LMV) ve benzeri simptom gösteren bitkilerden 307 örnek toplayarak DAS-ELISA ile testlemişlerdir. 307 örneğin 35 tanesini LMV ile

enfekteli bulmuşlar ve bunlar içerisinde 30 tanesini seçerek moleküler özelliklerinin belirlenmesi amacıyla RT-PCR analizleri yapmışlar, kılıf protein (KP) genlerinin dizilimlerini çıkararak nükleotid ve amino asit dizilimlerini ortaya koymuşlardır. Çalışmalar sonucunda, Güney Marmara Bölgesi LMV izolatlarının nükleotid dizilimleri bakımından kendi aralarında % 95-100, dünya izolatları ile % 89-100, amino asit dizilimleri bakımından ise kendi aralarında % 95-100, dünya izolatları ile % 93-100 oranlarında benzerlik gösterdiğini saptamışlardır.

Krause-Sakate ve ark (2002), Brezilya'da yaptıkları çalışmada 73 LMV izolatı arasında NIB-kılıf protein bağlantı noktasını kodlayan değişken bölgede 216- nükleotid sekansa dayalı genetik çeşitliliği inceleyerek LMV izolatlarının kümesini ayırt etmişlerdir; LMV-Yar, LMV-Greek ve LMV-RoW. Son kümede, izolatların iki alt grubu, LMV-common ve LMV-Most, analiz edilen LMV izolatlarının geniş oranı için hesaplanmıştır. Bu iki alt grubun tohum kaynaklı izolatları içerdiği saptanmıştır. Ek olarak tohum kaynaklı LMV-Most izolatlarının, yaygın kullanılan *moI¹* ve *moI²* dayanıklı iki genin üstesinden gelerek böylece marul kültüründe potansiyel bir tehdit oluşturduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada LMV-Most, LMV-Common ve ek olarak LMV-RoW kümesinin izolatları arasında genetik ilişkisini saptamışlardır.

Krause-Sakate ve ark (2004), Potyvirus cinsinde yer alan LMV-Common ve LMV-Most izolatlarının marul mozaik virüsünün tohumla taşınan iki tipi olduğunu bildirmişlerdir. LMV-Most *moI¹* ve *moI²* çekinik genleri tarafından marulda dayanıklılığı kırmaktadır. RT-PCR ile yaptıkları denemede seçilmiş bölgelerin sekansının genom boyunca, LMV-Tn2 doğal rekombinant, LMV-Most ve LMV-Common izolatları arasında P3 kod bölgesinde rekombinasyon alanına yerleştiğini göstermişlerdir. Bunun doğal olarak meydana gelen LMV rekombinant izolatının ilk kanıtı olduğunu bildirmişlerdir.

Krause-Sakate ve ark (2005), Marul Mozaik Virüsü (LMV, cins Potyvirus)'nün AF199 izolatının sistemik solmayı takiben lokal lezyonlara ve Ithaca ve Vanguard 75 marul kültürlerinde bitki ölümüne neden olduğunu

bildirmişlerdir. Fenotip analiz sonucunda Vanguard 75'te değil Ithaca'da ölümcül solmaya sebep olduğunu saptamışlardır. Bu semptom belirtilerinin etkeni iki marul kültüründe farklı bulunmuştur. Solma fenotipi bu iki bölgenin kararlı aminoasit sekansında direkt ilişkili bulunmamıştır. Dahası, LMV-AF 199 proteinlerinin geçici ifadesi ayrı ya da kombinasyonda, lokal nekroz ya da bitkide görülebilir reaksiyona neden olmuş böylece sonuçlar sistemik solma reaksiyonunun RNA'dan daha çok protein sekanslarından kaynaklandığını önermiştir.

Lot ve ark (1996), LMV'nin marul ürünlerinde dünya çapında oldukça zararlı olduğu bildirilmiştir. Maruldan 3 hassas çeşit kullanılarak *Agrobacterium tumefaciens* ile yaprak explantları birlikte kültüre alınmış ve marulun rejenerasyonu ve transformasyonu için bir prosedür geliştirilmiştir. Birkaç transformant LMV CP'nin algılanabilir seviyesinde toplanmıştır. R1 soyunun 12 RO transformantları tek bir lokusta T-DNA integrasyonu ile LMV'ye karşı korunmaya çalışılmıştır. 5 RO transformantının LMV-O inokulasyon anında bitkilerin gelişme zamanına bağlı olarak etkin direnç gösterdiği saptanmıştır.

Nebreda ve ark (2003), İspanya'da marul ve brokoliyle ilişkili yaprak biti virüs vektörlerini tanımlamak için ve onları marul mozaik virüsüne ileten popülasyon dinamiklerini ve yeteneğini saptamak için araştırma yapmışlar, Moericke ve tile tuzaklarını kullanmışlardır. Moericke tuzaklarıyla, tile tuzağına göre daha çok yaprak biti türü yakalamışlar, fakat virüs yayılmasında belirlenen türlerin uçuş aktivitesini tahmin etmek için sonucunu en yaygın bulmuşlardır. Yeşil tile tuzaklar ve sarı Moericke tuzakları 2001'de ilkbahar ve sonbahar yetiştirme periyodunda yaprak biti uçuşunu gözlemlemek için kullanılmıştır. Marulda beslenen yaprak biti türleri haftalık olarak sayılmış ve LMV'nin taşınma etkisi daha sık yakalanan yaprak biti türleri için saptanmıştır. İlkbaharda Madrid ve Murcia bölgelerinde *Hyperomyzus lactucae*, *Brachyudus helichrysis*, Navarro bölgesinde brokolide *Aphis fabae*, *B. helichrysis* ve *H. lactucae* türleridir. Sonbaharda Madrid Bölgesi'nde *Hyadaphis coriandri* ve *Aphis spiraecola*, Murcia'da *A. spiraecola* ve *Myzus persicae*, Navarra'da *Therioapsis trifolii* ve

çeşitli Aphis türleri brokolide en fazla bulunmuştur. Marulda kolonize olan ana yaprak biti türleri *Nasonovia ribisnigri* iken diğer türler *Aulacorthum solani* ve *Macrosiphum euphorbiae* daha kolonize bulunmuştur. LMV'nin en etkili vektörleri *M. persicae*, *Aphis gossypii* ve *M. euphorbiae* olarak bildirilmiş, *A. fabae* ve *H. lactucae* daha düşük etkinlikte taşınırken; *Rhopalosiphum padi* ve *Nasonovia ribisnigri*'nin taşınmadığı saptanmıştır.

Pavan ve ark (2008), marulu enfekteleyen çeşitli virüsleri bildirmişlerdir. En önemlisinin dünya çapında bulunan tohum ve yaprak bitiyle non-persistent taşınan potyvirus, *Lettuce mosaic virus* (LMV) olduğunu ifade etmişlerdir. LMV'nin mozaik, küçülme, düzgün baş oluşturmama ve bazen nekroz gibi oldukça çeşitli semptomlara sebep olduğu bildirilmiştir. *mo1*¹ ve *mo1*² genlerini taşıyan bitki çeşitlerinin, ırkların çoğu direnci yenmesine rağmen, yaygın ırklara dayanıklı olduğu saptanmıştır. Tospovirus'ün en az üç türünün, *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV), *Tomato Chlorotic Spot Virus* (TCSV) ve *Ground nut Ringspot Virus* (GRSV)'ün özellikle yaz aylarında vektör tripslerin yüksek popülasyonları arazide bulunduğu, önemli kayıplara sebep olduğu bildirilmiştir. Soğuk sezon boyunca (Mayıs-Eylül arasında) iki virüs iri damar hastalığıyla ilişkili bulunmuştur: MiLBVV, Ophiovirus cinsine ait olan ve LBVaV, Varicosavirus cinsi. LBVaV ve MiLBVV'nin her ikisi de toprak kökenli fungus *Oplidium brassicae* ile taşınmıştır. *Lettuce Mottle Virus* (LeMoV, cins Sequivirus), *Cucumber Mosaic Virus* (CMV, cins Cucumovirus) ve *Bidens Mosaic Virus* (BiMV, Potyvirus cinsi)'ünün marul alanlarında görülme sıklığı yıl boyunca düşük olmasına rağmen, bu virüslerin de marulda belirtilere neden olduğu rapor edilmiştir.

Peypelut ve ark (2004), marul mozaik virüsü (LMV)'nün *mo1* genini içeren kültüvarlarda Most izolatlarını enfekteleyebildiğini bildirmişlerdir. Spesifik LMV-Most izolatlarının tanısı için reverse transcription (RT-PCR) dayalı test geliştirilmiş ve tamamı genom sekansına dayalı sırayla Most tip, Common tip ve bu iki tipe de ait olmayan üç LMV izolatını farklı denemelerle kıyaslamışlardır; (i)

genomun 3' ucunda, kapsid proteininin değişken N-ucunu kodlayan bir tanı kısıtlama bölgesinin varlığı (ii) 5' ucu ve genomunda P1 kod bölgesinin bölümüne karşılık gelen cDNA büyütmek için tasarlanan primerler kullanarak RT-PCR (iii) merkez bölge genomunun büyümesi için tasarlanan primerler kullanılarak RT-PCR. Denemelerde farklı coğrafik orijinlerden 21 izolattan ve LMV'nin moleküler çeşitliliğini temsil eden koleksiyonu tekrar yapılarak merkez bölgenin genomunun RT-PCR'ı tercih edilmiştir. Çünkü sonuçların LMV izolatları arasında doğal kombinasyondan daha az etkilendiği ve LMV-Most izolatının tek başına ve karışık kontaminasyon durumlarında hassas tanımlamayı takip ettiği bildirilmiştir.

Sertkaya ve ark (2009), Hatay ilinde Sonbahar-2008 ve ilkbahar-2009 döneminde arazi koşullarında mozaik lekeler, damar bandlaşması, kloroz ve nekroz, şekil bozukluğu ve gelişme geriliği gibi belirtiler gözlenen bitkilerden yaprak örnekleri toplamışlardır. İndikatör bitkiler kullanarak biyolojik testlemeler yapmışlardır. Test bitkilerine yapılan inokulasyonlarda 17/25 oranında simptom oluşumu gözlenmiştir. Mekanik inokulasyon ve DAS-ELISA testi sonucunda simptomlu bitkilerin 2/25 oranında CMV, diğer bitkilerin ise LMV ile enfekteli olduğu gözlenmiştir.

Uzunoğulları ve Beşirli (2011), Yalova ilinde 2010 ve 2011 üretim sezonlarında yetiştirilen marul bitkilerinin yapraklarında sarı ve yeşil renkte beneklenmeler, yaprakta kabarcıklık, yaprak kenarlarında deformasyon, nekrotik lekeler ve bodurluk gibi belirti gösteren 400 bitkiden yaprak örneği toplamışlardır. Örnekleri, Hıyar Mozayik Virüsü (*Cucumber Mosaic Virus*=CMV), Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (*Tomato Spotted Wilt Virus*=TSWV) ve Marul Mozaik Virüsü'nün (*Lettuce Mosaic Virus*=LMV) poliklonal antikorlarını kullanarak DAS-ELISA yöntemi ile testlemişlerdir. Örneklerin % 40'ının Marul Mozaik Virüsü (LMV) ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Enfekteli örnekler *Chenopodium quinoa* L., *Chenopodium amaranticolor* Costa & Reyn bitkilerine mekanik inokulasyon yöntemi ile inokule edilmiştir.

