

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Behçet Kemal ÇAĞLAR

HIYAR MOZAİK VİRÜSÜ (CMV)’NÜN KAVUN (CMV-K), DOMATES (CMV-D), BİBER (CMV-B) İZOLATLARININ BİYOLOJİK, SEROLOJİK, MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE KARAKTERİZASYONU VE SATELLİT-RNA’ LERİN VİRÜS ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA, 2006

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HIYAR MOZAİK VİRÜSÜ (CMV)'NÜN KAVUN (CMV-K), DOMATES (CMV-D), BİBER (CMV-B) İZOLATLARININ BİYOLOJİK, SEROLOJİK, MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE KARAKTERİZASYONU VE SATELLİT-RNA'LERİN VİRÜS ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Behçet Kemal ÇAĞLAR
DOKTORA TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu tez, 28/04/2006 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği İle Kabul Edilmiştir

İmza.....	İmza.....	İmza.....
Prof. Dr. Mehmet Asil YILMAZ DANIŞMAN	Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU ÜYE	Prof. Dr. Özden ÇINAR ÜYE
İmza.....	İmza.....	
Prof. Dr. Semih ERKAN ÜYE	Doç. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR ÜYE	

Bu Tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç.Ü. Araştırma Fonu Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: ZF 2004 D 32

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

DOKTORA TEZİ

HIYAR MOZAİK VİRÜSÜ (CMV)'NÜN KAVUN (CMV-K), DOMATES (CMV-D), BİBER (CMV-B) İZOLATLARININ BİYOLOJİK, SEROLOJİK, MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE KARAKTERİZASYONU VE SATELLİT-RNA'LERİN VİRÜS ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Behçet Kemal ÇAĞLAR

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

Danışman : Prof. Dr. Mehmet Asil YILMAZ
Yıl : 2006, Sayfa : 89

Jüri : Prof. Dr. Mehmet Asil YILMAZ
Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU
Prof. Dr. Özden ÇINAR
Prof. Dr. Semih ERKAN
Doç. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR

Hıyar Mozaik Virüsü (CMV) *Bromoviridae* familyası içerisinde *Cucumovirus* cinsinin en önemli üyelerinden birisidir ve IA, IB ve II olarak üç alt grup içerisinde çok çeşitli ırklara sahiptir. CMV konukçu dizisi geniş bir virüs olup 85 familya içerisinde 1000'den fazla bitkiyi enfekte edebilmektedir. Ayrıca CMV satellit-RNA'lar için yardımcı virüs olarak rol almaktadır.

Araştırma Adana, Mersin, Hatay ve Şanlıurfa illerinde üretimi yapılan kavun, domates ve biberlerde zararlı CMV izolatlarının tanımlanmaları, sınıflandırılmaları, çoğalttıkları satellit-RNA'lerin büyüklüklerini ve satellit-RNA'ların virüs üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Yapılan surveylerle toplanan örnekler ELISA ile testlenmiş ve CMV ile enfekteli oldukları belirlenen kavun, domates ve biber bitkilerinden alınan örnekler mekanik inokulasyon yöntemi ile test bitkileri dahil olmak üzere kavun, domates, biber bitkilerine de aşılanmıştır. CMV izolatları enfekteli bitkilerden arılaştırılarak virionların elektrik ortamındaki hareket hızları kontrol edilmiştir. İzolatların RNA-1, RNA-2, kılıf proteini ve 2a proteinini kodlayan genleri üzerinde bazı bölgeler RT-PCR ile çoğaltılmıştır. PCR ürünleri RFLP çalışmasında *MluI*, *Eco RI*, *Hind III*, *Bam HI* ve *Msp I* endonükleaz restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve agaroz jelde görüntülenmiştir. Sonuçlar 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 simptomun satellit-RNA'den kaynaklanabileceğini, CMV-K' nın çapraz koruma (cross-protection)'da kontrol ajanı olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: CMV, RT-PCR, RFLP, Alt grup, Satellit-RNA

ABSTRACT

PhD THESIS

**CHARACTERIZATION OF MELON (CMV-K), TOMATO (CMV-D),
PEPPER (CMV-B) ISOLATES OF CUCUMBER MOSAIC VIRUS (CMV)
BY BIOLOGICAL, SEROLOGICAL, MOLECULAR METHODS AND
EFFECT OF SATELLITE-RNAS ON VIRUS**

Behçet Kemal ÇAĞLAR

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

Supervisor : Prof. Dr. Mehmet Asil YILMAZ
Year : 2006, Pages: 89

Jury : Prof. Dr. Mehmet Asil YILMAZ
Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU
Prof. Dr. Özden ÇINAR
Prof. Dr. Semih ERKAN
Ass. Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR

Cucumber Mosaic Virus (CMV) is a member of the genus *Cucumovirus* in *Bromoviridae* family and has many different strains in the subgroup IA, IB and II. CMV may infect over 1000 plant species in 85 plant families and has a role as helper virus for satellite-RNA.

The research was undertaken to identify and classify CMV isolates in three subgroups and determine molecular weight, and effects of satellit-RNA on virus infectivity on melon, tomato and pepper in Adana, Mersin, Hatay and Şanlıurfa cities.

The collected melon, tomato and pepper samples during the survey of 2003-2006 were tested by ELISA separately and found to be infected with CMV. Later these samples were inoculated to indicator plants as well as melon, tomato, pepper. The virions of different CMV isolates were purified from the infected plants and speed of virions was detected by electrophoresis. Some regions on RNA-1, RNA-2, coat protein and 2a protein genes of different isolates were amplified by RT-PCR. The PCR product fragments were digested by restriction enzymes *Mlu*I, *Eco* RI, *Hind* III, *Bam* HI and *Msp*I in RFLP researches and bands observed on agarose gel.

The results of research indicated that CMV-K, CMV-D and CMV-B isolates are belong to subgroup IA. Three of them support satellite-RNA 700bp molecular weight, CMV-K is a mild strain, the reason of symptom expression is the satellite-RNA on CMV-K and this isolates can be used as control agent of cross-protection.

Key words: CMV, RT-PCR, RFLP, Subgroup, Satellite-RNA.

TEŞEKKÜR

Hiyar mozaik virüsü (CMV)'nün kavun, domates, biber izolatlarının biyolojik, serolojik ve moleküler tekniklerle karakterizasyonu ve satellit RNA' lerin virüs üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla yaptığım doktora tez çalışmamın her aşamasında ihtiyacım olan bilgi ve ekipman desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Asil YILMAZ' a ve çalışmalarında bana gerekli olan desteği sağlayan ve özveri ile yardımcı olan sayın Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU' na, Doç. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR' e ve çalışmaların süresince laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Yard. Doç. Dr. Muharrem Arap KAMBEROĞLU, Araş. Gör. Mustafa KÜSEK ve Araş. Gör. Gökmen KOÇ' a çok teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi doktora çalışmalarım sırasında da maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen ve beni destekleyen babam, annem, ailemin tüm fertleri ve eşim Feray ÇAĞLAR' a çok teşekkür ederim.

Bunlara ek olarak projenin yürütülmesinde çalışmalarına maddi olarak sağlayan Ç.Ü. Araştırma Fonu Merkezine teşekkür ederim

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
 1.GİRİŞ	 1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
3. MATERYAL VE METOD	21
3.1.Materyal	21
3.1.1. Araştırmanın Yürütüldüğü Yer ve Bitkisel Materyaller.....	21
3.1.2. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Materyal	22
3.1.2.1. DAS-ELISA ve İmmunodiffusion Çalışmaları	22
3.1.3. Biyolojik Tanı Çalışmalarında Kullanılan Materyaller.....	22
3.1.4. Virion Analizi Çalışmaları ve Total Nükleik Asitlerin Elde Edilmesinde Kullanılan Materyaller.....	23
3.1.5. RT-PCR ve RFLP Çalışmalarında Kullanılan Materyaller	24
3.1.6. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyaller	24
3.2. Metod	25
3.2.1. Simptomolojik Gözlemler ve Örneklem	25
3.2.2. Test Bitkilerinin Yetiştirilmesi	25
3.2.3. Virüsün Mekanik İnokulasyon Yöntemiyle Taşınması.....	26
3.2.4. Serolojik Çalışmalar	27
3.2.4.1. DAS-ELISA Testi Çalışmaları	27
3.2.4.2. İmmunodiffusion Testi Çalışmaları	28
3.2.5. Virion Analizi Çalışmaları.....	29
3.2.6. Total Nükleik Asitlerin Elde Edilmesi	30
3.2.7. RT-PCR ve RFLP Çalışmaları	32

