

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sabire CAN

**AKDENİZ BÖLGESİ'NDE ÖRTÜ ALTI BİBER ÜRETİM
ALANLARINDA HIYAR MOZAİK VİRÜSÜ (*Cucumber Mosaic
Virus*, CMV)'NÜN SAPTANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA-2019

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AKDENİZ BÖLGESİ'NDE ÖRTÜ ALTI BİBER ÜRETİM ALANLARINDA
HIYAR MOZAIK VİRÜSÜ (*Cucumber Mosaic Virus*, CMV) 'NÜN
SAPTANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Sabire CAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu Tez .3./1./2019 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr.Saadettin BALOĞLU
DANIŞMAN

.....
Doç.Dr.Muharrem A. KAMBEROĞLU
ÜYE

.....
Dr.Öğr.Üyesi Hakan FİDAN
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-2017-9016

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

AKDENİZ BÖLGESİ'NDE ÖRTÜ ALTI BİBER ÜRETİM ALANLARINDA HIYAR MOZAİK VİRÜSÜ (*Cucumber Mosaic Virus*, CMV)'NÜN SAPTANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Sabire CAN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU

Yıl: 2019, Sayfa: 91

Jüri : Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU

: Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU

: Dr. Öğr. Üyesi Hakan FİDAN

Bu çalışma, 2016-2018 yılları arasında Adana, Mersin, Hatay ve Antalya illerinde örtü altı biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda Hıyar mozaik virüsü (*Cucumber Mosaic Virus*, CMV)'nün saptanması ve karakterizasyonu amacıyla yürütülmüştür. Arazi gözlemlerinde semptomatolojik olarak CMV ile enfekteli olabileceğinden şüphelenilen toplam 263 adet örtü altı biber bitkisinden yaprak, sürgün, meyve ve tohum olmak üzere 300 örnek alınmış ve DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiştir. Testlenen 300 örneğin 62'sinin CMV ile enfekteli olduğu saptanmış, ayrıca 23 örneğin de düşük absorban değerleri ile hastalıklı olabileceği dikkate alınmıştır. RT-PCR çalışmaları, CMV'ye spesifik RW8/RV11 primer çifti kullanılarak, DAS-ELISA da pozitif olarak saptanan toplam 85 örnek içerisinde 16 izolat ile yürütülmüş ve 650 bp büyüklüğünde bant elde edilmiştir. Survey alanlarını temsil edecek şekilde 8 izolat seçilmiş ve DNA dizileme yaptırılmıştır. Testlenen izolatlardan seçilen bu 8 izolatın hem birbirlerine, hem de daha önce Türkiye'den turp izolatı olarak Gen Bankasında yayınlanmış olan LC066508 Gen Bank numaralı CMV ile çok yakın ilişkili olduğu dizi analizi sonucu oluşturulan soyağacı ile ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Biber, CMV, DAS-ELISA, RT-PCR, Dizi Analizi

ABSTRACT

MSc THESIS

DETECTION AND CHARACTERIZATION OF *CUCUMBER MOSAIC VIRUS* (CMV) IN THE GREENHOUSE PEPPER CULTIVATION IN MEDITERRANEAN REGION.

Sabire CAN

**DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION
INSTITUTE OF NATURAL APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA**

Sopervisor : Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU

Yıl: 2019, Pages : 91

Jury : Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU

: Assoc. Prof. Muharrem A. KAMBEROĞLU

: Asst. Prof. Dr. Lecturer Hakan FİDAN

This study was conducted to detect and characterize *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) in the greenhouse pepper cultivation areas of Adana, Mersin, Hatay and Antalya provinces between 2016-2018 years. During on field observation, totally 300 samples including leaf, shoot, fruit, seed from 263 plants which are suspected as symptomatologic infected with CMV were collected and were tested by DAS-ELISA. Of the 300 tested samples, 62 were found to be infected with CMV, and 23 samples were considered to be diseased with a low absorbance value. RT-PCR studies were performed with 16 isolates from a total of 85 samples identified as positive for DAS-ELISA using a primer pair specific for CMV-specific RW8 / RV11 and a band size of 650 bp was obtained. Eight isolates were selected and DNA sequencing was performed to represent the survey areas. PCR products of 8 isolates were DNA sequenced and created phylogenetic tree. These 8 isolates were found to be very close to each others and radish isolate of CMV (Gene Bank No: LC066508) from Turkey by phylogenetic tree.

Key Words: Pepper, CMV, DAS-ELISA, RT-PCR, Phylogenetic tree

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Biber dünyanın birçok yerinde yetiştirilmektedir. Biberin meyvesi dünya genelinde taze ya da baharat olarak tüketilmektedir. Ayrıca Türkiye dünyada biber üreten önemli ülkeler arasında yer almaktadır. Ülkemizde örtü altı yetiştiriciliği; yüksek kış sıcaklığı ve kışın güneşlenme süresinin uzun olmasından dolayı özellikle Akdeniz kıyı bölgesinde yoğun olarak yapılmaktadır. Biber yetiştiriciliğinin örtü altı olarak önemli olduğu bu bölgede birçok kültür bitkisinde önemli zararlara neden olan ve dünyada en yaygın virüs hastalıklarından biri olan Hıyar Mozaik Virüsü (*Cucumber Mosaic Virus*, CMV)'ün varlığının serolojik yöntemle belirlenmesi, saptanan izolatların moleküler karakterizasyonu ve akrabalık ilişkileri araştırılmıştır.

Ülkemizde biber virüs hastalıkları konusunda değişik çalışmalar yürütülmüş ve önemli virüs hastalıkları saptanmıştır. Ancak yürütülen çalışmalar daha çok, açık alanlardaki biberlerde virüslerin yaygınlığı ve oranı, saptanan virüs izolatlarının karakterizasyonu ve açık alandaki biberlerde oluşturdukları belirtileri içermekte bu durum; Hıyar mozaik virüsü (CMV)'nün araştırma konusu olarak seçilmesi fikrini vermiş ve buna bağlı olarak da Akdeniz sahil şeridindeki örtü altı biber üretim alanlarında CMV ile ilgili bir çalışma yapılmıştır.

Bu amaçlar doğrultusunda, 2016-2018 yılları arasında Adana, Mersin, Hatay ve Antalya illerinde, yaygın olarak örtü altı biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda yürütülen bu çalışmada; CMV'nin oluşturduğu belirtilere bakarak simptomolojik ve ayrıca Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) ve Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) yöntemleri ile etmenin tanısı ve saptanması, serolojik ve moleküler yöntemlerle saptanan farklı CMV izolatlarının karakterizasyonu ve dizi analizlerinin yapılması ile saptanan izolatların dünyadaki ve ülkemizdeki diğer izolatlar ile akrabalık (moleküler olarak genetik benzerlik ve farklılıkları) ilişkilerinin belirlenmesi gerçekleştirilmeye çalışılmıştır.

Arazi gözlemlerinde simptomatolojik olarak CMV ile enfekteli olabileceğinden şüphelenilen toplam 263 adet örtü altı biber bitkisinden yaprak, sürgün, meyve ve tohum olarak toplam 300 adet örnek alınmıştır. Alınan tüm örnekler öncelikli olarak DAS-ELISA ile testlenmiştir. Testlenen 300 örneğin yaprak dokusundan oluşan 62'sinin CMV ile enfekteli olduğu saptanırken negatif kontrolün iki katına yakın olan, daha düşük absornans değeri ile 23 örneğin de hastalıklı olabileceği dikkate alınmıştır. Sonuç olarak pozitif saptanan değişik absorbans değeri veren ve farklı lokasyonlardan alınan toplam 85 örnek içinden 16 örnek ile RT-PCR çalışmaları yürütülmüştür. CMV'ye özgü RW8-RV11 primer çifti kullanılarak Mersin ilinin Akdeniz ilçesi (Kazanlı, Karaduvar mahalleleri) ile Tarsus ilçesi ve Antalya ilinin Kumluca ilçesinden toplanan örtü altı biber izolatlarına ait 650 bp büyüklüğünde bantlar elde edilmiş ve bulunan bu izolatların dizi analizleri yapılarak akrabalık ilişkileri ortaya konulmuştur. Dizi analizi çalışmaları için de daha önce serolojik çalışmalar sonucunda CMV ile bulaşık olarak saptanan ve RT-PCR çalışmalarında net bantlar oluşturan 16 örnek içinden seçilmiş 8 örnek, CMV izolatlarının karşılaştırılması için DNA dizi belirleme çalışmalarında kullanılmıştır. CMV dizi belirleme çalışmalarında CMV ile enfekteli örtü altı biber bitkisinden izole edilen Mersin ilinin Akdeniz ilçesindeki Kazanlı, Karaduvar, Tarsus mahalleleri ile Antalya ilinin Kumluca ilçesinden toplanan örtü altı biber izolatları kullanılmıştır. Sonuç olarak seçilen 8 izolatın da hem birbirleri ile hem de daha önce Türkiye'de küçük turp bitkisinden izole edilmiş olan CMV izolatı olarak Gen Bankasında yayınlanmış LC066508 Gen Bank numaralı CMV ile çok yakın (%98 benzerlik göstermiştir) izolatlar olduğu ortaya konulmuştur.

Bu çalışmanın yapıldığı Adana, Mersin, Hatay, Antalya illerinde toplam 676 207 ton kadar üretimi yapılan örtü altı biber Akdeniz Bölgesi için önemli sebzelerden biridir (TÜİK, 2017). Bu bölgede hastalık ve zararlı etmenleri ekonomik açıdan verimde kayba sebep olmaktadır. Bu etmenler içinde özellikle de virüsler kimyasal mücadelesi olmaması ve vektörlerin virüsleri taşıması sebebiyle

ayrı bir öneme sahiptir. Özellikle de Hıyar mozaik virüsü ekonomik önemi olan, birçok sebze de hastalık yapabildiği gibi yabancı otlar ve süs bitkileri de dâhil olmak üzere çok geniş bir konukçu dizisine sahiptir. Hıyar mozaik virüsü latent olarak yabancı otlarda da yaşamını devam ettirebildiği için virüsün yayılmasını önleyecek tüm tedbirlerin alınmasına özen gösterilmelidir. Dolayısıyla da; virüs hastalıklarına 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

Çalışmamın her aşamasında katkılarıyla beni yönlendiren, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU'na,

Çalışmam süresince desteklerini gördüğüm; Doç. Dr. Behçet Kemal ÇAĞLAR, Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Gökmen KOÇ'a, ayrıca Antalya'daki survey çalışmalarında yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Hakan Fidan ve ekibine, yine seroloji çalışmalarında desteğini gördüğüm Dr. Pelin KELEŞ ÖZTÜRK'e

Çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan Zir. Yük. Müh. Ali GÜNEŞ'e, Zir. Yük. Müh. Eray ATALAY, Zir. Yük. Müh. Havva Nur SAĞLAM, Zir. Yük. Müh. Serkan KIZILYAMAÇ, Zir. Müh. Fatime DAŞ, Zir. Müh. Nurullah ÇETİZ ve survey çalışmalarında yardımını gördüğüm Zir. Müh. Aytaç KURTULUŞ'a

Projemin yürütülmesinde çalışmalarına maddi olanak sağlayan Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans çalışmalarında da maddi ve manevi her konuda beni destekleyen babam Mahmut CAN, annem Mehtap CAN'a ve kardeşlerime

Emeği geçen herkese sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XIV
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1. Materyal	29
3.1.1. Çalışma Bölgesi ve Çalışmanın Konusunu Oluşturan Materyal.....	29
3.1.2. ELISA Testlerinde Kullanılan Materyal	30
3.1.3. Total Nükleik Asit (TNA) Ekstraksiyonu Çalışmalarında Kullanılan Materyal	31
3.1.4. RT-PCR Yönteminde Kullanılan Materyal.....	31
3.1.5. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal	32
3.2. Yöntem.....	32
3.2.1. Örneklerin Toplanması ve Muhafazası	33
3.2.2. DAS-ELISA Testleri.....	35
3.2.3. Total Nükleik Asit (Total NA) Ekstraksiyonu Çalışmaları.....	38
3.2.4. RT-PCR Çalışmaları	39
3.2.5. Agarose Gel Elektroforez Çalışmaları	41
3.2.6. Dizi Analizi (Sekans Analizi) ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları.....	42
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	45

4.1. Simptomolojik Çalışmalar, CMV ile Bulaşık Bitkilerin Saptanması	45
4.2. DAS-ELISA Çalışmaları.....	52
4.3. Total RNA Ekstraksiyon Çalışmaları	58
4.4. RT-PCR Çalışmaları	59
4.5. Hıyar Mozaik Virüsü (CMV) Dizi Belirleme ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları.....	62
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	67
KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	85
EKLER.....	86

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1.	Dünyada Biber Üretiminin Dağılımı	2
Çizelge 1.2.	Türkiye’de Niteliklerine Göre Örtü Altı Tarım Alanları (da).....	3
Çizelge 1.3.	Türkiye’de Akdeniz Sahil Şeridindeki İller Bazında Niteliklerine Göre Örtü Altı Tarım Alanları (da).....	3
Çizelge 1.4.	Türkiye’de Akdeniz Sahil Şeridindeki İller Bazında Örtü Altı Biber Ekim Alanları (da) ve Üretimi (Ton)	3
Çizelge 2.1.	Biberde Önemli ve Yaygın Virüs Hastalıkları.....	15
Çizelge 3.1.	Örneklerin Alındığı Yer ve Testemek İçin Alınan Örnek Bitki Sayısı	30
Çizelge 4.1.	Arazi Çıkışı Yapılan Alanlar ve ELISA Testi Sonucu CMV İle Enfekteli Olan Örtü Altı Biber Bitkileri	53
Çizelge 4.2.	DAS-ELISA Testi Çalışmalarında Alınan Toplu Sonuçlar	57
Çizelge 4.3.	RT-PCR Çalışmalarında Kullanılan Örnekler ve Sonuçlar	61
Çizelge 4.4.	Hıyar Mozaik Virüsü (CMV) DNA Dizi Belirleme ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmalarında Seçilen İzolatlar	63
Çizelge 4.5.	RW8 / RV11 Primer Çifti ile Elde Edilen Filogenetik Analizde Kullanılan CMV İzolatlarının Dünyada Yer alan Diğer İzolatlarla Benzerlik Oranı.....	64



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1.	Survey Alanı Olarak Akdeniz Sahil Şeridi İlleri.....	29
Şekil 3.2.	Çalışmanın Aşamalarını Gösteren Diyagram.....	34
Şekil 3.3.	Yapılan çalışmada biber bitkisinin yaprak ve meyvelerinde bulunan açık ve koyu yeşil mozaik, klorotik lezyonlar, damar açılması gibi virüs belirtileri (ELISA Testinde Pozitif Çıkan CMV Simptomları).....	38
Şekil 4.1	M44 İzolatı-Doğanay-Dolma Biber (Mersin/Karaduvar-CMV Enfeksiyonu) Uç Yapraklarda Daralma ve Uç Sürgün Deformasyonları.....	46
Şekil 4.2.	M45 İzolatı-Filinta Kıl Biber (Mersin/Karaduvar-CMV Enfeksiyonu) Yaprak Deformasyonları, Yapraklarda Mozayik ve Yapraklarda Meşe Yapağı Belirtisi	46
Şekil 4.3.	M35 İzolatı-Filinta-Dolma Biber (Mersin/Karaduvar-CMV Enfeksiyonu) Yaprak Deformasyonları ve Kloroz.....	47
Şekil 4.4.	M36 İzolatı-Filinta-Dolma Biber (Mersin/Karaduvar-CMV Enfeksiyonu) Yaprak Deformasyonları ve Yaprak Damarlarında Kloroz.....	47
Şekil 4.5.	T23 İzolatı-Pailin-Sivri Biber (Mersin/Tarsus-CMV Enfeksiyonu) Uç Yapraklarda Nekroz, Kloroz, Uç Yapraklarda Daralma ve Gövde Nekrozları.....	47
Şekil 4.6.	T22 İzolatı-Pailin-Sivri Biber (Mersin/Tarsus-CMV Enfeksiyonu) Bodurluk ve Uç Yapraklarda Kloroz	47
Şekil 4.7.	K6 İzolatı-Filinta-Sivri Biber (Mersin/Kazanlı-CMV Enfeksiyonu) Uç Yapraklarda Kloroz ve Uç Yapraklarda Nekroz	48
Şekil 4.8.	T8 İzolatı-Mert-Sivri Biber (Mersin/Tarsus-CMV Enfeksiyonu) Uç Yapraklarda Daralma ve Kloroz	48

Şekil 4.9.	K15 İzolatı-Ejder-Sivri Biber (Mersin/Kazanlı-CMV Enfeksiyonu) ; Boğum Aralarının Kısılması ve Bodurluk	48
Şekil 4.10.	K2 İzolatı-Filinta-İnce Sivri Biber (Mersin/Kazanlı-CMV Enfeksiyonu) Uç Yapraklarda Kloroz ve Yapraklarda Renk Değişikliği	48
Şekil 4. 11.	T11 İzolatı-Mert-Sivri Biber (Mersin/Tarsus-CMV Enfeksiyonu) Yapraklarda Nekroz ve Yaprak Damar Aralarında Bombeleşme	49
Şekil 4.12.	K5 İzolatı-Filinta-Sivri Biber (Mersin/Kazanlı-CMV Enfeksiyonu) Uç Yapraklarda Kloroz ve Yapraklarda Nekroz.....	49
Şekil 4.13.	A7 İzolatı-Diyar-Kapya (Antalya/Kumluca-CMV Enfeksiyonu) Yaprak Deformasyonları ve Kloroz	49
Şekil 4.14.	A9 İzolatı-Diyar F1-Kapya (Antalya/Kumluca-CMV Enfeksiyonu) Yaprak Deformasyonları, Yapraklarda Mozaik, Yaprak Damarlarında Kloroz ve Yapraklarda Meşe Yapağı Belirtisi	50
Şekil 4.15.	A15 İzolatı-Nirvin-Kırmızı Kaliforniya (Antalya/Kumluca-CMV Enfeksiyonu) Yapraklarda Renk Değişikliği ve Yaprak Deformasyonları.....	50
Şekil 4.16.	A17 İzolatı-Sarı Kaliforniya-Dolma Biber (Antalya/Kumluca-CMV Enfeksiyonu) Yapraklarda Mozaik ve Yaprak Damarlarında Kloroz.....	50
Şekil 4. 17.	CMV izolatlarına ait, RW8 / RV11 primer çifti ile yapılan RT-PCR ürünleri.....	55
Şekil 4.1.	RW8 / RV11 primer çifti ile saptanan CMV izolatlarının soyağacı (Bootstrap 1000 tekrarlamalı) (Neighbor-joining metodu kullanılarak yapılan filogenetik analiz)	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	: Adenin
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
mg	: Miligram
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
M	: Molarite
M-MLV	: Moloney Murine Leukaemia Virus
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksid
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
PBS	: Phosphate buffered saline (Fosfat tuz tampon çözeltisi)
pH	: power of Hydrogen (Çözeltinin asitlik bazlık seviyesi)
PVP	: Polyvinylpirrilodone
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
T	: Timin
TAE	: Tris Acetate EDTA Buffer
TBE	: Tris Borate EDTA Buffer
T _m	: Termal melting
TSWV	: <i>Tomato spotted wilt virus</i>
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
W/V	: Ağırlık/Hacim

1. GİRİŞ

Biber ‘‘*Capsicum annuum* var. *annuum*‘‘, Solanacea familyasından, ılıman ve subtropik ülkelerde bir yıllık, tropikal ülkelerde iki yıllık veya çok yıllık yetiştirilen bir bitkidir. Biberin anavatanı tropikal Amerika’dır. *C. annuum* var. *annuum*’un anavatanı Brezilya, *Capsicum frutescens*’in anavatanının Orta Amerika olduğu kabul edilir. Kristof Kolomb tarafından biber 1493 yılında İspanya’ya getirilmiş daha sonra 1548 yılında İngiltere’ye, 1578 yılında Orta Avrupa ve diğer Avrupa ülkelerine yayılmış ve daha sonra 17. yüzyılda Portekizliler tarafından Güneydoğu Asya’ya götürülmüştür. Türkiye’ye biber 16. yüzyılda önce İstanbul’a getirilmiş ve daha sonra diğer bölgelerimize yayılmıştır (Özalp, 2010).

Capsicum cinsi içerisinde 25 tür olup bunlardan 5 tür (*C. annuum* L., *C. baccatum* L., *C. pubescens* Ruiz & Pav., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L.) yaygın olarak yetiştirilmektedir. *C. annuum* L. türü, ekonomik anlamda en önemli olanı ve en çok yetiştirilenidir. Bunun yanında diğer 20 türün hastalık ve zararlılar açısından dayanıklılık genlerinin kaynağı olarak önem taşıdığı bildirilmektedir (Permezny ve ark, 2003).

Biber taze, konserve, salça, turşu, sos, ketçap, konsantre olarak tüketildiği gibi domates ve diğer hazır çorbalara ilave edilerek de tüketilmekte olup, kurutulur, toz ve pul biber yapımında, ayrıca boya ve ilaç sanayii gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Biber özellikle A ve C vitaminleri açısından çok zengin bir bitki olması açısından da önemlidir (Anonymous, 2013a).

Ülkemizde ilk olarak 1940’lı yıllarda başlayan örtü altı yetiştiriciliği; ekolojik koşullara bağlı bir gelişme göstererek, yüksek kış sıcaklığı ve kışın güneşlenme sürelerinin uzun olmasından dolayı özellikle Akdeniz kıyı bölgesinde yoğun olarak yetiştirilmektedir (Anonymous, 1997).

Biber dünyanın birçok yerinde toplam 3.625.452 hektar alanda yeşil ve kuru olarak yetiştirilmektedir (FAO, 2014). Biberin meyvesi dünya genelinde taze ya da baharat olarak tüketilmektedir. Çizelge 1.1.’ de görüldüğü gibi dünyadaki en

önemli biber üreticisi 16 120 406 ton ile Çin'dir. Bunu 2 732 635 ton ile ikinci sırada Meksika takip etmiş ve ardından 2 127 944 ton ile üçüncü sırada Türkiye en önemli üreticiler olarak yer almaktadır (FAO, 2014).

Türkiye'de 2017 yılı verilerine göre toplamda 752 167 dekar örtü altından 83 926 dekar alanda örtü altı biber yetiştirildiği ve toplam 704 293 ton örtü altı biber üretimi gerçekleştiği anlaşılmaktadır (TÜİK, 2017).

Çizelge 1.1. Dünyada Biber Üretiminin Dağılımı (FAO, 2014)

ÜLKELER	ÜRETİM (TON)
ÇİN	16.120.406
MEKSİKA	2.732.635
TÜRKİYE	2.127.944
ENDONEZYA	1.875.095
HİNDİSTAN	1.492.000
İSPANYA	1.130.340
ABD	9.14.490
TOPLAM	26.392.910
DİĞERLERİ	9.750.203
DÜNYA TOPLAM	36.143.113

Türkiye'de niteliklerine göre toplam örtü altı tarım alanı son yılların rakamlarına göre 752 167 da iken (Çizelge 1.2.) bunun % 81,9 olan 616 280 da alan Akdeniz sahil şeridindeki çalışmanın yürütüldüğü Adana, Mersin, Hatay ve Antalya illerindedir. Bu illerdeki örtü alanları değerlendirildiğinde ise Çizelge 1.3.'ten de anlaşılacağı üzere Antalya en yoğun yetiştiriciliğin yapıldığı alan olup Antalya'yı sırasıyla Mersin, Adana ve Hatay illeri takip etmektedir (TÜİK, 2017).

Akdeniz bölgesinde örtü altı biber üretim miktarı yönünden değerlendirildiğinde; yine Antalya ili ilk sırayı alırken Mersin, Adana ve Hatay illeri şeklinde sıralanmaktadır (Çizelge 1.4.). Söz konusu illerde biber yetiştiriciliği

olarak örtü altında değişik zaman dilimlerinde üretim yapılırken üretilen biber çeşitleri bazında da değişiklikler görülmektedir.