Zerbini ve ark (1995), Kaliforniya'nın Salinas Vadisi'nde marul mozaik virüsünün patlak vermesi, nekroza neden olan giriş ya da marul mozaik virüsünün şiddetli suşlarıyla ilişkilendirilmiştir. Moleküler, serolojik ve biyolojik yöntemlerin bir kombinasyonu bu epidemiyile ilişkili bir tip LMV izolatına neden olan kabul edilen 5 nekroz içeren LMV izolatını karakterize etmek için kullanılmıştır. Kılıf proteinin (KP) N-terminal bölgesi aminoasit sekanslarının ortaya çıkarılmış kıyaslamaları (burada hypervariable (HV) bölge olarak bahsedilen) farklı suşların varlığını göstermemiştir. CP-HV'nin amino asit benzerlikleri % 88-98 aralığında bulunmuş ve kabul edilen 5 nekroza neden olan izolatların sekansları farklı bulunmuştur. Farklı marul çeşitlerinde tüm izolatlar virülenslik üzerinde patotip II olarak sınıflandırılmıştır. Bu inokulasyon koşulları altında, tüm izolatlar duyarlı kültürlerde nekrotik simptomlara neden olmuştur. Nekroz girişi viral çeşitlilikten çok konukçu ve çevresel faktörlere dayandırılmıştır. Son zamanlarda marul mozaik virüsünün patlak vermesinde yeni pek çok LMV patotip virulentlerinin sorumlu olduğu sonucuna varılmış ve CP-HV bölgesinde % 12 çeşitlilik görülmüştür (Zerbini ve ark, 1995).

3. MATERYAL VE METOT**3.1. Materyal****3.1.1. Çalışma Materyali Hakkında Bilgiler**

Yürütülen çalışmada 2015-2017 sonbahar ve kış dönemlerinde Adana ilinde Ceyhan, Çukurova, Karaisalı, Merkez, Sarıçam, Seyhan, Yakapınar, Yumurtalık ve Yüreğir ilçelerinden; Mersin ilinde ise, Akdeniz, Yenice ve Tarsus'ta marul yetiştiriciliği yapılan alanlardan semptomatolojik gözlemler sonucu LBVD veya LMV'nin en az biri ile bulaşık olduğu düşünülen marullar materyal olarak kullanılmıştır. Örneklerin alındığı yer ve testlenen bitki sayısı Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Örneklerin alındığı yer ve testlenen bitki sayısı

İl	İlçe	Tarla Sayısı	Testlenen Bitki Sayısı
Adana	Ceyhan	2	11
	Çukurova	1	3
	Karaisalı	5	21
	Merkez	2	13
	Sarıçam	3	9
	Seyhan	5	21
	Yakapınar	4	7
	Yumurtalık	8	14
	Yüreğir	2	2
Mersin	Akdeniz	2	2
	Yenice	4	14
	Tarsus	8	30
	Toplam	46	160

Arazi çalışmalarında LBVD ve LMV ile enfekteli olduğundan şüphelenilen toplam 160 adet marul bitkisi toplanmıştır. Tez çalışması, Ç.Ü.Z.F. Bitki Koruma

Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarı ve mevcut klima odalarında yürütülmüştür.

3.1.2. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Materyal

Serolojik çalışmalarda, Adana ve Mersin illerinin tez kapsamı dahilindeki ilçelerinde/mahallelerinde MiLBVV, LBVaV ve LMV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen marullardan alınan yapraklar materyal olarak kullanılmıştır. Bunlara ilaveten, ticari olarak satışı yapılan marul tohumları ile bunlardan elde edilen marul fideleri de ELISA testine tabi tutulmuştur.

ELISA testlerinde, ticari olarak temin edilen BIOREBA firmasının MiLBVV ve LMV'ye spesifik ELISA kitleri, ELISA pleytleri (NUNC), otomatik pipetler, pipet uçları, saf su, tampon çözeltiler (Ek-1) ve ELISA okuyucusu (Medispec ESR 200) kullanılmıştır.

3.1.3. Total RNA Ekstraksiyonu Çalışmalarında Kullanılan Materyal

ELISA testleri sonucunda MiLBVV ve LMV ile enfekteli olduğu saptanan arazi örnekleri ve ticari ELISA kiti bulunmayan LBVaV'nin gösterdiği semptomlara benzer belirti gösteren marul bitkilerinden alınan dokular materyal olarak kullanılmıştır. Ayrıca, MiLBVV semptomu gözlenip, ELISA testinde pozitif sonuç alınamayan örneklerden de ekstraksiyon çalışmaları yapılmıştır.

Total RNA ekstraksiyonu işleminde; ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları, ekstraksiyon paketleri (BIOREBA), eppendorf tüpleri, steril havan ve havan eli, tampon çözeltiler (Ek-2), masa tipi soğutmalı santrifüj (Universal 320R) kullanılmıştır.

3.1.4. RT-PCR Çalışmalarında Kullanılan Materyal

MiLBVV, LBVaV ve LMV'nin moleküler tanısı amacıyla virüs ile bulaşık marullardan elde edilen toplam nükleik asitler çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

RT-PCR uygulamalarında, Moloney Murine Leukaemia Virus'den oluşan Revert Aid Reverse Transcriptase enzimi (M-MLV 200 U/μl, 10000 U, Thermo Scientific) ve 5X Reaction Buffer for RT, Taq polymerase enzimi (Taq DNA polimeraz enzimi, 500 U, 5 U/μl, Thermoscientific), dNTP set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 4X25 μmol, Thermoscientific), MgCl₂, DNA Ladder marker (100 bp, Solis Biodyne ve 100 bp Gene Direx), pipet ve steril pipet uçları, PCR tüpleri, saf su ve Çizelge (3.2.)'de verilen virüse spesifik primerler (10 μM) kullanılmıştır.

PCR işlemi, TECHNE GENIUS (TC- 4000) ve Applied Biosystems marka thermocycler cihazları kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 3.2. PCR'da Kullanılan Primer çiftleri ve Band Büyüklüğü

Primer Çiftleri	Dizi	Moleküler Büyüklüğü (bp)
1-LBVaV (1) LBVaV (2)	'TCA TCC CCC AGT TCA CAA A' 'ATG TCC TTC GCC ACC TGT CT'	360
2-MiLBVV (1) MiLBVV (2)	'CAG CAC TTT TTG GAT TTT GTC C' 'AGA GAA GCC TGT TCC TGC AA'	233
3-LBVaV (F) LBVaV (R)	'AAC ACT ATG GGC ATC CAC AT' GCA TGT CAG CAA TCA GAG GA'	322
4-Cps1 Cpas1	'CTC ATG ACA AAA GAA GAG AAG C' 'CAC ATC AAA TAT GAA GTT GTG CTC'	450
5-VP-248 VP-249	'CGC CAG GAT CTT TGA TCC ATC TG' 'TTG CGA CAT GTT CCT CCT CAT CG'	296
6-VP-286 VP-287	'TAT CAG CTC ACA TAC TCC CTA TCG' 'CAA CTA GCT CAG AAT ACA TGC AG'	469
7-LMV (1) LMV (2)	'AAG GCA GTA AAA CTG ATG' 'TTT ATA CTA CAG TCT TTA'	800
8-LMV CPF LMV CPR	'AAT GGT AGA CGC AAA GCT T' 'GTG CAA CCC TCT CAC GCC'	360

3.1.5. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Agaroz jel elektroforez çalışmalarında, total nükleik asit ekstraksiyonu uygulaması sonucunda elde edilen total RNA'lar ve RT-PCR çalışmalarında elde edilen PCR ürünleri materyal olarak kullanılmıştır.

Agaroz jel elektroforez uygulamasında, agaroz (Sigma), tampon çözeltiler (Ek-3), Mini Sub. DNA Cell Elektroforez cihazı (BIORAD), güç kaynağı ve UV ışık kaynağından (UVP Ultraviolet Transilluminator) yararlanılmıştır.

3.2. Metot**3.2.1. Bitkilerin Toplanması ve Muhafaza Edilmesi**

Adana ve Mersin illerinde yetiştirilen marulda zararlı LBVD ve LMV'nin tanımlanması ve karakterizasyonu amacıyla Ceyhan, Çukurova, Karaisalı, Merkez, Sarıçam, Seyhan, Yakapınar, Yumurtalık, Yüreğir, Akdeniz, Tarsus ve Yenice ilçelerinde/mahallelerinde arazi çıkışları gerçekleştirilmiştir. Arazi çalışmaları, 2015-2017 yıllarında sonbahar ve kış dönemlerinde marul ekim alanlarında yapılmıştır.

Arazide öncelikle semptomatolojik gözlemler yapılarak LBVD ve LMV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen marul bitkilerinin yapraklarından örnek dokular alınmıştır. Örnek alınan bitkilerde marul bitkilerinin yapraklarında damar dokusu çevresinde klorotik alanlar, damar genişlemesi, şiddetli yaprak deformasyonları, gelişmede azalma, yaprakta mozaik ya da beneklenme, bazen nekroz ve baş gelişiminde bozulma semptomları aranmış, bu semptomlardan en az birini gösteren marul bitkilerinden yapraklar alınarak çalışmalarda kullanılmıştır (Çizelge 3.3.).

Araziden alınan örnekler numaralandırılarak buzdolabı poşetlerine konulmuş, laboratuvara getirilmiş ve çalışmalarda kullanılmaya kadar, kısa süreliğine + 4 C°'de, daha uzun süreliğine -20 C°'de muhafaza altına alınmıştır.

Çizelge 3.3. Arazi çıkışlarında aranan belirtiler

	MiLBVV	LBVaV	LMV
Damar dokusu çevresinde klorotik alanlar	√	√	√
Damar genişlemesi	√	√	
Şiddetli yaprak deformasyonları	√	√	√
Gelişmede azalma	√	√	√
Yaprakta mozaik			√
Yaprakta beneklenme			√
Nekroz			√
Baş gelişiminde bozulma	√	√	√

3.2.2. Serolojik Çalışmalar

Serolojik çalışmalarda; marul tarlalarında semptomatolojik olarak MiLBVV ve LMV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen marul bitkileri toplanarak DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiştir.

ELISA testlerinde firmanın önerdiği yöntem dikkate alınmış ve modifiye edilerek uygulanmıştır.

3.2.2.1. DAS-ELISA Testi

1. Testlenen virüse spesifik poliklonal γ -globulin (MiLBVV ve LMV'ye spesifik antiserumlar; BIORREBA), firmanın bildirdiği yöntemle göre belirli

oranlarda sulandırılarak kaplama tampon çözeltisinde karıştırılmış ve ELISA pleytlerinin her bir çukuruna 100 µl olacak şekilde iki tekrarlı koyulmuştur.

2. Pleytler, 35 °C’de 4 saat inkübasyona alınmış ve yıkama tamponu ile en az 3 dk 3 defa yıkanmıştır.
3. 1/10 oranında hazırlanan ELISA ekstraksiyon tamponu ile bitki dokusu ezilerek özsuyu çakartılmış ve her kuyuya 100 µl koyularak pleytler +4 °C’de bir gece inkübasyona alındıktan sonra yıkama tamponu ile en az 3 dk 3 defa yıkanmıştır.
4. Konjugat tamponu içerisine virüse spesifik konjugat (v-globulin) sulandırılarak her kuyuya 100’er µl gelecek şekilde koyulmuş ve 35 °C’de 3 saat inkübasyona alındıktan sonra yıkama tamponu ile en az 3 dk 3 defa yıkanmıştır.
5. A1 kuyusu da dahil olmak üzere pleytlerin her kuyusuna substrat tampon çözeltisinden 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan substrattan (1mg/ml p-nitrophenyl phosphate) her çukura 100’er µl konularak pleytler 45-60 dk oda sıcaklığında karanlık bir ortamda bekletilmiştir.
6. Pleytteki sarı renk ölçümleri ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda okunarak sonuçlar elde edilmiştir.

3.2.3. Total RNA Ekstraksiyonu

Total RNA Ekstraksiyonu, arazi çıkışlarında toplanan ve ELISA testi ile bulaşık olduğu saptanan bitkiler ile pozitif olmayan bitkilerden alınan dokular kullanılarak Astruc ve ark (1996), ve Navarro ve ark (2004)’ın önerdiği yöntemle göre modifiye edilerek yapılmıştır.