3.2.7.1. PCR İçin Materyalin Oluşturulması	32
3.2.7.1.(1). Hedef Nükleik Asitlerin Elde Edilmesi	32
3.2.7.1.(2). Primerlerin Oluşturulması.....	33
3.2.7.1.(3). Amplifikasyon Sırasında Kullanılan Kimyasalların Optimum Konsantrasyonlarının Ayarlanması	35
3.2.7.2. Hedef Bölgelerin Çoğaltılması (Amplifikasyon)	36
3.2.7.2.(1). CMV-K, CMV-D ve CMV-B İzolatlarının Ait Oldukları Alt Grubun Viral RNA–2 Geni Üzerinde Bir Bölgeye Göre Belirlenmesi	36
3.2.7.2.(2). CMV-K, CMV-D ve CMV-B İzolatlarının Ait Oldukları Alt Grubun Viral RNA–1 Geni Üzerinde Bir Bölgeye Göre Belirlenmesi ve Kısmi Karakterizasyonu.....	38
3.2.7.2.(3). CMV-K, CMV-D ve CMV-B İzolatlarının Ait Oldukları Alt Grubun Virüsün Kılıf Protein Geni Üzerinde Bir Bölgeye Göre Belirlenmesi	40
3.2.7.2.(4). CMV-K, CMV-D ve CMV-B İzolatları ile İnfekteli Kavun, Domates ve Biber Bitkilerinde Satelit RNA’lerin Varlığının ve Satelit RNA’lerin Molekül Ağırlıklarının Saptanması	41
3.2.8. Agarose Gel Elektroforez Çalışmaları	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	44
4.1. Simptomolojik Çalışmalar	44
4.1.1. CMV-K, CMV-D ve CMV-B İzolatlarının Test Bitkilerinde Neden Oldukları Hastalık Belirtileri	45
4.2. Serolojik Çalışmalar	54
4.2.1. DAS-ELISA Testi Çalışmaları	54
4.2.2. İmmunodiffusion Çalışmaları.....	55
4.3. Viron Analizleri	55
4.4. Moleküler Çalışmalar	57
4.4.1. CMV-K, CMV-D ve CMV-B İzolatlarının RT-PCR ve RFLP İle Farklılıklarının Saptanması ve Alt Grup Analizi.....	57

4.4.2. Satellit RNA Analizleri	63
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR.....	73
ÖZ GEÇMİŞ.....	83
EKLER.....	84

SİMGELER ve KISALTMALAR

A:	Adenine
APS:	Ammonium persülfate
<i>Bam</i> HI:	Endonükleaz restriksiyon enzimi
BSA:	Bovine Serum Albumin
Bp:	Base pair
C:	Cytosine
°C:	Santigrad derece
Cap:	Catabolite activator protein
CARNA:	Cucumber mosaic virus associated RNA
cDNA:	Komplementer Deoksiribonükleik asit
CMV:	Cucumber Mosaic Virus
CMV-B:	Cucumber Mosaic Virus- biber izolatu
CMV-D:	Cucumber Mosaic Virus- domates izolatu
CMV-K:	Cucumber Mosaic Virus-kavun izolatu
CP:	Coat Protein (Kılıf protein)
Da:	Dalton
dATP:	Deoksiadenozintrifosfat
dCTP:	Deoksisitidintrifosfat
dd:	Double distile
dGTP:	Deoksiguanozintrifosfat
DiECA-Na:	Sodyum dietildithiocarbamat
DNA:	Deoksiribonükleik asit
dNTP:	Deoksinükleotidtrifosfat
dsRNA:	Double stranded (çift iplikli)
dTTP:	Deoksitimidintrifosfat
<i>Eco</i> RI:	Endonükleaz restriksiyon enzimi
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA :	Enzim-Linked Immunosorbent Assay
G:	Guanine

gr:	Gram
H ₂ O:	Su
<i>Hind</i> III:	Endonükleaz restriksiyon enzimi
Kb:	Kilo base
kDa:	Kilo dalton
M:	Molarite
Mg:	Miligram
µl:	Mikrolitre
ml:	Mililitre
<i>Mlu</i> I:	Endonükleaz restriksiyon enzimi
mM:	Milimolar
M-MLV:	Moloney Murine Leukemia Virus
MNSV:	Melon Necrotic Spot Virus
Mol:	Mol
mRNA:	Messenger RNA
<i>Msp</i> I:	Endonükleaz restriksiyon enzimi
MW:	Molekül ağırlığı
Nm:	Nanometre
Nt:	Nükleotit
ORF:	Okunabilir açık alanlar
PAGE:	Polyacrilamid Gel Elektroforezi
PBS:	Potasyum fosfat-tuz tamponu
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG:	Polietilen Glikol
pH:	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
Pmol:	Pikomol
Pr:	Primer
PSV:	Peanut Stunt Virus
PVY:	Potato Virus Y
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA:	Ribonükleik asit

RNAse:	Ribonükleaz
rpm:	Dakikadaki devir sayısı
RT:	Reverse Transcriptase
Sat-RNA:	Satellit RNA
SDS:	Sodyum dodesil sulfat
SLS:	Sodyum lauril sarkosin
SspI:	Endonükleaz restriksiyon enzimi
SqMV:	Squash Mosaic Virus
T:	Thymine
TAE:	Tris Asetik Asit EDTA
Taq:	Termo stabil polimeraz enzimi
TAV:	Tomato Aspermy Virus
TBE:	Tris Boric Asit EDTA
TE:	Tris EDTA
TNV:	Tobacco necrosis virus
TMV:	Tobacco Mosaic Virus
ToMV:	Tomato Mosaic Virus
tRNA:	Transfer RNA
TSWV:	Tomato Spotted Wilt Virus
u:	Ünite
V:	Hacim
VPg:	Virion Protein G (RNA'nın 5' ucuna bağlı protein)
WMV-2:	Watermelon Mosaic Virus-2
W/V:	Ağırlık/hacim
ZYMV:	Zucchini Yellow Mosaic Virus

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan bitkisel materyallerin illere göre dağılımı.....	21
Çizelge 3.2. Mekanik inokulasyon çalışmasında kullanılan test bitkileri	23
Çizelge 4.1. CMV-K, CMV-D ve CMV-B İzolatlarının tanılanmasında kullanılan test bitkilerinin isimleri ve neden oldukları simptomlar	45

Şekil 4.1. Sağlıklı (A) ve CMV-K ile bulaşık (B,C) kavun	47
Şekil 4.2. Sağlıklı (A) ve CMV-K ile bulaşık (B,C) <i>N. glutinosa</i>	47
Şekil 4.3. Sağlıklı (A) ve CMV-K ile bulaşık (B) <i>N. tabacum</i> "Samsun"	48
Şekil 4.4. Sağlıklı (A) ve CMV-K ile bulaşık (B) <i>N. tabacum</i> "Xanthi"	48
Şekil 4.5. Sağlıklı (A) ve CMV-D ile bulaşık (B) domates.....	50
Şekil 4.6. Sağlıklı (A) ve CMV-D ile bulaşık (B,C,D) <i>N. glutinosa</i>	50
Şekil 4.7. Sağlıklı (A) ve CMV-D ile bulaşık (B) <i>N. tabacum</i> "Samsun"	51
Şekil 4.8. Sağlıklı (A) ve CMV-D ile bulaşık (B,C) <i>N. tabacum</i> "Xanthi"	51
Şekil 4.9. Sağlıklı (A) ve CMV-B ile bulaşık (B,C) biber	52
Şekil 4.10. Sağlıklı (A) ve CMV-B ile bulaşık (B, C, D) <i>N. glutinosa</i>	53
Şekil 4.11. Sağlıklı (A) ve CMV-B ile bulaşık (B,C) <i>N. tabacum</i> "Samsun"	53
Şekil 4.12. Sağlıklı (A) ve CMV-B ile bulaşık (B,C) <i>N. tabacum</i> "Xanthi"	54
Şekil 4.13. CMV-K (A,B,D), CMV-D (C) ve CMV-B (E) izolatlarının virion analizleri, negatif kontrol (F)	55
Şekil 4.14. CMV-K (A,D), CMV-D (B,E) ve CMV-B (C,F) izolatlarının virion analizleri, negatif kontrol (G).....	56
Şekil 4.15. PCR Marker (a) ve 650 bp'lik CMV-K (b), CMV-D (c), CMV-B (d) DNA bantları, negatif kontrol (e), PCR mix (f)	58
Şekil 4.16. DNA Marker 100 bp (a) ve 650 bp'lik CMV-K (b), CMV-D (c), CMV-B (d) DNA bantları. PCR Marker (e), <i>MluI</i> Enzimiyle muamele edilmiş CMV-K (f), CMV-D (g), CMV-B (h) DNA bantları	58
Şekil 4.17. DNA Marker 100 bp (a) ve 408 bp'lik CMV-K (b), CMV-D (c), CMV-B (d) DNA bantları, negatif kontrol (e), PCR mix (f)	60
Şekil 4.18. PCR Marker (a) ve 408 bp'lik CMV-K (b), CMV-D (c), CMV-B (d) DNA Bantları; PCR Marker (e), <i>MluI</i> Enzimiyle muamele edilmiş CMV-K (f), CMV-D (g), CMV-B (h) DNA bantları	60

Şekil 4.19. (A) PCR Marker, (B) DNA marker 100 bp (a) ve 194 bp'lik CMV-K (b), CMV-D (c), CMV-B (d) DNA bantları, negatif kontrol (e), PCR mix (f)	61
Şekil 4.20. DNA Marker 100 bp (a) ve 488 bp'lik CMV-K (b), CMV-D (c), CMV-B (d) DNA bantları, negatif kontrol (e) ve PCR mix (f)	62
Şekil 4.21. İzolatların çoğaltılan 488 bp'lik DNA'larının <i>Eco</i> RI (A), <i>Hind</i> III (B), <i>Bam</i> HI (C) ve <i>Msp</i> I (D) ile muamelesiyle elde edilen sonuçlar ...	62
Şekil 4.22. DNA Marker 100 bp (a) ve 700 bp'lik CMV-K (b) kavun, CMV-D (c) domates, CMV-B (d) biber CMV-Satellit RNA, negatif kontrol (e) ve PCR mix (f)	64
Şekil 4.23. CMV izolatları ile infekteli <i>N. glutinosa</i> (A) ve <i>N. tabacum</i> "Xanthi" (B) bitkilerinde satellit RNA. DNA Marker 1 kb (a) ve 700 bp'lik CMV-K (b), CMV-D (c), CMV-B (d) CMV-satellit RNA bantları, negatif kontrol (e), PCR mix (f)	64
Şekil 4.24. CMV-K (A), CMV-D (B) ve CMV-B (C) ile bulaşık <i>N. glutinosa</i>	65
Şekil 4.25. Marker 1 kb (a) ve CMV-K, CMV-D ve CMV-B ile infekteli <i>N. glutinosa</i> de 650 bp'lik CMV-K (b), CMV-D (c), CMV-B (d) RNA-2 bantları, negatif kontrol (e), PCR mix (f)	65

1. GİRİŞ

Bölgemizde yetiştirilen sebzelerden kavun, domates ve biber erken ve geç turfanda yetiştiricilik yönünden önemli sebzelerdendir. Vitamin deposu olmaları, her mevsim taze olarak ve ayrıca kurutmalık, salça, yoğunlaştırılmış su, konserve turşu, reçel, ketçap olarak tüketilmeleri nedeni ile hayatımızda önemli bir yere sahiptirler.