Çizelge 1.2. Türkiye’de Niteliklerine Göre Örtü Altı Tarım Alanları (da) (TÜİK, 2017)

Örtüaltı Tarım Alanı	Dekar
Alçak Tünel	191 399
Cam Sera	857 48
Plastik Sera	3 551 20
Yüksek Tünel	119 898
Türkiye Genel Toplam	752 167

Çizelge 1.3. Türkiye’de Akdeniz Sahil Şeridindeki İller Bazında Niteliklerine Göre Örtü Altı Tarım Alanları (da) (TÜİK, 2017)

Örtüaltı Tarım Alanı (da)	Adana	Antalya	Hatay	Mersin
Alçak Tünel	126 490	12 748	9 474	30 066
Cam Sera	6	64 996	3	13 763
Plastik Sera	1 249	187 041	1 56	87 815
Yüksek Tünel	8 503	13 276	889	58 402
Toplam	136 248	278 062	11 922	190 047
İl Genel Toplam	616 280 da			

Çizelge 1.4. Türkiye’de Akdeniz Sahil Şeridindeki İller Bazında Örtü Altı Biber Ekim Alanları (da) ve Üretimi (Ton) (TÜİK, 2017)

İl Adı	Ekim alanı (da)*	Üretim (ton)*
Hatay	1 634	3 637
Adana	7 850	62 508
Mersin	30 435	215 188
Antalya	37 014	394 874
Toplam	76 933	676 207

(*) Örtüaltı Biber Ekim Alanı (da) ve Üretimi (ton): Alçak-Yüksek Tünel, Cam-Plastik Sera/ Salçalık, Kapya, Dolmalık, Sivri ve Çarliston biber üretiminin tamamını içermektedir.

Diğer tüm kültür bitkilerinde olduğu gibi ticari biber yetiştiriciliğinde de yanlış veya yetersiz kültürel uygulamalar dışında canlı ve cansız hastalık etmenleri nedeniyle elde edilen üründe önemli düzeylerde verim kayıpları oluşmaktadır. Sebze üretim alanlarında üretimi sınırlayan çok sayıda fungus, bakteri ve virüs hastalığı bulunmaktadır. Bu etmenler arasında, kimyasal ve fiziksel yapısı, boyutu, enfeksiyon şekli, değişik yollarla ve özellikle böcek vektörler ve tohumla taşınıyor ve yayılıyor olması dışında etkili ve kolay uygulanır etkin bir mücadele yönteminin, daha da özelde kısa ve kesin sonuç alınan bir kimyasal mücadelenin doğrudan uygulanıyor olmayışı kültür bitkilerinde virüs hastalıklarının önemini daha da arttırmaktadır (Agrios, 1997).

Virüs hastalıklarının bulunuşu, zararı, oluşturduğu belirtiler diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi biberde de çeşit ve çevre koşullarına göre konukçu-etmen ilişkileri ile değişiklik göstermektedir. Bu nedenle virüs hastalıklarının neden olduğu zararı en alt düzeye indirebilmek ve kontrol yöntemlerini geliştirebilmek için öncelikle yetiştiriciliği yapılan kültür bitkisinde bulunan virüslerin tanısının doğru yapılması gerekmektedir. Virüs hastalıklarının tanısında sadece belirtilere veya gözleme dayalı tanı doğru değildir. Çünkü virüslerin bitkilerde oluşturduğu belirtiler birçok faktöre bağlı olup diğer biyotik ve abiyotik faktörlerin oluşturduğu belirtiler ile de çoğu zaman benzerlik göstermekte ve karışıklıklar ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda serolojik tanı yöntemleri dışında bazı moleküler tekniklere paralel olarak biber virüslerinin bitki dokularından hassas ve doğru olarak teşhisine olanak sağlayan PCR teknikleri de geliştirilmiştir (Jacobi ve ark, 1998; Vinayarani ve ark, 2011).

Biber bitkilerinde hastalığa neden olan virüs hastalığı etmenlerinden bir tanesi de Hıyar mozaik virüsü (*Cucumber mosaic virus*; CMV)'dür. Hıyar mozaik virüsü, ilk olarak hıyar (*Cucumis sativus* L.) bitkisi üzerinde 1934 yılında Amerika'da Price tarafından bulunduğu rapor edilmiştir. Bu virüs Bromoviridae familyası içerisinde yer alan Cucumovirus cinsinin en önemli üyelerinden birisi olarak kabul edilmektedir. CMV, TMV'den sonra en fazla konukçu dizisine sahip

virüs olarak bilinmektedir. Ayrıca diğer virüs hastalıklarından sahip oldukları konukçu dizisi ve sayısı bakımından daha önemli olarak görülmektedir. Virüs 100 familyaya giren 1200'den fazla bitkiyi enfekte edebilme yeteneğindedir (Zitter ve Murphy, 2009). CMV, izometrik ve zarf içermeyen, yaklaşık olarak 29-30nm çapında yuvarlak şekilli, üç parçalı (+) ssRNA genomuna sahip ve tek bir partikülden oluşan bir virüstür (Palukaitis ve Garcia-Arenal 2003). Bu 3 parçalı genom RNA1 (~3350nt), RNA2 (~3050nt) ve RNA3 (~2200nt)'den oluşmaktadır. Ayrıca RNA3'ün bazen dördüncü bir RNA (~1030nt) içerebildiği de belirtilmiştir. RNA1 tek bir protein kodlamaktadır. RNA1'in kodladığı bu protein 1a olarak ifade edilmiş ve genomun viral replikasyon için hayatı öneme sahip olduğu bildirilmiştir (Zitter ve Murphy, 2009). RNA2 ise 2a ve 2b olmak üzere 2 protein kodlamaktadır. 2a proteini viral replikasyonla ilişkilendirilirken, 2b proteini ise enfeksiyon sırasında konukçunun kendini savunmak amacı ile ürettiği gen sessizleştirme sinyallerini engellemektedir. Son olarak RNA3 ise 3a ve kılıf proteini olmak üzere 2 protein kodlamaktadır. RNA3'ün kodladığı bu 3a proteininin virüsün hücreden hücreye hareketinden sorumlu hareket proteini olduğu belirtilmiştir (Zitter ve Murphy, 2009, Nouri ve ark, 2014).

CMV izolatlarının sınıflandırılmasının geçmişte; serolojik ilişkiler ve izolatların göstermiş oldukları nt benzerlik oranlarına dayanarak alt grup I ve alt grup II olmak üzere yapıldığı belirtilmiştir (Palukaitis ve ark, 1992). Son yıllarda çok sayıda CMV izolatının CP genlerinin ve 5' okuma yapılmayan bölgelerinin analizi ile alt grup I'in IA ve IB şeklinde 2'ye ayrıldığı görülmektedir (Roossinck ve ark, 1999). CMV alt grup I ve II arasındaki nt düzeyinde benzerlik oranlarının 69 ile 77 arasında değiştiği belirtilirken, grupların kendi içlerinde ise benzerlik oranlarının %90'nın üzerinde olduğu belirtilmiştir (Palukaitis ve ark, 1992). Ayrıca CMV IA ve II alt gruplarının tüm dünya izolatlarından oluşabileceği bildirilirken, IB alt grubunun ise genellikle Asya izolatları ile sınırlandığı ifade edilmiştir (Roossinck, 2002).

Türkiye’de gerçekleştirilen birçok çalışmada CMV varlığı farklı konukçularda tespit edilmiştir (Gümüş ve ark, 2004; Beler ve Açıkgöz, 2005; Çağlar, 2006; Ergun et al. 2013, Erkan ve ark, 2013; Sarı, 2015, Sertkaya 2015; Gökdağ ve ark, 2016; Karanfil ve ark, 2016).

Virüs hastalıklarının biber bitkisinde verim ve kaliteye ne oranda etki ettiği konusunda yeterli çalışma olmadığı gibi son zamanlarda konu üzerine eğilim olmasına rağmen dayanıklılık konusunda da pek fazla çalışma bulunmadığı söylenebilir. Bunun yanısıra; Akdeniz Bölgesi’nde biber bitkisinde değişik çalışmalar yürütülmüş ve biber bitkisinde zarar yapan önemli virüsler belirlenmiştir. Ancak yürütülen çalışmalar genellikle açık alan biber yetiştiriciliğini, örneğin Maraş biberleri, Karaisalı biberleri gibi önemli yerel ürünlerde virüs hastalıklarının saptanması, yaygınlığı ve zarar oranlarının belirlenmesi konularını içermekte bu durum; hıyar mozaik virüsü (CMV)’nün araştırma konusu olarak seçilmesi fikrini vermiş ve buna bağlı olarak da Akdeniz sahil şeridindeki örtü altı biber üretim alanlarında CMV ile ilgili çalışma yürütülmüştür.

Bu tez çalışmasında öncelikli olarak; Akdeniz Bölgesi’nde yoğun örtü altı biber yetiştiriciliğinin yapıldığı bazı alanlarda biberlerde yaygın olan virüs hastalıklarının belirlenmesi amacıyla 2016 yılında dar kapsamlı bir ön survey çalışması yapılmıştır. Bu amaçla da; biber üretiminin yoğun olarak yapıldığı, Mersin ili Tarsus ilçesi ile Akdeniz ilçesi (Kazanlı mahallesinden) ve Hatay ili Samandağ ilçesi örtü altı biber üretim alanlarından virüs ve benzeri belirtiler gösteren 52 adet örtü altı biber örneği toplanmıştır. Bu örneklerle; *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV), *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Pepper mottle virus* (PepMoV), *Pepper veinal mottle virus* (PVMV), *Potato X virus* (PVX), *Potato Y virus* (PVY), *Tobacco etch virus* (TEV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) ve *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)’lerinin varlığını saptamak için DAS-ELISA testleri uygulanmıştır. Elde

edilen sonuçlara bakıldığında varlığı en çok görülen virüs hastalığının CMV olduğu belirlenmiştir.

Örtü altı biberde en yaygın olan virüsü belirlemek amacıyla yapılan bu ön çalışmalardan elde edilen sonuçlara bağlı kalarak; Akdeniz Bölgesi'nde sahil şeridinde yer alan Adana, Mersin, Hatay ve Antalya il ve ilçelerindeki örtü altı biber üretim alanlarında virüs hastalıklarının oluşturduğu belirtilere benzer belirtiler gösteren ve CMV ile bulaşık olduğu düşünülen biber bitkilerinden örnekler toplanmıştır. Toplanan örtü altı biber örneklerinde serolojik (DAS-ELISA) ve moleküler (RT-PCR) yöntemler ile CMV'nin varlığının belirlenmesi ve değişik alanlardan gelen örneklerde virüsün karakterizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla bu çalışma yürütülmüştür. Sonuç olarak CMV nin saptanması ve izolatlarının karakterizasyonu ile dizi analizlerinin yapılması, saptanan izolatların dünyadaki ve ülkemizdeki diğer izolatlar ile akrabalık (moleküler olarak genetik benzerlik ve farklılıkları) ilişkilerinin belirlenmesi çalışmada amaçlanmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Hıyar mozayik virüsü ilk olarak 1916'da Amerika Birleşik Devletleri'nde tanımlanmıştır (Doolittle, 1916; Kılıç ve ark. 2015'ten). *Bromoviridae* familyasının *Cucumovirüs* genusuna ait bir virüs olan CMV, ilk kez 1934 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde Price tarafından izole edilmiştir. Daha sonra Afrika, Avrupa ve dünyanın diğer yerlerinde rapor edilmiştir (Price, 1934; Kılıç ve ark. 2015'ten).

CMV *Bromoviridae* familyası içerisinde *Cucumovirüs* genusuna ait bir virüstür (Martelli, 2003a). *Cucumovirüs*ler pozitif yüklü üç parçalı genoma sahiptirler, *Cucumovirüs* genusu içerisinde CMV gibi çeşitli kültür bitkilerine zarar veren *Peanut Stunt Virus* (PSV), *Tomato Aspermy Virus* (TAV) (Kaper ve Waterworth, 1981; Palukaitis ve ark, 1992) ve *Bean Distortion Mosaic Virus* (White ve ark, 1995) gibi önemli virüsler bulunmaktadır.

Dünyada birçok kültür bitkisinde yaygın ve zararlı olan CMV, izometrik yapıda olup, çapı 29 nm'dir. Virüsün virionu, %18 nükleik asit, %82 protein içermekte olup genom yapıları tek iplikçikli doğrusal RNA'dan meydana gelmektedir. Viral genomun en büyük parçası 3.389 kb, ikincisi 3.035 kb, üçüncü en büyük parça ise 2.197 kb olarak belirlenmiştir. (Francki, 1980; Habili, 1987; Roossinck, 2001).

*Cucumovirüs*ler zarf şeklinde olmayan icosahedral simetri gösteren yaklaşık olarak 29-29.33-30 nm çapında tek tip partiküllere sahiptirler. Nükleokapsitlerin yüzeyindeki kapsomerlerin düzeni açıkça veya karmaşık biçimde yaklaşık 32 kapsomerden oluşmaktadır. Partiküllerinin izoelektrik noktası pH 5.5-5.716-6.05 ve çökelme katsayıları ise sırasıyla 98-116.6-152S dir. Partiküllerin termal inaktivasyon noktası 50-56.66-70 oC, in-vitro'da canlı kalma süreleri de 1-3,5-10 gündür. Partiküller linear, pozitif yüklü ve tek iplikli RNA-1, RNA-2 ve RNA-3 'ten oluşan %16-18.4-21.2 oranında nükleik asit içerirler. Toplam genom uzunluğu 8500-8606-8698 nt olup, en uzun segment (RNA-1) 3355-3384-3410 nt, ikinci uzunluktaki segment (RNA-2) 2946-3018-3074 nt,

üçüncü segment (RNA-3) 2186-2199-2214 nt, dördüncü segment ise (RNA-4) 1000 nt molekül ağırlığındadır. Bütün RNA'ların 3' uçları birbirine benzer ve her bir taxon için de 200 nt uzunluğunda karakteristik bir bölgeye sahiptir. Genomlar, % 23.1-23.83-24 guanin; %23-24.8-26.2 adenin; %21-21.83-24 sitosin; %29-29.51-30.1 urasil oranında baz içerirler. RNA'lerin 5' uçları bir adet cap, VPg proteini bulundurulur. RNA'lerin 3' uçları poly A bölgesi bulundurmamaktadır. Bütün genomik RNA'lerin 3' uçlarında tRNA benzeri bir bölge bulunmaktadır. Partiküller içerisinde genomik olmayan nükleik asitler de mevcut olup genomik ve subgenomik (mRNA ya da satellit RNA) nükleik asitler birlikte paketlenmişlerdir. RNA-3 üzerinde bulunan mRNA olarak isimlendirilen RNA-4 kılıf proteinini kodlamaktadır. Genomik RNA'lar tek tek paketlenmesinin yanı sıra RNA-4 ve RNA-3 birlikte paketlenirler (Lot ve Kaper, 1976: Çağlar, 2006'dan).

CMV yaklaşık olarak 29 nm çapında ve 180 alt üniteden (T= icosahedral simetri gösteren) oluşan ve çökelme katsayıları yaklaşık 98S olan (Rossinck, 2001), polyhedral partiküllere (virionlara) sahip olup bu partiküller ipliksi pozitif yüklü tek iplikli üç adet (RNA-1, RNA-2, RNA-3) genomik RNA'i ve iki adet sub-genomik RNA'i (RNA-4 ve 4A) paketlenmektedirler. RNA-1 ve RNA-2 ayrı ayrı partiküller içerisinde paketlenmiş olup RNA-3 ve RNA-4 (Lot ve Kaper, 1976: Çağlar, 2006'dan) ve başka bir ihtimal olarak RNA-3 ve RNA4A aynı partikül içerisinde birlikte paketlenmişlerdir. Bu özelliklerinden dolayı CMV çok partiküllü bir yapıya sahip olup bitkiyi enfekte edebilmesi için üç tip partikülün hepsine birden ihtiyaç duymaktadır.

RNA-1 tek parçadan (monocistronic) oluşmakta ve methyltransferase ve RNA helicase aktivitesine sahip 1a olarak isimlendirilen ve dizayn edilen 110 kDa'luk tek bir proteini kodlamaktadır. RNA-2 viral polimeraz aktivitesine sahip ve 2a olarak isimlendirilen ve dizayn edilen 98 kDa'luk bir proteini kodlamaktadır. RNA-2 aynı zamanda RNA4A subgenomunun içerdiği 2b proteinini de kodlamaktadır. 2b proteini virüsün bitki içerisindeki hareketi ve virülentliği üzerinde önemli bir role sahiptir (Galitelli, 2000). RNA-3 de iki parçalı

(bicistronic) yapıya sahip olup genin 5' yarı tarafı 3a proteinini, 3' yarı tarafı da kılıf (CP) proteinini kodlamaktadır. Kılıf protein bölgesi subgenomik RNA-4 tarafından kodlanır. Genin 5' yarı tarafındaki 3a proteini virüsün aynı zamanda hareketinden sorumlu hareket (Movement) proteini olarak dizayn edilmiştir.

CMV partikülleri ve bütün genomik RNA'leri virüsün doğada var olan farklı izolatlarının sınıflandırılmasında kullanılabilmektedir (Hsu ve ark, 2000).

CMV, genomik RNA'leri üzerindeki genetik yapılarına ve baz dizilimi benzerliklerine göre alt grup I (WT) ve alt grup II (S) (Galitelli, 1998) diye iki alt grupta toplanmışlardır. Yapılan surveyler sonucunda doğada CMV izolatlarının %70'inin alt grup I'e, %20'sinin de alt grup II' ye ait olduğu saptanmıştır (Hsu ve ark, 2000).

Finetti Sialer ve ark (1999), CMV'nün alt grup'ları konusunda çalışma yapmışlar ve ellerinde bulunan CMV-TTS, CMV-FL ve CMV-77 izolatlarının hangi alt gruba dahil olduğunu saptamışlardır. Kontrol olarak ta CMV-Fny (alt grup IA), CMV-Tfn (alt grup IB), CMV-S (alt grup II), izolatlarını kullanmışlardır. Çalışmada hedef RNA olarak CMV'nün RNA-2 genomik RNA'sinin belirli bir bölgesini spesifik primerler kullanarak RT-PCR-RFLP (Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemi ile çoğaltarak bu bölgede MluI restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği bölgenin varlığını kontrol etmişlerdir. Bu izolatlardan nükleik asit izolasyonu yapmışlar RNA-2 genomik RNA'i üzerinde 650 bplik bir bölgeyi (RW8) 5'-GGTTCGAA (AG)(AG)(AT)ATAACCGGG-3' ve (RV11) 5'-GTTTATTTACAAGAGCGTA CGG-3' dejenere primer'lerini kullanarak PCR yöntemi ile çoğaltmışlardır. Daha sonra PCR ürününü MluI restriksiyon enzimi kullanarak RFPL çalışmasına tabi tutmuşlardır. CMV'nün grublandırılmasında izolatların alt grup I, alt grup II olarak gruplandırılmasından daha çok alt grup IA, alt grup IB ve alt grup II olarak gruplandırılabilceği bildirilmiştir.

Bromoviridae familyasının *Cucumovirus* genusuna dahil bir virüs olan CMV'nin, 365 takım ve 85 familyaya giren en az 1000 bitki türünü enfekte ettiği

bildirilmektedir (Hobbs ve ark, 2000; Kılıç ve ark, 2015). Doğal konukçuları içerisinde çoğunlukla Cucurbitaceae, Fabaceae ve Solanaceae familyalarına ait türlerin bulunduğu Brunt ve ark (1996) tarafından bildirilmiş olup CMV'nin domates, biber, patlıcan, ıspanak, hıyar, fasulye, patates, muz gibi konukçularının yanı sıra krizantem, glayöl, çöl gülü, lale, petunya, zambak, sardunya gibi süs bitkilerinde de önemli zararlara neden olduğu rapor edilmiştir (Ferreira ve Boley, 1992; Kılıç ve ark, 2015).

Etmen virüsün tohum, hastalıklı bitki artıkları ve yabancı otlarla taşındığı gibi (Brunt ve ark, 1996) yaprak bitleri ile de etkin bir şekilde taşındığı bildirilmektedir (Pollard, 1973; Palukaitis ve ark, 1992; Kaper ve Waterworth, 1981; Çağlar, 2006). Hıyar Mozayik Virüsü, Aphididae takımına bağlı 60' dan fazla yaprak biti türü ile non-persistent biçimde taşınmakta olduğu (Francki ve ark, 1979; Racciah ve ark, 1985), özellikle sonbahar ve ilkbahar mevsimlerinin ılık ve az yağışlı olması ile yaprak biti popülasyonunun arttırmasından dolayı CMV'nin taşınmasının da buna paralel olarak arttığı bildirilmektedir. Yaprak bitleri içerisinde *Myzus persicae*'nin CMV'nün bazı izolatlarını *Aphis gossypii*'den daha etkili taşıdığı bildirilmiştir (Tanne ve Zimmernan-Gries, 1980). Değişik araştırmacılar CMV ile erken dönemde enfekte olan biber bitkilerinin meyvelerinin sağlıklılarından %80 oranında daha küçük, şekillerinin bozuk ve açık renkli olduklarını rapor etmişlerdir (Agrios ve ark, 1985; Ünlü ve Güldür, 2004; Uzunoğulları ve ark, 2015).

CMV yaprak bitleriyle taşınmanın yanı sıra mekanik inokulasyon ile de *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo*, *Citrullus lanatus*, *Lycopersicum esculentum*, *Capsium annum*, *Nicotiana tabacum*, *N. rustica*, *Chenopodium amaranticolor* ve *C. quinoa* indikatör bitkilerine taşınmakta ve sonuçta test bitkilerinde damar açılması ve mozaik belirtileri ortaya çıkmaktadır (Kosaka ve Fukunishi, 1997; Karamanlı ve ark, 2010). CMV'nin biberlerde yapraklarda beneklenmeler, mozaik belirtileri, damarlarda sarı renk açılmaları, yaprak deformasyonları, halkalı lekeler, meyve deformasyonları, yapraklarda meşe yaprağı oluşumu gibi

simptomlara da neden olduğu bildirilmiştir (Green ve Kim, 1991; Kılıç ve ark, 2015).

Biberlerde yaklaşık 65 virüsün hastalık oluşturduğu bildirilmiş olup önemli olarak görülen ve ciddi verim kayıplarına neden olan virüslerden bazıları *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Potato Y virus* (PVY), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Pepper veinal mottle virus* (PVMV), *Pepper ringspot virus* (PRSV)'dir (Green ve Kim, 1994; Kılıç ve ark, 2015). Biberde önemli ve yaygın olan virüs hastalıklarından bazıları ile ilgili bilgiler Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalara göre Martelli ve Quacquarelli (1983), doğada biber bitkilerini infekte eden 15 taksonomik gruba ait 20'den fazla virüsün rapor edildiğini bildirmişler ve bazı tobamo-, poty, potex-, tospo virüs gruplarının sera gibi korunmuş alanlarda özellikle etkili olduğunu, ya vektörler ile veya mekanik olarak ya da tohumla taşındığını kaydetmişlerdir. Biberlerde önemli olarak bulunan virüs hastalıkları ve genel bilgiler Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Green ve Kim (1994), Cucumovirus cinsine ait alan CMV'nin, biberlerde şiddetli ürün kayıplarına neden olan virüs hastalığı olduğunu ve yaklaşık 101 familyada 1200 bitki türünde bulunması ile dünya genelinde en yaygın virüslerden biri olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar CMV'nin bitki gelişiminin erken dönemlerinde enfeksiyonu sonucu zararın daha yüksek ve yayılmanın daha etkili olduğunu ve yaptıkları çalışmada, CMV'nin %60' dan daha fazla ürün kaybına neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Rodriguez-Alvarado ve ark (2002), Güney Meksika'nın en önemli biber üretim alanlarında, özellikle Şili biberlerinde 2 yıl boyunca şiddetli hastalıklara neden olan virüsleri saptamak için survey çalışmaları yapmışlar, bu çalışmada biber alanlarını ve çevresindeki yabancı otları da incelemişlerdir. Mozaik, yaprak ve meyve bozukluğu belirtisi olan bitkileri ve yabancı otları, ELISA yöntemini kullanarak *Pepper mottle virus* (PepMoV) ve *Cucumber mosaic virus* (CMV) için

testlemişler, söz konusu virüsleri tek veya karışık enfeksiyon olarak saptamışlardır. İncelenen bazı biber ve yabancı otlar, diğer bazı virüsler açısından daha düşük oranda enfekteli bulunurken, çok yıllık *Solanum elaeagnifolium*, *Convolvulus arvensis* (tarla sarmaşığı), *Chamysuraces* türlerinin de PepMoV ve CMV ile bulaşık olduğunu belirlemişlerdir.