3.2.3.1. Total RNA Ekstraksiyonu Aşamaları

1. Örnekler ezme tamponu (100mM Tris-HCl pH.8.0, 50 mM EDTA pH. 7.0, 500 mM NaCl, 10mM 2.merkapto etanol (1/1000)) ile 1:2 (ağırlık/hacim)

- oranında sulandırılarak ekstrakte edilmiş ve elde edilen bitki özsuyu eppendorf tüplere alınmıştır.
2. Bitki öz suyundan 1ml alınarak eppendorf tüplerine aktarılmış ve örnekler 3 dakika 4.000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
 3. Sıvı kısım üzerine % 20’lik Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisinden 50 µl ilave edilerek vorteks ile karıştırılmış ve sonra tüpler 65 °C’de 30 dakika su banyosunda inkübasyona tabi tutulmuştur.
 4. Tüplere 250 µl potasyum asetat (5M) ilave edilerek 20 dakika buz içerisinde bekletilmiş ve 15 dakika 13.000 rpm’de santrifüj yapılmıştır.
 5. Elde edilen sıvı kısım ikiye bölünmüş ve 500 µl’si eppendorf tüplerine aktararak -70 °C’de saklanmıştır. Geriye kalan 500 µl sıvı kısım yeni hazırlanan eppendorf tüplerine konularak ve üzerine % 100’lük etil alkolden 500 µl ilave edilerek 1ml’ ye tamamlanmış ve vorteks ile karıştırılmıştır.
 6. Daha sonra tüplere 50 µl sodyum asetat (3M) ilave edilmiş ve örnekler tekrar karıştırılarak -20 °C’de bir gece inkübe edilmiştir.
 7. Örnekler 15 dakika 14.000 rpm’de santrifüj edilerek sıvı kısım ortamdan uzaklaştırılmıştır.
 8. Eppendorf tüpleri filtre kağıdı üzerinde ters çevrilerek 5 dakika kurutulmuş ve pellet üzerine % 70’lik etil alkolden 1ml ilave edilmiştir.
 9. Örnekler RNA’ları çöktürmek amacıyla 5 dakika 13.000 rpm’de santrifüj edilmiş ve tüp içerisindeki etil alkol dökülerek eppendorf tüpleri kurutma kağıtları üzerinde kurutulmuştur.
 10. Elde edilen nükleik asitler 50 µl RNaz saf su ile sulandırılarak, 15 µl ve 35 µl olmak üzere ikiye bölünmüş ve -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.4. RT-PCR Çalışmaları

Çalışmada MiLBVV ve LMV’nin moleküler tanısını yapmak, dizi belirleme çalışmalarında kullanılacak DNA’ların elde edilmesini sağlamak, ticari

olarak ELISA kiti bulunmayan LBVaV'yi saptamak ve moleküler karakterizasyonunu yapmak amacıyla RT-PCR çalışmaları Prieto ve ark (2001) ve Navarro ve ark (2004)'a göre modifiye edilerek yapılmıştır.

Örnek sayısı fazla olduğu için MiLBVV, LBVaV ve LMV ile şüpheli örnekler ilçelere/mahallelere göre seçilerek moleküler çalışmalarda izolat olarak kullanılmıştır (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.4. RT-PCR çalışmalarında seçilen virüs izolatları ve alındığı il

Virüs İzolatı	Örnek Numarası	İl	Yöntem
Yakapınar	2	Adana	RT-PCR
Yüreğir	4	Adana	RT-PCR
Yumurtalık	6	Adana	RT-PCR
Yenice-1	11	Mersin	RT-PCR
Yenice-2	12	Mersin	RT-PCR

RT-PCR işlemi aşağıdaki şekilde iki aşamalı yapılmıştır:

1. aşamada, RT (Reverse transcription) işlemi ile cDNA'lar elde edilmiş; 2. aşamada ise elde edilen bu cDNA'lar kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

1. RT işleminde, PCR tüplerinin her birine total RNA'dan 2 µl konulup, üzerine 2 µl primer (10 pmol/ µl) ilave edilerek thermocycler'a yerleştirilmiş ve 95 °C'de 3 dk denatürasyon işlemi uygulanmıştır. Daha sonra tüpler buz üzerine alınarak 5 dk bekletilmiştir. PCR tüplerine 14.6 µl saf su, 1 µl dNTP, 0.1 µl M-MLV enzimi, 5 µl RT-buffer (5X), 0.3 µl RNaz inhibitörü ilave edilerek son hacim 25 µl olarak ayarlanmış ve örnekler thermocycler'a yerleştirilerek 42 °C'de 60 dk inkübe edilmiştir.

2. PCR işleminde ise ayrı bir PCR tüpüne, 1. aşamada yapılan işlemlerden elde edilen cDNA'lardan 2 µl konularak üzerine 16.3 µl saf su, 2.5 µl 10X PCR tampon çözeltisi (100 mM Tris -HCl (pH 8.8), 500 mM KCl, % 0.8 Nonidet P40),

1.5 µl MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl dNTP, 0.2 µl Taq DNA polymerase, 1 µl forward primer ve 1 µl reverse primer ilave edilmiştir.

Daha sonra tüpler çizelge 3.5.'teki gibi olacak şekilde ayarlanarak thermocycler'a yerleştirilmiş ve böylece PCR işlemi tamamlanmıştır.

Çizelge 3.5. MiLBVV, LBVaV ve LMV için uygun sıcaklıklar

MiLBVV	LBVaV	LMV
95 °C 3 dk	95 °C 3 dk	94 °C 3 dk
95°C 30 sn } 51°C 30 sn } 30 döngü 72 °C 40 sn }	95°C 30 sn } 62°C 30 sn } 30 döngü 72 °C 40 sn }	94°C 1 dk } 55°C 2 dk } 35 döngü 72°C 2 dk }
72°C 10 dk	72°C 10 dk	72°C 10 dk

3.2.5. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları

Agaroz jel elektroforez çalışması % 1.5 ve % 2.0'lik olacak şekilde Galitelli ve Minafra (1994)'ya göre uygulanmıştır.

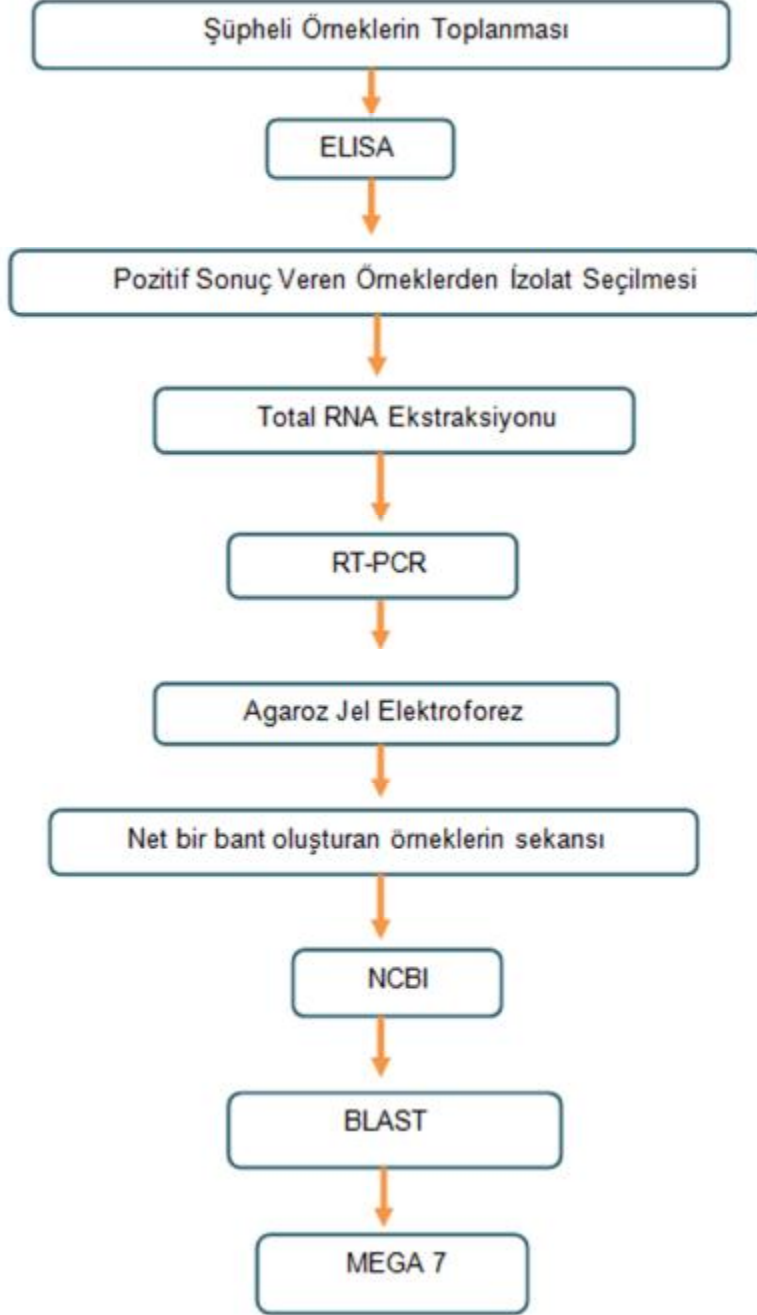
1. Cam erlen içerisine 20 ml 1X TAE (4.84 g Tris, 2ml 0.5 M Na₂EDTA, 1.142 ml Glacial acetic acid) ya da 1X TBE tampon çözeltisi konulmuş ve agaroz tamamen eriyinceye kadar ısıtıcıda tutulmuştur.
2. Karışım kaynadıktan sonra ısıtıcıdan alınarak kısa bir süre soğumaya bırakılmış ve tank içerisine dökülerek tarak takılmıştır.
3. Jelin donması beklenmiş ve jel donduktan sonra tarak çıkartılarak elektroforez tankına yerleştirilmiş ve jeli 1-2 mm geçecek kadar kullanılan buffera göre 1X TAE ya da 1X TBE eklenmiştir.
4. Örnekler ve marker 10 µl olacak şekilde jeldeki kuyulara dikkatli bir şekilde yerleştirilmiştir. Marker ilk çukura konulmuş ve yükleme tamponundaki turuncu renk (Orange G) jelin sonuna gelene kadar

elektroforez tankına virüslere göre değişmekle beraber 30 ya da 35 V elektrik akımı verilmiştir.

5. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel, oda sıcaklığında 10 dk süreyle ethidium bromid (30 µl ethidium bromid/100 ml saf su) çözeltisinde boyanmış ve daha sonra fazla ethidium bromidi uzaklaştırmak için 10 dk saf su içerisinde tutulmuştur.
6. Jel yıkandıktan sonra UV transilluminatör üzerine konulmuş ve UV ışıkta ortaya çıkan bantlar gözlemlenerek fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.6. Dizi Belirleme ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları

Bu çalışmada kullanılan ve MiLBVV, LBVaV ve LMV için seçilen izolatların dizi belirleme ve analiz çalışmalarında izlenen yollar, şekil 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Dizi Belirleme ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları

Dizi analizi alışmaları Macrogen Firması'ndan yararlanılarak yapılmıştır. NCBI, BLAST ve MEGA 7 programları kullanılarak filogenetik ağaçlar elde edilmiş ve belirlenen izolatların dünyada bildirilmiş olan diğer izolatlarla benzerlik oranları saptanmıştır

ELISA testi ve RT-PCR alışmaları sonucunda örnekler seçilerek dizi analizi ve filogenetik sınıflandırma çalışmalarında izolat olarak kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. LBVD ve LMV ile Bulaşık Bitkilerin Saptanması

LBVD ve LMV izolatlarının toplanması, tanılanması ve karakterizasyonu amacıyla 2015-2017 sonbahar ve kış sezonlarında Adana ve Mersin illeri ile marul yetiştiriciliğinin yaygın yapıldığı alanlarda yürütülen tez çalışmasında simptomatolojik olarak yaprakların damarları çevresinde klorotik alanlar, damar genişlemesi, şiddetli yaprak deformasyonları, gelişmede azalma, yaprakta mozaik ya da beneklenme, bazen nekroz ve baş gelişiminde bozulma simptomları gösteren 160 marul bitkisinden bitki dokuları alınmış ve laboratuvar çalışmalarında öncelikle ELISA yöntemi ile testlenmiştir.