Türkiye'de 17.563.000 hektar işlenen ve ekilen tarla alanının 818.000 hektarında toplam 20.678.500 ton sebze üretimi yapılmaktadır. Yetiştirilen toplam sebzeler içerisinde kavun 1.735.000 ton, domates 9.820.000 ton, biber 1.790.000 ton (dolmalık ve sivri) ile önemli bir yere sahiptir. Araştırmanın yürütüldüğü Adana, Mersin, Hatay ve Şanlıurfa' da toplam 119.315 ha alanda sebze yetiştirilmekte ve bu alanda 152.058 ton kavun, 1.328.493 ton domates, 381.129 ton biber (dolmalık ve sivri) üretimi yapılmaktadır (Anonymous, 2003). Bu illerdeki kavun, domates ve biber üretim miktarları karşılaştırıldığında ülkemizin kavun üretiminin % 8.76 sının, domates üretiminin % 11.86 sının ve biber üretiminin % 21.29 unun bu illerden karşılandığı ve adı geçen illerin kavun, domates ve biber üretimin de Türkiye'de önemli bir yere sahip olduğu karşımıza çıkmaktadır.

Ülkemizde ve dünyada nüfusun hızla artması ve besin kaynaklarının giderek azalması daha fazla ürün yetiştirme zorunluluğunu da beraberinde getirmektedir. Sebze üretim alanlarının sınırlı olması nedeniyle birim alandan alınacak ürünün arttırılması ve mevcut miktarın korunması gerekmektedir. Bununla birlikte sebze tarımında üretimi ve daha fazla verim alınmasını engelleyen birçok canlı ve cansız etmen bulunmaktadır. Canlı etmenler içerisinde boyutu, kimyasal ve fiziksel yapısı, enfeksiyon şekli, bitki içerisindeki çoğalması, taşınması, simptom oluşturmaları ve etkin bir mücadelesinin olmayışı gibi yönleri ile virüs hastalıklarının özel bir önemi vardır (Agrios, 1997, Yılmaz ve Davis, 1984, Yılmaz ve ark., 1979 ve 1993).

Kültür bitkilerinde zararlı virüs hastalıkları içerisinde tütün mozaik virüsü'nden sonra en fazla konukçu çevresine sahip virüs hıyar mozaik virüsü (CMV) dür. Çok sayıda ırkının bulunması, doğada simptomların farklı biçimlerde ortaya çıkması ve simptomların oluşum şeklini etkileyen satellit RNA'lerin

çoğalmasına yardımcı olması hıyar mozaik virüsü (CMV)'nün araştırma konusu olarak seçilmesi fikrini vermiştir.

CMV *Bromoviridae* familyasının *Cucumovirüs* genusuna ait bir virüstür. Yaprak bitleri ile non-persistent olarak taşınmakta ve doğada birçok monokotiledon ve dikotiledon yabani ve kültür bitkisinde zararlara sebep olmaktadır. Doğada konukçuları üzerinde çok çeşitli simptomlara neden olduğu gibi latent olarak ta bulunmaktadır. CMV, alt grup I ve alt grup II olmak üzere iki ana alt gruba ayrılmaktadır. Alt grup I de kendi içerisinde IA ve IB olarak iki bölümde sınıflandırılmaktadır. Farklı alt gruplar içerisinde bulunan her ırk birbirinden farklı olarak biyolojik, serolojik ve genetik özelliklere sahiptirler ve bu farklılıklar virüsün doğadaki davranışlarını etkilemektedir. Örneğin; konukçular üzerinde farklı ırkların farklı simptomlar oluşturmaları ve ırkların virionlarının elektrikli ortamda farklı hareket etmeleri gibi davranışlar ortaya çıkmaktadır.

CMV satellit RNA'lerin çoğalmaları için yardımcı virüs fonksiyonuna sahip bir virüstür. Satellit RNA'ler doğada var olan ve bitki ile ilgileri olmayan, çoğalabilmeleri için yardımcı bir virüse bağımlı olan küçük nükleik asit molekülleridirler. Bu moleküller yardımcı virüsün genomu ile ilişkili olabilirler yada olmayabilirler, ancak genetik olarak yardımcı virüsün genomu ile benzerlik gösterebilirler. Her iki durumda da çoğalmaları, bitki içerisinde taşınmaları ve infeksiyon yapabilmeleri için yardımcı bir virüse ihtiyaç duyarlar yada bağımlıdır. Virüsün konukçuklarda oluşturduğu simptomların yapısını ve şiddetini etkileyerek hastalığın şiddetini azaltır yada arttırırlar. Simptomların şiddetini etkilemelerinin yanı sıra bazı satellit RNA'lar cross-protection yoluyla kontrol materyali olarakta kullanılmaktadır (Montasser ve ark., 1998; Monti ve ark., 1999).

Araştırma Adana, Mersin, Hatay ve Şanlıurfa illerinde CMV'nün kavun (CMV-K), domates (CMV-D) ve biber (CMV-B) izolatlarının altgrup analizlerini yapmak, satellit RNA'lerin varlığını ve molekül ağırlıkların saptamak amacıyla yapılmış ve CMV'nün zararının kavun, domates ve biberlerde artma nedenlerinin ve virüsle mücadele yollarının araştırılması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

CMV'nün ilk defa Amerika'da hıyar bitkisinde bulunduğu Doolittle tarafından 1916 yılında rapor edilmiştir (Brunt ve ark.,1990). CMV Bromoviridae familyası içerisinde *Cucumovirüs* genusuna ait bir virüstür (Martelli, 2003a). Cucumovirüsler 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.

Cucumovirüs genusuna ait virüsler bir çok yabancı ve kültür bitkisinde şiddetlisinden zayıf ırkına göre değişen ölçülerde bitkilerde bodurlaşma, yapraklarda mozaik ve bükülmeler şeklinde semptomlara neden olmaktadır. Bu virüsler çeşitli vektör böcekler (yaprak bitleri ile non-persistent olarak), mekanik inokulasyon, aşı ve tohum ile taşınabilmekte, fakat bitkilerin birbiriyle teması yoluyla taşınmamaktadırlar (Anonymous, 2002a).

Cucumovirüsler 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 °C, 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'ların 5' uçları bir adet cap, VPg proteini bulundurlar. RNA'ların 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 yada satellit RNA) nükleik asitler birlikte paketlenmişlerdir. RNA-3 üzerinde bulunan mRNA olarak isimlendirilen RNA-4 kılıf proteinini kodlamaktadır. Genomik RNA'ler tek tek paketlenmesinin yanı sıra RNA-4 ve RNA-3 birlikte paketlenirler (Lot, and Kaper, 1976). Sonuç olarak viral genom RNA-1, RNA-2 ve tek molekülden oluşan RNA-3 ve RNA-4 olmak üzere üç farklı partikülden meydana gelmiştir. CMV çok komponentli bir virüs, bitkiyi infekte edebilmesi için de partiküllerin hepsine ayrı ayrı ihtiyacı vardır. Virionlar % 78,8-81,6-6,84 oranında protein içerirler. Viral partiküllerin yapısal proteinlerinin büyüklüğü 24240-24370-24500 Da olup virüs yapısal olmayan proteinleri de kodlamaktadır. Yapısal olmayan proteinlerin en büyüğü, 30000-33150-36300 Da; ortanca olanı, 31000 Da ve en sonuncusu 9900 Da dur. Partiküller lipit içermemektedir. Virionların virüsün çoğalmasından bağımsız olarak yardımcı virüs özelliği bulunmaktadır (Anonymous, 2002a).

CMV 1000'e yakın değişik bitki türünde çok çeşitli simptomlar oluşturan geniş konukçu dizisine sahip bir virüstür (Palukaitis, P. ve ark., 1992; Kaper, J.M. Waterworth, H.E., 1981). Palukaitis ve arkadaşları da 1992 yılında CMV'nün yabancı ve kültür bitkileri içerisinde 800'den fazla sayıda bitki türünde zararlı olduğunu saptamışlardır. Aynı şekilde CMV'nün monokotiledon ve dikotiledon 85 bitki familyası içerisinde 800 den fazla bitki türünde zararlı olduğu 1992 yılında Palukaitis ve arkadaşları tarafından rapor dılmıştır (Alonso-Parados ve ark., 1998). Kaper ve Waterworth, (1981) tarafından CMV'nün tahıllarda, meyvelerde, sebzelerde ve süs bitkilerinde ekonomik kayıplara neden olduğunu bildirmişlerdir (Hsu ve ark.,2000).