Çizelge 2.1. Biberde Önemli ve Yaygın Virüs Hastalıkları (Pernezny ve ark, 2003)

Familya	Cins	Tür	Kısaltma	Taşıma şekli
Bromoviridae	Cucumovirus	<i>Cucumber mosaic virus</i>	(CMV)	Yaprak bitleri, mekanik inokulasyon, tohum
Bromoviridae	Alfavirus	<i>Alfalfa mosaic virus</i>	(AMV)	Yaprak bitleri, mekanik inokulasyon
Potyviridae	Potyvirus	<i>Potato Y virus</i>	(PVY)	Yaprak bitleri, mekanik inokulasyon
		<i>Tobacco etch virus</i>	(TEV)	Yaprak bitleri, mekanik inokulasyon
		<i>Pepper mottle virus</i>	(PepMoV)	Yaprak bitleri, mekanik inokulasyon
		<i>Chilli veinal mottle virus</i>	(ChiVMV)	Yaprak bitleri, mekanik inokulasyon
		<i>Pepper veinal mottle virus</i>	(PVMV)	Yaprak bitleri, mekanik inokulasyon
Alphaflexiviridae	Potexvirus	<i>Potato X virus</i>	(PVX)	Mekanik inokulasyon, temas
Virgaviridae	Tobamovirus	<i>Tobacco mosaic virus</i>	(TMV)	Mekanik inokulasyon, tohum, temas
		<i>Tomato mosaic virus</i>	(ToMV)	Mekanik inokulasyon, tohum, temas
		<i>Pepper mild mottle virus</i>	(PMMoV)	Mekanik inokulasyon, tohum, temas
Bunyaviridae	Tospovirus	<i>Tomato spotted wilt virus</i>	(TSWV)	Thrips, mekanik inokulasyon
Geminiviridae	Bigeminivirus	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	(TYLCV)	Beyazsinek

Choil ve ark (2005), Kore’de 2001-2004 yılları arasında biberlerde zararlı virüs hastalıkları ile ilgili yaptıkları survey çalışmalarında elektron mikroskobu, test bitkisi reaksiyonları, rapid immuno-filter paper assay (RIPA), RT-PCR ve viral nükleotid dizi analizleri gibi yöntemleri kullanmışlardır. Yaptıkları çalışmada toplanan 1056 örnekte bazı virüsleri bulmuşlar ve bu örneklerin; 343 adedinin (%32,5) sadece CMV ile, 153 (%14,5) adedinin CMV ve PepMoV ile, 54 adedinin (% 5,1) CMV ve PMMoV ile, 3 adedinin (%0,3) CMV ve *Broad bean wilt virus 2* (BBWV2) ile, 1 adedinin (%0,1) CMV, PepMoV ve BBWV2 ile, 8 adedinin (%0,8) CMV, PepMoV ve PMMoV ile karışık enfeksiyon şeklinde bulaşık olduğunu bulmuşlardır. Yapılan tespit çalışmalarında en yaygın virüs olarak CMV bulunurken değişen oranlarda CMV+PepMMov, CMV+PMMoV, PepMov+BBWV2 ve CMV+PepMoV+PMMoV gibi karışık ikili-üçlü enfeksiyonlar da belirlenmiştir. Aynı çalışmada toplanan 30 örneğin de herhangi bir virüsle enfekteli olmadığını rapor etmişlerdir.

Ali ve Kobayashi (2010), biberlerde zararlı olan CMV’nin tohumla da taşındığını bildirmişler ve yaptıkları çalışmada genç biber fidelerini CMV-Fny (Fast New York) izolatu ile mekanik olarak inokule etmişler, CMV enfekteli bitkilerin meyvelerinden olgunlaşan tohumlar çıkarılmış, bu tohumlardan gelişen genç biber fidelerinden total RNA ekstrakte edilmiş ve CMV alt-grubu IA’ya özgü olan ve bu çalışmada farklı primerleri de kullanarak RT-PCR ile testlemişler ve 950 bp’lik band bulmuşlar. Bu çalışma sonucunda CMV’nin biberde tohumla taşınmada enfeksiyon oranının %95-100 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar petri kaplarında tohum büyüme testleri yapmışlar ve CMV’nin enfeksiyonun tohum kılıfında %53 ile %83 arasında, embriyo enfeksiyonunun ise %10 ile %46 arasında değiştiğini saptamışlardır.

Arogundade ve ark (2012), Nijerya’da biberlerde en çok görülen virüslerin PVMV, CMV, TYLCV ve TMV olduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada biber yetiştirilen 6 farklı bölgenin her birinden 40 örnek olmak üzere şüpheli örnekler toplamışlar ve bu örnekleri ELISA yöntemi ile testlemişler, testler

sonucunda örneklerdeki PVMV enfeksiyonunun %36,79, CMV enfeksiyonunun ise %22,14, ve ayrıca örneklerin % 10 'nun ise her iki virüsle karışık enfeksiyon olduğunu belirleyip rapor etmişlerdir.

Svoboda ve Svobodova-Leisova (2012), Çek Cumhuriyeti'nde 2006-2010 yılları arasında biber bitkilerindeki virüsleri belirlemek için yaptıkları surveylerde açık alan ve örtü altı alanlarda viral enfeksiyon belirtileri gösteren 375 yaprak örneği toplamışlar ve bu örnekleri AMV, BBWV-1, CMV, PMMoV, PVY, TMV ve TSWV için ELISA yöntemini kullanarak testlemişler. Örneklerde AMV, BBWV-1, CMV ve PVY etmenlerini saptamışlar, en yaygın olarak CMV ve PVY'yi belirlemişler, ayrıca CMV ve PVY'ye karşı dayanıklı gen kaynaklarını da değerlendirmişlerdir.

Hindistan'da biber plantasyonlarından alınan 50 adet biber örneğinin %18'inde CMV enfeksiyonunun söz konusu olduğunu yürüttükleri bir çalışmada Biswas ve ark (2013) rapor etmişlerdir.

İran'da biberde zararlı virüslerin belirlenmesi amacıyla 2012-2013 yılları arasında Soleimani (2014), bir çalışma yapmış ve 23 bölgeden yaklaşık 500 biber örneği toplamıştır. Bu örneklerde; yapraklarda mozaik, beneklenme, kıvrılma, koyu yeşil damar açılması, bodurluk gibi belirtilere rastlandığını bildiren araştırmacı, DAS-ELISA yöntemini kullanarak 55 örnekte PVMV, 23 örnekte PMMV, 17 örnekte PMV, 15 örnekte PVY, 21 örnekte AMV, 18 örnekte CMV ve 13 örnekte ise TSWV enfeksiyonunu saptamıştır. Ayrıca örneklerin %8,6'sında da çoklu enfeksiyon olduğunu rapor etmiştir. Bu çalışma İran'daki biber tarlaları açısından PVMV, PMMoV, PMV ve TSWV gibi etmenlerin varlığının saptanması ile ilgili ilk rapor olduğu bildirilmiştir.

Nijerya'da biberlerde mevcut virüslerin varlığının ortaya koyulması, çeşitliliğinin ve dağılımının belirlenmesi amacıyla 2010-2011 yılları arasında Olawale ve ark (2015) tarafından yürütülen çalışmada şüpheli olarak görülen yaprak örnekleri toplanmış ve bunlar ACP-ELISA (antijen coated plate enzym-linked immunosorbent assay) yöntemi ile test edilmiştir. Simptomolojik olarak

şüpheli bitkilerde yapraklarda mozaik, leke, kıvrılma, yaprak boyutunda azalma, damar sararması, yaprak ve meyve deformasyonları, bodurlaşma gibi belirtilere rastlamışlar ve 2010 yılında ortalama hastalık yaygınlığını %79 ve 2011 yılında ise %76 olarak belirlenirken tek veya karışık enfeksiyonları da saptamışlardır. PVY, PVX, PVMV, PMMoV, TMV, CMV, TEV ve ToMV olmak üzere toplam 8 farklı virüsün testlendiği çalışmada en yüksek oranda saptanan (%79) etmen virüs PVY olup, bunu sırasıyla %67 ile TEV, %61 ile CMV, %58 ile PVMV, %23 ToMV izlemiştir.

Ülkemizde biberlerdeki virüs hastalıkları ile ilgili yapılan çalışmalarda TMV, ToMV, CMV, PMMoV, TSWV, PVY, AMV ve TEV etmenlerinin varlığı değişik zamanlarda ve bölgelerde bir çok araştırmacı tarafından belirlenmiştir (Yılmaz ve ark, 1983; Yılmaz ve Davis, 1985; Bostan ve Dursun, 2002; Sertkaya ve ark, 2003; Arlı-Sökmen ve ark, 2005; Özaslan ve ark, 2006; Güldür ve Çağlar, 2006; Buzkan ve ark, 2006; Daplan ve Sertkaya, 2007; Buzkan ve Yüzer, 2009; Şevik, 2011; Sertkaya, 2012; Kılıç ve ark, 2015; Keleş Öztürk, 2017).

Son yıllarda, moleküler tekniklerdeki gelişmelere paralel olarak da biber virüslerinin bitki dokularından hassas ve doğru olarak teşhisine olanak sağlayan PCR teknikleri geliştirilmiştir (Buzkan ve Yüzer, 2009; Mostafae ve ark, 2012; Yao ve ark, 2013; Biswas ve ark, 2013; Kılıç ve ark, 2015).

Çoğu bitki virüsünü tanılama çalışmalarında kullanılan ELISA testleri, biberlerdeki virüsleri belirlemek için de araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılmıştır (Choi ve ark, 2002; Şevik, 2011; Arogundade ve ark, 2012; Svoboda ve Svobodova-Leisova, 2012; Iqbal ve ark, 2012). Bu yöntemin tercih edilmesinde hızlı, duyarlı, ekonomik ve güvenilir olması etkili olmaktadır (Vinayarani ve ark, 2011).

Tekinel ve ark (1969), Mersin ilinde ekonomik bakımdan önemli biber, patlıcan, fasulye ve marul gibi bazı sebzelerin virüsleri üzerinde araştırmalar yapmışlardır. Bu çalışmada mekanik inokulasyon yöntemini uygulamışlar. Biber virüslerinin tespiti için Domates, Tütün, Hıyar, Datura, Chenopodium, Fasulye,

Börülce gibi test bitkiler kullanılmıştır. Bu test bitkilerine üç yapraklı devrede iken mekanik inokulasyon ile taşıma çalışmaları yapılmış ve bazı virüslerin saptandığı bildirilmiştir. Üç yıl devam eden mekanik inokulasyon çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre biberlerde Biber mozaik virüsü, Hıyar mozaik virüsü, Patates X virüsü belirlenmiştir. Ayrıca alınan örneklerde yapılan kontrollerde biber bitkilerinde başlangıçta hastalık %1-10, son devrelerde ise %90-100 oranında bulunduğu rapor edilmiştir.

Güllü ve Çalı (1994), Doğu Akdeniz Bölgesi örtü altı sebze alanlarında görülen virüs hastalıklarının belirlenmesi üzerine araştırmalar yapmışlardır. 1989-1991 yıllarında yürütülen bu çalışmada yoğun olarak örtü altı sebze yetiştiriciliği yapılan Adana, İçel ve Hatay illerinde sera ve alçak plastik tünellerde domates, patlıcan, hıyar ve biber bitkilerinde sorun olan viral hastalık etmenleri ve bunların yaygınlık oranları ortaya konmuştur. Hasta veya şüpheli bitki örneklerinden yapılan mekanik inokulasyon çalışmalarında ToMV, CMV ve ToMV+PVX örtü altı sebze yetiştiriciliğinde en çok rastlanan virüsler olduğunu belirlemişler. Yapılan bu çalışmada sonuç olarak; Doğu Akdeniz Bölgesini kapsayan Hatay, Adana ve Mersin illeri örtü altı sebze yetiştiriciliğinde, viral hastalık etmenleri açısından gerek ülkemizde gerekse yabancı ülkelerde yapılan araştırma sonuçlarından farklı bir durum gözlenmemiştir. Özellikle yapılan bu survey çalışmasının biber sonuçlarına baktığımızda Mersin ilinde incelenen seraların %70'inde, Adana'da örtülü alanın %28'inde, Hatay'da ise %40'ında viral hastalıkların olduğunu, bunun da örtü altı sebze yetiştiriciliği açısından önemli bir sorun olduğunu göstermiştir. Mersin ilinde örtü altı biber üretim alanlarında yürütülen survey çalışmalarında çiçek döneminde yapılan ilk kontrollerde seraların %50'sinde, meyve döneminde yapılan ikinci kontrollerde ise %87,5'inde virüs hastalıklarıyla bulaşık bitkilerin bulunduğunu tespit etmişler. Çiçek döneminde yapılan ilk kontrollerde biber seralarının ortalama bulaşıklık düzeyi %2,28 bulunmuş, meyve döneminde yapılan ikinci kontrolde bu oranın %5,17'ye çıktığını belirlemişler. Adana ilinde yapılan surveydeki örtülü alanın %33,25'inde virüs

simptomlu bitkilere rastlanmış ve bu alanın virüs hastalıklarıyla ortalama bulaşıklık oranının %2 olduğu belirlenmiştir. Hatay ilinde yapılan surveyde biber yetiştirilen örtülü alanın ise %23,33'ünde simptomlu bitkilere rastlanmış ve bu alan için ortalama bulaşıklık oranı %1,53 olarak bulunmuştur. Ve ayrıca yapılan mekanik inokulasyon çalışmalarında testlenen biber örneklerinin TMV ve CMV ile bulaşık olduğu görülmüştür. Sonuçlara baktığımızda CMV özellikle Charleston adıyla bilinen biber çeşidinde tespit edilmiştir.

Gümüş (1998), İzmir ilinin önemli biber üretim alanlarında görülen virüs hastalıklarının yaygınlık oranları ve yaygın olarak yetiştirilen biber çeşitlerinin bu virüslere karşı olan reaksiyonları ilgili 1995-1998 yılları arasında bir çalışma yapmış. Araştırmada biber alanlarında bulunan virüs belirtilerinin yaygınlık oranlarını belirlemiştir. Yaptığı surveyde bitkilerde yapraklarda mozayik, deformasyon, sarı band şeklinde lekeler, kıvrımlaşma, gövdede nekrozlar, bitkilerde bodurlaşma, meyvelerde yanıklık ve deformasyonlar gibi belirtiler gözlemlemiştir. Yapılan surveyde 7 ilçeden toplam 88 örnek toplamış, virüs belirtisi gösteren bu örneklerde mekanik inokulasyon ve ELISA testi yöntemini kullanarak yaygın olan virüsleri tespit etmiştir. Elde edilen izolatların elektron mikroskopta görüntülerini fotoğraflamış, bölgede yaygın olarak problem olan virüslerin TMV, PVY, CMV ve bunların karışık olarak oluşturdukları enfeksiyonlar olduğunu belirlemiştir. Ayrıca, bölgede yetiştirilen Acı sivri, Tatlı sivri, Dolmalık ve yağlık biber çeşitlerinin yapılan bu araştırma sonucunda biberlerde yaygın olarak gözlenen virüslere karşı reaksiyonlarını saptamıştır.

Arlı-Sökmen ve ark (2005), Samsun ilinde biber üretimini etkileyen bazı virüs hastalıklarını tespit etmek amacıyla, 1998-1999 yılları arasında survey yapmışlar ve biber yetiştirilen alanlardan toplam 313 örnek toplamışlardır. Bu örnekleri, AMV, CMV, PVY, TMV, ToMV ve TSWV için ELISA yöntemini kullanarak incelemişlerdir. Testlenen 313 bitkinin 42'sinde TMV+PVY (%15,4) ikili enfeksiyon bulmuşlar ve bunun en yaygın ikili enfeksiyon olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmanın Türkiye'deki biber üretim alanlarında AMV'nin

varlığı açısından da ilk kayıt olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, çalışmada bu virüslerin kaynağı olabilecek bazı yabancı ot türlerine olan etkilerini de araştırmışlar. Bunun için 15 familyaya ait 24 yabancı ot türünü testlemişler. *Amaranthus retroflexus*'un CMV, PVY, ToMV, TMV ve TSWV konukçusu olduğunu, *Hibiscus trionum*'un PVY ve TSWV konukçusu olduğunu belirtmişlerdir.

Demir (2005), Kahramanmaraş ve ilçelerinden toplanan 171 biber yaprak örneğini CMV, AMV, PVX, PVY, PMMoV ve TEV için DAS-ELISA ile testlemiş ve örneklerin %52,6'sının bir veya daha fazla virüsle enfekteli olduğunu bulmuştur. Toplanan örneklerde PMMoV'nin %8.2 ve CMV'nin enfeksiyon oranının ise %4,6 olduğunu açıklamıştır.

Buzkan ve ark (2006), Türkiye'nin biber üreten önemli bölgeleri içerisinde, 2004 yılında biber üretim sezonu boyunca, biberi enfekte eden altı virüsün görülme sıklığını, şiddetini ve dağılımını belirlemişlerdir. Güneydoğu Anadolu'nun ve Doğu Akdeniz'in dört farklı bölgesinden rastgele seçilmiş 50 adet biber yetiştirilen alandan survey yapmışlardır. Çalışma alanından 515 örnek toplamışlar ve bu örneklerle CMV, AMV, PVX, PVY, PMMoV ve TEV için DAS-ELISA testi uygulamışlardır. Testlenen biber örneklerin %64,8'nin enfekteli olduğunu bulmuşlar ve PVY'nin (%26,4) en yaygın bulunduğu, bunu sırasıyla PVX (%25,8), AMV (%25,2), TEV (%23), PMMoV (%9,1) ve CMV' nin (%8,3) izlediğini bulmuşlardır. Ayrıca bu çalışmada AMV enfeksiyonu yüksek oranda ve ilk kez üç alanda (Kahramanmaraş, Şanlıurfa ve Gaziantep) bulunduğu rapor edilmiştir. Bunun yanında Hatay ilinde AMV tespit edilmemiş ve PMMoV' nin de testlenen alanlarda yeni bir virüs olduğu rapor edilmiştir.

Şanlıurfa'da ilkbahar ve sonbahar dönemlerinde biberlerde yaptıkları bir çalışmada Ünlü ve Güldür (2004), CMV enfeksiyonunun sırasıyla %47 ve %76 oranlarında yaygın olduğunu rapor etmişlerdir.

Çağlar (2006) tarafından yürütülen çalışmada Şanlıurfa, Hatay, Adana ve Mersin illerinde kavun, domates ve biber bitkilerinde zararlı CMV izolatlarının

tanımlanmaları, sınıflandırılmaları, çoğalttıkları satellit-RNA'lerin büyüklüklerini ve satellit-RNA'ların virüs üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla yaptığı surveylerde topladığı 60 adet kavun, 62 adet domates ve 35 adet biber örneğini ELISA ile testlemiş ve 5 adet kavun, 9 adet domates ve 6 adet biber örneğinin CMV ile bulaşık olduğunu bulmuştur. Enfekteli olduğu saptanan bu bitkilerden alınan örnekleri mekanik inokulasyon yöntemi ile test bitkilerine aşılamış ve CMV izolatlarını enfekteli bitkilerden arılaştırarak virionların elektrik ortamındaki hareket hızlarını kontrol etmiştir. İzolatların RNA-1, RNA-2, kılıf proteini ve 2a proteinini kodlayan genleri üzerinde bazı bölgeleri RT-PCR ile çoğaltmıştır. PCR ürünlerini RFLP çalışmasında MluI, Eco RI, Hind III, Bam HI ve Msp I endonükleaz restriksiyon enzimleri ile kesmiş ve agaroz jelde görüntülemiştir. Çalışmanın sonucunda CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının alt grup IA' ya ait olduğunu, üç izolatında 700 bp satellit-RNA'ni çoğalttıkları, CMV-K'nın zayıf ırk olduğunu ve bu ırkta belirtinin satellit-RNA'den kaynaklanabileceğini, CMV-K'nın çapraz koruma (cross-protection)'da kontrol ajanı olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Özaslan ve ark (2006), Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde biberde zararlı virüs hastalıklarını saptamak ve meydana gelen zararlarını önlemek amacıyla, Gaziantep ilinin Nurdağı ve İslahiye ilçelerinde survey yapmışlardır. Biber üretim alanlarında yapraklarda mozaik, kıvrılma, damar açılması, klorotik ve nekrotik lekeler ile meyve ve yaprak deformasyonları gibi belirtiler gözlemlemişlerdir. Topladıkları bu örnekleri biyolojik ve serolojik yöntemleri kullanarak testlemişler, yapılan mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan test bitkilerinde TMV ve CMV belirtileri gözlemlemişlerdir. Kullanılan DAS-ELISA metodunda ise, 81 örnek testlemişler ve bu örneklerden 16 tanesinin CMV ve 17' sininde TMV ile enfekteli olduğunu tespit etmişlerdir.

Denizli ili biber, patlıcan ve marul üretim alanlarındaki virüs hastalıklarının belirlenmesi ile ilgili yapılan bir çalışmada DAS-ELISA testi sonucunda, biber örneklerinin %81,13'ünün TSWV, %1.89' unun CMV,

%11.32'sinin ise karışık olarak (CMV, AMV, TSWV) enfekteli olduğunu rapor edilmiştir (Özdemir ve Erilmez, 2007).

Kahramanmaraş ili kırmızı biberlerinde tohumla taşınan altı virüsün (AMV, CMV, TMV, ToMV, TSWV, PMMoV) moleküler tanısını yapmak için Buzkan ve Yüzer (2009), RT-PCR yöntemini kullanmışlar ve 2006-2007 yılları arasında yürütülen bu çalışmada farklı lokasyonlarından toplam 125 meyveden tohum alıp çimlendirmişler ve meydana gelen biber fidelerinden nükleik asit izolasyonu yapmışlardır. Sonuçta araştırmacılar biber tohumlarında sadece CMV enfeksiyonunu saptamışlar ve diğer virüs enfeksiyonlarına rastlamadıklarını bildirmişlerdir.

Keleş Öztürk ve Baloğlu (2015), Türkiye'nin Doğu Akdeniz bölgesindeki Adana, Mersin, Hatay, Kahramanmaraş ve Osmaniye illerinde açık alanlardaki yeşil biber, dolmalık biber, kırmızı biber çeşitlerinde; virüs hastalıklarının saptanmasını belirlemek amacıyla yaptıkları bir araştırmada meyve ve yaprak örnekleri toplamışlar ve tüm örnekleri AMV, *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV), CMV, PMMoV, *Pepper mottle virus* (PepMoV), *Pepper veinal mottle virus* (PVMV), PVX, *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco etch virus* (TEV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), ToMV, TSWV ve *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) için DAS-ELISA kullanılarak test etmişler. Ayrıca DAS-ELISA'da pozitif çıkan örnekleri RT-PCR ile karakterize etmişler ve sonuç olarak açık alandaki biber çeşitlerinde PVY, TEV, CMV, TSWV, PMMoV, PVMV, ToMV, TMV ve PepMoV tanımladıklarını bildirmişlerdir.