Yapılan arazi çıkışlarında Adana'da Ceyhan'dan 16, Çukurova'dan 12, Karaisalı'dan 21, Merkezden 13, Sarıçam'dan 9, Seyhan'dan 21, Yakapınar'dan 7, Yumurtalık'tan 14 ve Yüreğir'den 2 bitkiden; Mersin'de ise Akdeniz'den 2, Tarsus'tan 30 ve Yenice'den 14 bitkiden örnekleme yapılmıştır.

Simptomatolojik gözlemler ile MiLBVV ve LBVaV ile enfekteli olduğu tespit edilen bitkilerin bulunduğu marul tarlalarında hastalığın yaygınlık oranının % 90-100 arasında olduğu gözlenmiştir. MiLBVV ve LBVaV'nin bitkide en fazla damarlarda genişleme, damar renginde açılma, baş oluşturmama ve deformasyon simptomlarına sebep olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.7., Şekil 4.12., Şekil 4.13.) Bitkide gelişme geriliği, gevrekleşme, yapraklarda sararma, kabarcıklaşma ve nekroz da simptomlar arasındadır (Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.8., Şekil 4.9.).

Alemzadeh ve Izadpanah (2012), İran'da yaptıkları çalışmada marul bitkilerinde damarlarda hafif şişkinlikten belirgin kalınlaşmaya kadar simptomlar, yapraklarda buruşukluk ve bitkide bodurluk belirtileri gözlemlemişlerdir. Simptomların soğuk mevsim (Aralık, Ocak ve Şubat) boyunca daha belirgin olduğunu bildirmişlerdir.

Al-Saleh ve ark (2015), Riyadh Bölgesi'nde yaptıkları çalışmada marul bitkilerinin yaklaşık % 40'ında damar açılması, bodurluk, yapraklarda deformasyon ve ana damarlarda kalınlaşma belirtileri gözlemlenmiş ve LBVD ile ilişkili bulunmuşlardır.

Fletcher ve ark (2005), Avustralya'da marulda yaptıkları survey çalışmalarında özellikle bitkide küçükleme ve sararma, yaprakta beneklenme, nekroz ve iri damar belirtileri olan örnekleri toplamış ve LBVD'yi bu alanlarda yaygın bulunmuşlardır.

LMV ile enfekteli marul bitkilerinde ise en fazla sararma, bodurluk ve yapraklarda kabarcıklaşma belirtilerinin görüldüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.10., Şekil 4.11.).

Bu tez çalışmasında Adana ve Mersin illerine bağlı marul yetiştiriciliğinin yaygın olduğu ilçelerden/mahallelerden MiLBVV, LBVaV ve LMV için testlemek amacıyla toplam 160 adet örnek alınmıştır.



Şekil 4.1. Marul yaprağında deformasyon ve gevrekleşme (Adana Merkez/MiLBVVenfeksiyonu)



Şekil 4.2. Marul yaprağında damar genişlemesi (Yenice/MiLBVV+LBVaV enfeksiyonu)



Şekil 4.3. Yaprakta damar açılması (Karaisalı/MiLBVV+LBVaV enfeksiyonu)



Şekil 4.4. Yaprakta kabarcıklaşma (Çukurova/ MiLBVV enfeksiyonu)



Şekil 4.5. Marulda gelişme geriliği (Seyhan/MiLBVV enfeksiyonu)



Şekil 4.6. Marul yaprağında kabarcıklaşma (Seyhan/MiLBVV enfeksiyonu)



Şekil 4.7. LBVD ile bulaşık marul bitkisinin araziden bir görüntüsü



Şekil 4.8. Yaprakta sararma, kabarcıklaşma ve nekroz (Karaisalı/MiLBVV enfeksiyonu)



Şekil 4.9. Gelişmede gerileme (Karaisalı/MiLBVV enfeksiyonu)



Şekil 4.10. Marul bitkisinde gelişmede azalma ve baş gelişiminde bozulma (Yakapınar/LMV+MiLBVV karışık enfeksiyonu)



Şekil 4.11. Marulda gelişmede azalma, sararma ve nekroz (Tarsus/LMV)



Şekil 4.12. Marul yaprağının büyütülmüş hali (Karaisalı/MiLBVV enfeksiyonu)



Şekil 4.13. Baş oluşturmamış bir bitkinin arazide görüntüsü (LBVD enfeksiyonu)

4.2. ELISA Çalışmaları

Marul tarlalarında simptomatolojik olarak MiLBVV, LBVaV ve LMV'nin en az biri ile bulaşık olduğundan şüphelenilen 160 marul bitkisinden yapılan ELISA testleri sonucunda Adana ve Mersin illeri ile yaygın bir şekilde marul yetiştiriciliği yapılan ilçelerde/mahallelerde mevcut arazilerden toplanan 160 marul bitkisinden 53 tanesi MiLBVV ve 22 tanesi LMV ile enfekteli bulunmuştur. 10 bitkide ise MiLBVV+LMV karışık enfeksiyonu saptanmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Arazi çıkışı yapılan alanlar ve ELISA testi sonucu MiLBVV ve LMV ile enfekteli olan marul bitkileri

İlçe/Mahalle	Testlenen Bitki Sayısı	Pozitif Sonuç Veren Örnek Sayısı (MiLBVV)	Pozitif Sonuç Veren Örnek Sayısı (LMV)	Karışık Enfeksiyon LMV+MiLBVV
Ceyhan	11	-	-	-
Çukurova	12	9	-	-
Karaisalı	21	13	-	-
Merkez	13	1	-	-
Sarıçam	9	1	-	-
Seyhan	21	7	-	-
Yakapınar	7	3	2	2
Yumurtalık	14	2	8	1
Yüreğir	2	1	-	-
Akdeniz	2	-	-	-
Tarsus	30	6	11	6
Yenice	14	9	1	1
Toplam	160	53	22	10

Fletcher ve ark (2005), Yeni Zelanda'da özellikle marulda cüceleşme ve sararma, yaprakta beneklenme, nekroz ve iri damar belirtileri gösteren bitkileri serolojik olarak ELISA testine tabi tutmuşlardır. Surveylerde LBVD'ye kompleks iki virüsün (MiLBVV ve LBVaV) sebep olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca survey periyodları boyunca iri damar hastalığını marulda en yaygın virüs hastalığı olarak saptamışlardır. Surveylerde LNYV, CMV, LMV, TuMV ve BWYV gibi diğer virüslerin sıklıkla karışık enfeksiyon yaptığı fakat önemli ürün kayıplarına neden

olmadığı bildirilmiştir. TSWV, ArMV ve TNV'ye ise surveylerde hiç rastlamadıklarını bildirmişlerdir.

4.3. Total RNA Ekstraksiyon Çalışmaları

ELISA testleri sonucunda MiLBVV ve LMV ile enfekteli olduğu belirlenen marul örneklerinin taze yapraklarından ve LBVaV'nin oluşturduğu semptomlara benzer belirti gösteren taze marul yapraklarından alınan dokular kullanılarak Astruc ve ark (1996)'nın önerdiği yöntem dikkate alınarak nükleik asitler elde edilmiş ve PCR işlemi sonrası PCR ürünleri % 1,5'lük ya da % 2'lik agaroz jel kullanılarak TAE veya TBE tampon çözeltisinde elektroforez yöntemi ile bandlar elde edilmiştir.

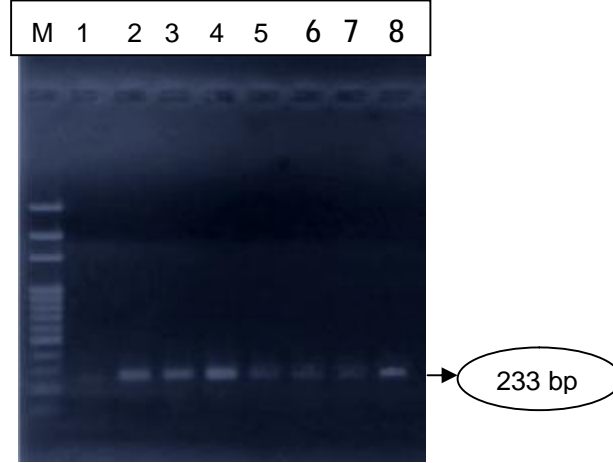
4.4. RT-PCR Çalışmaları

Temel olarak yüksek sıcaklıkta yapısı bozulmayan bir DNA polimeraz kullanılarak, Thermo Cycler yardımıyla DNA replikasyonunun in vitro ortamda tekrarlanması sonucu DNA'nın çoğaltılmasını sağlayan PCR mekanizması günümüzde moleküler biyoloji ve genetik laboratuvarlarının sıkça kullandığı bir yöntemdir (Anonymous, 2007).

Bu tez çalışmasında, RT-PCR yöntemi ticari antiserumu bulunmayan LBVaV'nin moleküler karakterizasyonu ve ELISA testleri sonucu saptanan MiLBVV ve LMV'nin moleküler karakterizasyonu amacıyla kullanılmıştır. PCR çalışmalarında MiLBVV, LBVaV ve LMV'ye özgü primer çiftleri kullanılarak yurtdışında bazı araştırmacıların elde ettikleri band büyüklüğüyle aynı bandlar bulunmuştur.

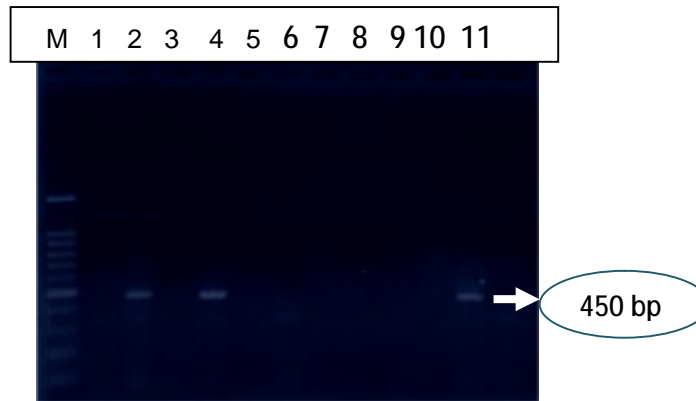
MiLBVV için MiLBVV(1) ve MiLBVV(2) primer çifti kullanılarak Çukurova, Seyhan, Karaisalı, Yakapınar ve Yenice ilçelerinden toplanan marul izolatlarına ait 233 bp büyüklüğünde bandlar elde edilmiştir (Şekil 4.14.). Bu sonuçlar, Araya ve ark (2011)'nin çalışması ile benzerlik göstermiş ve Şili'de

yapılan bu çalışmada aynı araştırcılar MiLBVV(1) ve MiLBVV(2) primerlerini kullanarak 233 bp'lik bandlar gözlemlemişlerdir.



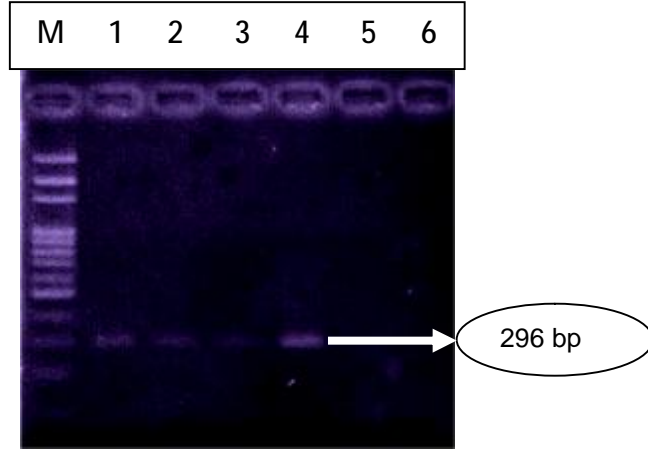
Şekil 4.14. MiLBVV'nin 2 nolu primer çifti ile yapılan RT-PCR bandları

MiLBVV için Cps1 ve Cpas1 primer çifti kullanılarak Yakapınar, Yüreğir ve Yenice ilçelerinden toplanan marul izolatlarına ait 450 bp büyüklüğünde bandlar elde edilmiştir (Şekil 4.15.). Bulunan sonuçlar, Barcala Tabarrozzi ve ark (2010)'nın çalışması ile benzerlik göstermiş ve Arjantin'de yapılan bu çalışmada aynı araştırcılar Cps1 ve Cpas1 primerlerini kullanarak 450 bp'lik bandlar elde etmişlerdir.