Doğal konukçuları içerisinde çoğunlukla Cucurbitaceae, Fabaceae ve Solanaceae familyalarına bağlı *Arachis hypogea* (L.), *Capsicum annuum* (L.), *Cicer arietinum* (L.), *Citrullus vulgaris* (L.), *Commelina nudiflora* (L.), *Cucumis sativus* (L.), *Cucumis melo* (L.), *Cucurbita pepo* (L.), *Cucurbita maxima* (Dutch.), *Dioscorea alata* (L.), *Ipomoea batatas* (L.), *Lens esculenta* (Moench), *Lycopersicon esculentum* (Mill), *Musa sapientum* (L.), *Musa textilis* (L.), *Nicotiana tabacum* (L.),

Passiflora edulis, *Phaseolus spp.* (L.), *Pisum sativum* (L.), *Psophocarpus tetragonolopus* (L.), *Trifolium spp.* (L.), *Vicia faba* (L.), *Vigna angularis* (Willd), *Vigna radiata* (L.), ve *Vigna unguiculata* (L.) gibi bitkiler doğal konukçuları içerisinde yer almaktadır (Brunt ve ark., 1990).

Virüs bitkilerin yapraklarında hafiften şiddetliye doğru değişen mozaik, yaprak deformasyonları ile yada sadece bodurlaşma, yapraklarda eğrelti otu şeklinde (fearn leaf) yaprak deformasyonları (Kearney ve ark., 1990), yapraklarda ayak kabı bağı oluşumu, meyvelerde nekroz gibi belirtiler oluşturmaktadır (Blancard, 1988). Çoğunlukla konukçu ve virüs izolatına bağlı olarak bitkilerde büyüme bozukluğu, yanıklık, fan leaf, halkalı lekeler, meyvelerde yumuşamalar ve nekrozlarla birlikte bitki ölümleri (Hsu ve ark., 2000) ve üründe %50 oranında kayıplar ortaya çıkmaktadır (Kucharek, ve ark., 1998). CMV, cevizir menekşesinde belirtil oluşturmayan Broad Bean Wilt Virüsü ile birlikte aynı bitkiye aşılandığında latent biçimde belirtil oluşturmaktadır (Shukla ve ark., 1980).

CMV çok çeşitli yolla bitkiden bitkiye, bölgeden bölgeye ve ülkeler arasında taşınabilmektedir. CMV çok sayıda yaprak biti ile non-persistent olarak taşınmaktadır. Pollard, (1973) virüs'ün 80 den fazla, Palukaitis ve ark., (1992) virüs'ün 75 den fazla, Kaper ve Waterworth, (1981) virüsün 60'dan fazla yaprak biti türü ile non-persistent olarak taşınabildiğini rapor etmişlerdir. Yaprak bitleri içerisinde *Myzus persicae*'nin CMV'nün bazı izolatlarını *Aphis gossypii*'den daha etkili taşıdığı bildirilmiştir (Tanne ve Zimmernan-Gries, 1980). Türkiye'de muzlarda saptanan ve özçürüklüğüne neden olan iki virulent izolatın *A.gossypii* tarafından en fazla *M. Rosea* tarafından en az oranda taşındığı, *A fabae* ve *M. Rosea*'nın virüsü taşıdığı bildirilmiştir (Yılmaz, 1976).

Virüs aynı zamanda mekanik inokulasyon ve aşı yolu ile (Cohen ve ark., 1988) ve 19 farklı bitki türünün tohumları ile taşınmaktadır (Brunt ve ark., 1990). 1981 yılında Davis ve arkadaşları CMV'nün tohum kökenli olduğunu fasulye tohumlarını testleyerek ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada 1978 ve 1979 yıllarında 259 fasulye bitkisini ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ile testlemişler ve bütün bitkiler virüsten arı bulunmuştur. Aynı yöntem ile yapılan

tohum testlemelerinde 32 tohum içerisinde tek bir tohumda tohum kökenli CMV'nü saptamışlardır.

CMV yaklaşık olarak 29 nm çapında ve 180 alt ünitelerden (T= icosahedral simetri gösteren) oluşan ve çökeltme katsayıları yaklaşık 98S olan (Rossinck, 2001), polyhedral partiküllere (virionlara) sahip olup bu partiküller iplikli pozitif yüklü tek iplikli üç adet (RNA-1, RNA-2, RNA-3) genomik RNA'ı ve iki adet sub-genomik RNA'ı (RNA-4 ve 4A) paketlemektedirler. RNA-1 ve RNA-2 ayrı ayrı partiküller içerisinde paketlenmiş olup RNA-3 ve RNA-4 (Lot ve Kaper, 1976) 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.

Peden ve Symons, (1973) yapmış oldukları çalışmada CMV-Q ırkından 4 ana RNA izole etmişler ve bunları %2,4'lük polyacrylamide jelde görüntülemişlerdir. 16S ve 23S *Escherichia coli* ribozomal RNA'ı marker olarak kullanarak RNA-1, RNA-2, RNA-3 ve RNA-4'ün molekül ağırlıklarını sıvı jelde $1,30 \times 10^6$, $1,13 \times 10^6$, $0,78 \times 10^6$ ve $0,34 \times 10^6$ olarak; %98'lik formamide içerisindeki jelde $1,35 \times 10^6$, $1,16 \times 10^6$, $0,85 \times 10^6$ ve $0,35 \times 10^6$ Da olarak saptamışlardır. Araştırmacılar çalışma sonucunda üç büyük genin baklada lokal lezyona sebep olduğunu ve simptom oluşumunda bu üç genin hepsine birden ihtiyaç olduğu kanısına varmışlardır.

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 atfen Ding ve ark., 1995, 1996; Brigneti ve ark., 1998; Li ve ark., 1998). 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'nün bazı ırkları RNA-5 olarak isimlendirilen beşinci bir RNA'e sahiptir. Bu gen RNA-1 ve RNA-2 gibi genomik RNA'lerin 3' ucunda düzensiz olarak 300 nükleotidden oluşan CMV RNA-5 bulundurmaktadır (Galitelli, 2000 atfen Bancard ve ark.,1996, 1997).

Collmer ve Kaper 1985 yılında CMV'nün RNA-3 ve RNA-4'ün 3' uçlarında satellit RNA olarak isimlendirdikleri CARNA-5 saptamışlardır.

Genomik ve subgenomik RNA'lere ek olarak CMV'nün bazı ırkları çoğalması ve yayılması için tamamen viral genoma bağımlı ve satellit RNA (satRNA) şeklinde isimlendirilen küçük RNA'lere sahiptirler. Satellit RNA'ler herhangi bir temel fonksiyonu ile yardımcı virüsü desteklemezler. Ancak bazı satellit RNA'ler CMV tarafından bitki içerisinde sistemik olarak taşınırlar (Bernal, ve Garcia-Arenal, 1994). Bilinen CMV satellit RNA'ler 335-405 nt den oluşur ve fonksiyonel olarak görünüşte herhangi bir okuna bilird bölge (ORF) içermezler. Bu RNA'ler doğada çok çeşitli varyantlara sahiptirler ve bazen yardımcı virüs'ün neden olduğu hastalığın şiddetini arttırabilir veya azaltabilirler (Galitelli, 2000 atfen Garcia-Arenald ve Palukaitis, 1999).

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).

Daha sonra CMV'nün serolojik özellikleri ve kılıf protein geni nükleotid dizilimlerine göre alt grup I ve alt grup II diye iki alt gruba ayrıldığını, alt grup I içerisinde bir çok ırk üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda 26 CMV ırkının RNA-3 geninin 5' ucuna yakın bölgede çevrilmemiş bölgelerin bulunduğunu ve CMV'nün IA, IB ve II olarak alt gruplandırılması gerektiğini, 5' ucuna yakın bölgenin her alt grup için farklı olduğu saptanmıştır (Rossinck ve ark., 1999).

Rossinck 2002 yılında farklı RNA'ler üzerindeki 3 ORF'nin (Okunabilir açık bölge) hepsinin CMV'nün alt gruplandırılmasını açıklamadığını ve hepsinin kullanılamayacağını, genlerin evrimsel gelişiminde 1a ve 3a proteinlerini kodlayan ORF'lerin çok daha yoğun olduğu ve virüs'ün filogenetik sınıflandırılmasında 2a ve kılıf proteinin kodlandığı ORF'ler kadar rol alamadığını rapor etmiştir.

CMV izolatlarının farklı alt grup'lara dahil olup olmadıklarını saptamak amacıyla yapılan diğer bir çalışmada 30 CMV izolatının biyolojik (konukçu reaksiyonu), serolojik (ELISA), fiziksel (PAGE; Polyacryamide Gel Electrophoresis) yöntemler ile karakterizasyonu protein analizleri ve çift iplikli RNA (dsRNA) analizleri yapılmıştır. Bu çalışma sırasında kullanılan bütün yöntemler CMV'nün CMV-I ve CMV-II olmak üzere iki ana alt gruba ayrıldığını ve dsRNA analizine ve konukçu reaksiyonuna dayalı olarak alt grup CMV-I'inde CMV-Ia ve CMV-Ib diye ikiye ayrıldığını göstermiştir (Daniels ve Campbell, 1992).