Kılıç ve ark (2015), CMV ve PMMoV'unun belirlenmesi amacıyla 2012-2013 yılları arasında Burdur ilinde biber üretim alanlarında yürüttükleri çalışmada virüs belirtisi gösteren 124 bitki örneğini toplamışlar, serolojik ve moleküler yöntemler ile testlemişlerdir. Yapılan DAS-ELISA sonucunda; 124 örnekten 20'si virüsler ile enfekteli bulunmuş, hasta olduğu saptan örneklerin 8 adedinin CMV, 8'inin de PMMoV ile enfekteli olduğu rapor edilirken, 4 örneğin de karışık enfeksiyon olarak her iki virüs ile bulaşık olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yapılan

RT-PCR çalışmalarında CMV için farklı primerler kullanmışlar ve benzer sonuçları elde etmişlerdir. Çalışmada CMV için kılıf protein geninin yaklaşık 678 bp'lik bir kısmını çoğaltmışlar ve virüse özgü spesifik bantlar elde ederlerken; çalışma süresince toplanan biber örneklerinde DAS ELISA testleri sonucunda PMMoV teşhis edilmesine rağmen yapılan RT-PCR çalışmalarda ise 830 bp büyüklüğünde spesifik bantları elde edemediklerini bildirmişlerdir.

Uzunoğulları ve Gümüş (2015), Marmara bölgesinin Çanakkale, Bursa, Yalova, İstanbul, Bilecik ve Sakarya illerinde bazı kültür bitkilerinde doğal enfeksiyona neden olan hıyar mozaik virüsü CMV'nün tespiti için yürüttükleri çalışmada Çanakkale (Ezine)'den 48 domates, Bursa (İznik, Orhangazi, Yenişehir)'dan 15 domates, 25 biber, 35 glayöl, Yalova (Merkez)'dan 12 hıyar, 8 kabak, 16 biber, İstanbul (Pendik)'dan 25 biber, Bilecik (Osmaneli)'den 14 domates, 15 biber ve Sakarya (Pamukova)'dan 22 biber olmak üzere toplam 235 adet örnek toplamışlardır. Yapılan survey çalışmalarında, domates, biber, hıyar, kabak ve glayöl bitkilerine ait yapraklarda kloroz, mozaik, renk açılması, bodurluk ve yaprak deformasyonu gözlenmiştir. Bu örneklerle DAS-ELISA yöntemini uygulamışlar ve toplanan biber örneklerine baktığımızda %69'u CMV ile enfekteli bulunmuştur. Ayrıca RT-PCR yöntemini de uygulamışlar. PCR çalışmaları, virüsün kılıf protein geni üzerinde 540 bp uzunluğundaki alanı çoğaltan primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR ürünlerinin amplifikasyonu sonucunda 540 bp büyüklüğünde DNA bantları %1'lik agaroz jel elektroforezde gözlenmiştir. Çalışma sonucunda ise; moleküler ve serolojik sonuçların paralellik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Güneş ve Gümüş (2016), Antalya ilinde örtü altı ve açık alanda bazı virüslere karşı dayanıklı olduğu bilinen biber çeşitlerinde CMV ve TSWV etmenlerinin yaygınlığını belirlemek amacıyla çalışma yapmışlar ve bu kapsamda toplam 148 adet biber örneğini DAS-ELISA ile testlemişlerdir. Bu örneklerin 11 tanesinde (%7,34) CMV ve 53 tanesinde (%35,81) TSWV saptamışlar. Ayrıca bu örneklerle RT-PCR testi de uygulamışlar, yapılan sekans analizi sonuçlarına göre de

TSWV izolatının Türkiye, İtalya ve İspanya’da biber bitkilerinde TSWV dayanıklılığını kıran izolatlar ile %92-97 oranında benzer olduğunu bulmuşlardır.

Keleş Öztürk ve Çolak Ateş (2016a), biber yetiştiriciliğindeki önemli hastalıklar ve korunma yöntemleri ile ilgili yaptıkları bir bildiride biber yetiştiriciliğini etkileyen birçok biyotik ve abiyotik faktörlerin bulunduğunu ve biyotik faktörlerden en önemlilerinin viral ve fungal hastalıklar olduğunu bildirmişlerdir. Biber üretiminde ekonomik öneme sahip olanların, CMV, PVY, TEV, TSWV, PMMoV, TMV, ToMV, Fusarium solgunluğu (*Fusarium solani*), Biber kök ve kökboğazı yanıklığı (*Phytophthora capsici*), kurşuni küf (*Botrytis cinerea*), külleme (*Leveillula taurica*) olarak sıralamışlardır. Üretim alanlarında hastalık ve zararlılar ile mücadelede kültürel önlemlerin ilk sırayı aldığını öne sürerek kültürel önlemlerde; hastalık etmeni taşımayan temiz tohum kullanılması, dayanıklı çeşitlerin temin edilmesi, tohum ekiminin sık yapılmaması, fideliklerin sık sık havalandırılması, aşırı azotlu gübreden kaçınılması, fazla sulamadan kaçınılması, hastalıklı bitkilerin imha edilmesi, kullanılan alet ve ekipmanların dezenfekte edilmesi, virüs vektörü olan böceklerle ve virüs hastalıklarının konukçusu olan yabancı otlarla mücadele yapılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Keleş Öztürk ve Baloğlu (2016b), Doğu Akdeniz bölgesinde Kypa biber üretiminde önemli virüs hastalıkları ile ilgili yaptıkları çalışmada, yağlık biber yetiştiriciliği yapılan üretim alanlarından toplanan biberlerde, virüs hastalıklarının belirlenmesi amacıyla DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemlerini kullanmışlar. Yaptıkları analizler sonucunda bölgede yağlık biber üretimini sınırlayan, önemli düzeyde verim ve kalite kayıplarına neden olan başlıca virüs hastalıkları olarak TEV, PVY, CMV, TSWV olduğunu belirtmişlerdir. Bu hastalıkların özellikle karışık enfeksiyonlarında, gelişim geriliği ve bodurluk, meyve ve yaprakta şekil ve renk bozukluğu gözlediklerini dolayısıyla da meyve miktarı ve hasat sayısının azalmış olduğunu bildirmişlerdir.

Keleş Öztürk (2017), Doğu Akdeniz Bölgesi’nde Adana, Mersin, Hatay, Kahramanmaraş ve Osmaniye illerinde 2014-2017 yılları arasında açık alanda

yetiştirilen biber çeşitlerinde virüs hastalıklarının saptanması ve ayrıca Karaisalı biber popülasyonunun en yaygın virüs hastalığına karşı reaksiyonu ile bazı dayanıklılık genlerinin belirlenmesi amacıyla geniş kapsamlı bir çalışma yürütmüştür. Yapılan survey çalışmalarında toplanan biber örneklerinin DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemlerini kullanarak; CMV, TEV, PVY, TSWV, PMMoV, TMV, ToMV, AMV, PVMV ve PepMoV ile bulaşık olduğunu belirlemiştir. Virüs belirtileri açısından şüpheli olarak toplanan örneklerde tekli ve karışık enfeksiyonları birlikte değerlendirmiş; Adana ilinde %30,1 ile PVY, Hatay ilinde %28,5 ile PVY ve CMV, Kahramanmaraş ilinde %43,1 ile CMV, Mersin ilinde %23,7 ile CMV ve Osmaniye ilinde %47,6 ile CMV yaygın olarak bulmuştur. Enfekteli olduğu saptanan örnekleri mekanik inokulasyon yöntemini de uygulamıştır. Ayrıca DAS-ELISA testinde CMV için pozitif sonuç veren 5 ilden seçtiği 10 örnekte yapılan RT-PCR çalışmalarında 513 bp'lik bant bulmuştur. Karaisalı biber popülasyonunun 3 saf hattında (K7, K25, K34) TEV hastalığının neden olduğu verim ve kalite kayıplarını belirlemiş, en yüksek ortalama kayıp oranlarının; toplam verimde K7 hattında (%77,5), salça randımanında K34 hattında (%33,6) olduğunu rapor etmiştir. Karaisalı biber popülasyonunun toplam 40 farklı saf hattında, TSWV, PVY ve PMMoV için dayanıklılık genlerinin varlığını Markör Destekli Seçim (Marker Assisted Selection-MAS) ile araştırmıştır. İncelemeye alınan hatların, TSWV ve PVY hastalığına karşı hassas olduğunu; PMMoV hastalığına 12 hattın dayanıklı, 28 hattın ise duyarlı olduğunu belirlemiştir.

Keleş Öztürk ve Baloğlu (2018a), Hatay ili biber üretim alanlarında virüslerin belirlenmesi ile ilgili yaptıkları çalışma kapsamında 2014-2015 yıllarında Hatay il sınırları içerisinde açıkta biber üretilen alanlarda survey çalışması yapmışlar ve bu alanlardan virüs belirtisi gösteren toplam 408 adet biber örneği toplamışlar. Toplanan biber örneklerinde virüslerin varlığı DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri kullanılarak belirlemişlerdir. Toplanan 408 adet örneğin 218 adetinin çeşitli virüslerle tekli ve karışık enfeksiyon şeklinde bulunduğunu ve toplanan örneklerin virüs etmenleri ile bulaşıklık oranının ortalama %53,4 olarak

belirlediklerini bildirmişlerdir. Belirlenen virüsler tekli enfeksiyon oranına göre değerlendirildiğinde yaygınlıkta ilk sırayı %28,5 oranı ile CMV ve PVY'nin aldığını bunu sırasıyla %24,5 ile TEV, %9,8 ile PVMV, %3,3 ile PepMoV, %2,7 ile PMMoV, %1,3 ile TSWV, %0,8 ile TMV, %0,4 ile ToMV izlediğini ve en düşük bulunma oranının ise %0,2 ile AMV olduğunu belirlemişlerdir. Söz konusu virüs enfeksiyonlarının hem verimi düşürmekte hem de kalite kayıplarına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Keleş Öztürk ve Baloğlu (2018b), Mersin ilinde açık alandaki biber yetiştiriciliğinde hastalıklara yol açan virüsleri araştırmışlar ve bu amaçla da 2014 ve 2015 yıllarında survey çalışmaları yapmışlar ve toplam 173 biber bitkisinden yaprak ve meyve örnekleri alınarak bunları DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile tespit etmişler. Mersin ilinden toplanan örneklerde tespit edilen virüsler tek tek değerlendirildiğinde, en yaygın virüsün %23,7 ile CMV olduğunu saptamışlardır ve bunu sırasıyla; TEV %21,7 PVMV %20, PVY %17,3, TSWV %9,3, PepMoV %4,3, PMMoV ve ToMV %1,3 oranında izlediğini belirtmişlerdir ve ayrıca test edilen örneklerde, TMV'nin %1 ile en düşük enfeksiyon oranına sahip olduğu bildirmişlerdir.

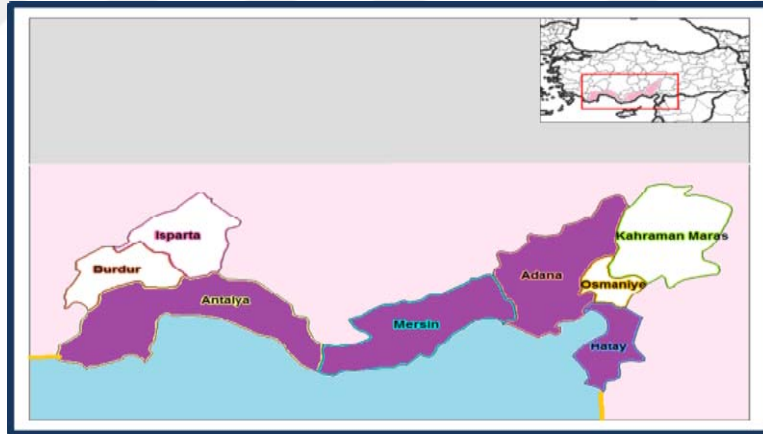


3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma Bölgesi ve Çalışmanın Konusunu Oluşturan Materyal

Yürütülen çalışmada, Akdeniz Bölgesi'nde yer alan Adana, Mersin, Hatay, Antalya il ve ilçelerindeki (Şekil 3.1.) örtü altı üretim alanlarında yetiştirilen biberlerden virüs ile bulaşık olduğundan şüphelenilen bitkilerden alınan sürgün, yaprak, meyve, tohum örnekleri çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Arazi çalışmalarında; Adana'nın Karataş ilçesi Tuzla beldesi, Mersin'nin Tarsus ilçesi ve Akdeniz ilçesi (Adanalıoğlu, Kazanlı, Karacailyas, Karaduvar mahalleleri), Hatay'ın Samandağ ilçesi ile Antalya'nın Kumluca ve Finike ilçelerinden plastik sera, alçak ve yüksek tünellerde biber yetiştirilen alanlardan 263 adet örtü altı biber bitkisi toplanmıştır. Örneklerin alındığı yer ve testlenen bitki sayıları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Survey Alanı Olarak Akdeniz Sahil Şeridi İlçeri

Arazi çalışmalarında CMV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen toplam 263 adet örtü altında yetiştirilen biber bitkisi toplanmıştır. Araştırmalar, Çukurova

Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarı ve mevcut klima odalarında yürütülmüştür.

Çizelge 3.1. Örneklerin Alındığı Yer ve Testemek İçin Alınan Örnek Bitki Sayısı

İl	İlçe/Belde/Mah.	Örnek Alınan Sera Sayısı	Toplanan Örnek Sayısı
ADANA	Karagöçer	2	13
	İnceyol	2	3
	Kum Höyüğü	2	4
	Ara Toplam	6	20
ANTALYA	Kumluca/Yeşilköy	2	4
	Kumluca/Yenicepınar	4	16
	Kumluca/Hacıveliler	1	2
	Kumluca/Hızırkaya	1	3
	Finike/Hasyurt	2	5
	Ara Toplam	10	30
HATAY	Samandağ	8	44
	Ara Toplam	8	44
MERSİN	Akdeniz/Adanalıoğlu	15	91
	Akdeniz/Kazanlı	6	31
	Akdeniz/Karacailyas	1	2
	Akdeniz/Karaduvar	2	4
	Tarsus	10	41
	Ara Toplam	34	169
GENEL TOPLAM		58	263

3.1.2. ELISA Testlerinde Kullanılan Materyal

Serolojik tanı amacıyla yapılmış olan ELISA testlerinde survey alanından toplanan virüs belirtisi gösteren 263 bitki örneği (Çizelge 3.1.) ve bu örneklerin

bazılarından ayrıca alınan meyve, tohum gibi dokularda olmak üzere (Temmuz 2017’de Mersin ili Tarsus ilçesinden toplanan örneklerden 11 adet meyve, 10 adet tohum örneği ve Akdeniz ilçesindeki Kazanlı mahallesinden de 8 adet meyve, 8 adet tohum olmak üzere 37 farklı meyve-tohum dokularından oluşan örnek eklenmiştir) toplam 300 örnek, ticari olarak temin edilen BIOREBA firmasının ELISA kitleri, EK 1’ de verilen farklı tampon çözeltiler, ELISA pleytileri (NUNC) ve test sonuçlarını değerlendirme amacıyla 405 nm filtreye sahip ölçümler için Medispec ESR 200 marka ELISA okuyucusu kullanılmıştır.

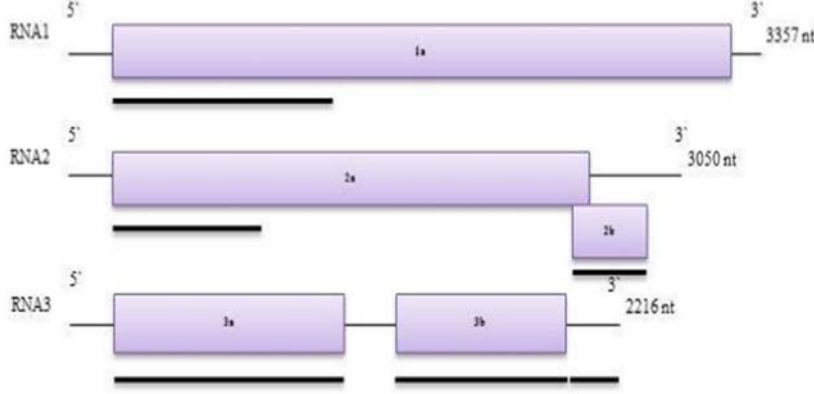
3.1.3. Total Nükleik Asit (TNA) Ekstraksiyonu Çalışmalarında Kullanılan Materyal

ELISA testleri sonucunda, değişik değerde absorbans değerleri ile CMV için pozitif kabul edilen infekteli olduğu saptanmış arazi örneklerinden elde edilen bitki öz suları, çalışma materyalini oluşturmuştur.

Total RNA ekstraksiyonu işleminde; steril havan ve havan eli veya ekstraksiyon poşetleri, tampon çözeltiler, ependorf tüpleri, ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları, masa tipi soğutmalı santrifüj (Universal 320R) kullanılmıştır.

3.1.4. RT-PCR Yönteminde Kullanılan Materyal

CMV için pozitif bulunan örneklerde virüs enfeksiyonunun teyidi ve moleküler karakterizasyonu amacıyla yapılmış olan PCR yönteminde; bulaşık bitkilerden elde edilen total nükleik asitler, Taq polimerase enzimi, RT enzimi dNTPs, RNase inhibitör, çeşitli tampon çözeltiler (Ek 2), saf su, steril pipet uçları ve pipet, PCR tüpü ve bu virüsün RNA 2 geni üzerinde (Şekil 3.2.) 650 bp’lik bölgeye spesifik (RW8) 5'-GGTTCGAA(AG)(AG)(AT)ATAACCGGG-3' (RV11) 5'-GTTTATTTA CAAGAGCGTACGG-3' primer çifti (Finetti Sialer ve ark, 1999) materyal olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.2. CMV'nin Genomik Yapısı (Nouri ve ark, 2014)

3.1.5. Agaroze Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Agaroz jel elektroforez çalışmalarında RT-PCR çalışmalarında elde edilen PCR ürünlerinin kontrol edilmesi sağlanmıştır. Agaroz jel elektroforez işleminde, agaroz (Sigma), tampon çözeltiler (EK 3), Mini Sub. DNA Cell Elektroforez cihazı (BIORAD) ve güç kaynağı, UV ışık kaynağı (UVP Ultraviolet Transilluminator) ve jel görüntüleme sisteminden yararlanılmıştır.

3.2. Yöntem

Yapılması planlanan bu çalışma iki aşamada yürütülmüştür. Çalışmanın birinci aşaması survey ve testleme, ikinci aşaması ise serolojik ve moleküler yöntemlerle karakterizasyon amaçlı faaliyetlerden oluşmuştur (Şekil 3.3).

Birinci aşama, survey amaçlı yapılmış, örtü altı biber bitkilerinde mevcut virüs hastalıklarının saptanarak CMV'nin durumunun incelenmesi amacıyla arazi çıkışları yapılmış, virüs ile infekteli olduğu düşünülen örtü altı biber bitkilerinden örnekler taraflı seçim olarak toplanmış, virüs belirtisi gösteren şüpheli örnek bulunmadığı durumlarda ise tesadüfi örnekler alınmıştır. Bu örnekler, DAS-ELISA ve/veya RT-PCR yöntemi ile testlenmiştir. Tesadüfi örnek alma durumunda her bir

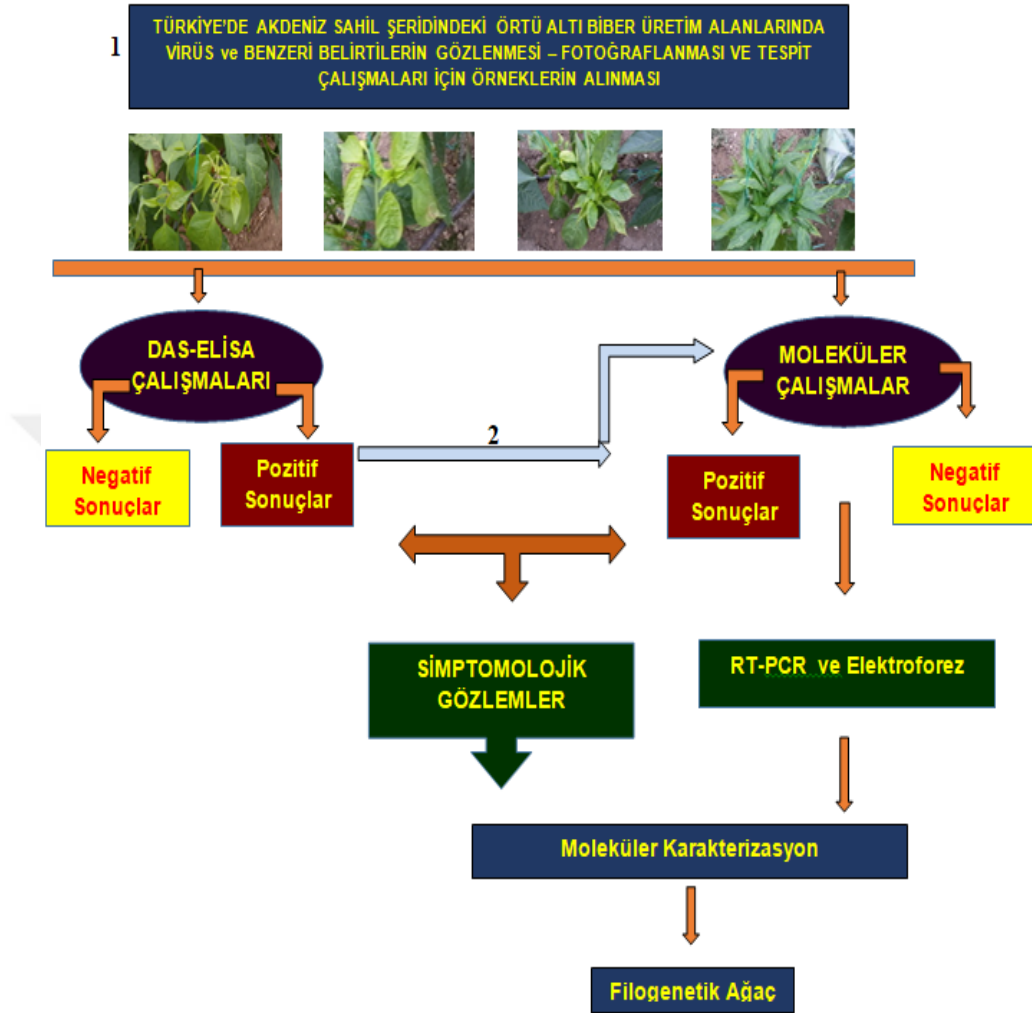
dekar için minimum 5 örnek toplanmıştır. Tüm çalışma boyunca seçilmiş toplam 263 örnek alınmıştır.

İkinci aşamada ise, toplanan örnekler, CMV'nin saptanması amacıyla, öncelikle DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiş ve CMV ile bulaşık olduğu saptanan örneklerde RT-PCR işlemleri yürütülerek virüsün moleküler yöntemlerle tanılanması ve karakterizasyonu yapılmış, CMV olduğu saptanan izolatlardan dizi analizi ile akrabalık ilişkileri araştırılmıştır.