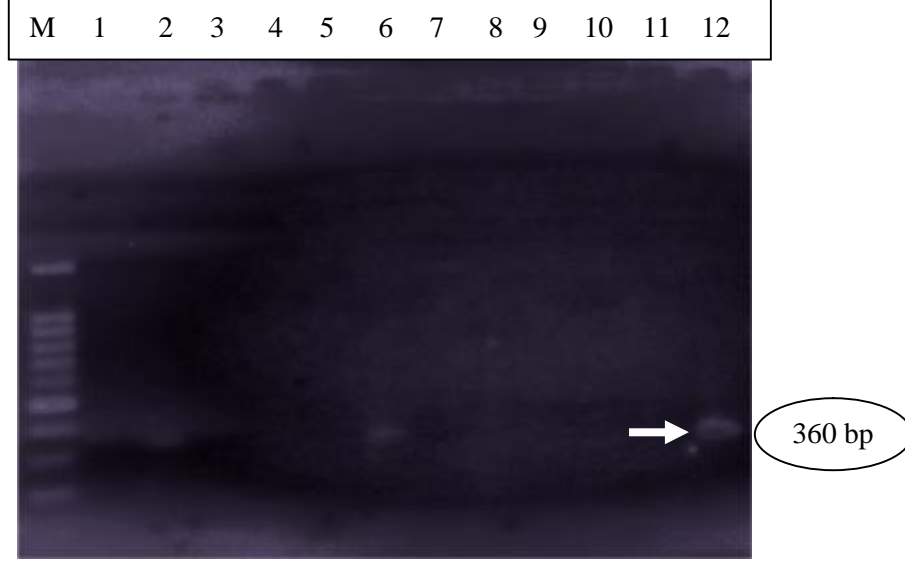
Şekil 4.15. MiLBVV'nin 4 nolu primer çifti ile yapılan RT-PCR bandları

LBVaV'ye özgü VP-248 ve VP-249 primer çifti kullanılmış ve Adana ilinde Çukurova ve Karaisalı; Mersin ilinde ise Yenice'den alınan marul izolatlarına ait 296 bp'lik bandlar gözlenmiştir (Şekil 4.16.). Bulunan sonuçlar Navarro ve ark (2004)'nın İspanya'da yapılan çalışması ile eş değer sonuçlar göstermiş ve LBVaV için 296 bp'lik bandlar elde edilmiştir. Ticari antiserumu bulunmayan LBVaV çalışmada ELISA ile saptanamamış, RT-PCR yöntemi ile saptanmıştır.



Şekil 4.16. LBVaV'nin 5 nolu primer çiftiyle yapılan RT-PCR bandları

LMV'ye özgü LMV CPR ve LMV CPF primer çifti kullanılarak Adana'da Yakapınar ve Yumurtalık; Mersin'de ise Yenice ilçelerinden/mahallelerinden marul izolatlarına ait 360 bp'de bandlar gözlenmiştir (Şekil 4.17.).



Şekil 4.17. LMV'nin 8 nolu primer çifti ile yapılan RT-PCR bandları

RT-PCR çalışmalarında MiLBVV ve LBVaV'nin ikisinin ortak enfeksiyon gösterdiği saptanmıştır. LBVaV, MiLBVV yokluğunda semptom göstermezken; MiLBVV, LBVaV varlığına ya da yokluğuna bağlı olmaksızın iri damar semptomu göstermiştir. Bulunan sonuçlar LBVD'ye neden olan etmenin MiLBVV olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar Hayes ve ark (2006)'nın bulguları ile uyumludur. Aynı araştırmacılar MiLBVV ve LBVaV'nin ortak enfeksiyonunu Kaliforniya'da marul yetiştirilen yerlerde yaygın olarak bulmuşlardır.

LMV ve LBVD yürütülen tez çalışmasında ara sıra karışık enfeksiyonda saptanmıştır. Fletcher ve ark (2005), Avustralya'da yaptıkları çalışmada LBVaV'nin LBVD kompleksinde bulunduğunu fakat buna rağmen iri damar semptomlarına sebep olmadığını bildirmiştir. LBVD'yi arazi çıkışları boyunca marulda en yaygın virüs hastalığı olarak bildirmişlerdir. LMV ve LBVD Avustralya'da yapılan bu çalışmada ara sıra karışık enfeksiyonda bulunmuştur.

Sanches ve ark (2008), Brezilya'da yaptıkları çalışmada LBVaV ve MiLBVV'nin karışık enfeksiyonda iri damar hastalığına sebep olduğunu bildirmişlerdir.

4.5. Dizi Belirleme ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları

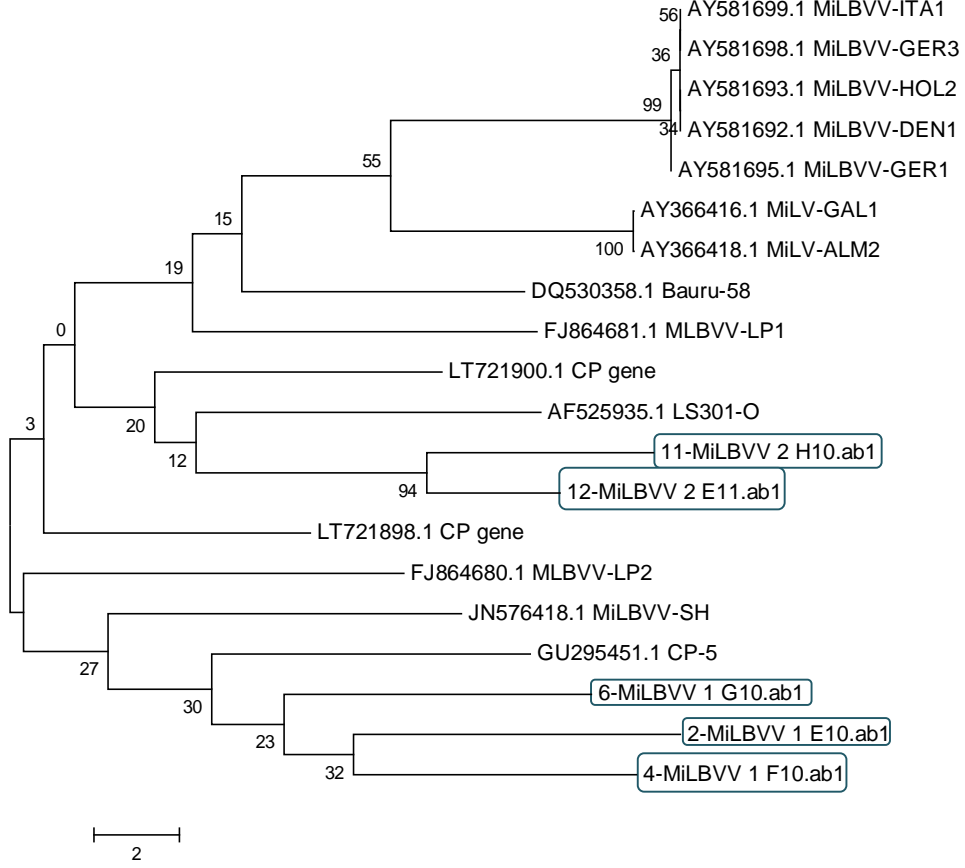
Genetik sekanslama ya da DNA sekanslama, bir DNA zincirinde bulunan dört bazın adenin (A), guanin (G), sitozin (S) ve timin (T) sırasını belirlemek için kullanılan metot veya teknolojidir (Anonymous, 2014).

PCR çalışmaları sonucu elde edilen PCR ürünlerine ait nükleotid dizileri, Macrogen firması tarafından ticari olarak belirlenmiş ve bu tez çalışmasında kullanılan izolatlara ait sekans bilgileri dünyada kaydedilmiş diğer izolatlarla nükleotid düzeyde karşılaştırılarak filogenetik ağaçlar elde edilmiştir.

4.5.1. Marul İri Damar Virüsü (MiLBVV) Dizi Belirleme Çalışması

MiLBVV dizi belirleme çalışmalarında MiLBVV ile enfekteli marul bitkilerinden izole edilen Yakapınar, Yüreğir, Yumurtalık, Yenice-1 ve Yenice-2 izolatları kullanılmıştır.

MiLBVV(1)-MiLBVV(2) primer çifti ile yapılan MiLBVV izolatlarının (2- MiLBVV 1 E 10.ab1, 4- MiLBVV 1 F10.ab1, 6- MiLBVV 1 G10.ab1, 11- MiLBVV 2 H 10.ab1) yer aldığı filogenetik ağaçta Yenice-1 ve Yenice-2 izolatları aynı grupta yer alırken, Adana'dan alınan izolatlarla Mersin'den alınan izolatlar farklı gruplarda yer almıştır (Şekil 4.18.). Bu izolatların dünyada yer alan diğer izolatlarla benzerlik oranı Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

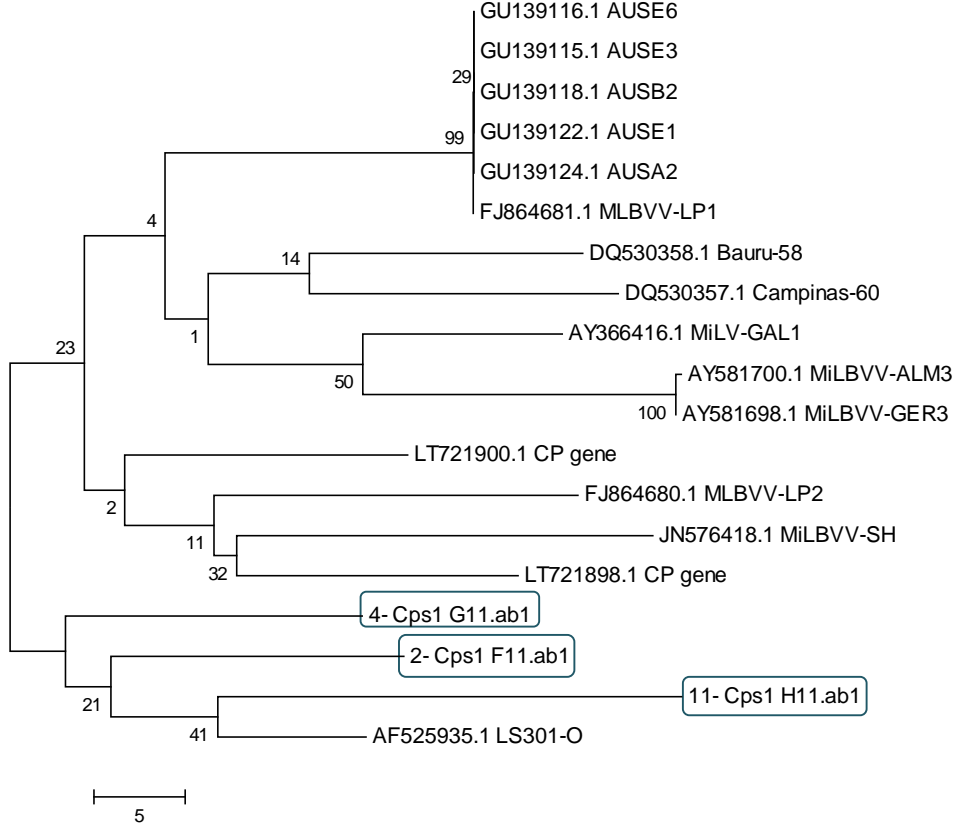


Şekil 4.18. MiLBVV(1)-MiLBVV(2) primer çifti ile saptanan MiLBVV izolatlarının (2- MiLBVV 1 E 10.ab1, 4- MiLBVV 1 F10.ab1, 6- MiLBVV 1 G10.ab1, 11- MiLBVV 2 H 10.ab1) filogenetik soyağacı (Bootstrap 1000 tekrarlamalı)