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'si üzerinde 650 bplik bir bölgeyi (RW8) 5'-GGTTCGAA (AG)(AG)(AT)ATAACCGGG-3' ve (RV11) 5'-GTTTATTTACAAGAGCGTAC GG-3' dejenere primer'lerini kullanarak PCR yöntemi ile çoğaltmışlardır. Daha sonra PCR ürününü *MluI* restriksiyon enzimi kullanarak RFPL çalışmasına tabi tutmuşlardır. Bu enzimin tanıdığı ve kestiği bölgenin (A▼CGCG T / T GCGC▲A) varlığına yada bu bölgenin sayısına göre izolatları gruplandırmışlardır. RFLP çalışması sonucunda CMV-TTS, CMV-FL izolatlarının RNA-2 geninin çoğaltılan bölgesinde 470 bp ve 160 bp'lik iki parça ortaya çıkmış ve bu izolatlar alt grup IB ye, CMV-77 izolatında kesilen parça gözlenememiş ve bu izolat alt grup IA ya dahil

edilmiştir. CMV-77 izolatı CMV-Fny (alt grup IA) ile, CMV-TTS, CMV-FL izolatları CMV-Tfn (alt grup IB) ile aynı sonucu vermiştir. CMV-S (alt grup II) izolatında 320 bp, 170 bp ve 150 bp'lik üç tane fragment ortaya çıkmış ve bu da daha önceden belirtildiği gibi alt grup II'ye dahil edilmiştir. Bu yöntem ile 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.

Türkiye'de bağlardan toplanan CMV-YA200, limonlardan toplanan CMV-L43 ve İtalya'da portakallardan toplanan CMV-OR izolatlarının Paradies ve ark., (2000) tarafından biyolojik ve moleküler karakterizasyonu yapılmış ve bu izolatların hangi alt grup'a ait olduğu saptanmıştır. Araştırmada hedef nükleik asit olarak RNA-1 ve RNA-2 genomik RNA'nın belirli bir bölgesini spesifik primerler kullanarak RT-PCR-RFLP yöntemi ile çoğaltarak çoğaltılan bu bölgede *MluI* ve *SspI* restriksiyon enzimlerinin tanıdığı ve kestiği bölgenin var olup olmadığı kontrol edilmiş ve 2a proteinini kodlayan gen bölgesinde ayrıca karakterizasyonu yapılmıştır. Hedef olarak RNA-2 üzerindeki çalışmada kontrol izolat olarak CMV-FL (alt grup IB), RNA-1 üzerindeki çalışmada CMV-S (alt grup II) ırklarını kontrol olarak kullanmışlardır. Bu izolatlar dan nükleik asit izolasyonu yapmışlar ve yine Finetti Sialer ve ark., (1999)'nın kullandığı (RW8) 5'-GGTTCGAA(AG)(AG)(AT)A TAACCGGG-3' ve (RV11) 5'-GTTTATTTACAAGAGCGTACGG-3' dejenere primer'lerini kullanarak RNA-2 üzerinde 650 bp molekül ağırlığında bir bölgeyi, (R1-3') 5'-CATAGTC(CT)TT(GATC)ATAGAGGGGAACC-3' ve (R1-5') 5'-TGAAGGGAACGATGATGTTCG-3' dejenere primer'lerini kullanarak RNA-1 üzerinde 408 bp molekül ağırlığında bir bölgeyi PCR yöntemi ile çoğaltmışlardır. Daha sonra bu PCR ürünlerini *MluI* ve *SspI* restriksiyon enzimlerini kullanarak RFPL çalışmasına tabi tutmuşlardır. Bu enzimlerden *MluI* enziminin tanıdığı ve kestiği (A ▼ CGCG T / T GCGC ▲ A), *SspI* enziminin tanıdığı ve kestiği (AAT ▼ ATT / TTA ▲ TAA) bölgelerin varlığına ve bu bölgelerin sayılarına göre izolatları gruplandırmışlardır. RFLP çalışması sonucunda RNA-2 üzerinde yapılan çalışmada çoğaltılan PCR ürünleri *MluI* enzimi ile muamele edilmiş, CMV-YA200, CMV-L43 ve CMV-OR izolatların hiçbirisinde kesilen parça gözlenememiş bu izolatlar alt grup

IA ya dahil edilmiştir. Daha önceden rapor edilmiş gibi CMV-FL (alt grup IB) izolatında 470 bp ve 160 bp'lik iki parça elde edilerek bu izolat alt grup IB içerisinde yerini korumuştur. RNA-1 üzerinde yapılan çalışmada çoğaltılan PCR ürünleri *MluI* ve *SspI* enzimleri ile muamele edilmiş, CMV-YA200, CMV-L43 ve CMV-OR izolatların hiçbirisinde her iki enzim muamelesinde kesilen parça gözlenememiş bu izolatlar alt grup IA ya dahil edilmiştir. CMV-S (alt grup II) izolatında *MluI* enzimi ile muamelesi sonucunda 250 bp ve 150 bp'lik iki fragment elde edilmiş ve bu izolat alt grup II içerisinde yerini korumuştur. Çalışma sırasında ayrıca CMV-Fny ırkının 2035–2056 bölgesine komplementer 5'-TTACC(AG)AACTCATCAGA GAGTA-3' ve CMV-Fny ırkının 1864-1883 bölgesine komplementer 5'-TTTGC(AC)TGGTG(CT)TA(CT)GACAC-3' primerler kullanılarak CMV'nün RNA-2 üzerinde bulunan ve 2a proteinin kodlandığı 194 bp'lik bölge çoğaltılmışlar ve karakterize etmişlerdir. Çalışma sonucunda da 194 bp'lik bant elde etmişlerdir. Biyolojik çalışmalar sırasında CMV-YA200 izolatının *N. glutinosa*'da sistemik mozaik ve sistemik yaprak deformasyonu, *N. tabacum* "Xanthi"de sistemik mozaik ve sistemik nekrosis; CMV-L43 izolatının *N. glutinosa*'da sistemik mozaik ve sistemik yaprak deformasyonu, *N. tabacum* "Xanthi"de sistemik hafif mozaik ve CMV-OR izolatının *N. glutinosa*'da sistemik mozaik ve sistemik yaprak deformasyonu, *N. tabacum* "Xanthi"de sistemik mozaik simptomu oluşturduğu ve hiçbir izolatın domateste fearn lef simptomu oluşturmadığı rapor edilmiştir.

Singh ve ark., (1995) *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI* ve *MspI* restriksiyon enzimleri kullanılarak infectious chlorosis hastalığına sebep olan CMV alt grup I izolatlarının karakterizasyonu amacıyla yaptıkları bir çalışmada CMV-SL, CMV-LY ve CMV-MR izolatlarının alt grup analizlerini yapmışlardır. Araştırmada hedef nükleik asit olarak kılıf protein geni kullanılmış ve RNA'nın belirli bir bölgesi (Downstream): 5'-GCCGTAAGCTGGATGGACAA-3' ve (Upstream): 5'-TATGATAAGAAGCTTG TTTCGCG-3' primerler çifti kullanılarak RT-PCR-RFLP yöntemi ile çoğaltılmış ve bu bölgede *EcoRI* (G▼AATT C / C TTAA▲G), *HindIII* (A▼AGCT T / T TCGA▲A), *BamHI* (G▼GATC C / C CTAG▲G) ve *MspI* (C▼CG G / G GC▲C) restriksiyon enzimlerinin tanıdığı ve kestiği bölgenin varlığını kontrol etmişlerdir. Kullanılan primer çifti alt grup II için 499–502 bp'lik, alt grup I için 486-488 bp'lik

bir bölgeyi çoğaltabilmektedir. Araştırma sonucunda üç izolat *EcoRI* enzimi ile muamele edildiğinde CMV-SL ve CMV-MR izolatlarında herhangi bir kesilen bölgenin bulunmadığı, ancak CMV-LY izolatında kesilen bölgenin bulunduğu ve 329 bp ve 170bp'lik iki parçanın gözleendiği; *HindIII* ve *BamHI* enzimleri ile muamele edildiğinde üç izolatın hiçbirinde kesilen bölgenin bulunmadığı ve farklı parçaların gözlenmediği; *MspI* enzimi ile muamele edildiğinde CMV-SL ve CMV-MR izolatlarında kesilen bölgenin bulunduğu ve 337 bp ve 151 bp'lik iki parçanın, CMV-LY izolatında kesilen bölgenin bulunduğu ve 197 bp, 151 bp, 126 bp'lik üç parçanın gözleendiği ortaya çıkmıştır. Araştırmacılar bu sonuçlara dayanarak CMV-SL ve CMV-MR izolatlarının alt grup I'e ve CMV-LY izolatının alt grup II'ye ait olduğunu ortaya koymuşlardır.

Farklı CMV izolatları arasındaki serolojik ilişkilerin belirlenmesi amacıyla Xu ve Barnett, (1984) CMV-CA, CMV-D, CMV-S ve Peanut Stunt Virüs'ünün E, W yada T ırklarını CMV antiserumu kullanarak Gel Difüzyon testine tabi tutmuşlardır. Araştırmada CMV-CA ile CMV-D arasında herhangi bir serolojik farklılık bulunmamasına karşın CMV-CA ile CMV-S arasında serolojik farklılık saptanmıştır. Xu ve Barnett, (1984) Tomato Aspermy Virus (TAV)'den serolojik olarak farklı olan CMV-CA ile Peanut Stunt Virüs (PSV)'nin E, W yada T ırkları arasında da herhangi bir serolojik benzerlik olmadığını saptamışlardır.