3.2.1. Örneklerin Toplanması ve Muhafazası

2016-2018 yılları arasında biber üretim sezonlarında yapılan arazi çalışmalarında, virüsler tarafından meydana getirilen semptomlardan bir veya birkaçını gösteren bitkilerden yaprak ve sürgün, eğer varsa meyve-tohum örnekleri alınmıştır. Alınan örnekler naylon torbalara konulup, bilgi etiketleri yazılıp numaralandırılmış, fotoğrafları çekilerek etiketlendikten sonra, buz kutularında laboratuvara getirilmiş ve bu bitki dokuları kullanılıncaya kadar 7-10 gün gibi kısa bir süre için +4 °C' de, daha uzun bir süre için ise -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

Viral hastalık belirtilerine benzer belirtiler gösteren biber bitkileri şüpheli örnek olarak alınmıştır. Söz konusu virüs şüpheli olarak alınan bitkilerde gözlenen belirtiler Şekil 3.4.'te verilmiştir. Örnekleme yapılırken, Green ve Kim (1991) ve Keleş Öztürk (2017)'ün bildirdiği şekilde yapraklarda beneklenmeler, mozayik semptomları, damarlarda sarı renk açılmaları, yaprak deformasyonları, halkalı lekeler, meyve deformasyonları, yapraklarda meşe yaprağı oluşumu gibi semptomları gösteren bitkiler seçilmiş ve örnek olarak alınıp çalışmada kullanılmıştır.



Şekil 3.3. Çalışmanın Aşamalarını Gösteren Diyagram

3.2.2. DAS-ELISA Testleri

Araziden toplanan tüm bitki yaprak örnekleri ve bazı örneklerden ayrıca alınan meyve, tohum doku örnekleri Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked- Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) testi Clark ve Adams, (1977) ve ELISA kitlerinin temin edildiği firmanın (BIOREBA AG) bildirdiği şema dikkate alınarak CMV'yi belirlemek amacıyla yapılmıştır. Çalışmaların başlangıcında ön survey amacıyla toplanan örnekler (Şekil 3.4) için CMV dışında diğer bazı virüslerin (TSWV, TEV, TMV, PVY, PVX, AMV, PepMOV, PMMoV, ChiVMV, PVMV, ToMV ve TYLCV) belirlenmesi ve CMV'nin durumun izlenmesi amacıyla da yine aynı firmadan temin edilen kitler kullanılarak ELISA testi yapılmıştır.

Yapılan ELISA testlerinde, her bir pleytte birer çift olmak üzere pozitif, negatif ve tampon çözelti şeklinde üç kontrol kullanılmış, pozitif kontrol için örnek firmadan temin edilmiş, testlerde tüm toplanan örnekler için ikişer çukurun yan yana veya alt alta kullanılmasına özen gösterilmiştir.

ELISA testlerinin sonuçlarının değerlendirmesi öncelikle görsel yapılmış ve spektrofotometrik değerlendirilmesinde, pozitif örneğin ve tampon çözeltinin absorbans değerinin kontrolü ile negatif kontrolün bulunduğu çukurlardan elde edilen absorbans değerlerinin (OD_{405}) ortalamasının en az iki katı değeri veren örnekler bulaşık kabul edilmiştir.

ELISA testinin uygulanmasında izlenmiş basamaklar aşağıda sıralanmıştır:

- a. Kaplama tamponu ile kullanılacak optimum konsantrasyonda sulandırılmış γ -globulinden Microtiter ELISA plate'nin her bir çukuruna 200 μ l konulmuş ve pleyt üzeri kapatılarak 37 °C de 2-3 saat inkübe edilmiştir.
- b. İnkübasyondan sonra yıkama tamponu ile tüm çukurlar üç kez yıkanmış ve yıkama işleminde tampon çözelti üç dakika süreyle çukurlarda bekletilmiştir. Daha sonra ters çevrilerek pleyt boşaltılmıştır. Bu işlem üç kere tekrar edilmiştir.

- c. Her bir çift çukura 200 µl, örnek tamponu ile hazırlanmış örnekler düzenlenmiş plana göre konulmuş ve pleytin üzeri kapatılıp 4 °C de bir gece boyunca inkübe edilmiştir.
- d. İnkübasyondan sonra pleytler yıkama tamponu ile yukarıda belirtildiği şekilde tekrar yıkanmıştır.
- e. Konjugate tamponu ile optimum konsantrasyona göre sulandırılmış olan Enzim- Konjugate (enzimle işaretli Ig G) her bir çukura 200 µl konulmuş ve pleyt 37 °C de 2-3 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- f. İnkübasyondan sonra pleytler yıkama tamponu tekrar üç defa yıkanmıştır.
- g. Substrat tamponu içerisinde 1mg/ml olacak şekilde taze hazırlanacak substrattan (p-nitrophenylphosphate) her bir çukura 200 µl konulmuş ve pleytler, 30-60 dak. veya gerekli görüldüğünde daha uzun süre oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir.
- h. İnkübasyon süresi sonunda, gerekli olduğu durumlarda reaksiyonu durdurmak için her bir çukura 20-50 µl 3 M NaOH ilave edilmiştir.
- i. Ölçümler Medipeç ESR 200 ELISA okuyucusu ile 405 nm dalga boyunda yapılmıştır.





Şekil 3.4. Survey çalışmasında örtü altı biber bitkisinin yaprak ve meyvelerinde bulunan açık ve koyu yeşil mozaik, klorotik lezyonlar, damar açılması gibi virüs belirtileri (ELISA Testinde Pozitif Çıkan CMV Simptomları)

3.2.3. Total Nükleik Asit (Total NA) Ekstraksiyonu Çalışmaları

Total NA ekstraksiyonu çalışmasında surveyler ve serolojik testler sonucunda virüsle bulaşık olduğu saptanan biber bitkisi (yaprak) dokularından elde edilmiş olan bitki özsuğu kullanılmıştır. Total NA izolasyonu Astruc ve ark. (1996)'nın önerdiği yöntemine göre yapılmıştır.

Total NA izolasyon yönteminde izlenen aşamalar sırasıyla:

- a. Örnekler ekstraksiyon bufferı (100mM Tris-HCl pH.8.0, 50mM EDTA pH. 7.0, 500 NaCl, 10mM 2. mercapto-ethanol 1/1000) ile 1:2 (w/v) oranında sulandırılarak porselen hava içerisinde havaneli yardımı ile ezilmiş ve bitki özsuğu steril tülbentten süzölmüştür. Bitki özsuğundan 1ml alınarak eppendorf tüpleri içerisine yerleştirilmiştir.
- b. Örnekler 3 dakika 4.000 rpm de santrifüj edilmiştir.

- c. Pelete 50 µl Sodium Dodecylsulfat (%20) ilave edilerek vortekste karıştırılmış ve sonra tüpler 65 °C de 30 dakika su banyosunda bekletilmiştir.
- d. Tüplere 250 µl potasium asetate (5M) ilave edilerek 20 dakika buz içerisinde bekletilmiştir.
- e. Tüpler 15 dakika 13.000 rpm de santrifüj edilmiştir.
- f. Süpernatant ikiye bölünmüş ve 500 µl'si yeni hazırlanmış eppendorf tüplerine konarak -70 °C te saklanmıştır. Geriye kalan 500 µl süpernatant yeni hazırlanan eppendorf tüplerine konulup, üzerine %100'lük ethanolden 500 µl ilave edilerek 1ml'ye tamamlanmış ve tüpler vortekste karıştırılmıştır.
- g. Sonra tüplere 50µl sodium asetate (3M) ilave edilmiş ve örnekler tekrar karıştırılarak -70 °C de bir gece bekletilmiştir.
- h. Örnekler 15 dakika 14.000 rpm de santrifüj edilerek süpernatant ortamdan uzaklaştırılmış ve eppendorf tüpleri ters çevrilerek filtre kağıdı üzerinde 5 dakika kurutulmuş daha sonra pellet üzerine 1ml ethanol (% 70) ilave edilmiştir.
- i. Örnekler Total NA'ların çökmesi için 5 dakika 13.000 rpm de santrifüj edilerek tüp içerisindeki ethanol atılarak eppendorf tüpleri kurutma kağıtları ile dikkatlice kurulanmıştır.
- j. Elde edilen total NA'lar 50 µl RNase free distile su ile sulandırılmıştır. Örnekler 15µl ve 35 µl olmak üzere ikiye bölünerek eppendorf tüpleri içerisinde -70 °C de muhafaza edilmiştir.

3.2.4. RT-PCR Çalışmaları

Moleküler yöntemlerle saptanması ve tanınması amacıyla RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla da, serolojik veya simptomolojik olarak CMV ile bulaşık olduğu saptanan örneklerinden elde edilen total NA'lar kullanılmıştır.

RT-PCR yöntemi değişik araştırmacıların bildirdikleri yöntemlere göre Sidek ve ark. (1999) ve Prieto ve ark. (2001)'na göre yürütülmüştür.

İki aşamalı olarak yürütülmüş olan RT-PCR yönteminde birinci aşamada; RT (Reverse transcription) işlemi ile cDNA' lar elde edilmiş, ikinci aşamada ise; bu cDNA' lar kullanılarak PCR işlemi yapılmıştır.

RT aşamasında; Öncelikle 200µl lik PCR eppendorf tüpüne 2µl total NA, 1 µl reverse primer (10 pmol) ve 12µl ddH₂O konularak thermalcycler aletinde 95 °C de 3 dakika bekletilerek nükleik asitlerin denatüre olması ve düz bir iplik haline gelmesi sağlanmıştır. Tüpler thermalcycler'dan alınıp hemen buz içerisine yerleştirilerek tüp içerisindeki reverse primerin viral RNA üzerindeki hedef bölgeye yapışması sağlanmıştır. Daha sonra tüp içerisine 10 µl reverse transcriptase karışımı (1µl dNTP, 0,1 µl AMV enzimi, 5 µl RT-buffer, 0,3 µl RNase inhibitörü, 3,6 µl ddH₂O) ilave edilerek son hacim 25 µl ye tamamlanmış ve örnekler 42 °C de 1 saat inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

PCR aşamasında; 1. aşamada yapılan işlemlerden elde edilen cDNA'lardan her bir PCR tüpüne 2 µl cDNA konularak üzerine 1 µl dNTPs (10mM), 5 µl Dream Taq Green Buffer (10X), 1µl Primer forward (10pmol), 1µl primer reverse (pmol), 0,25 Dream Taq (5u/µl) ve 39,75 ddH₂O ilave edilip karıştırılarak 50 µl' lik son hacme tamamlanmış PCR tüpleri daha önceden programlanmış olan thermalcycler aletine yerleştirilmiştir. Örneklerle uygulanan thermalcycler programında 35 döngü içerisinde bulunan bağlanma sıcaklığı (annealing temperature) 64 °C sentezlenecek olan primerin tm (melting temperature)'si dikkate alınarak hesaplanmış, saptamada ve karakterizasyonda kullanılan primerlere göre değiştirilmiştir.

95 °C 3 dk	1 döngü	<u>bağlı</u>
93 °C 1 dk		
64 °C) 1 dk	35 döngü	
72 °C 1 dk.....		<u>bağlı</u>
72 °C 10 dk	1 döngü	

olarak ayarlanmış daha sonra tüpler thermalcyclers'a yerleştirilip PCR aşaması tamamlanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri, hazırlanmış olan agaroz jel elektroforez işlemi ile kontrol edilmiş ve gözlenen bantların fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.5. Agarose Gel Elektroforez Çalışmaları

Agarose Gel Elektroforez çalışmalarında total NA analizleri sonucunda elde edilen virüse ait total NA ve RT-PCR çalışması sonucunda, viral NA'den sentezlenip çoğaltılan DNA'lar kontrol edilmiştir.

Agarose Jel Elektroforez çalışması Galitelli ve Minafra, (1994)'e göre yapılmıştır. İşlemler sırasıyla:

- Agarose 400 mg olacak şekilde 20 ml 1xTAE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acide, 2 mM EDTA) içerisine konulmuştur.
- Bu agarose-TBE buffer karışımı kaynayınca ve agarose eriyinceye kadar magnetik karıştırıcı üzerinde içerisinde ısıtıldıktan sonra volum 20 ml'ye ayarlanmıştır (%2'lik Agaroz jel).
- Karışım tekrar 60 °C ye kadar soğumaya bırakılmış ve tarak geçirilmiş olan tank içerisine boşaltılmıştır.
- Jel donduktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çekilip jel'in üzerini 1-2 mm kadar kaplayınca kadar tank içerisine TBE ya da TAE buffer ilave edilmiştir.

- e. 10 µl örnek jeldeki çukurlara dikkatli bir şekilde yerleştirilmiştir. İlk çukura 8 µl 1 kb DNA Ladder (marker) konulmuştur. Loading buffer daki turuncu renk (orange G) jel' in sonuna gelene kadar jel tankına elektrik akımı verilmiştir.
- f. Elektroforez (Runnin) işlemi tamamlandıktan sonra jel, oda sıcaklığında 10 dakika 100 ml H₂O +30 µl (10mg/ml distilate su) ethidium bromide karışımı içerisinde boyanmıştır. Jeldeki fazla ethidium bromide uzaklaştırıncaya kadar 10 dakika çeşme suyu içerisinde tutulmuştur. Sonuçlar UV transilluminatör de kontrol edilmiştir.

3.2.6. Dizi Analizi (Sekans Analizi) ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları

Serolojik ve moleküler çalışmalar sonucunda CMV ile infekteli olarak saptanan bitkilerden DAS-ELISA'da yüksek absorbans değeri verip, RT-PCR'da net bir bant oluşturan, 8 farklı pozitif örnek kodlanarak dizi belirleme ve analiz çalışmalarında izolat olarak kullanılmıştır (Çizelge 4.4.).

DNA dizi belirleme çalışmalarında serolojik ve moleküler olarak tanısı yapılan virüslere ait PCR ürünleri diziliminin belirlenmesinde Refgen Biyoteknoloji (bilgi@refgen.com) firmasından özel hizmet alınarak yaptırılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda izolatların çoğaltılan kısımları NCBI'da (The National Center for Biotechnology Information) BLAST (Basic National Center for Biotechnology Information) ile dünyada saptanmış olan diğer izolatlarla karşılaştırılarak benzerlikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.5.). Firmanın gerçekleştirmiş olduğu dizi analizi işleminin sonuçları MEGA6 programı kullanılarak örnekler arasındaki akrabalık seviyesinin ülkemiz dışında dünyadaki diğer izolatlar ile ilişkilerinin ortaya konulması amacıyla soy ağaçları (filogenetik ağaçlar) oluşturulmuştur (Şekil 4.18.). Filogenetik analiz Neighbor-joining metodu kullanılarak yapılmıştır (Saitou ve Nei, 1987). Bootstrap testi (1000 replikasyon) kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçların replike yüzdeleri dalların yanında

belirtilmiştir (Felsenstein, 1985). Evrimsel uzaklıkları baz alınarak oluşturulan filogenetik ağaçta, aynı birimlerdeki dal uzunlukları ayarlanarak çizilmiştir. Kimura 2-parametre metodu ile oluşturulan evrimsel uzaklıklar, birimlerin gen bölgelerindeki baz değişimlerin sayısı ile hesaplanmıştır (Kimura, 1980). Filogenetik evrimsel analizleri MEGA6 programı ile yapılmıştır (Tamura ve ark, 2013).





4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Simptomolojik Çalışmalar, CMV ile Bulaşık Bitkilerin Saptanması

CMV izolatlarının toplanması, tanılanması ve karakterizasyonu amacıyla 2016-2018 yılları arasında örtü altı biber üretim dönemlerinde yapılan arazi çalışmalarında, virüslerin neden olduğu belirtilerden bir veya birkaçını gösteren bitkilerden yaprak, sürgün ve bazılarında da tohum ve meyve örnekleri alınmıştır. Ayrıca herhangi bir virüsle bulaşık olabileceğinden şüphelenilen örnekler de alınmıştır. CMV ile bulaşık olduğu düşünülüp örnek alınan bitkilerde Şekil 3.4.'te gösterilen tipte belirti veren biber bitkileri seçilmiştir. Bu amaçla örtü altı biber yetiştirilen alanlardan virüs hastalık belirtileri veya benzer belirtileri gösteren toplam 263 biber bitkisi örneği toplanmıştır.

Arazi çalışmalarında; Adana'nın Karataş ilçesindeki Tuzla beldesi, Mersin'nin Tarsus ilçesi ve Akdeniz ilçesi (Adanaoğlu, Kazanlı, Karacailıas ve Karaduvar mahallelerinden), Hatay'ın Samandağ ilçesi ile Antalya'nın Kumluca ve Finike ilçelerinden plastik sera, alçak ve yüksek tünellerde biber yetiştirilen alanlardan örnekler alınmıştır.

Simptomatolojik gözlemler ile DAS-ELISA ve RT-PCR testi sonucuna göre CMV ile enfekteli olduğu saptanan örneklerde; üretim alanlarına yapılan sürveyler sırasında bitkilerin sergilediği uç yapraklarda kloroz, nekrozlar, uç sürgün deformasyonları, uç yapraklarda darlama, yapraklarda renk değişikliği, yaprak damarlarında kloroz, yapraklarda mozayik, yaprak deformasyonları, yapraklarda nekroz ve klorozlar, yaprak damarlarında nekroz, gövde nekrozları, bodurluk, çalılışma, yapraklarda meşe yaprağı oluşumu gibi belirtiler görülmüş ve bunların fotoğrafları da alınmıştır. Belirtiler topluca değerlendirildiğinde daha önce yapılan çalışmalarda birçok araştırmacı tarafından rapor edilen belirtilerle benzer olduğu belirlenmiştir (Green ve Kim, 1991; Kılıç ve ark, 2015; Gümüş, 1998; Özasan ve ark, 2006; Soleimani, 2014; Oawale ve ark, 2015).

DAS-ELISA ve RT-PCR testi sonucunda CMV ile enfekteli olduğu belirlenmiş örnekler Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10., Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13., Şekil 4.14., Şekil 4.15., Şekil 4.16.'da verilmiştir.



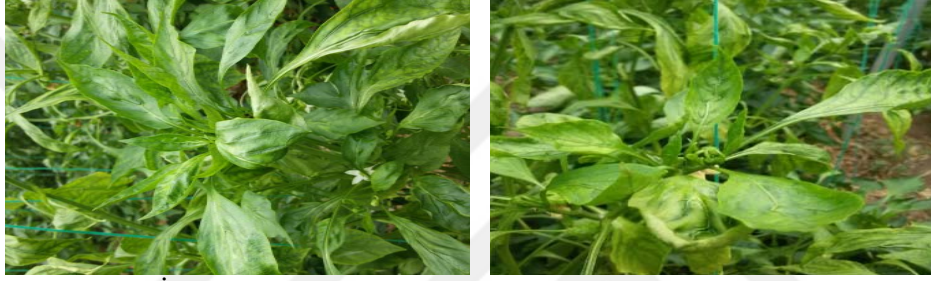
Şekil 4.1 M44 İzolatı-Doğanay-Dolma Biber (Mersin/Karaduvar-CMV Enfeksiyonu) Uç Yapraklarda Daralma ve Uç Sürgün Deformasyonları



Şekil 4.2 M45 İzolatı-Filinta-Kıl Biber (Mersin/Karaduvar-CMV Enfeksiyonu) Yaprak Deformasyonları, Yapraklarda Mozayik ve Yapraklarda Meşe Yaprığı Belirtisi



Şekil 4.3 M35 İzolatı-Filinta-Dolma Biber (Mersin/Karaduvar-CMV Enfeksiyonu)
Yaprak Deformasyonları ve Kloroz



Şekil 4.4 M36 İzolatı-Filinta-Dolma Biber (Mersin/Karaduvar-CMV Enfeksiyonu)
Yaprak Deformasyonları ve Yaprak Damarlarında Kloroz



Şekil 4.5 T23 İzolatı-Pailin-Sivri Biber (Mersin/Tarsus-CMV Enfeksiyonu) Uç
Yapraklarda Nekroz, Kloroz, Uç Yapraklarda Daralma ve Gövde
Nekrozları



Şekil 4.6 T22 İzolatı-Pailin-Sivri Biber (Mersin/Tarsus-CMV Enfeksiyonu)
Bodurluk ve Uç Yapraklarda Kloroz



Şekil 47. K6 İzolatı-Filinta-Sivri Biber (Mersin/Kazanlı-CMV Enfeksiyonu)
Uç Yapraklarda Kloroz ve Uç Yapraklarda Nekroz



Şekil 4.8. T8 İzolatı-Mert-Sivri Biber (Mersin/Tarsus-CMV Enfeksiyonu)
Uç Yapraklarda Daralma ve Kloroz



Şekil 4.9. K15 İzolatı-Ejder-Sivri Biber (Mersin/Kazanlı-CMV Enfeksiyonu)
Boğum Aralarının Kısalması ve Bodurluk



Şekil 4.10 K2 İzolatı-Filinta-İnce Sivri Biber (Mersin/Kazanlı-CMV Enfeksiyonu) Uç Yapraklarda Kloroz ve Yapraklarda Renk Değişikliği



Şekil 4.11 T11 İzolatı-Mert-Sivri Biber (Mersin/Tarsus-CMV Enfeksiyonu) Yapraklarda Nekroz ve Yaprak Damar Aralarında Bombeleşme



Şekil 4.12 K5 İzolatı-Filinta-Sivri Biber (Mersin/Kazanlı-CMV Enfeksiyonu) Uç Yapraklarda Kloroz ve Yapraklarda Nekroz



Şekil 4.13. A7 İzolatı-Diyar-Kapya (Antalya/Kumluca-CMV Enfeksiyonu) Yaprak Deformasyonları ve Kloroz



Şekil 4.14. A9 İzolatı-Diyar F1-Kapya (Antalya/Kumluca-CMV Enfeksiyonu) Yaprak Deformasyonları, Yapraklarda Mozaik, Yaprak Damarlarında Kloroz ve Yapraklarda Meşe Yapağı Belirtisi



Şekil 4.15. A15 İzolatı-Nirvin-Kırmızı Kaliforniya (Antalya/Kumluca-CMV Enfeksiyonu) Yapraklarda Renk Değişikliği ve Yaprak Deformasyonları



Şekil 4.16. A17 İzolatı-Sarı Kaliforniya-Dolma Biber (Antalya/Kumluca-CMV Enfeksiyonu) Yapraklarda Mozaik ve Yaprak Damarlarında Kloroz

Benzer şekilde daha önce yapılan çalışmalarda Green ve Kim (1991), Kılıç ve ark (2015), CMV' nin biberlerde yapraklarda beneklenmeler, mozaik belirtileri, damarlarda sarı renk açılmaları, yaprak deformasyonları, halkalı

lekeler, meyve deformasyonları, yapraklarda meşe yaprağı oluşumu gibi semptomlara sebep olduğunu bildirmişlerdir (Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.14., Şekil 4.16.) (Çizelge 4.3.).

Gümüş (1998), İzmir ilinin önemli biber üretim alanlarında görölen virüs hastalıklarının yaygınlık oranları ve yaygın olarak yetiştirilen biber çeşitlerinin bu virüslere karşı olan reaksiyonları ile ilgili 1995-1998 yılları arasında yaptığı çalışmada; yapraklarda mozaik, yaprak deformasyonu, sarı band şeklinde lekeler, kıvrıcıklaşma, gövdede nekrozlar, bitkilerde bodurlaşma, meyvelerde yanıklık ve deformasyonlar gibi belirtiler gözlemlediğini bildirmiőtir. Yürütölen bu çalışmada da serolojik ve moleköler çalışmalar sonucunda CMV ile enfekteli olarak belirlenen bitki örneklerinde yine benzer belirtiler saptanmıştır (Şekilde 4.2., Şekil 4.5., Şekil 4.9., Şekil 4.15.) (Çizelge 4.3.).

Çalışmada elde edilen belirtilere benzer olarak Özaslan ve ark (2006), Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde biberde virüs hastalıklarını saptamak ve zararlarını önlemek amacıyla, Gaziantep ilinin Nurdağı ve İslahiye ilçelerinde yaptıkları survey çalışmasında da biber üretim alanlarında mozaik, kıvrılma, damar açılması, klorotik ve nekrotik lekeler ile meyve ve yaprak deformasyonları gibi belirtiler gözlediklerini bildirmişler ve yürütölen bu tez çalışmasında da yine benzer semptomlar görölmüőtür (Şekil 4.2, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12., Şekil 4.13.) (Çizelge 4.3.).