Çizelge 4.2. MiLBVV(1)- MiLBVV(2) Primer Çifti ile Elde Edilen İzolatların Dünyada Yer alan Diğer İzolatlarla Benzerlik Oranı

MiLBVV(1)- MiLBVV(2)	Isolate	Accession Number	% Identity	Origin
	MiLBVV-ITA1	AY581699.1	% 97	Spain
	MiLBVV- GER3	AY581698.1	% 97	Spain
	MiLBVV- HOL2	AY581693.1	% 95	Spain
	MiLBVV- DEN1	AY581692.1	% 96	Spain
	MiLBVV- GER1	AY581695.1	% 95	Spain
	MiLV-GAL1	AY366416.1	% 97	Spain
	MiLV-ALM2	AY366418.1	% 95	Spain
	Bauru-58	DQ530358.1	% 95	Brazil
	MLBVV-LP1	FJ864681.1	% 97	Argentina
	CP-gene	LT721898.1	% 95	Egypt
	LS301-0	AF525935.1	% 95	Netherlands
	MLBVV-LP2	FJ864680.1	% 97	Argentina
	MiLBVV-SH	JN576418.1	% 95	Iran
	CP-5	GU295451.1	% 97	Argentina

Cps1-Cpas1 primer çifti ile yapılan MiLBVV izolatlarının (2- Cps1 F11.ab1, 4-Cps1 G11.ab1, 11 Cps1 H11.ab1) yer aldığı filogenetik ağaçta Yenice-1 izolatı Hollanda izolatı ile aynı grupta yer almıştır (Şekil 4.19.). Bu izolatların dünyada yer alan diğer izolatlarla benzerlik oranı Çizelge 4.3.'te verilmiştir.



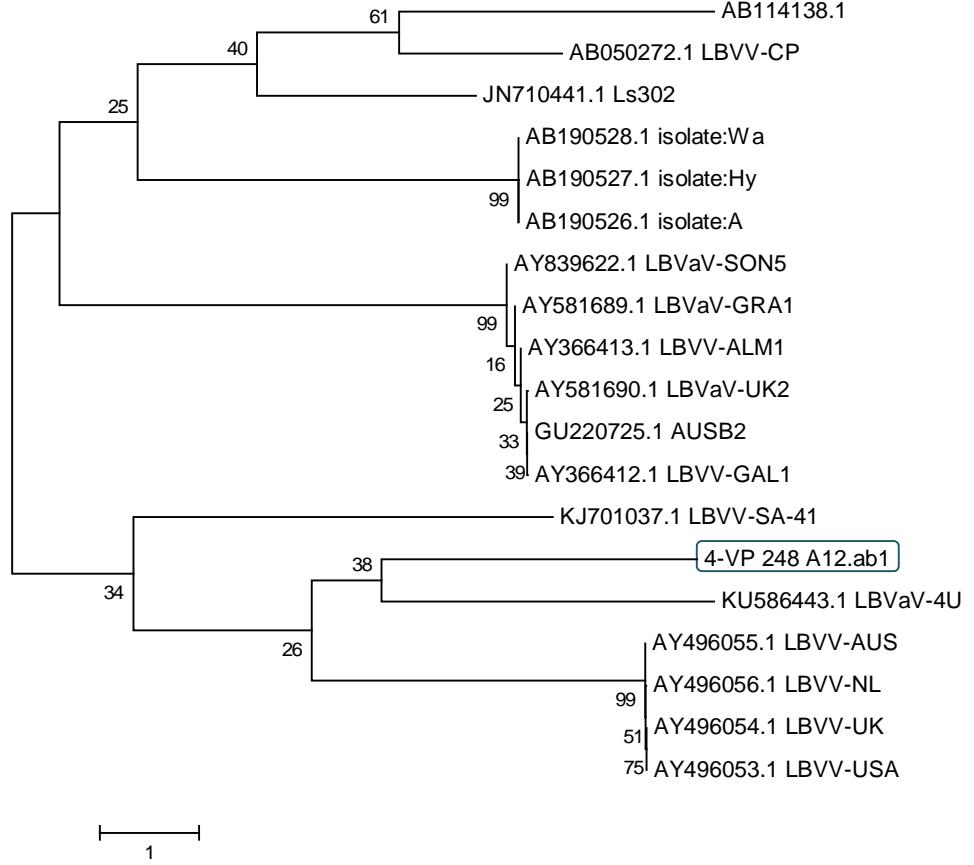
Şekil 4.19. Cps1-Cpas1 primer çifti ile saptanan MiLBVV izolatlarının (2- Cps1 F11.ab1, 4- Cps1 G11.ab1, 11- Cps1 H 1011.ab1) filogenetik soyağacı (Bootstrap 1000 tekrarlamalı)

Çizelge 4.3. MiLBVV Cps1-Cpas1 Primer Çifti ile Elde Edilen İzolatların Dünyada Yer alan Diğer İzolatlarla Benzerlik Oranı

MiLBVV Cps1-Cpas1	Isolate	Accession Number	% Identity	Origin
	MiLV-GAL1	AY366416.1	% 98	Spain
		LT721900.1	% 98	Egypt
	MiLBVV-GER3	AY581698.1	% 98	Spain
		LT721898.1	% 97	Egypt
	MiLBVV-ALM3	AY581700.1	% 97	Spain
	AUSA-2	GU139124.1	% 97	Australia
	AUSE6	GU139116.1	% 97	Australia
	Bauru-58	DQ530358.1	% 97	Brazil
	Campinas-60	DQ530357.1	% 97	Brazil
	AUSE1	GU139122.1	% 97	Australia
	MLBVV-LP2	FJ864680.1	% 96	Argentina
	LS301-O	AF525935.1	% 96	Netherlands
	MiLBVV-SH	JN576418.1	% 96	Iran
	AUSB2	GU139118.1	% 96	Australia
	MLBVV,LP1	FJ864681.1	% 96	Argentina
	AUSE3	GU139115.1	% 96	Australia

4.5.2. Marul İri Damar Virüsü (LBVaV) Dizi Belirleme Çalışması

LBVaV dizi belirleme çalışmalarında LBVaV ile enfekteli marul bitkisinden izole edilen Yüreğir izolatu kullanılmıştır. Yüreğir izolatu Suudi Arabistan izolatıyla aynı grupta yer almıştır (Şekil 4.20.). Bu izolatin dünyada yer alan diğer izolatlarla benzerlik oranı Çizelge 4.4.'te verilmiştir.



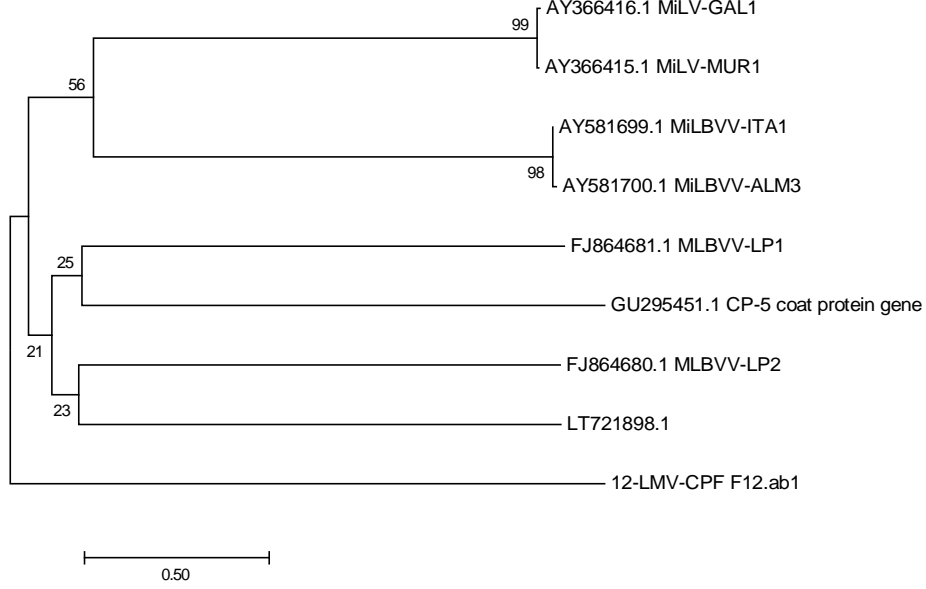
Şekil 4.20. VP 248-VP 249 primer çifti ile saptanan LBVaV izolatının (4- VP 248 A12.ab1) filogenetik soyağacı (Bootstrap 1000 tekrarlamalı)

Çizelge 4.4. LBVaV CPF-LBVaV CPR Primer Çifti ile Elde Edilen İzolatların Dünyada Yer alan Diğer İzolatlarla Benzerlik Oranı

LBVaV CPF-LBVaV CPR	Isolate	Accession Number	% Identity	Origin
	LBVaV-4U	KU586443.1	% 96	Saudi Arabia
	Ls302	JN710441.1	% 95	Netherlands
	LBVaV-UK2	AY581690.1	% 95	Spain
	LBVaV-GRA1	AY581689.1	% 94	Spain
	LBVV-ALM1	AY366413.1	% 94	Spain
	AUSB2	GU220725.1	% 94	Australia
	LBVV-GAL1	AY366412.1	% 94	Spain
	LBVV-SA-41	KJ701037.1	% 94	Saudi Arabia
	LBVaV-AUS	AY496055.1	% 94	Germany
	LBVV-NL	AY496056.1	% 94	Germany
	LBVV-UK	AY496054.1	% 94	Germany
	LBVV-USA	AY496053.1	% 94	Germany
	LBVaV-SON5	AY839622.1	% 93	Spain
		AB114138.1	% 92	Japan
	Isolate:Wa	AB190528.1	% 92	Japan
	Isolate:Hy	AB190527.1	% 92	Japan
	Isolate:A	AB190526.1	% 92	Japan
	LBVV-CP	AB050272.1	% 92	Japan

4.5.3. Marul Mozaik Virüsü (LMV) Dizi Belirleme Çalışması

LMV dizi belirleme çalışmalarında LMV ile enfekteli marul bitkisinden izole edilen Yenice-2 izolatu kullanılmıştır. Yenice-2 izolatu hiçbir ülkeyle aynı grupta yer almamıştır (Şekil 4.21.). Bu izolatin dünyada yer alan diğer izolatlarla benzerlik oranı Çizelge 4.5.'te verilmiştir



Şekil 4.21. LMV-CPF, LMV-CPR primer çifti ile saptanan LMV izolatının (12-LMV-CPF F12.ab1) filogenetik soyağacı (Bootstrap 1000 tekrarlamalı)

Çizelge 4.5. LMV CPF-LMV CPR Primer Çifti ile Elde Edilen İzolatların Dünyada Yer Alan Diğer İzolatlarla Benzerlik Oranı

LMV CPF-LMV CPR	Isolate	Accession Number	% Identity	Origin
	CP gene	LT721898.1	% 81	Egypt
	MiLV-GAL1	AY366416.1	% 79	Spain
	MiLBVV-ITA1	AY581699.1	% 79	Spain
	MiLV-MUR1	AY366415.1	% 78	Spain
	MLBVV-LP2	FJ864680.1	% 78	Argentina
	MiLBVV-ALM3	AY581700.1	% 78	Spain
	MLBVV-LP1	FJ864681.1	% 78	Argentina
	CP-5	GU295451.1	% 77	Argentina

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın amacı, Adana ve Mersin ili marul üretim alanlarında marul iri damar hastalığına sebep olan etmen virüs veya virüs kompleksinin belirlenmesi ve marul mozaik virüsünün saptanmasıdır. Ayrıca, LBVD ve LMV'nin saptanarak bu çalışmada kullanılacak izolatların elde edilmesi ve Adana ve Mersin illerinden elde edilen bazı MiLBVV, LBVaV ve LMV izolatlarının moleküler karakterizasyonlarının yapılması amacıyla yürütülmüştür. Bu amaçlar doğrultusunda, virüs ile bulaşık olduğundan şüphelenilen marul bitkilerinden örnekler alınarak, serolojik (DAS-ELISA) ve moleküler (RT-PCR) yöntemler ile testlenmiş ve elde edilen izolatların moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca, bu çalışma sonucunda, toplanan örneklerde bulaşıklık oranının ortaya konulması da mümkün olmuştur.