CMV ve PSV serotiplerinin ve tanımlanması üzerine Ahmad ve Scott, (1985)'un yaptığı bir çalışmada 10 CMV ve 2 PSV izolatın konukçu reaksiyonu, semptomatolojik ve serolojik özellikler araştırılmış ve CMV izolatlarını konukçu dizisi ve semptomlarına ve serolojik ilişkilerine göre 2 gruba ayırmışlardır. Kıyaslanan bütün CMV Arkansas izolatlarının DTL serogrupa, PSV izolatlarının da W serogrupa ait olduğunu saptamışlardır.

Kuwite ve Purficull, (1982) mekanik inokulasyon, yaprak biti ile taşınan ve kanatlı fasulye de klorotik halkalı leke, bakla'da mozaik semptomlarına neden olan CMV-B ırkı ile CMV-Piers' yellow ırkını ve baklanın başka bir CMV ırkı arasında serolojik ilişki olduğunu rapor etmişlerdir.

Farklı alt gruplara ait CMV izolatlarının virionlarının elektrikli ortamdaki hareket hızlarının karşılaştırılması amacıyla Rodriguez ve ark., (1995)'nin yaptıkları

bir çalışmada CMV-35, CMV-SD1, CMV-Gi, CMV-Ke, CMV-Or, CMV-SD2 izolatlarını, kontrol olarak, elektrikli ortamda hızlı CMV-S (alt grup II) ve yavaş hareket eden CMV-P (alt grup I) izolatu kullanmışlardır. Kullanılan izolatların virionları saflaştırılmış ve %1,2'lik agaroz jelde 60V elektrik akımı verilerek 2 saat koşulmuştur. Çalışma sonucunda CMV-35, CMV-SD1, CMV-Gi, CMV-Ke, CMV-Or, CMV-SD2 izolatlarının virionları CMV-P (alt grup I) izolatu virionları ile aynı hızda hareket etmiştir. Bu sonuçla araştırmacılar bu izolatların alt grup I' e ait olduğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada izolatların konukçularda oluşturdukları belirtiler hakkındaki sonuçlarında; alt grup I izolatlarının çoğunun şiddetli mozaik ve yaprak deformasyonu oluşturduğunu rapor etmişlerdir.

Suzuki ve ark., (1991)'nın RNA-3'ün görevi ile ilgili olarak yapmış oldukları çalışmada CMV-Y ırkının RNA-1, RNA-2 ve RNA-3'ün bütün kopyasını modifiye edilmiş T7 promotor geni ile cDNA olarak klonlamışlardır. Genleri 5' ucuna yakın bölgedeki bu ekstra küçük viral olmayan nükleotitler RNA-1 ve RNA-2'nin infektivitesini azaltmış fakat RNA-3'ü etkilememiştir. RNA-3'ün 3a proteini ve kılıf proteinin kodlandığı bölgelerinde içine alacak şekilde RNA-3'ün bütün genomundan çeşitli cDNA mutantları elde edilmiş ve RNA-1 ve RNA-2 ile birlikte bütün bitkilerine aktarılmıştır. Bu mutantlar bitkide sistemik belirtiler oluşturmamıştır. RNA-3'ün N-terminal ucunda kılıf protein bölgesinde küçük değişiklik yapılan bir mutant bakla'da lokal lezyon ve tütünde lokal klorotik lekeler şeklinde belirtiler oluşturmıştır. Bu çalışmanın sonucunda 3a proteini ve kılıf proteininin CMV'nün bitki içerisinde uzun mesafelerde hareketini sağladığını ortaya koymuşlardır. Aynı şekilde Canto ve ark., (1997) RNA-3 üzerindeki küçük modifikasyonların bitkilerde sistemik mozaik belirtisi oluşumunu gerçekleştiremediklerini bildirmişlerdir.

Nagano ve ark., (1999) RNA-3 üzerinde farklı uçlarda kodlanmış olan 3a ve kılıf proteinlerinin birbirileri ile olan uyum ilişkisi virüsün hücreden hücreye hareketinden sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte Gal-On ve ark., (1994)'nın Fny-CMV ve Syn-CMV ırkları ile enfekteli bitkilerde bu ırkların 2a, 3a ve kılıf proteinlerini kodlayan genleri ve bu ırkların oluşturduğu sistemik belirtiler üzerinde yaptıkları araştırmalar, sistemik belirtiler gelişim hızının

virüsün çoğalma hızından daha çok hareket proteinlerinin çoğalma hızı ile ilişkili olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır

CMV'nün kılıf proteininin virüsün bitki içerisinde uzun mesafelere taşınmasında konukçuya özel bir rolü vardır ve *Cucumis sativus* CMV için sistemik bir konukçudur. Hıyarda sistemik simptom oluşturmamayan Tomato Aspermy Cucumovirus'unun 1 ırkı (1-TAV) hıyar bitkisine CMV ile birlikte aktarılmış ve bitkide çoğalması sağlanmıştır. Daha sonra yapılan testlerde TAV'ın bitkide muntazam olmayan kısmı yayılmasının CMV ile karışık enfeksiyonu ile sağlandığı sonucu ortaya çıkartılmıştır. Hıyar bitkisi ile 1-TAV RNA'sinin ve CMV'nün RNA-1, RNA-2 ve RNA-3'ün kombinasyonu sonucunda RNA-3'ün tek başına 1-TAV'ün bitkide uzun mesafelere taşınmasından sorumlu olduğunu bildirilmiştir. Araştırma sırasında CMV'nün 3a ve kılıf proteinini kodlayan bölgede bazı mutasyonlar belirlenmiş ve kılıf proteinlerinin konukçuya spesifik fonksiyonlar gösterdiği sonucunu ortaya koyulmuştur (Taliensky ve Garcia-Arenal, 1995).

CMV'nün kılıf proteinini kodlayan genin fonksiyonları üzerinde Perry ve arkadaşlarının 1994 yılındaki yapmış oldukları çalışmada virüsün Fny-CMV ve M-CMV ırklarını kullanarak *Aphis gossypii* ile taşıma denemesi yapmışlardır. Bu çalışma sonucunda kılıf protein geni üzerindeki genetik değişikliklerin virüsün yaprak biti ile taşınmasını etkilediğini ve kılıf protein geninin vektör böceklerle taşınmayı belirlediğini rapor etmişlerdir (Perry ve ark., 1994). Benzer çalışma Peryy ve ark. (1998) tarafından yapılmış ve sonuçta yaprak biti ile taşınan Fny-CMV ırkı ile yaprak biti ile çok zayıf olarak taşınan M-CMV ırkının kılıf proteinini kodlayan genlerde bazı genetik farklılıklar saptamışlardır.

Gould ve ark., (1978) arılastırdıkları CMV'ünde yaklaşık olarak 0.12×10^6 Da molekül ağırlığında RNA-5 ve Satellit RNA bulmuşlardır. CMV ve Tomato Aspermy Virus'ünün bu RNA'lerin çoğalması için yardımcı virüs olarak rol aldığını rapor etmişlerdir.

Satellit RNA'ler bitki ile tam olarak alakası olmayıp çoğalabilmeleri için yardımcı virüse bağımlıdır. Satellit'ler a)-kendine ait protein kılıf içinde bulunanlar (satellit virüs), b)-yardımcı virüsün protein kılıfı içerisinde bulunanlar (satellit RNA) olarak iki kategoriye ayrılırlar (Martelli, 2003b).

Viral satellit RNA'ler viral genomla birlikte genomun terminal ucuna benzeyen tek iplikli küçük mRNA'lerin bir molekülü olup çoğalması için özel bir yardımcı virüs bağımlıdır. Kendi genetik yapılarını kalıp olarak kullanarak bitki hücresinde çoğalırlar. Yardımcı virüsün çoğalması ile ilişki içerisinde simptomun oluşumunu etkilerler. Doğada iki çeşit satellit virüs olup bunların yardımcı virüsleri Tobacco necrosis virus (TNV) ve Tobacco mosaic virus (TMV). Bu satellit virüslerin her ikisi de 18 nm çapında ve yardımcı virüslerden farklı olan kılıf proteinlere sahip olup, sahip oldukları tek parçalı (monocistronic) genomik RNA'leri tarafından kodlanır (Martelli, 2003b)..

Satellit RNA'ler; a)-Yapısal olmayan ve fonksiyonları bilinmeyen proteinleri kodlayan büyük molekül ağırlığına sahip (yaklaşık 500K) ipliksi, tek parçalı messenger molekül (Nepovirüs satellitleri), b)-Daha küçük molekül ağırlığında (yaklaşık 200-250 K) messenger olmayan ipliksi molekül (Tombusvirüs ve Carmovirüs satellitleri), c)- Dahada küçük molekül ağırlığında (yaklaşık 150 K) ipliksi yada sarmal yapıda messenger olmayan molekül (Cucumovirüs, Nepovirüs ne Sobemovirüs satellitleri) olmak üzere doğada üç tipte bulunmaktadır (Martelli, 2003b).

Satellit RNA'nın CMV'nün üzerindeki etkileri üzerine Valencia'da domateslerde nekrogenik sendromun ortaya çıkmasına kadar yapılan surveylerde İspanya CMV izolatlarının satellit RNA bulundurmadığını ve bu sendrom ortaya çıktıktan sonra CMV domates izolatının nekrogenik satellit RNA'lerin çoğalmasını destekledikleri satellit RNA'nın domateslerde virüsün simptom şiddetini arttırdığını ortaya koymuşlardır. Bu sendromun ortaya çıkmasından sonra virüsün satellit RNA varyantlarını destekleyerek çoğalttıkları ve domateslerde epidemelere sebep olduğunu ve çalışma sonucunda CMV-satRNA'nın CMV'nün epidemiyasına neden olduğunu rapor etmişler ve virüsle mücadelede virüsün simptom şiddetini azaltıcı satellit RNA'lerin biyolojik kontrol malzemesi olarak kullanılmasını önermişlerdir (Alonso-Prados ve ark., 1998).