Yine Soleimani (2014), İran'da biberlerdeki virüs hastalıklarının belirlenmesi amacıyla 2012-2013 yılları arasında yaptığı çalışmada 23 bölgeden topladığı yaklaşık 500 biber örneğinden yapraklarda mozaik, beneklenme, kıvrılma, koyu yeşil damar açılması, bodurluk gibi araőtırmacının gözlemlemiő olduğu belirtilerin, yapılan bu çalışmada belirlenen semptomlarla benzer olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.6., Şekil 4.16.) (Çizelge 4.3.).

Olawale ve ark (2015), Nijerya'da biberlerde virüslerin varlığını ve yaygınlığını belirlemek amacıyla 2010-2011 yıllarında yürüttükleri çalışmada şüpheli görölen yaprak örneklerinde yapraklarda mozaik, leke, kıvrılma, yaprak

boyutunda azalma, damar sararması, yaprak ve meyve deformasyonları, bodurlaşma gibi belirtilere rastladıklarını bildirmişler ve bu durum yapılan çalışmada saptanan Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.6., Şekil 4.9.'daki belirtiler ile benzerlik göstermektedir.

Yapılan bu çalışmada sonuç olarak; Akdeniz bölgesini kapsayan Adana, Mersin, Hatay ve Antalya illerindeki örtü altı biber yetiştiriciliğinde viral hastalık etmenleri açısından saptanan semptomolojik bulgulara, gerek ülkemizde gerekse yabancı ülkelerde yapılan araştırma sonuçlarından farklı bir durum gözlenmemiş, CMV için karakteristik belirtiler gösteren örneklerin gerçekten enfekteli olduğu hem DAS-ELISA hem de bazıları RT-PCR testleri ile de teyit edilmiştir.

4.2. DAS-ELISA Çalışmaları

Survey çalışmalarında CMV belirtisi gösteren örtü altı biber bitkisi örnekleri ile CMV belirtisi görülmemesi durumunda tesadüfi olarak seçilen toplam 263 bitki örneği alınmıştır (Çizelge 3.1.). Örneklerin çoğu yapraktan alınmış ve ayrıca aynı örneklerin bazılarında yaprak dışı olarak meyve, tohum gibi farklı 37 örnek (Temmuz 2017'de Mersin ili Tarsus ilçesinden toplanan örneklerden 11 adet meyve, 10 adet tohum örneği ve Akdeniz ilçesindeki Kazanlı mahallesinden de 8 adet meyve, 8 adet tohum örneği) olmak üzere toplam 300 örnek tanı yapmak ve virüsün varlığını ortaya koymak amacıyla, Clark ve Adams, (1977) tarafından bildirilen genel yöntem ve kitin temin edildiği firmanın (Bioreba Ag) önerileri doğrultusunda Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked-Immunesorbent Assay (DAS- ELISA) testine tabi tutulmuştur. Ayrıca, çalışmaların başlangıcında ön survey amacıyla muhtelif yerlerden toplanan örnekler için CMV dışında diğer bazı virüslerin (TSWV, TEV, TMV, PVY, PVX, AMV, PepMoV, PMMoV, ChiVMV, PVMV, ToMV ve TYLCV) belirlenmesi ve CMV'nin durumun izlenmesi amacıyla da yine aynı firmadan temin edilen kitler kullanılarak DAS-ELISA testi yapılmıştır. Ayrıca; yaprak dokusu dışındaki örneklerden hiçbirinde ELISA testinde CMV için pozitif sonuç elde edilememiş, dolayısıyla yaprak dışı örnekler

diğer testlerde de kullanılmamıştır. Yapılan çalışma sonucunda testlenen toplam 300 örnekten sadece yaprak dokusu olan 62 adet örnekte negatif kontrolün iki katının üzerinde absorbans değeri ile CMV enfeksiyonu saptanırken daha düşük absorbans değerine sahip olan negatif kontrolün absorbans değerinin yaklaşık iki katına yakın değeri ile 23 örnek de enfekteli olarak dikkate alınmıştır (Çizelge 4.1.) (Çizelge 4.2.). Sonuç olarak; CMV için pozitif bulunan 85 örnekten bir kısmı RT-PCR testlemelerinde doğrulaması yapılmak üzere kullanılmıştır.

Benzer olarak Çekya’da 2006-2010 yılları arasında biber bitkilerindeki virüsleri belirlemek için yürütölen survey çalışmasında Svoboda ve Svobodova-Leisova (2012)’nın virüs belirtileri gösteren açık alan ve örtü altı alanlardan topladıkları 375 örneğin yaprak dokuları DAS-ELISA ile testlemiş ve söz konusu örneklerde en çok görölen virüsün CMV olduğunu belirlemişlerdir.

Çizelge 4.1. Arazi Çıkışı Yapılan Alanlar ve ELISA Testi Sonucu CMV İle Enfekteli Olan Örtü Altı Biber Bitkileri

İl	İlçe/Belde/Mah.	ELISA TESTLERİNDE ÖRNEK SAYILARI			
		Testlenen	Pozitif	Düşük abs. verenler	Diğer Virüsler
ADANA	Karagöçer	13	-	-	11
	İnceyol	3	-	-	3
	Kum Höyüğü	4	-	-	2
	Toplam	20	-	-	16
ANTALYA	Kumluca/Yeşilköy	4	1	3	-
	Kumluca/Yenicepınar	16	9	-	-
	Kumluca/Hacıveliler	2	-	-	-
	Kumluca/Hızırkaya	3	-	3	-
	Finike/Hasyurt	5	3	1	-
	Toplam	30	13	7	-
HATAY	Samandağ	44	14	1	4
	Toplam	44	14	1	4
MERSİN	Akdeniz/Adanalıoğlu	91	17	7	-
	Akdeniz/Kazanlı	47	7	3	-
	Akdeniz/Karacailyas	2	1	-	-
	Akdeniz/Karaduvar	4	4	-	-
	Tarsus	62	6	5	-
	Toplam	206	35	15	-
GENEL TOPLAM		300	62	23	20

Arazi çalışmalarında plastik sera, alçak ve yüksek tünellerde biber yetiştirilen alanlardan alınan örneklerden;

Adana'nın Karataş ilçesi Tuzla beldesinden testlenen 20 örnekte CMV ile enfekteli örnek bulunamazken; örneklerin 12 tanesinde TSWV (Karagöçer, İnceyol ve Kum Höyüğü mah.) saptanmış bunlardan 3 tanesi TSWV+TEV (Karagöçer mah. ve İnceyol mah.) ve 1 tanesi TSWV+PVY (Karagöçer mah.) şeklinde karışık enfeksiyon olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1. ve 4.2.).

Rodriguez-Alvarado ve ark (2002), Güney Meksika'nın en önemli biber üretim alanlarında, 2 yıl boyunca Şili biberlerinde şiddetli hastalığa neden olan virüsleri tespit etmek için yaptıkları bir çalışmada ELISA yöntemini kullanarak PepMoV ve CMV için testlemişler ve bunların diğer virüslere göre daha yüksek oranda yaygın olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca her iki virüsün tekli veya ikili enfeksiyonlar şeklinde bulunduğunu rapor etmişlerdir. Buna karşılık, yürütülen bu tez çalışmasında CMV tekli enfeksiyon olarak özellikle yaprak örneklerinde saptanmıştır. Ayrıca; Adana ve civarından şüpheli olarak alınan özellikle de Şili biber çeşidi örneklerinde CMV saptanamamıştır. Diğer bazı virüslerin varlığı (toplanan örneklerden 12 adet TSWV ve 3 adet TSWV+TEV ve 1 adet TSWV+PVY ile bulaşık örnek) ortaya konmuştur.

Benzer şekilde; Keleş Öztürk (2017) Adana bölgesinde açık alanda yetiştirilen biberlerde zararlı virüsleri belirleme çalışmaları sonucunda en yaygın virüsün %30,1 enfeksiyon oranı ile PVY olduğunu ve bunu sırasıyla %25,5 ile CMV, %26,8 ile TEV'in ve diğerlerinin takip ettiğini ve değişen oran ve kombinasyonlarda da karışık enfeksiyonların saptandığını rapor etmiş dolayısı ile bu durum yürütülen bu çalışmada; Adana'daki CMV bulguları için paralellik gösterdiği söylenebilir.

Antalya ilinden testlenen 30 örnekten 13 tanesi yüksek absorbens değeri ile CMV pozitif ve 7 tanesi de negatif örneğin iki katına yakın absorbens değeri ile CMV için RT-PCR'da test edilmiştir. Kumluca ilçesinden 10 örnek CMV ile pozitif ve 6 örnek CMV ile düşük absorbens değeri ile enfekteli saptanırken Finike

ilçesinden alınan 3 örneğin CMV için pozitif ve 1 örneğinde yine düşük absornans değeri ile CMV şüpheli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1 ve 4.2).

Güneş ve Gümüş (2016), Antalya ilinde örtü altı ve açık alanda dayanıklı biber çeşitlerinde CMV ve TSWV etmenlerinin yaygınlığını belirlemek amacıyla yürüttükleri çalışmalarında toplam 148 adet biber örneğini DAS-ELISA ile testlemişler ve bu örneklerin 11 tanesinde (%7,34) CMV ve 53 tanesinde (%35,81) TSWV saptadıklarını bildirmişlerdir. Yürütülen bu tez çalışmasında; örtü altı yetiştiriciliğinde Antalya ilindeki lokasyonlardan seçilen örneklerin (30/13) % 43 'ü CMV pozitif saptanmış, ayrıca virüs belirtisi gösteren testlenmek üzere alınan biber bitkilerinin diğer virüsler ile de enfekteli olabileceği muhtemel olup bu çalışmada değerlendirmeye alınmamıştır.

Hatay'ın Samandağ ilçesinden ise testlenen 44 örneğin 15 tanesi (14 pozitif ve 1 adet düşük absorbans değeri ile CMV şüpheli örnek) değişen absorbans değerleri ile CMV pozitif belirlenirken; testlenen örneklerin arasında 2 örnek TSWV ve 2 örnek te TEV ile bulaşık olarak saptanmıştır (Çizelge 4.1 ve 4.2).

En fazla örneğin alındığı Mersin ilinden ise; testlenen 206 yaprak örneğinden 35 adet CMV ile enfekteli ve 15 tanesi de düşük absorbans değeri vermiştir. Tarsus ilçesinden 6 adet CMV pozitif, 5 örnek CMV ile şüpheli; Akdeniz ilçesinden ise Adanalıoğlu mahallesinden 17 adet CMV pozitif ve 7 adet CMV şüpheli; Kazanlı mahallesinden de 7 adet CMV ile pozitif ve 3 adet CMV şüpheli, Karacailyas mahallesinden 1 ve Karaduvar mahallesinden de 4 örneğin CMV ile enfekteli olduğu görülmüştür (Çizelge 4.1. ve 4.2.).

Keleş Öztürk (2017), Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yaptığı survey çalışmalarında toplanan biber örneklerinin DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemlerini kullanarak; CMV, TEV, PVY, TSWV, PMMoV, TMV, ToMV, AMV, PVMV ve PepMoV ile bulaşık olduğunu belirlemiştir. Virüs belirtileri açısından şüpheli olarak toplanan örneklerde tekli ve karışık enfeksiyonları birlikte değerlendirmiş, Adana ilinde %30,1 ile PVY, Hatay ilinde %28,5 ile PVY ve CMV, Kahramanmaraş ilinde %43,1 ile CMV, Mersin ilinde %23,7 ile CMV ve

Osmaniye ilinde %47,6 ile CMV en yaygın olarak bulmuştur. Açıkta yetiştirilen biberlerdeki duruma benzer şekilde; bu tez çalışmasının yürütüldüğü Akdeniz Bölgesi'nde Mersin ilinde farklı lokasyonlarda örtü altında yetiştirilen biberlerde de CMV'nin varlığı saptanmışken Adana ilinde ise CMV saptanmamıştır.



Çizelge 4.2. DAS-ELISA Testi Çalışmalarında Alınan Toplu Sonuçlar

Örnek Alım Tarihi	ÖRNEĞİN KAYNAĞI		TESTLENEN Örnek Sayısı	OD ₄₀₅ SONUÇ			CMV ÖRNEK SAYISI				
	İL	İlçe/Belde/Mah.		KONTROLLER			POZİTİF		Düşük Abs. Verenler		NEGATİF
				POZİTİF (+)	NEGATİF (-)	TAMPON (-)	OD 405	Sayısı	Sayısı	OD 405	Sayısı
27.12.2016	MERSİN	KAZANLI	8	2,02	0,22	0,2	1,30-2,70	5	2	0,29-0,40	1
27.12.2016		TARSUS	10	2,02	0,22	0,2	1,30-2,70	4	1	0,29-0,40	5
27.12.2016		TARSUS	7	2,02	0,22	0,2	1,30-2,70	2	4	0,29-0,40	1
17.7.2017		TARSUS	22	9,99	0,08	0,07	0	0	0	0,07-0,13	22
17.7.2017		TARSUS	23	9,99	0,04	0,05	0	0	0	0,07-0,9	23
20.7.2017		ADANALIOĞLU	16	9,99	0,51	0,04	0	0	0	0,07-0,13	16
20.7.2017		ADANALIOĞLU	16	9,99	0,08	0,07	0	0	0	0,07-0,13	16
20.7.2017		KARADUVAR	4	9,99	0,08	0,07	0,32-0,49	4	0	0	0
27.7.2017		KAZANLI	18	9,99	0,09	0,03	0	0	0	0,07-0,13	18
27.7.2017		KAZANLI	17	9,99	0,07	0,06	0	0	0	0,07-0,10	17
19.10.2017		ADANALIOĞLU	13	1,26	0,15	0,13	0,36-0,58	4	3	0,10-0,13	6
19.10.2017		KAZANLI	4	1,26	0,15	0,13	0,34-1,15	2	1	0,13	1
19.10.2017		KARACAIYAS	2	1,26	0,15	0,13	0,35	1	0	0,19	1
15.4.2018		ADANALIOĞLU	14	0,38	0,11	0,14	0,23-0,52	11	0	0,16-0,19	3
12.5.2018		ADANALIOĞLU	17	0,81	0,09	0,11	0,28	1	2	0,09-0,12	14
20.5.2018		ADANALIOĞLU	15	1,98	0,09	0,11	0,27	1	2	0,08-0,015	12
			206					35	15		156
15.12.2016	HATAY	SAMANDAĞ	27	3,92	0,26	0,21	0,9-2,58	14	1	0,27-0,37	12
8.1.2018		SAMANDAĞ	17	1,29	0,11	0,09	0	0	0	0,04-0,68	17
			44					14	1		29
11.1.2018	ADANA	KARAGÖÇER	13	1,68	0,05	0,04	0	0	0	0,04-0,05	0
11.1.2018		İNCEYOL	3	1,68	0,05	0,04	0	0	0	0,04-0,05	0
11.1.2018		KUM HÖYÜĞÜ	4	1,68	0,05	0,04	0	0	0	0,04-0,05	0
			20					0	0		0
28.11.2017	ANTALYA	KUMLUCA	25	1,58	0,12	0,14	0,81-1,12	10	6	0,23-0,26	9
28.11.2017		FİNİKE	5	1,69	0,21	0,17	0,98-1,20	3	1	0,39-0,43	1
			30					13	7		10
			300					62	23		195

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Sabire CAN

Örtü altında genellikle tek enfeksiyon değil karışık enfeksiyon şeklinde olması virüs simptomu olmasına rağmen CMV'den kaynaklanmadığını göstermektedir. Özellikle TSWV'de dayanıklılığı kıran izolatların biber seralarında ana sorun olduğu ve özellikle TSWV geni içeren biberlerde CMV enfeksiyonu gibi mozaikler meydana getirmesi simptomolojik olarak örnek alımında en büyük zorluk olarak karşımıza çıkmaktadır.

Ayrıca; ELISA testi sonucunda negatif ve buffer değerlerinin 2 katı olan örnekler, ELISA'da pozitif için yeterli absorbans değerlerine ulaşmamıştır. Bu örneklerde enfeksiyon yeni olmasından ve yeterince virüs konsantrasyonu olmamasından kaynaklanacağı düşünülerek daha hassas bir yöntem olan RT-PCR testi ile doğrulaması yapılmıştır.

4.3. Total RNA Ekstraksiyon Çalışmaları

Yapılan Total RNA ekstraksiyon çalışmasında; ELISA testi sonucunda yaprak dokusundan oluşan kesin pozitif olduğu saptanan 62 adet örnek ile daha düşük ve negatif kontrolün iki katına yakın absorbans değeri ile pozitif şüpheli olarak kabul edilen 23 örnek dahil olmak üzere toplam 85 örnek arasından seçilenlerin (Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2.) Astruc ve ark (1996)'nın önerdiği yöntem kullanılarak nükleik asitleri ayrı ayrı elde edilmiştir. Çalışmada meyve ve tohumdan oluşan örneklerden hiçbirinde ELISA testinde CMV için pozitif sonuç elde edilemediğinden total NA ekstraksiyonunda kullanılmamıştır.

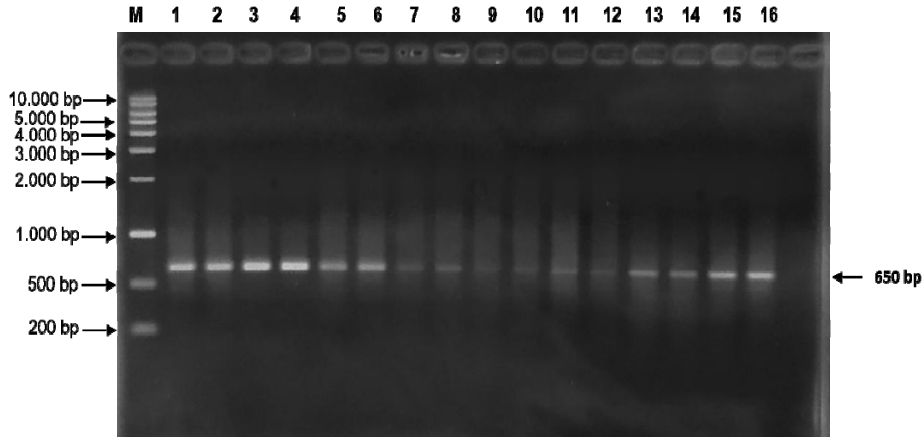
Benzer olarak Çekya'da 2006-2010 yılları arasında biber bitkilerindeki virüsleri belirlemek için yürüten survey çalışmasında Svoboda ve Svobodova-Leisova (2012)'nin virüs belirtileri gösteren açık alan ve örtü altı alanlardan topladıkları 375 örneğin yaprak dokuları ile yaptıkları DAS-ELISA testinde en yaygın olarak CMV'nin varlığını rapor etmişlerdir. Akdeniz Bölgesi örtü altı biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda yürütülen bu çalışmada da serolojik ve moleküler çalışmalar sonucunda CMV ile infekteli olarak saptanan yaprak dokusu kullanılan

bitki örneklerinden pozitif sonuçlar alınması yine bu örneklerden nükleik asit elde edilmesiyle CMV'nin saptanmış olması bunu doğrular niteliktedir.

4.4. RT-PCR Çalışmaları

Survey çalışmalarında toplanan örtü altında yetiştirilen biber örneklerinden ELISA testleri sonucu saptanan toplam 85 adet CMV ile infekteli örnekte virüsü moleküler olarak saptamak ve tanılamak amacıyla seçilen 16 örnek ile RT-PCR çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla, bulaşık bitkilerden elde edilen total NA' lar ve CMV'ye özgü primer çiftleri ile yapılan PCR çalışmaları sonrasında elde edilen PCR ürünleri için %1,5'lik agaroz jel ile TAE tampon çözeltisinde elektroforez yöntemi kullanılarak bandların elde edilmesi sağlanmıştır.

RT-PCR çalışmalarında Antalya ili Kumluca ilçesinden 4 örnek (A7, A9, A15, A17 izolatları), Mersin ili Akdeniz ilçesindeki Kazanlı mahallesinden 4 (K2, K5, K6, K15 izolatları), Karaduvar mahallesinden 4 (M35, M36, M44, M45 izolatları) ve Tarsus ilçesinden 4 (T8, T11, T22, T23 izolatları) örnek olmak üzere toplam 16 örnekten CMV için bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.17.).



Şekil 4. 17. CMV izolatlarına ait, RW8 / RV11 primer çifti ile yapılan 650 bp'lik RT-PCR ürünleri M; 1kb Marker, 1 (K2), 2 (K5), 3 (T11), 4 (T23), 5 (K6), 6 (T8), 7 (T22), 8 (K15), 9 (M35), 10 (M36), 11 (M44), 12 (M45), 13 (A7), 14 (A9), 15 (A15), 16 (A17) (Çizelge 4.3.)

Yapılan bu RT-PCR çalışmasında CMV izolatlarını moleküler olarak saptama ve tanılama amacıyla; Finetti-Sialer ve ark (1999)'nın RT-PCR-RFLP yöntemi ile CMV izolatlarının farklılıklarının ortaya konması için yapmış oldukları çalışmadaki dejenere primerleri kullanılmıştır Araştırmacılar kullandıkları RNA-2 genomik RNA'ı üzerinde 650 bp'lik bir bölgeyi (RW8) 5'-GGTTCGAA(AG)(AG)(AT)ATAACCGGG-3' ve (RV11) 5'-GTTTATTTACAAGAGCGTACGG-3' dejenere primer'lerini kullanarak PCR yöntemi ile çoğaltmışlardır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlarla Finetti-Sialer ve ark (1999)'nın yaptıkları çalışmanın sonuçları ile paralellik göstermiştir (Şekil 4.17.).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar aynı zamanda Çağlar (2006)'nın yapmış olduğu çalışmanın sonuçları ile de paralellik göstermiştir (Şekil 4.17.). Araştırmacı; CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının farkını bulmak ve gruplandırma içerisinde hangi alt gruba ait olduğunu belirlemek amacıyla yaptığı RT-PCR-RFLP çalışmasında (RW8) 5'-GGTTCGAA(AG)(AG)(AT)ATAACCGGG-3' (77,47 pmol/ µl, RNA 2' nin 618-637 bölgesine komplementer), (RV11) 5'-GTTTATTTACAAGAGCGTACGG-3' (67,07 pmol/µl, RNA 2' nin 1-22 bölgesine komplementer) dejenere primer çiftini kullanarak RNA-2 geni üzerinde 650 bp'lik bölge çoğaltmıştır. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi ile jelde her üç izolat içinde beklenen 650 bp'lik DNA bandı gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak çalışmada CMV ile infekteli olarak saptanan 62 ve düşük absorbans değeri veren 23 örnek dahil olmak üzere toplam 85 örtü altı biber örneğinden seçilen (Çizelge 4.1., Çizelge 4.2.) RT-PCR işlemi uygulanmış olan 16 örnekten pozitif sonuç alınmış, beklenen büyüklüğe sahip bantlar (650 bp) elde edilmiştir (Çizelge 4.3.). Ayrıca, yine bu 16 farklı örnek üzerinden serolojik ve moleküler çalışmalar sonucunda CMV ile infekteli olarak saptanan bitkilerden ELISA'da yüksek absorbans değeri veren ve PCR 'da net bant oluşturan, ayrıca farklı alanlardan gelen örneklerden seçilen farklı 8 pozitif örnek kodlanarak dizi belirleme ve analiz çalışmalarında izolat olarak kullanılmıştır (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.3. RT-PCR Çalışmalarında Kullanılan Örnekler ve Sonuçlar

PCR No:	Jel Kuyu No:	Alındığı İl-İlçe-Belde	Virüs İzolat Adı	DAS-ELISA	RT-PCR	Görülen Belirtiler (*)
2	1	Mersin/Kazanlı	K2 İzolatı-Filinta-İnce Sivri Biber	+	+	UYK, YRD (Şekil 4.10.)
4	2	Mersin/Kazanlı	K5 İzolatı-Filinta-İnce Sivri Biber	+	+	UYK, UYN (Şekil 4.12.)
6	3	Mersin/Tarsus	T11 İzolatı-Mert-Sivri Biber	+	+	YN, YDB (Şekil 4.11.)
10	4	Mersin/Tarsus	T23 İzolatı-Pailin-Sivri Biber	+	+	UYN, K, GN (Şekil 4.5.)
11	5	Mersin/Kazanlı	K6 İzolatı-Filinta- İnce Sivri Biber	+ ?	+	UYK, UYN (Şekil 4.7.)
12	6	Mersin/Tarsus	T8 İzolatı-Mert-Sivri Biber	+ ?	+	UYD, K (Şekil 4.8)
17	7	Mersin/Tarsus	T22 İzolatı-Pailin-Sivri Biber	+ ?	+	B, UYK (Şekil 4.6.)
39	8	Mersin/Kazanlı	K15 İzolatı-Ejder-Sivri Biber	+	+	B, BK (Şekil 4.9.)
62	9	Mersin/Karaduvar	M35 İzolatı-Filinta-Dolma Biber	+	+	YD, K (Şekil 4.3.)
63	10	Mersin/Karaduvar	M36 İzolatı-Filinta-Dolma Biber	+	+	YD, YDK (Şekil 4.4.)
64	11	Mersin/Karaduvar	M44 İzolatı-Doğanay-Dolma Biber	+	+	UYD, USD (Şekil 4.1.)
65	12	Mersin/Karaduvar	M45 İzolatı-Filinta Kıl Biber	+	+	YD, YMB (Şekil 4.2.)
68	13	Antalya/Kumluca	A7 İzolatı-Diyar-Kapya	+	+	YD, K (Şekil 4.13.)
70	14	Antalya/Kumluca	A9 İzolatı-Diyar F1-Kapya	+	+	YD, YM, YBM (Şekil 4.14.)
73	15	Antalya/Kumluca	A15 İzolatı-Nirvin-Kırmızı Kaliforniya-Dolma Biber	+	+	YRD, YD (Şekil 4.15.)
74	16	Antalya/Kumluca	A17 Sween-Sarı Kaliforniya-Dolma Biber	+	+	YM, YDK (Şekil 4.16.)