Bu tez çalışmasında saptanan sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- a) Marul tarlalarına yapılan arazi çıkışları sonucunda toplam 160 adet marul bitkisi toplanarak testlenmiştir. Toplanan örnekler MiLBVV ve LMV'nin tespiti için DAS-ELISA testine tabi tutulmuştur.
- b) Adana ilinden 114 örnek ve Mersin ilinden 46 örnek toplanmıştır.
- c) ELISA testi sonuçlarına göre toplam 53 bitki MiLBVV ile 21 bitki ise LMV ile bulaşık saptanmıştır. Ayrıca 10 bitkide MiLBVV+LMV karışık enfeksiyonu saptanmıştır.
- d) LBVaV'ye özgü ticari ELISA kitleri mevcut olmadığı için sadece RT-PCR ile testlenmiştir.
- e) RT-PCR çalışmalarında 37 bitki MiLBVV, 16 bitki LBVaV ile bulaşık bulunmuştur.

Yapılan çalışmalar sonucunda MiLBVV ve LBVaV'nin ikisinin ortak enfeksiyon gösterdiği saptanmıştır. LBVaV, MiLBVV yokluğunda simptom

göstermezken; MiLBVV, LBVaV varlığına ya da yokluğuna bağlı olmaksızın iri damar simptomsu göstermiştir. Bulunan sonuçlar LBVD'ye neden olan etmenin MiLBVV olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak yürütülen tez çalışmasında marul yetiştiriciliğinde sorun olan ve kimyasal mücadelesi olmayan LBVD ve LMV'nin tanımlanması ve karakterizasyonu amacıyla serolojik ve moleküler yöntemler uygun bir şekilde gerçekleştirilerek pozitif sonuçlar elde edilmiştir.

Tez çalışmasının yapıldığı Adana ve Mersin illerinde 100.000 tonun üzerinde üretimi yapılan marul bölge için önemli kışlık sebzelerden biridir. Bu bölgede hastalık ve zararlı etmenleri ekonomik açıdan verimde kayba sebep olmaktadır. Bu etmenler içinde virüsler kimyasal mücadelesi olmaması ve vektörlerin virüsleri taşıması sebebiyle ayrı bir öneme sahiptir.

Bu virüslere karşı, yapılacak olan etkili bir vektör mücadelesine ek olarak, virüsten ari tohum ve üretim materyalinin kullanılması, koruyucu kültürel uygulamalar, dayanıklı veya tolerant çeşitlerin tercih edilmesi çok önemlidir.

KAYNAKLAR

- Abak, A., Düzyaman, E., Şeniz, V., Gülen, H., Pekşen, A., and Kaymak, H.Ç., 2010. Sebze Üretimini Geliştirme Yöntem ve Hedefleri. http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/c05147f3029c97c_ek.pdf
- Alan, B., 2012. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Yetiştirilen Bazı Kışlık Sebzelerde Hastalık Yapan Virüslerin Tanılanması ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Adana, 134s.
- Alemzadeh, E., Izadpanah, K., 2012. Occurrence and Partial Characterization of *Lettuce big vein associated virus* and *Mirafiori lettuce big vein virus* in Lettuce in Iran. Springer, 23(3):354-358.
- AL-Saleh, M.A., AL-Shahwan, I.M., Amer, M.A., Shakeel, M.T., Umar, M., Abdala, D.A., Efthimiou, C.E., Katis, N.I. 2015. First reports of *Lettuce big-vein associated Virus* and *Mirafiori lettuce big-vein virus* infecting lettuce in Saudi Arabia. New Disease Reports, 31,2.
- ANONYMOUS, 2007. <https://biyoinformatik.wordpress.com/2007/02/21/pcr-polimeraze-chain-reaction-nedir/>
- ANONYMOUS, 2007. <http://www.gencziraat.com>
- ANONYMOUS, 2007. <http://eol.org/pages/5219224/names>
- ANONYMOUS, 2011. <http://www.bahcebitkileri.org/marul-yetistiriciligi-ve-cesitleri.html>
- ANONYMOUS, 2014. <http://www.niftytest.com/tr/education/what-is-genetic-sequencing/>
- ANONYMOUS, 2015. <https://evhayat.com/kis-sebzeleri-nelerdir/>
- Araya, C., Pena, E., Salazar, E., Roman, L., Medina, C., Mora, R., Aljaro, A., Rosales, I.M., 2011. Symptom Severity and Viral Protein or RNA Accumulation in Lettuce Affected by Big-Vein Disease. Chilean Journal of Agricultural Research, 71(1):63-72.

- Astruc, N., Marcos, J.F., Macquarie, G., Candresse, G.T., and Vicent, P., 1996. Studies on the Diagnosis of Hop stunt viroid in Fruit Trees: Identification of New Host and Application of a Nucleic Acid Extraction Procedure Based on Non-Organic Solvents. *European Journal of Plant Pathology*, 102:837-846.
- Balkaya, A., Saribaş, Ş., and Özgen, T., 2016. Türkiye’de Kışlık Sebze Türlerinin Tarımsal Üretimdeki Yeri ve Önemi. *Türktob*, 8-12.
- Barcala Tabarozzi, A.E., Pena, E.J., Dal Bo, E., Robles Luna, G., Reyes, C.A., and Garcia, M.L., 2010. Identification of *Mirafiori lettuce big-vein virus* and *Lettuce big-vein associated virus* infecting *Lactuca sativa* with symptoms of lettuce big-vein disease in Argentina. *Plant Pathology*, 59:1160.
- Candresse, T., Lot, H., German-Retana, S., Krause-Sakate, R., Thomas, J., Souche, S., Delaunay, T., Lanneau, M., and Gall. O.L., 2007. Analysis of the serological variability of *Lettuce mosaic virus* using monoclonal antibodies and surface plasmon resonance technology. *Journal of General Virology*, 88:2605-2610.
- Choueri, E., Digiario, M., Minafra, A., and Savino, V., 1993. A Survey of Peach Viruses in Apulia. *Adv. Hort. Sci.* 7:61-64.
- Çalışkan, A.F., 2007. Kabak Sarı Mozayik Virüsü (Zucchini Mosaic Virus, ZYMV)’nin Tanısı ve Bitki Aktivatörleri Kullanılarak Mücadele Olanaklarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Adana, 106s.
- Demirci, E., and Açıkgöz, S., 1995. Relations of Some Weed Species with *Lettuce Big-vein Virus* in Erzurum-Türkiye. *J. Turk. Phytopath.*, 24:135-137.
- Dinant, S., and Lot, H., 1992. *Lettuce Mosaic Virus*. *Plant Pathology*, 41(5):528-542.

- Dinant, S., Maisonneuve, B., Albouy, J., Chupeau, Y., Chupeau, M. C., Bellec, Y., Gaudefroy, F., Kusiak, C., Souche, S., Robablio, C., and Lot, H., 1997. Coat Protein Gene, Mediated Protection in *Lactuca sativa* against lettuce mosaic potyvirus strains. *Molecular Breeding*, 3:75-86.
- Döken, M. T., Açıköz, S., and Demirci, E., 1993. *Big-vein virus* disease of lettuce in Erzurum, Türkiye. *J. Turk. Phytopath.*, 22(1):41-43.
- Döken, M.T., Demirci, E., and Açıköz, S., 1994. Morphology of *Oplidium brassicae* (Wor.) Dang. and its Transmission of Big-vein Virus to Lettuce. *J. Turk. Phytopath.*, 23:133-142.
- Demirci, E., Açıköz, S., and Döken, M.T., 1995. Relations of Some Weed Species with Lettuce Big-Vein Virus in Erzurum-Türkiye. *J. Turk. Phytopath.*, 24(3):135-137.
- Erkan, S., Gümüş, M., Paylan, İ.C., Duman, İ., and Ergün, M., 2013. İzmir İli ve Çevresindeki Bazı Kışlık Sebzelerde Görülen Viral Etmenlerin Saptanması. *Ege Üniv. Ziraat Fakültesi Derg.*, 50(3):311-322.
- FAO, 2015. The World Lettuce Economy. [HTTP://WWW.FAO.ORG/FAOSTAT/EN/#DATA](http://www.fao.org/faostat/en/#data)
- Fidan, Ü., Türkoğlu, T. 1988. Ege Bölgesi Marul Bitkilerinde Görülen Virüs Hastalıkları Üzerinde Ön Çalışmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 28(1-2):43-56.
- Fletcher, J.D., France, C.M., and Butler, R.C., 2005. Virus Surveys of Lettuce Crops and Management of Lettuce Big-Vein Disease in New Zealand. *New Zealand Plant Protection*, 58:239-244.
- Fujii,H., Sasaya, T., Takezaki, A., Ishikawa, K., and Fujino, M., 2003. Resistance to Lettuce Big-Vein Disease in Lettuce Cultivars. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 72(4):315-317.
- Gallitelli, D., and Minafra, A., 1994. Electroforesis. Course on Plant Virus Diagnosis, 15-30 October 1994. Adana-Turkey. Page:89-99.

- Hartwright, L.M., Hunter, P.J., and Walsh, J.A., 2010. A comparison of Olpidium isolates from a range of host plants using internal transcribed spacer sequence analysis and host range studies, Elsevier, 114:26-33.
- Hayes, R. J., Wintermantel, W. M., Nicely, P.A., Ryder, E. J. 2006. Host Resistance to *Mirafiori lettuce big-vein virus* and *Lettuce big-vein associated virus* and Virus Sequence Diversity and Frequency in California, Plant Disease, 90:233-239.
- Heidari, F., Koochi-Habibi, M., Mosahebi, G.H., 2010. Identification and Partial Characterization of Viral Agent of *Lettuce Big Vein* in Tehran Province. Iranian Journal of Virology 4(1):17-22.
- Hiraguri, A., Ueki, S., Kondo, H., Nomiyama, K., Shimizu, T., Ichiki-Uehara, T., Omura, T., Sasaki, N., Nyunoya, H., and Sasaya, T., 2013. Identification of movement protein of *Mirafiori lettuce big-vein ophiovirus*. Journal of General Virology, 94:1145-1150.
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>
- ICTV, 2017. *Lettuce big-vein associated virus*, 2016. <http://talk.ictvonline.org/taxonomy>
- ICTV, 2017. *Mirafiori Lettuce big-vein virus*, 2008. <http://talk.ictvonline.org/taxonomy>
- Jafarpour, B., Shepherd, R. J., and Grogan, R. G., 1979. Serologic Detection of *Bean Common Mosaic* and *Lettuce Mosaic Viruses* in Seed. Phytopathology, 10:1125-1129.
- Karanfil, A., Korkmaz, S., 2016. Güney Marmara Bölgesi Marul Üretim Alanlarında Marul mozaik virüsü (*Lettuce mosaic virus*; LMV) İzolatlarının Kılıf Protein Genine Göre Moleküler Karakterizasyonu. Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi. İnci Kağıtçılık Ofset Matbaa, Konya, 938s.