Doğal ve 390 nt molekül ağırlığına sahip satellit RNA'yi destekleyen bir CMV domates meyve nekrozu hastalığı (CMV-Tfn)'ni oluşturmak için cam serada deneme koşullarında kullanılmıştır. Bu virüs domateslerde iletim demetleri ve

meyvelerde meyve nekrozu hastalığının oluşturduğu simptomların hemen hemen aynısını oluşturmuştur. Diğer yandan satellit RNA domatesta virüsün arazideki tipik simptomlarının hafiflemesini sağlamıştır. Bu çalışma ile CMV-satRNA'lerinin yeni bir biyolojik özelliği ortaya konmuştur (Crescenzi ve ark., 1993).

Satellit RNA'lerin doğada az oranda farklı baz dizilimine sahip çeşitlerinin bulunduğunu ve bu küçük farklılığın patojenite üzerinde olumsuz etkilerinin olabileceğini ve bu farklı satellit RNA'lerin kendi yardımcı virüslerin kontrolünde kullanılabileceği Moriones ve ark.(1991) tarafından bildirilmiştir. Yine doğada genetik olarak çok küçük farklılıklarda satellit RNA'lerin bulunduğunu ve küçük genetik farklılıkların farklı konukçularda CMV-satRNA'ler üzerinde çok büyük etkilerinin olabileceği rapor edilmiştir (Garcia-Arenal ve ark., 1987).

Palukaitis ve Zaitlin, (1984) yapmış oldukları çalışmalar sonucunda CMV'nün domateslerde çok iyi karakterize edilmiş nekrotik simptom oluşturmayan G-satRNA ile nekrotik simptom oluşturan n-CARNA-5'ler ve ayrıca baz dizilimi yakın ve domateslerde nekrotik simptoma sebep olmayan yeni 2 çeşit B-satRNA ve WL-satRNA'lerini saptamışlardır. B-satRNA ve WL-satRNA'leri birkaç nükleotid farklılığı olmasına karşın genetik olarak birbirleri ile G-satRNA ve n-CARNA-5'lerin benzerliğinden daha fazla yakın olduklarını, buna karşın B-satRNA ve WL-satRNA'lerinin genetik olarak G-satRNA'ya n-CARNA-5'dan daha yakın olduklarını ortaya koymuşlardır. WL-satRNA CMV'nün domates bitkilerinde bulunması ile beyaz yapraklığa sebep olmaktadır (Gonsalves ve ark., 1982).

CMV'nün D-sat RNA (D-sat) populasyonlarının büyük oranlarda genetik farklılığa sahip bölgeler bulundurmaları bu moleküllerin dikkate değer bir şekilde birbirinden ayrılmasını sağlamaktadır. Bu RNA'ler farklı bitkilere aktarıldıkları zaman bitki içerisinde yardımcı virüsün desteği ile çoğalmakta ve bu çoğalan RNA'ler doğada bulunan orijinal genetik yapıdan farklı olabilmektedir (Kurath ve Palukaitis, 1990).

Daha sonra İspanyada CMV epidemileri süresince CMV satellit RNA'lerin genetik çeşitliliğini saptamak amacıyla 1989, 1990 ve 1991 yıllarında 62 çeşit CMV-satRNA varyantının karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışma sonucunda CMV-satRNA'lerin evriminin epidemileri de beraberinde getirdiğini ve büyük genetik

farklılığa sahip CMV-satRNA'lerin çok çeşitli popülasyonları oluşturduğunu ve bunun yıldan yıla artacağı saptanmıştır (Aranda ve ark., 1993).

İspanya'nın doğusunda 1986 ve 1992 yılları arasında CMV ve CMV satellit RNA'ler domates nekrotik hastalığı epidemilerine sebep olmuştur. 1989'dan önce ortaya çıkan domates nekrotik hastalığı 1991 den sonra komple ortadan kaybolmuştur. Bu sonuçtan sonra CMV ve CMV satellit RNA ile infekteli bitkilerin analizleri bu virüslerin oluşturduğu nekrogenik fenotipler üzerinde yapılan çalışmaların sonucunda domates nekrotik hastalığının ortadan kaybolmasının satellit RNA popülasyonlarında ortaya çıkan genetik değişikliklerden kaynaklandığı ve satellit RNA'ların virüsün bitkilerde oluşturduğu simptom fenotipini etkilediği bildirilmiştir (Escriu ve ark. 2000).

Yine farklı satellite RNA varyantları üzerinde yapılan bir çalışmada 1988 ile 1993 yılları arasında İtalya'da CMV'nün epidemileri süresince 22 CMV satRNA'in primer yapısı ve biyolojik özellikleri araştırılmıştır. Bu CMV satRNA'lerden 11 tanesi'nin CMV alt grup II'e, 10 tanesi CMV alt grup I'e ve 1 tanesi de her iki alt grup ırklarına yakın bulunmuştur. Bu CMV satRNA'ler domates fidelerine inokule edildiğinde oluşan simptomların satellit RNA'lerin genetik yapılarına göre nekrotik simptom ve simptom oluşturmadağı gözlenmiştir. Bu sonuçla CMV satRNA'lardaki genetik farklılıkların simptom oluşumunda büyük etki gösterdiği bildirilmiştir (Grieco ve ark., 1997).

Satellit RNA'lerin CMV üzerindeki etkisi ile ilgili olarak 1995 yılında yapılan çalışmada satellit RNA'in Solanaceae ve kabakgiller familyasına ait bitkilerde CMV'nün miktarını etkilediği sonucu ortaya çıkmıştır. Satellit RNA'in bulunmadığı durumda her iki konukçuda son inokulasyondan 7 gün sonra CMV-Fny ve CMV-Sny ırklarının RNA'lerinin birikim seviyelerinin birbirine yaklaşık olduğu, 14 gün sonra CMV-Fny RNA'lerinin daha az olduğu, CMV-Sny birikiminin sadece tütünde CMV-Fny den daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Satellit RNA'lerin varlığı durumunda tütün ve kabakta inokulasyondan 7 gün sonra CMV-Fny ırkının RNA-1, RNA-2 ve protein çoğalmasının olumsuz yönde etkilendiği, ancak CMV-Sny ırkını etkilenmediği bildirilmiş olup 14 gün sonra CMV-Fny RNA'ları ve proteinleri her iki konukçuda azalmış, tünde CMV-Sny ırkının RNA-1 ve RNA-2' si azalmış fakat

kabakta etkilenmemiştir. CMV-Sny ırkı kabakta satellit RNA'ı desteklememektedir (Gal-on ve ark., 1995). Çalışmalar satellit RNA'lerin virüsün ırklarına ve konukçuya göre değişmek üzere virüsün bitkideki çoğalma miktarını etkilediği fikrini vermektedir.

Kearney ve ark.,(1990) satellit RNA'lerin CMV üzerindeki etkisi konusunda yaptıkları çalışmalar sırasında domateste morarma, sararma, nekrotik lezyon ve şiddetli bodurlaşmaya sebep olan yeni bir CMV-Chi ırkını ve bu ırkta aynı zamanda bir satellite RNA (sat-Chi) saptamışlardır. CMV-genomik RNA'lerinin satellite RNA'den ayrı olarak elde edilip bitkiye verilmesiyle domateste arazidekine benzer şiddetli belirtiler gözlemişler fakat nekrotik lezyon gözleyememişlerdir. Aynı bitkiye satellite RNA'lerin aktarılmasından sonra bitkilerde nekrotik belirtilerin oluştuğunu ve 6 haftada domateslerin öldüğünü gözlemlemişlerdir. Bu sonuçla satellit RNA'lerin CMV'nün bitkide belirti oluşumunu şiddetlendirdiğini rapor etmişlerdir. Benzer şekilde yapılan bir çalışmada (Takanami, 1981) tütünde parlak bir sarılık belirti oluşturan CMV'ünde büyük molekül ağırlığına sahip Satellit RNA bulunmuştur. Bu satellit RNA'ler izole edilmiş daha sonra satellit RNA bulundurmayan ve yeşil mozaik belirtiye sebep olan CMV ile karışık olarak tütün bitkilerine inokule edildiğinde bütün bitkilerde parlak bir sarılık belirti ortaya çıkmıştır. Burada parlak bir sarılık belirtiye sebep olan satellit RNA tarafından oluşturulduğu sonucuna varılmıştır.