(*) : UYK, Uç yapraklarda kloroz; UYN, Uç Yapraklarda Nekroz; USD, Uç Sürgün Deformasyonları; UYD, Uç Yapraklarda Daralama; YRD, Yapraklarda Renk Değişikliği, YDK, Yaprak Damarlarında Kloroz; YMB, Yapraklarda Meşe Yaprığı Belirtisi; YDB, Yaprak Damar Aralarının Bombeleşmesi; YM, Yapraklarda Mozayik; YD, Yaprak Deformasyonları; YN, Yapraklarda Nekroz; K, Kloroz; YDN, Yaprak Damarlarında Nekroz; GN, Gövde Nekrozları; YD, Yaprak Deformasyonları; BK; Boğum Aralarının Kısılması; B, Bodurluk; Ç, Çalılışma

Bitkilerde zararlı virüs hastalıklarının belirtileri birbirine zaman zaman çok benzediği gibi çevresel faktörler ve virüs-konukçu ilişkileri de oluşan belirtilerde değişik görüntülere neden olmakta ve virüs hastalıkları yönünden karmaşa veya karışıklıklar ortaya çıkmaktadır. Nitekim yapılan çalışmada alınan örneklerde belirtiye dayalı tanının yanlış olabileceği gibi bu örneklerde enfeksiyonun yeni

olması ve düşük konsantrasyondan kaynaklandığı düşünülerek daha hassas, daha güvenli, daha spesifik olan RT-PCR testine de tabi tutulmuştur.

4.5. Hıyar Mozaik Virüsü (CMV) Dizi Belirleme ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları

Daha önce serolojik ve moleküler çalışmalar sonucunda CMV ile infekteli olarak saptanan ve PCR çalışmalarında net bantlar oluşturan seçili pozitif 8 farklı örnek CMV izolatlarının karşılaştırmaları için DNA dizi belirleme çalışmalarında kullanılmıştır. Dizi belirleme amacıyla Mersin ili Akdeniz ilçesindeki Kazanlı mahallesinden K2, K5; Karaduvar mahallesinden M36, M44; Tarsus ilçesindeki T11, T23 ile Antalya ili Kumluca ilçesinden alınan A7 ve A15 izolatları/örnekleri kullanılmıştır (Çizelge 4.4.).

DNA dizi belirleme çalışmalarında serolojik ve moleküler olarak tanısı yapılan virüslere ait PCR ürünleri diziliminin belirlenmesinde Refgen Biyoteknoloji (bilgi@refgen.com) firmasından özel hizmet alınarak sekans çift yönlü yaptırılmıştır. Elde edilen olan sonuçlar doğrultusunda izolatların çoğaltılan kısımlarının dünyada saptanmış olan diğer izolatlarla karşılaştırılması yapılarak soy ağacı elde edilmiştir (Şekil 4.18.). Bu izolatların dünyada yer alan diğer izolatlarla benzerlik oranı Çizelge 4.5.'te verilmiştir.

RW8 / RV11 primer çifti ile elde edilen CMV dizi analizinde seçilen 8 izolatın (CMV-K2, CMV-K5, CMV-T11, CMV-T23, CMV-M36, CMV-M44, CMV-A7, CMV-A15) hem birbirlerine ve hem de daha önce Türkiye'den küçük turp izolatı olarak Gen Bankasında yayınlanmış olan LC066508 Gen Bank numaralı CMV ile çok yakın (%98 benzerlik göstermiştir) izolatlar olduğu ortaya konulmuştur. Çalışmada genel olarak en yüksek benzerlik oranını %98 ile Türkiye, Sırbistan, Macaristan, İspanya ve Fransa izolatları gösterirken; en düşük benzerlik oranını %95 ile İran izolatı göstermiştir (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.4. Hıyar Mozaik Virüsü (CMV) DNA Dizi Belirleme ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmalarında Seçilen İzolatlar

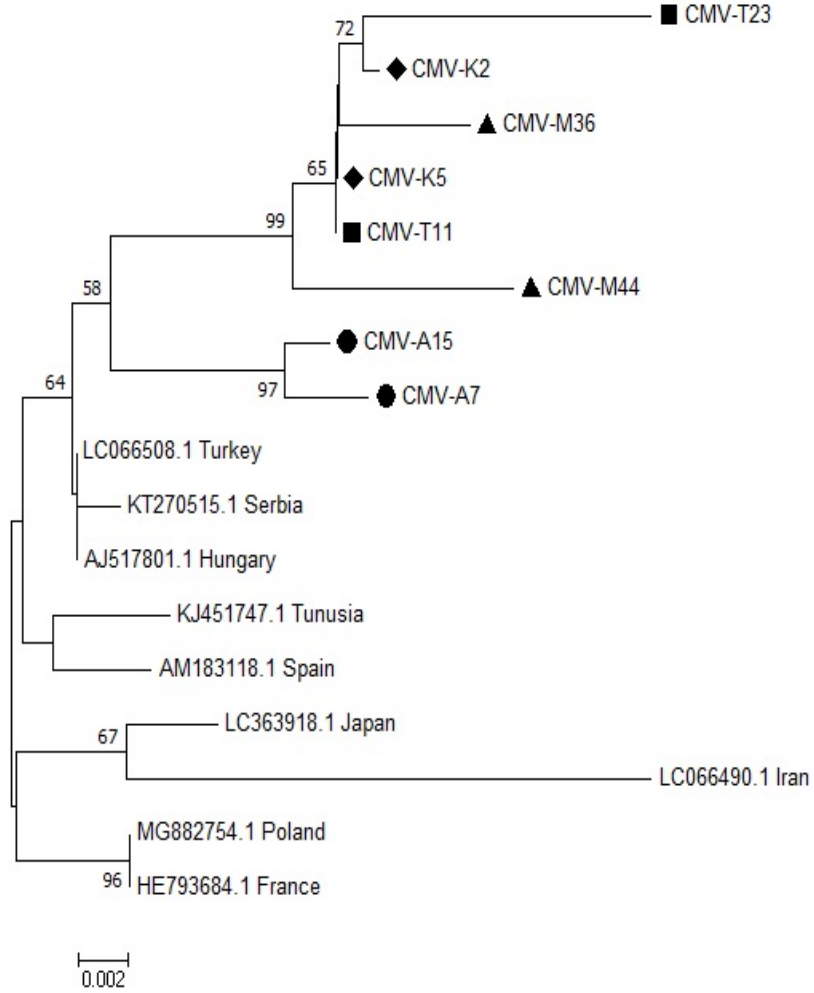
PCR No:	Jel Kuyu No:	Alındığı İl-İlçe-Belde	Seçilen Virüs İzolat Adı	DAS-ELISA	RT-PCR	Görülen Simptomlar (*)
2	1	Mersin/Kazanlı	K2 İzolatı-Filinta-İnce Sivri Biber	+	+	UYK, YRD (Şekil 4.10.)
4	2	Mersin/Kazanlı	K5 İzolatı- Filinta-İnce Sivri Biber	+	+	UYK, UYN (Şekil 4.12.)
6	3	Mersin/Tarsus	T11 İzolatı-Mert-Sivri Biber	+	+	YN, YDB (Şekil 4.11.)
10	4	Mersin/Tarsus	T23 İzolatı-Pailin-Sivri Biber	+	+	UYN, K, UYD, GN (Şekil 4.5.)
63	10	Mersin/Karaduvar	M36 İzolatı-Filinta-Dolma Biber	+	+	YD, YDK (Şekil 4.4.)
64	11	Mersin/Karaduvar	M44 İzolatı-Doğanay-Dolma Biber	+	+	UYD, USD (Şekil 4.1.)
68	13	Antalya/Kumluca	A7 İzolatı-Diyar-Kapya	+	+	YD, K (Şekil 4.13.)
73	15	Antalya/Kumluca	A15 İzolatı-Nirvin-Kırmızı Kaliforniya-Dolma Biber	+	+	YRD, YD (Şekil 4.15.)

(*) : UYK, Uç yapraklarda kloroz; UYN, Uç Yapraklarda Nekroz; USD, Uç Sürgün Deformasyonları; UYD, Uç Yapraklarda Daralama; YRD, Yapraklarda Renk Değişikliği, YDK, Yaprak Damarlarında Kloroz; YMB, Yapraklarda Meşe Yapağı Belirtisi; YDB, Yaprak Damar Aralarının Bombeleşmesi; YM, Yapraklarda Mozayik; YD, Yaprak Deformasyonları; YN, Yapraklarda Nekroz; K, Kloroz; YDN, Yaprak Damarlarında Nekroz; GN, Gövde Nekrozları; YD, Yaprak Deformasyonları; BK, Boğum Aralarının Kısılması; B, Bodurluk; Ç, Çalışma

Çizelge 4.5. RW8 / RV11 Primer Çifti ile Elde Edilen Filogenetik Analizde Kullanılan CMV İzolatlarının Dünyada Yer alan Diğer İzolatlarla Benzerlik Oranı

Orijin	Konukçu	Accession No:	Benzerlik Oranı (%)
Türkiye	<i>Rapistrum rugosum</i> (Küçük turp)	LC066508	%98
Sırbistan	<i>Cucurbita pepo</i> "Olinka" (Sakız Kabağı)	KT270515	%98
Macaristan	<i>Raphanus sativus</i> (Turp)	AJ517801	%98
Tunus	<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>Scolymus</i> (Enginar)	KJ451747	%97
İspanya	<i>Solanum lycopersicum</i> (Domates)	AM183118	%98
Japonya	<i>Corchorus olitorius</i> (Mühliye)	LC363918	%97
İran		LC066490	%95
Polonya	<i>Cucurbita pepo</i> convar. <i>Giromontiina</i> (Sakız kabağı)	MG882754	%97
Fransa	<i>Solanum lycopersicum</i> (Domates)	HE793684	%98

Filogenetik ağaçtaki RW8 / RV11 primer çifti ile saptanan bu 8 CMV izolatı arasında çok küçük farklılıklar görülmektedir (Şekil 4.18.). Bu durum bu izolatların farklı alt gruplarda olma ihtimalini güçlendirmektedir ayrıca bu kaniya bağlı kalarak Finetti Sialer ve ark (1999), Çağlar (2006) CMV'nün alt grup'ları konusunda çalışma da yapmışlardır. Bu çalışmada kullanılan CMV-T23, CMV-K2, CMV-36, CMV-K5, CMV-T11 izolatlarının kendi içinde benzerlik göstererek CMV-44 izolatıyla alt grup oluşturduğu görülmektedir. CMV-15 ve CMV-A7 kendi aralarında benzerlik oluşturarak diğer izolatlarla (CMV-K2, CMV-K5, CMV-T11, CMV-T23, CMV-36, CMV-44) alt grup oluşturmuştur. CMV dizi analizinde seçilen bu 8 izolat; Türkiye, Sırbistan ve Macaristan izolatları ile yakın benzerlik göstermiş olup; Tunus ile İspanya; Japonya ile İran; Polonya ile Fransa ise kendi içlerinde benzerlik göstermiştir.



Şekil 4.18 RW8 / RV11 primer çifti ile saptanan CMV izolatlarının soyağacı (Bootstrap 1000 tekrarlamalı) (Neighbor-joining metodu kullanılarak yapılan filogenetik analiz)



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

2016-2018 yılları arasında yürütülen çalışma kapsamında; Akdeniz Bölgesi'nde yer alan Adana, Mersin, Hatay ve Antalya il ve ilçelerindeki örtü altı biber üretim alanlarından toplanan örneklerden CMV'nin oluşturduğu belirtilere bakarak simptomolojik; CMV'nin varlığı ve tanısı amacıyla da serolojik (DAS-ELISA) ve moleküler (RT-PCR) yöntemler ile tespiti yapılmış ve değişik alanlardan saptanan izolatların serolojik ve moleküler karakterizasyonları gerçekleştirilerek nükleotid düzeyinde izolatların kendi içinde ve dünyadaki diğer izolatlar ile kıyaslaması yapıldıktan sonra bu benzerliklere göre soy ağacı oluşturulmuştur.

Bu tez çalışmasında saptanan sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- CMV izolatlarının toplanıp, tanılanması ve karakterizasyonu amacıyla 2016-2018 yılları arasında sonbahar ortasında başlayan survey çalışmaları Kasım, Aralık, Ocak, Nisan, Mayıs, Temmuz aylarında gerçekleştirilmiştir. Üretim alanlarına yapılan sürveyler sırasında bitkilerin sergilediği uç yapraklarda kloroz, nekrozlar, uç sürgün deformasyonları, uç yapraklarda daralma, yapraklarda renk değişikliği, yaprak damarlarında kloroz, yapraklarda mozaik, yaprak deformasyonları, yapraklarda nekroz ve klorozlar, yaprak damarlarında nekroz, gövde nekrozları, bodurluk, çalılaşma, yapraklarda meşe yaprağı belirtisi gibi simptomların daha önce yapılan çalışmalarda birçok araştırmacı tarafından rapor edilen belirtilerle benzer olduğu belirlenmiştir. Ayrıca; CMV belirtilerinin biber çeşidine göre farklılıklar gösterdiği gözlenmiştir. CMV hastalığının dolmalık ve kıl biber çeşitlerinde yapraklarda mozaik ve deformasyonlar, meşe yaprağı gibi oluşumlar daha çok görülürken; sivri biber çeşitlerinde bu belirtiler daha az görülüp, genelde yapraklarda kloroz ve nekrozlar şeklinde kendini göstermiştir.

- Akdeniz Bölgesi'nde örtü altı biber üretim alanlarına yapılan arazi çıkışları sonucunda; Adana ilinden 20 örnek, Mersin ilinden 169 örnek, Hatay ilinden 44 örnek, Antalya ilinden 30 örnek olmak üzere CMV ile enfekteli olabileceğinden şüphelenilen toplam 263 adet örtü altı biber bitkisi toplanmıştır.
- DAS-ELISA çalışmalarında; toplanan örtü altı biber bitkilerinden 263 yaprak örneğinin dışında ayrıca bu örneklerden alınan tohum ve meyvelerden oluşan 37 farklı örnek e dahil edilerek toplam 300 örnek (263 yaprak dokusu+37 meyve-tohum dokusu) testlere tabi tutulmuştur. Meyve ve tohumdan oluşan bu 37 farklı örnekten ELISA testinde CMV için pozitif sonuç elde edilememişken; 263 adet yaprak örneğinden oluşan 62 tanesinin CMV ile bulaşık olduğu, ayrıca OD₄₀₅ nm de negatif kontrolün absorbans değerinin iki katı civarında daha düşük absorbans değeri veren 23 örnek te CMV için pozitif olarak dikkate alınmış ve seçilen örnekler PCR çalışmalarında da kullanılmış, ayrıca yine ELISA testi ile 20 örnekte de diğer virüsler ile ilgili enfeksiyonlar belirlenmiştir. Çalışmada DAS-ELISA testi sonucunda, CMV benzeri belirtiler gösteren örneklerin bazıları CMV ile enfekteli bulunurken, bazılarının tipik CMV semptomu göstermesine rağmen negatif olarak bulunması; bu örneklerde CMV dışında başka virüslerle de enfekteli olabileceği dikkate alınmış, nitekim diğer virüsler için yapılan testlerde pozitif sonuçlar da alınmıştır.
- Total RNA Ekstraksiyon çalışmalarında; DAS-ELISA testi sonucunda yaprak dokularından oluşan ve kesin pozitif olduğu saptanan 62 adet örnek ile daha düşük ve negatif kontrolün iki katına yakın absorbans değeri ile pozitif şüpheli olarak kabul edilen 23 örnek dahil olmak üzere farklı alanlardan alınan 85 örnek arasından seçilenlerin nükleik asitleri ayrı ayrı elde edilmiştir.
- RT-PCR çalışmalarında ELISA testinde pozitif saptanan 85 örnek içinden değişik absorbans değerleri veren ve farklı alanlardan seçilen 16 örnek ile

yapılan RT-PCR çalışmalarında beklenen büyüklüğe sahip bantlar elde edilerek pozitif sonuçlar alınmıştır. CMV'ye özgü RW8-RV11 primer çifti kullanılarak Mersin ilinin Tarsus ilçesi, Akdeniz ilçesi (Kazanlı, Karaduvar mahalleleri) ve Antalya ilinin Kumluca ilçesinden toplanan örtü altı biber izolatlarına ait 650 bp büyüklüğünde bandlar elde edilmiştir.

- Hıyar Mozaik Virüsü (CMV) dizi belirleme ve filogenetik sınıflandırma çalışmalarında ise; ELISA'da yüksek absorbans değeri verip, PCR'da net bant oluşturanlardan seçilen 8 farklı örnek kodlanarak dizi belirleme ve analiz çalışmalarında izolat olarak kullanılmıştır. Böylece; survey yapılan alanlardan toplanan örneklerde izolat farklılıklarını belirlemek amacıyla yapılan gen dizileme (sekans) sonucu ile soyağacı oluşturulmuş, izolatlar arasındaki farklılıklar veya benzerlikler gen düzeyinde ortaya konmuştur. DNA dizilerine göre oluşturulan filogenetik ağaç göstermiştir ki, seçilen 8 izolatında hem birbirlerine ve hem de daha önce Türkiyeden küçük turp izolatı olarak Gen Bankasında yayınlanmış olan LC066508 Gen Bank numaralı CMV ile çok yakın (%98 benzerlik göstermiştir) benzerlikte izolatlar olduğu ortaya konmuştur. Filogenetik ağaçta bu 8 izolat arasında çok küçük farklılıklar görülmektedir. Bunun nedeni; CMV serolojik ve genetik baz dizilim özelliklerine göre Altgrup I ve II olarak ikiye ayrılmaktadır. Altgrup I de kendi içinde filogenetik akrabalıklarına IA ve IB olarak ikiye ayrılmaktadır. Bu gruplaşma içerisinde biyolojik, serolojik ve genetik özellikleri itibari ile ve genetik olarak çok az farka sahip birçok ırkları bulunmaktadır. Ayrıca bu araştırmanın moleküler aşamasında kullanılan RW8 ve RV11 primer çifti dejenere primer olup CMV' ye ait bütün grup ve alt gruplardaki ırklarının hepsini çoğaltma kapasitesine sahip primer çiftidir. Muhtemeldir ki DNA dizilemede kullanılan 8 izolat birbirinden farklı alt gruplarda olma ihtimalinden dolayı filogenetik ağaçta çok az farklılıklar göstermektedir. Bu durum RW8 ve RV11 primer çifti ile farklı altgruplara ait CMV izolatları saptanabildiğini göstermiştir. Ayrıca

bu izolatların alt grup analizleri daha farklı primer çiftleri kullanılarak da ve RFLP yaparak veya Haplotype analizi yaparak da ortaya konulabileceği söylenebilir.

Çalışmanın yapıldığı Adana, Mersin, Hatay, Antalya illerinde 600 000 ton civarında üretimi yapılan örtü altı biber Akdeniz bölgesi için önemli sebzelerden biridir. Bu bölgede örtü altı biber yetiştiriciliğini sınırlayan ve etkin mücadele yöntemi bulunmayan CMV ekonomik önemi olan, birçok sebze, meyvede hastalık yapabildiği gibi yabancı otlar ve süs bitkileri de dâhil olmak üzere çok geniş bir konukçu dizisine sahip olduğundan hastalık ve zararlı etmenleri ekonomik açıdan verimde kayba sebep olmaktadır. Bu etmenler içinde özellikle de virüsler kimyasal mücadelesi olmaması ve vektörlerin virüsleri taşıması sebebiyle ayrı bir öneme sahiptir. Özellikle de CMV'nin yaprak biti ile taşıyor olması etkili bir vektör mücadelesini önemli kılmaktadır. Genellikle; yaprak bitlerinin yoğun görüldüğü dönemler ilkbahar ve sonbahar dönemleridir. Çünkü yaprak biti popülasyonu iklim koşulları ile çok ilgilidir, kuraklık ve sıcaklık arttığında popülasyon birden düşer. Dolayısı ile belirtileri daha net görme açısından örneklerin bu mevsimde alınması simptomolojik açıdan güzel bulgular ortaya çıkarabilir. Ayrıca; örtü altında yetiştirilen biber bitkilerinde CMV enfeksiyonunun özellikle de pozitif çıkan örneklerin sonbahar-ilkbahar aylarında alınmış olması bunu doğrular niteliktedir. Özellikle de hastalığın ilk belirtileri yaprak bitleri ile olan enfeksiyonlardan yaklaşık 10 gün sonra bitkinin tepe yapraklarında ve tomurcuklarında mozaik belirtiler ile başladığı ve sürgünlerin aşağı doğru kıvrıldığı bildirilmektedir. Bu nedenle seralarda yaprak biti ile mücadelede; bulaşmayı önlemek amacıyla havalandırma açıklıklarının mutlaka tül ile kapatılmasına, üretim sahalarında ışığı yansıtıcı malçlamanın yapılarak vektör böceklerin uzaklaştırılmasına özen gösterilmelidir. CMV hastalığına karşı yapılacak olan etkili bir vektör mücadelesine ek olarak, koruyucu kültürel uygulamaların (fidelik ve üretim alanları ile çevresindeki yabancı otların yok edilmesi, hastalık belirtisi

gösteren bitkiler imha edilmeli, hasat sonunda üretim alanının tüm bitki artıklarından temizlenmesi ve bu artıkların imha edilmesi) yapılması da çok önemlidir. Bazı araştırmalarda etmen virüsün tohumla da taşındığı bildirilmekte olup virüsten ari tohum ve üretim materyalinin kullanılması yanında dayanıklı veya tolerant çeşitlerin üretimde tercih edilmesinin son derece önemli olduğu ayrıca; etmen virüsün zaman zaman latent olarak yabancı otlarda da bulunduğu bildirilmekte olup, bu nedenle yabancı otlar ile mücadelede de CMV'nin yayılmasını önlemede etkili olduğu da söylenebilir.