- Krause-Sakate, R., Fakhfakh, H., Peypelut, M., Pavan, M. A., Zerbini, F. M., Marrackhi, M., Candresse, T., and Le Gall, O., 2003. A Naturally occurring recombinant isolate of Lettuce mosaic virus. *Archives of Virology*, 149:191-197.
- Krause-Sakate, R., Le Gall, O., Fakhfakh, H., Peypelut, M., Marrackhi, M., Pavan, M. A., Souche, S., Lot, H., Zerbini, F. M., and Candresse, T., 2002. Molecular and Biological Characterization of *Lettuce Mosaic Virus* (LMV) Isolates Reveals a Distinct and Widespread Type of Resistance-Breaking Isolate: LMV-Most. *Phytopathology*, 5:563-572.
- Krause-Sakate, R., Redondo, E., Richard-Forget, F., Jadao, A. S., Houvenaghel, M. C., German-Retana, S., Pavan, M. A., Candresse, T., Zerbini, F. M., and Gall, O. L., 2005. Molecular Mapping of the Viral Determinants of Systemic Wilting Induced by a *Lettuce Mosaic Virus* (LMV) Isolate in some Lettuce Cultivars. *Elsevier*, 109:175-180.
- Lot, H., Campbell, R. N., Souche, S., Milne, and R.G., Roggero, P., 2002. Transmission by *Oplidium brassicae* of *Mirafiori lettuce virus* and Lettuce Big-Vein Etiology. *Phytopathology*, 92:288-293.
- Luna, G.R., Pena, E.J., Borniego, M.B., Heinlein, M., Garcia, L.G., 2013. Ophioviruses CPsV and MiLBVV movement protein is encoded in RNA 2 and interacts with the coat protein. *Virology*, 441:152-161.
- Maccarone, L. D., 2013. Relationships Between the Pathogen *Oplidium virulentus* and Viruses Associated with Lettuce Big-Vein Disease. *Plant Diseases*, 97(6):700-707.
- Moreno, A., and Fereres, A., 2012. Virus Diseases in Lettuce in the Mediterranean Basin. *Advances in Virus Research*, 84:247-248.
- Natsuaki, K., Marikawa, T., Natsuaki, T., and Okuda, S., 2002. *Mirafiori lettuce virus* detected from lettuce with big vein symptoms in Japan. *Jjphytopath*, 68:309.

- Navarro, J.A., Botella, F., Marhuenda, A., Sastre, P., Sanchez-Pina, M.A., Pallas, V., 2004. Comparative Infection Progress Analysis of *Lettuce big-vein virus* and *Mirafiori lettuce big-vein virus* in Lettuce Crops by Developed Molecular Diagnosis Techniques . European Journal of Plant Pathology, 94(5):470-477.
- Navarro, J.A., Botella, F., Marhuenda, A., Sastre, P., Sanchez-Pina, M.A., Pallas, V., 2005. Identification and partial characterisation of *Lettuce big-vein associated virus* and *Mirafiori lettuce big-vein virus* in common weeds found amongst Spanish lettuce crops and their role in lettuce big-vein disease transmission. European Journal of Plant Pathology, 113:25-34.
- Nebreda, M., Moreno, A., Perez, N., Palacios, I., Seco-Fernandez, V., and Fereres, A., 2004. Activity of Aphids associated with Lettuce and Broccoli in Spain and Their Efficiency as Vectors of *Lettuce Mosaic Virus*. Science Direct Virus Research, 100:83-88.
- Özalp, M.O., 1964. İzmir’de Sebzelerde Görülen Virüs Hastalıkları. Bitki Koruma Bülteni 4(1):18-25.
- Prieto, H., Bruna, A., Hinrichsen, P., and Munoz, C., 2001. Isolation and Molecular Characterization of a Chilean Isolate of *Zucchini yellow mosaic virus*. Plant Disease, 85:644-648.
- Pavan, M.A., Krause-Sakate, R., Silva, N., Zerbini, F.M., Gall, O.L. 2008. Virus Diseases of Lettuce in Brazil. Plant Viruses. M. Pavan (corresponding author), Plant Viruses, Global Science Books, Viçosa, pp.35-40.
- Peypelut, M., Krause-Sakate, R., Guiraud, T., Pavan, M.A., Candresse, T., Zerbini, F.M., and Le Gall, O., 2004. Specific Detection of Lettuce Mosaic Virus Isolates Belonging to the ‘Most’ Type. Journal of Virological Methods, 121(1):119-124.
- Roggero, P., Lot, H., Souche, S., Lenzi, R., and Milne, R.G., 2003. Occurrence of

- Mirafiori Letuce Virus and Lettuce Big-Vein Virus in Relation to Development of Big-vein Symptoms in Lettuce Crops. *European Journal of Plant Pathology*, 109(3):261-267.
- Sanches, M.M., Krause-Sakate, R., Pavan, M.A., 2008. Sequence diversity in the coat protein gene of Lettuce big-vein associated virus and Mirafiori lettuce big-vein virus infecting lettuce in Brazil. *Summa Phytopathol.*, V.34, n.2, p.175-177.
- Sasaya, T., Ishikawa, K., Kuwata, S., and Koganezawa, H., 2005. Molecular analysis of coat protein coding region of tobacco stunt virus shows that it is a strain of Lettuce big-vein virus in the genus *Varicosavirus*. *Archives of Virology*, 150:1013-1021.
- Sekimoto, S., Rochon, D., Long, J.E., Dee, J.M., and Berbee, M.L., 2011. A multigene phylogeny of *Olpidium* and its implications for early fungal evolution. *Bio Med Central Evolutionary Biology*, 11:331.
- Sertkaya, G., Karaca, F., Nurel, S., ve Yokarıbaşı, H., 2009. Marul Alanlarında Marul Mozaik Virüsü ve Hıyar Mozaik Virüsü'nün Biyolojik ve Serolojik Yöntemlerle Araştırılması. *Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri*, Berk Matbaacılık, Ankara, 380s.
- Sertkaya, G., 2015. Hatay İli Marul ve Ispanak Alanlarında Bazı Virüslerin Araştırılması. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20(1):7-12.
- Tekinel, N., Dolar, M.S., Sağsöz, S., Salcan, Y., 1969. Mersin Bölgesinde Ekonomik Bakımdan Önemli Bazı Sebzelerin Virüsleri Üzerinde Araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni Cilt 9, No.1*.
- TÜİK, 2015. Türkiye'de Marul Üretimi, 2009-2014. <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>
- TÜİK, 2017. Adana ilinde Marul Üretimi, 2012-2016. <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>
- TÜİK, 2017. Mersin ilinde Marul Üretimi, 2012-2016. <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>

- Türkiye Tarım Sektörü Raporu, 2013.
https://www.tobb.org.tr/Documents/yayinlar/2014/turkiye_tarim_meclisi_sektor_raporu_2013_int.pdf
- Uzunogulları, N., ve Beşirli, G., 2011. Yedikule Marul (L.S.L.var. Longifolia) Çeşidinde Zarar Yapan Bazı Viral Etmenlerin Tanılanması. Türkiye 4. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri. KSÜ Basımevi, Kahramanmaraş, 496s.
- Yardımcı, N., 2013. Bitki Virolojisi. Hasad Yayıncılık Ltd. Şti., İstanbul, 120 s.
- Yegül, M., 2017. Doğu Akdeniz Bölgesinde Badem ve Ceviz Ağaçlarında Görülen Virüs Hastalıklarının Saptanması, Karakterizasyonu ve Bazı Çeşit Davranışlarının Belirlenmesi. Doktora Tezi. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Adana, 197s.
- Yılmaz, 1981. Virus Particles Associated with Disease of Tomato and Lettuce in Turkey. *Phytopath. Medit.*, 2:79-80.
- Zelyüt, R.F., Ertunç, F., 2016. Ankara İli Marul Ekim Alanlarında Saptanan Virüs Enfeksiyonları. Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi. İnci Kağıtçılık Ofset Matbaa, Konya, 938s.
- Zerbini, F.M., Koike, S.T., Gilbertson, R.L., 1995. Biological and Molecular Characterization of *Lettuce Mosaic Potyvirus* Isolates from the Salinas Valley of California. *Phytopathology*, 85:746-7.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında İstanbul Şişli’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul’da tamamladı. 2008 yılında başladığı Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü’nden 2012 yılında ziraat mühendisi olarak mezun oldu. 2014 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı’na kaydoldu. 2017 yılında Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisansını tamamladı.

EKLER

Ek. 1.

ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4 (Fosfat Tampon Çözeltisi)

8.0 g	NaCl
0.2 g	KH ₂ PO ₄
2.9 g	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O veya 2.3 g Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O 1.44 g Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O 1.15 g Na ₂ HPO ₄
0.2 g	KCl
0.2 g	NaN ₃

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre saf su içerisinde eritilip pH'sı 0.1N olan NaOH veya 0.1 N HCl ile ayarlanmış ve +4 C'de muhafaza edilmiştir.

2. Coating Buffer Ph 9.6 (Kaplama Tampon Çözeltisi)

2.93 g	Na ₂ CO ₃
2.94 g	NaHCO ₃
0.2 g	NaN ₃

Yukarıda miktarı verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH ayarlaması yapılmış ve +4C'de saklanmıştır.

3. Washing Buffer (Yıkama Tampon Çözeltisi)

Bir litre PBS tamponu 0.5 ml Tween-20 ilave edilerek hazırlanmıştır.

4. Sample Extraction Buffer (Örnek tampon çözeltisi)

Bir litre yıkama tamponu çözeltisi içine 20 g Polyvinylpyrrolidone (PVP-40) ilave edilerek hazırlanmıştır.

5. Enzyme Conjugate Buffer (Konjugat Tampon Çözeltisi)

Bir litre örnek tamponu çözeltisi içine 2 g ovalbumin (egg albumin) ilave edilerek hazırlanmıştır.

6. Substrat Buffer Ph 9.8 (Substrat Tampon Çözeltisi)

97 ml Diethanolamine 800 ml saf su içerisine ilave edilmiş ve 0.2 g NaN_3 konarak Ph 9.8'e ayarlanmış ve 1 litreye tamamlanmıştır.

Ek. 2.

Total RNA Analizlerinde Kullanılan Solüsyonlar

Ekstraksiyon Buffer (100 Mm Tris-HCl Ph. 8.0, 50 Mm EDTA Ph. 7.0, 500 g NaCl, 100mM 2. Mercapto-ethanol (1/1000))

Tris-HCl	2.4228 g
EDTA	3.7224
NaCl	5.844 g

Yukarıda verilen kimyasallar 150 ml saf su içerisinde sırayla çözülerek Ph ayarlanmış ve son hacmi 200 ml'ye tamamlanmıştır. Ardından 1/1000 oranında 2-Mercaptoethanol eklenmiştir.

% 20 Sodium Dodecyl Sülfate (SDS)

Sodium Dodecyl Sülfattan 20 g alınarak 80 ml saf su içerisinde çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Potassium asetatate (CH₃COOK) (5M)

Potassium asetatattan 49.075 g alınarak 60 ml saf su içerisinde çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Sodium asetatate (CH₃COONa(3M))

Sodium asetatattan 40.824 g alınarak 60 ml saf su içerisinde çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.

% 70 lik Ethanol

% 100'lük ethanolden 70 ml alınarak 30 ml saf su ile karıştırılıp elde edilmiştir.

Ek. 3.

Agaroz Jel Elektroforezde Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. TBE Buffer (89 mM Tris, 89 mM borik asit, 2 mM EDTA)

(pH:8,3)

10.777 g Tris-Base, 5.502 g boric asit ve 0.744 g EDTA alınarak 900 ml saf su içinde eritildikten sonra çözeltinin pH'sı 8.3 olarak ayarlanarak ve hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 1X TBE buffer hazırlanmıştır.

2. TAE Buffer (10 mM Tris, 5 mM Sodium acetate, 0,5 mM EDTA)

(pH:8,3)

1.211 g Tris-Base, 0.680 g sodyum asetat ve 0.186 g EDTA alınarak 900 ml saf su içinde eritildikten sonra çözeltinin pH'sı 8.3 olarak ayarlanarak ve hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 1X TAE buffer hazırlanmıştır.

3. Etidyum Bromid

10 mg etidyum bromid 1 ml saf su içerisinde eritilmiş ardından 30 µl alınıp 100 ml saf su içine eklenmiştir.