Arazi surveylerinde özellikle de Akdeniz Bölgesi'nde; başta Mersin ili lokasyonlarındaki seralar olmak üzere; örtü altı biber üretim alanlarında yoğun bir şekilde virüs belirtilerinin gözlemlendiği ve seraların bazılarında verim kayıplarının olduğu görülmüştür. Özellikle örtü altı biber üretim alanlarında yürütülen bu survey çalışmalarında belirtileri daha net görme açısından pozitif çıkan örneklerin CMV sonuçlarını değerlendirdiğimizde; çiçek-meyve dönemini kapsayan genç ve gelişme dönemlerinde ve hasat sonuna yakın dönemlerde test örneklerinin alınmasının uygun olduğu söylenebilir. Çalışmada virüs benzeri belirtiler gösteren örnekler toplanmış ve bu örneklerde yapılan ELISA testlerinde CMV enfeksiyonları dışında TSWV, PVY, TEV gibi etmenler ile tek veya karışık enfeksiyonlarda saptanmıştır.

Ayrıca CMV'nin çeşit olarak; bölgede yetiştirilen Acı-Tatlı Sivri, Dolmalık, Kıl ve Kapyra biber çeşitlerinin tamamında değişen oranlarda görülmüştür. Bu nedenle Akdeniz Bölgesi'nde örtü altı biber alanlarında bu virüs ile ilgili daha detaylı çalışmaların yapılması; özellikle de CMV virüsünün bölgedeki yaygınlığı dışında verime olan etkilerinin, çeşit reaksiyonlarının, diğer konukçularının araştırılması yanında dayanıklı veya tolerant çeşitlerin araştırılması üzerine çalışmaların yapılması yararlı olacaktır.

Kısaca; ülkemizde biber virüs hastalıkları konusunda yapılan çalışmaların daha çok; açık alanlarındaki yaygınlığı ve oranı, saptanan virüs izolatlarının karakterizasyonu ve açık alandaki biberde oluşturdıkları belirtileri içermesi ve

buna bağı olarak da Akdeniz sahil şeridindeki örtü altı biber üretim alanlarında CMV için değışik konuları içeren çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu çalışmada CMV'nin serolojik ve moleküler yöntemler ile varlığı saptanmış ve karakterize edilerek nükleotid düzeyde karşılaştırması yapılmıştır.

Söz konusu çalışma; gelecekte bibeler ile ilgili yapılacak diğerk çalışmalarla veri teşkil edecek, planlanacak değışik amaçlar çalışmalar için katkı sağlamış olacaktır.



KAYNAKLAR

- Agrios, G.N., Walker M.E. and Ferro D.N. 1985. Effect of Cucumber mosaic virüs inoculation at successive weekly intervals on growth and yield of pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *Plant Disease*, 69: 52-55.
- Agrios, G.N., 1997. Plant diseases caused by viruses. In *Plant Pathology*. p: 479-556.
- Ali, A., Kobayashi, M. 2010. Seed transmission of Cucumber mosaic virüs in pepper. *Journal of Virological Methods* 163 (2010) 234-237.
- Anonymous, 1997. Tarımsal Yapı (Production-Price-Value) Pub. No. 2234. ISBN: 975-19-2187-2, Ankara.
- Anonymous, 2013a. Biber Yetiştiriciliği. [Online] Available <http://megep.meb.gov.tr>. (October, 5, 2013)
- Arlı-Sökmen, M., ve ark (2005). Occurrence of viruses in field-grown pepper crops and some of their reservoir weeds hosts in Samsun, Turkey. *Phytoparasitica*, 33(4), 347-358.
- Arogundade, O., Balogun, O.S., ve Kareem, K.T., 2012. Occurrence and distribution of pepper veinal mottle virus and cucumber mosaic virus in pepper in Ibadan, Nigeria. *Virology Journal*, 19, 79.
- Astruc, N., Marcos, J. F., Macquarie, G., Candresse, G. T. and Vicent Pallas, 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-Organik Solvents. *European Journal of Plant Pathology*, 102, 837-846.
- Belçer Ö., ve Açıkgoz S., 2005. Ege ve Marmara Bölgelerindeki zeytin fidanlıkları ve ağaçlarında görülen bazı virüs hastalıklarının ELISA testi ile saptanması. *ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2 (1), 79-84.

- Biswas, K., ve ark (2013). Molecular evidence of Cucumber mosaicvirus subgroupII Infecting Capsicum annuum L. in the Western region of India. *International Journal of current discoveries and innovations*, 2(2), 97-105.
- Bostan, H., ve Dursun, A., 2002. Identification of some virus diseases in pepper production areas in Kemaliye and Yusufeli Districts. *Atatürk Üniv. Agriculture Faculty Journal*, 33(4), 391-392.
- Brunt, A., A., ve ark (1996). *Viruses of Plant Description and Lists from the VideDatabase*. University Pres, Cambridge: U.K. 1444.
- Buzkan, N., ve Yüzer, D., 2009. Molecular detection of seed-borne viruses inKahramanmaraş red peppers. *Alatarım*, 8(1), 1-7.
- Buzkan, N., ve ark (2006). Evaluation of the status of capsicum viruses in the maingrowing regions of Turkey. *Bulletin OEPP*, 36(1), 15–19.
- Choi, G.S., ve ark (2002). First report of tobacco mild green mosaicvirus infectingpepper in Korea. *Plant Pathology Journal*,18, 323-327.
- Choi, G.S., ve ark (2005). Occurrence and Distribution of viruses Infecting Pepperin Korea. *Plant Pathology Journal*, 21(3), 258-261.
- Choil, G.S., Kim, J. H., Lee, D.H., Kim, J.S., Ryu, K.H., 2005. Occurrence andDistribution of Viruses Infecting Pepper İn Korea The Plant Pathology Journal Vol.21 No.3 9,258-261.
- Çağlar, B.K., 2006. Hıyar mozaik virüsü (CMV)'nün kavun (Cmv-K), domates (Cmv-D), biber (Cmv-B) izolatlarının biyolojik, serolojik, moleküler yöntemlerle karakterizasyonu ve satellit RNA'lerin virüs üzerindeki etkisi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana, Doktora Tezi.
- Daplan, N., ve Sertkaya, G., 2007. Detection of virus diseases in the main peppergrowing districts and determination of incidences of the diseases in different pepper types locally grown at Hatay. Proceedings of the second plant protection congress of Turkey. 27-29 August, Isparta. p314.

- Demir, M., 2005. Kahramanmaraş'ta Yetiştirilen Kırmızı Biberlerde Yaprakbiti İleTaşınan Virüslerin Saptanması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 25s.
- Doolittle, S.P., 1916. A New infectious mosaic disease of cucumber. *Phytopathology*, 6, 145-147.
- Ergun M., Semih E., and Paylan I.C., 2013. Cucumber mosaic virus in globe artichoke in Turkey. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35 (4), 514-517.
- Erkan S., Gümüş M., Paylan İ.C., Duman İ., ve Ergün M., 2013. İzmir ili ve çevresindeki bazı kışlık sebzelerde görülen viral etmenlerin saptanması. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 50 (3): 311-322.
- Felsenstein, J., (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Ferreira, S.A., Boley, R.A., 1992. Cucumber mosaic virus. [Online] Available: [http://www. Extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/cucvir.htm](http://www.Extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/cucvir.htm). (January, 20, 2013)
- Fınetti-Sialer, M.M., Cillo, F., Barbarossa, L., and Gallitelli, D., 1999. Differentiation of cucumber mosaic virus subgroups by RT-PCR RFLP. *Journal of Plant Pathology*, 81 (2):145-148.
- Franckı, R.I.B., Mossop, D.W., and Hatta, T., 1979. CMI/AAB DescriptionViruses No. 213: 6p. <http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr909.htm>
- Gallitelli, D., and Minafra, A., 1994. Electroforesis. Course on Plant Virus Diagnosis, 15-30 October 1994. Adana-Turkey. Page: 89-99.
- Gallitelli, D., 1998. Present status of controlling cucumber mosaic virus. In: Khaterpal, R.K., Koganezawa, Haididi A. (eds). *Control of Plant Virus Disease*, pp. 507-523. APS Pres, St. Paul, MN.
- Gallitelli, D., 2000. The ecology of cucumber mosaic virus and sustainable agriculture. *Virus Research* 71, 9-21.

- Green S.K., and Kim, J.S., 1991. Characteristics and control of viruses infecting peppers: a literature review. Asian Vegetable Research and Development Center. Technical Bulletin No. 18, 60p.
- Green, S.K., Kim, J.S., 1994. Source of resistance to viruses of pepper (*Capsicum* spp.): A catalog. *Technical Bulletin*, 20, AVRDC, 64.
- Gökdağ S., Karanfil A., ve Korkmaz S., 2016. Çanakkale ili ısıpanak alanlarındaki Şalgam mozaik virüsü ve Hıyar mozaik virüsü varlığının belirlenmesi. Bahçe, özel sayı (cilt II), 166-170.
- Güldür, M.E., ve ark (1994). Pepper mild mottle virus in pepper in Turkey. Proceedings of the 9th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Kusadası, pp: 465-467.
- Güldür, M.E., Çağlar, B.K., 2006. Outbreaks of Pepper mild mottle virus ingreenhouses in Şanlıurfa, Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 88 (3), 341.
- Güllü, M., Çalı, S., 1994. Doğu Akdeniz Bölgesi örtü altı sebze alanlarında görülenvirüs hastalıklarının belirlenmesi üzerine araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni, Cilt:34, No:(3-4), 79-93.
- Gümüş, M., 1998. İzmir İlinde biberlerdeki viral hastalık etmenlerinin ve oranlarının saptanması ve bazı biber çeşitlerinin bu virüslara reaksiyonlarının belirlenmesi üzerine araştırmalar. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İzmir, Doktora Tezi.
- Gümüş M., Erkan S., ve Tok S., 2004. Bazı kabakgil türlerinin tohumlarındaki viral etmenlerin saptanması üzerinde araştırmalar. Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg., 41 (1), 49-56.
- Güneş, N., Gümüş, M., 2016. Antalya İli Biber Alanlarında Saptanan CMV ve TSWV'nin Serolojik ve Moleküler Karakterizasyonu. Uluslararası Katılımlı Türkiye 6. Bitki Koruma Kongresi, Konya, 559.
- Habılı, N., and Franckı, R. I. B., 1974. Virology, 57: 392 Holland, p.258-332.

- Han-Xin, L., ve ark (2004). Molecular population genetics of *Cucumber MosaicVirus* in California: Evidence for founder effects and reassortment. *Journal of Virology*, 78(12), 6666-6675.
- Hobbs, H.A., Eastburn, D.M., D'arcy, C. J., 2000. *Solanaceous* weeds as possible sources of *Cucumber mosaic virus* in Southern illinois for aphid transmission to pepper. *Plant Disease*, 84, 1221-1224.
- Hsu, H.T., Barzuna, L., Hsu, Y.H., Bliss, W., and Perry, K.L., 2000. Identification and subgrouping of cucumber mosaic virus with Mouse monoclonal antibodies. *Phytopathology* 90:615-620.
- Iqbal, S., ve ark (2012). Prevalence and Distribution of Cucumber mosaic virüs (CMV) in major Chilli Growing Areas of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 44(5), 1749-1754.
- Jacobi, V., ve ark (1998). Development of multiplex Immunocapture RT-PCR Assay for detection and differentiation of tomato and tobacco mosaic viruses. *Journal of Virological Methods*, 74, 167-178.
- Kaper, J.M., and Waterworth, H.E., 1981. Cucumoviruses, in Handbook of Plant Virus Infectious and Comparative Diagnosis (Kurtsak. E., ed.), Biomedical, North Holland, pp. 258-332.
- Karamanlı, A., Kamberoğlu, M.A., 2010. Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti (KKTC)' nde Kabakgil Yetiştirilen Alanlarda Hıyar Mozayik Virüsü (Cucumber Mosaic Virus, Cmv) Ve Kabak Sarı Mozayik Virüsü (Zucchini Yellow Mosaic Virus, Zymv)' nün Surveyi. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, Cilt:22-3
- Karanfil A., Soylu B., ve Korkmaz S., 2016. Çanakkale ili ve ilçelerindeki soğanlı süs bitkilerinde Hıyar mozaik virüsü enfeksiyonunun serolojik ve moleküler yöntemler ile araştırılması. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 17 (2), 105-110.

- Kaper, J.M, Waterworth, H.E., 1981. Cucumoviruses in Handbook of Plant Virusfectious and Comparative Diagnosis (Kurtsak. E., ed.), Biomedical, North Holland, 258-332.
- Keleş Öztürk, P., Baloğlu, S., 2015. The determination of virus diseases for pepper grown into open fields in East Mediterranean region of Turkey. XVIII. International Plant Protection Congress, Berlin, s351.
- Keleş Öztürk, P., Çolak Ateş A., 2016a. Biber Yetiştiriciliğinde Önemli Hastalıklar ve Korunma Yöntemleri. IV. International Multidisciplinary Congress of Eurasia, Rome-Italy, p31.
- Keleş Öztürk, P., Baloğlu S., 2016b. Important Virus Diseases in Capia Pepper Production in Eastern Mediterranean Region. IV. International Multidisciplinary Congress of Eurasia, Rome-Italy, p29.
- Keleş Öztürk, P., 2017. Doğu Akdeniz bölgesinde yetiştirilen biberlerde virüs hastalıklarının saptanması ve Karaisalı biber populasyonunun en yaygın virüse karşı reaksiyonu ile bazı dayanıklılık genlerinin belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana, Doktora Tezi.
- Keleş Öztürk, P., Baloğlu S., 2018a. Hatay İli Biber Üretim Alanlarında Virüslerin Belirlenmesi. Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi, Aydın, p238.
- Keleş Öztürk, P., Baloğlu S., 2018b. Determination of Important Viruses in Open Field-Grown Pepper in Mersin Province of Turkey. 4. International Agriculture Congress. p202.
- Kılıç, H., Yardımcı, N., Toplu, S., Konu, A., 2015. Cucumber Mosaic Virus and Pepper Mild Mottle Virus in Pepper Growing Areas in Burdur Province, Turkey. International Journal of Scientific and Technological Research ISSN 2422-8702 (Online) Vol 1, No.1.
- Kimura, M., (1980) A Simple Method for Estimating Evolutionary Rate of Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. Journal of Molecular Evolution, 16, 111-120

- Kosaka, Y., and Fukunishi, T., 1997. Multiple inoculation with three attenuated viruses for the control of cucumber virus disease. *Plant Disease*, 81:733-738.
- Kumar, S., ve ark (2011). Detection of Tobacco mosaic virus and Tomato mosaic virus in pepper and tomato by multiplex RT-PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 53, 359–363.
- Kumar, S., Stescher G., and Tamura, K., 2016. MAGA6 Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874.
- Lot, H., and Kaper, J.M., 1976. Further studies on the RNA component distribution among the nucleoproteins of cucumber mosaic virus. *Virology* 74, 223-226.
- Martelli, G.P., and A., Quacquarelli., 1983. The Present Status of Tomato and Pepper Viruses, *ACTA Horticulturae* 127, Vegetable Viruses.39-64.
- Mostafae, S., ve ark (2012). The first report of PVY incidence in Iran pepper fields. *Global Advanced Research Journal of Microbiology*, 1(2), 13-18
- Nouri, S., Arevalo, R., Falk, B.W., Groves, R. L. 2014. Genetic Structure and Molecular Variability of Cucumber mosaic virus Isolates in the United States. *PLoS ONE* 9(5): e96582. doi:10.1371/journal
- Oka, N., ve ark (2008). Inhibition of *Pepper mild mottle virus* with commercial lases. *Journal of Phytopathology*, 156, 65-67.
- Olawale, A., Samuel, B.O., Solomon, A.S.O., Kumar, P.L 2015. Surveys of virus diseases on pepper (*Capsicum* spp.) in South-west Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 14(18): 3198-3205
- Özalp, R., 2010. Ülkemizde Biber Üretimi ve Örtüaltı Biber Yetiştiriciliği. *Tarım Türk Dergisi*, Temmuz-Ağustos 2010, Sayı:24, Yıl:5, (S: 29-32).
- Özaslan, M., ve ark (2006). Identification of Pepper Viruses by DAS-ELISA Assay in Gaziantep-Turkey. *Plant Pathology Journal*, 5(1), 11-14.

- Özdemir, S., Erilmez, S., 2007. Denizli ilinde yetiştirilen biber, patlıcan ve marulüretim alanlarında bazı viral etmenlerin Saptanması. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri.27-29 Ağustos Isparta. 114s.
- Palloix, A., ve ark (1994). Survey of pepper diseases affecting the main productionregions of Turkey with special interest in viruses and potyvirus pathotypes. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 13, 78-81.
- Palukaitis, P., Rossinck, M.J., Dietzgen, R.G., Francki, R.I.B., 1992. Cucurmosaic virus. *Advances in Virus Research*, 41: 281-348.
- Palukaitis, P., and Garcia-Arenal, F., 2003. Cucumber mosaic virus. AAB. *Descriptions of Plant Viruses*, No: 400.
- Pernezny, K., Roberts, P.D., Murphy, J.F., Goldberg, N.P., 2003. Compendiumof Pepper Diseases, The American Phytopathological Society.
- Pollard, D.G., 1973. Plant Penetration by Feeding Aphids (Hemiptera: Aphidoidea): A review. *Bulletin of Entomological Research*, 62: 631-714.
- Price, W.C., 1934. Isolation and Study of some yellow strains of cucumber mosaicvirus. *Phytopathology*, 24, 743-761.
- Raccah, B., Galon, A. and Eastop, V.F., 1985. The role of flying aphidvectors in the transmission of cucumber mosaic virus and potato virus topeppers in Israel.*Ann. Appl. Biol.*, 106: 451-460.
- Raj, S.K., Saxena, S., Hallan, V., Singh, B.P., 1998. Reverse transcriptionpolymerase chain reaction (Rtpcr) for Ddirect detection of Cucumber mosaic virus (CMV) in gladiolus. *IUBMB Life* 44 (1): 89–95.
- Rodriguez-Alvarado, G., Fernandez-Pavia, S., Creamer, S., Liddell, C., 2002. Pepper ttle virus Causing Disease in Chile Peppers in Southern New Mexico. *Plant Disease*. 86:603-605.
- Roossinck, M.J., 2001. *Cucumber mosaic virus*, a model for RNA virus evolution. *Molecular Plant Pathology*, 2(2), 59-63
- Roossinck, M.J., 2002. Evolutionary history of Cucumber mosaic virus deduced by phylogenetic analyses. *Journal of Virology*, 76 (7), 3382–3387.

- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Sarı, S., 2015. Samsun ilinde yetiştirilen yazlık sebzelerde enfeksiyon oluşturan Cucumber mosaic virus (CMV) izolatlarının karakterizasyonu ve konukçu-simptom-satellit RNA ilişkilerinin araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 89s.
- Sertkaya, G., Sertkaya, E., Daplan, N., 2003. Black nightshade (*Solanum nigrum* L.) As a host of Cucumber mosaic virus (CMV) in pepper crop in Hatay province of Turkey. Proceedings of 7th. EWRS (European Weed Research Society) Mediterranean Symposium, 6-9 May, Adana-Turkey, p129-130.
- Sertkaya, G. (2012). Studies on the Tomato mosaic virus (ToMV) on red pepper production areas in Hatay, Turkey. 9th National Symposium on Vegetable. 12-14 September, Konya, p223.
- Sertkaya, G., 2015. Hatay ili marul ve ıspanak alanlarında bazı virüslerin araştırılması. MKÜ, Ziraat Fakültesi Dergisi, 20 (1), 7-12.
- Soleimani, P., Hosseini, S., Hosseini, A., 2014. Distribution of same viral disease on pepper (*Capsicum annuum*) plants in Dezful fields from Iran. Bull. Env. Pharmacol. Life Sci., 3(4): 111-114.
- Svoboda, J., Svobodová-Leišová, L., 2012. Occurrence of viruses on pepper plantations in the Czech Republic. *Hort. Science*, 39(3), 139-143
- Şevik, M.A., 2011. Occurrence of pepper mild mottle virus in greenhouse grown pepper (*Capsicum annuum* L.) in the West Mediterranean region of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 10 (25), 4976-4979.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- Tanne, E., and Zimmerman-Gries, S., 1980. Cucumber mosaic virus on eggplant in Israel. *Plant Disease* 64:371-372.

- Tekinel, N., Dolar, S., Sağsöz, L., ve Salcan, Y., 1969. Mersin bölgesindeEkonomik bakımdan bazı sebzelerin virüsleri üzerinde araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni.9(1):37-39.
- Uzunogulları, N., ve Gümüş, M., 2015. Marmara Bölgesi'nde Bazı KültürBitkilerinde Doğal Enfeksiyona Neden Olan Hıyar Mozaik Virüsü (Cucumber mosaic virus, CMV)'nün Tespiti. Trakya University Journal of Natural Sciences, 16(1): 9-15, 2015 ISSN 2147-0294).
- Ünlü, Ş., Güldür, M.E., 2004. Şanlıurfa ilinde biberlerde Hıyar mozayik virüsü(CMV)'nün bulaşıklık oranının belirlenmesi.Hr. Ü.Z.F. Dergisi 8(3/4):83-89.
- Velasco, L., ve ark (2002). The complete nucleotide sequence and developmentof a differential detection assay for a pepper mild mottle virus (PMMoV) isolate that overcomes L3 resistance in pepper. *Journal of Virological Methods*, 106, 135-140.
- Vinayarani, G., ve ark (2011). Detection of mixed Infectionb of Tobamoviruses intomato and bell pepper by using RT-PCR and Duplex RTR-PCR. *International Journal of Plant Pathology*, 2(2),89-95.
- Wetter, C., Conti, M., 1988. *Pepper mild mottle virus*. CMI/AAB descriptions ofplant viruses: no. 330: p: 4
- White, P. S., Morelas, F. J., and Roossinck, M. J., 1995. Interspecific reassortment in the evolution of a cucumovirus. *Virology* 207, 334-337.
- Yao, Y.R., ve ark (2013). Molecular Detection of Pepper Viruses in SouthernVegetable Production Bases. *China Vegetables*, (10), 84-89.
- Yılmaz, M.A., Davis, R.F., 1985. Identification of viruses infecting vegetableCrops along the Mediterranean Sea coast in Turkey. *Journal of Turkish Phytopathology*, 14, 1-18.
- Yılmaz, M.A., Davis, R.F., Varney, E.F., 1983. Viruses on vegetable crops alongthe Mediterranean coast of Turkey). *Phytopathology*,73, 378.

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





ÖZGEÇMİŞ

31.07.1987’de Mersin’de doğdu. Lise öğrenimini Mersin Atatürk Lisesi’nde bitirdi. 2014 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü’nden Ziraat Mühendisi olarak mezun oldu. 2016 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı Fitopatoloji/Viroloji’de Yüksek Lisans eğitimine başladı.

Kariyer hedefi; kendi gelişimine yatırım yapmayı, alanında uzmanlaşmayı planlamakta, tek temennisi güzel işler yapmak, kendisine ve başkalarına faydalı olmak, Lisans eğitim sürecince edindiği bilgi ve becerilerini Bitki Koruma Yüksek Lisans programında edindiği bilgi ve birikimle geliştirerek hizmet edeceği kurumlara katkılarda bulunmaktır.



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 asetat (CH_3COOK) (5M)

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

Sodium asetat (CH_3COONa) (3M)

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

%70'lik Ethanol

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

Ek. 3.

Agaroz Jel Elektrophorezde 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. Ethidium Bromide

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