Satellit RNA'lerin CMV'nün belirti şiddetini arttırmasının yanında bazı faydalı yönleri de bulunmaktadır. Bu tür satellit RNA'ler CMV'nün şiddetli ırkları ile mücadele etmek için karşılıklı koruma yönteminde kullanılabilmektedir. Bu konuda Montasser ve ark., (1998)'nın yaptıkları çalışmada satellit RNA'ı kullanarak CMV ile mücadele yolları araştırmışlardır. Faydalı yada iyi huylu bir satellit RNA'ı aşı maddesi yada ilk inokulum (preinokulum) kaynağı olarak CMV-S zayıf ırkı ile birlikte combine etmişler ve bu kombinasyonun arazi ve sera koşullarında biber ve kavun bitkilerinde CMV'nün şiddetli CMV-D ve CMV-16 ırklarının kontrol altına alınabilirliğini saptamışlardır. CMV-D ve CMV-16 ırkları biber ve kavunda %33-60 oranında ürün kayıplarına neden olmakta, CMV-S zayıf ırkı ise biberde çok az bir ürün kaybına neden olmakta ve kavunu hiç etkilememektedir. Araştırmacılar ılımlı

satRNA ve CMV-S kombinasyonunu farklı zamanlarda bitkilere aktarılmış ve daha sonra bu bitkilere şiddetli CMV-D ve CMV-16 ırkları verildiğinde bütün bitkilerin şiddetli CMV ırklarına karşı korunduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Uygulama yapılan biber bitkilerinden elde edilen ürün miktarı sağlıklı kontrol bitkilerdeki ürünün %80'i ve kavun bitkilerinde sağlıklı kontrol bitkilerdeki ürünün %100'ü olarak kaydedilmiştir. Bu çalışma ile ılımlı satellit RNA'lerin CMV'nün şiddetli ırkları ile biyolojik mücadelede kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

Monti ve ark., (1999) İtalya'da CMV'nün faydalı yada ılımlı satellit RNA'lerinin aktarıldığı domates bitkilerinde CMV'nün durumunu kontrol etmişlerdir. Testler süresince verimlilik, virüs yoğunluğu ve satellit RNA'in yayılmaları kontrol edilmiş ve sonuçta infekteli bitki içerisinde kontrol bitkilere oranla virüsün düşük olduğu, transgenik bitkilerde satellit RNA'lerin hastalık şiddetini arttırmadığını saptamışlardır. Bu şekilde ılımlı yada faydalı satellit RNA'lerin virüsle mücadelede kullanılabilişliği bir kez daha ortaya konmuştur.

Benzer çalışmalar Cillo ve ark., (2004) tarafından yürütülmüştür. CMV Tfn-satRNA'in faydalı yada ılımlı satellit RNA'i domates bitkilerine aktarılmış ve daha sonra bu bitkilere satRNA içermeyen CMV-FL ırkı verilmiştir. Bu transgenik bitkilerin simptom göstermemiştir. Aynı bitkiler başlangıçta nekrotik bir satellite RNA'i destekleyen CMV-77 ırkına hassastırlar. Burada iki türlü dayanıklılık tespit edilmiştir. Birincisi; Transgenik bitkilere CMV-FL inokule edildiği zaman simptomsuz fenotip Tfn-satRNA tarafından CMV'nün eksi yönde düzenlenmesi ile alakalıdır. Diğer yandan ikincisi; infekteli transgenik bitkilerde bulunan Tfn-satRNA'lerin yaklaşık 23 bazlık bir bölgenin 77-satRNA'e homolog olması ve 77-satRNA'in çoğalmasını ve akümüasyonunu engellemesi ile alakalıdır. Araştırmacılar satellit RNA'lerin bitkilere gen aktarımı yoluyla transfer edilmesi ile bu bitkilerin CMV'nün çeşitli ırklarına karşı dayanıklı hale getirilebileceğini ortaya koymuşlardır.

Satellit RNA'ler CMV'nü etkilediği gibi TAV'ün de etkilemektedir. Domates ve türün bitkileri 1-TAV ve V-TAV'lerinin her ikisi yada ayrı ayrı 6 çeşit CMV-satRNA (B1, B2, B3, G, Ix yada WL2) ile birlikte inokule edilmiştir. Araştırmada total satellit RNA miktarı, kapsitlenen satellit RNA'leri ve G-

satRNA'in karakterizasyonu araştırılmıştır. Diğer 5 satellit RNA'in çoğalması, simptomlara olan etkileri, TAV'ün çoğalmasına olan etkileri, TAV genomik RNA'lerinin paketlenme süresini değiştirmek gibi fonksiyonları karşılaştırılmıştır. Her iki yardımcı virüs için satellit RNA'lerin yayılımı ve birikiminin aynı olmasına karşın B2 ve b3 satellit RNA'lerin paketlenmesi 1-TAV ile infekteli bitkide V-TAV'ne göre daha fazla bulunmuştur. Bu sonuç CMV satRNA'lerinin paketlenmeden de yayılabileceğini göstermektedir. Sistemik olarak infekteli yapraklarda CMV-satRNA'lerin birikimi V-TAV ve Ix-satRNA hariç bütün inokulasyonlarda saptanmıştır. V-TAV ve Ix-satRNA sadece inkule edilen yapraklarda protoplastlarda saptanabilmiştir. Ix-satRNA kapsid içerisinde saptanamamıştır. Bazı durumlarda CMV-satRNA'lerinin çoğalarak yapmış olduğu etkiden ziyade yayılımı yada kapsitlenme ile TAV'ün kontrolünde kullanılabilirliği sonucu ortaya çıkmaktadır (Moriones ve ark.,(1991).

CMV satellite RNA'ler fizyolojik ve biyolojik aktiviteleri yönünden RNA-5 (CARNA 5) ile benzerlik göstermektedir (Moosop ve Francki, 1978; Kaper ve Tousignant, 1977). Buna rağmen satellit RNA'den farklı olarak CARNA-5 domateslerde şiddetli bir nekrotik hastalığa neden olur. Satellit RNA çeşitli CMV ve TAV ile birlikte inokule edildiği zaman domateslerde sadece symptom şiddetinin artırılmasına sebep olmayıp, bazı zamanlar iyileştirici aktivitesi de bulunmaktadır. Bu iki RNA biyolojik aktivitelerindeki farklılığın RNA'lerin primer yapılarındaki bazı farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Moosop ve Francki, 1979).

Kabak (*Cucurbita pepo*) bitkisinde viral enfeksiyonlara neden olan CMV ve Zucchini sarı mozayik virüsü (ZYMV)'nün birlikte ve ayrı ayrı enfeksiyonları sonucunda infekteli bitki boyu, çiçek ve yaprak sayısı, orta ve genç yaprak alanının farklılıkların ortaya çıktığı bildirilmiştir (Vargün ve Ertunç, 1995).

Satellit RNA'lerin CMV ile infekteli bitkilerde PCR yöntemi ile saptanabileceği konusunda Grieco ve ark., (1997) primer seçimi yapmışlar ve bilinen bütün satellit RNA'lerin çoğaltımı için bunları tanıyabilen pr. A yada pr. Reverse: 5'-AAGGATCCGGGTCCTGT(ATC)(CT)(ACGT)GGAATG-3' ve pr. B yada pr. Forward: 5'-AAGGATCCGTTTTGTTTGT(AG)T(AG)GAGAATTGCG(CT)(AG)GAG-3' olarak isimlendirilen dejenere primerlerinin universal olduğunu ve

PCR çalışmasında kullanılabileceğini rapor etmişlerdir. Burada primerlerin 5' ucunda bulunan ve altı çizili olan AAGGATCC baz dizilimi primere sonradan ilave edilmiş ve *Bam*HI restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği bölgedir. Araştırmacılar çalışmaları sonucunda 334-340 nt'luk satellit RNA'ı çoğaltabildiğini rapor etmişlerdir. Aynı raporda başka araştırmacıların bildirilerine dayanarak CMV-TTS (alt grup IB)'nin 339 nt, CMV-Tfn (alt grup IB)'nin 390 nt satellit RNA'ın çoğaltılmasını sağladığını rapor etmişlerdir. CMV-satRNA'ın çoğaltılması için Monti, ve ark., (1999) (Forward): 5'-GTTTTGTTTG(AT)T(AG)GAGAATTGCG(CT)(AG)GAG-3' ve (Reverse): 5'-GGGTCCTGT(ATC)(CT)(ACGT)GGAATG-3' dejenere primer çifti kullanmışlardır. Çalışma sonucunda bu primerlerin kullanılması ile 300–400 bp' lik satellit RNA'ı çoğaltmışlardır.

Virüs'ün bulundurduğu beşinci RNA olan RNA-5, çoğaltılması için yardımcı virüse dayalı satellit RNA benzeri yada eksik RNA olarak isimlendirilmektedir. CMV'nün 6 ırkı ile yapılan çalışmada; tütüne verilen 5 izolatta büyük oranda RNA-5 tespit edilmiş, kabakta yapılan çalışmada küçük oranda RNA-5 saptanmıştır. Tütünde RNA-5'in virüsün simptom şiddetini, virüsün miktarını, özel aktivitelerini, virüsün bazı genomik RNA'ın (RNA-1) miktarını azalttığı ve yardımcı virüs'ün sentezinin baskı altına aldığı ortaya konulmuştur. CMV ile RNA-5'in miktarı virionlar ile alakalı olup yardımcı virüs ile konukçu bitkinin interaksiyonları ile alakalı olduğu bildirilmiştir (Kaper ve Tousignant, 1977).

Owens ve kaper, (1977) yaptıkları çalışmalarda CARNA5 (cucumber mosaic virus-associated RNA-5)'in iki adet düşük molekül ağırlığına sahip polipeptid kodladığını ve bu polipeptidlerle domateslerde ortaya çıkan letal nekrotik hastalığının alakalı olduğunu rapor etmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmanın Yürütüldüğü Yer ve Bitkisel Materyaller

Araştırma Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarı, iklimlendirme odası ve virüs araştırma serasında yürütülmüştür.

Araştırmalar sırasında kullanılan bitkilerin kaynağını Adana, Mersin, Hatay ve Şanlıurfa illeri, ilçeleri ve köylerindeki açık alanlarda ve seralarda ekimi yapılan ekonomik öneme sahip kavun, biber ve domatesler oluşturmuştur. CMV'nün önemli konukçuları arasında bulunan hıyar bitkisinin belirtilen alanlarda daha çok serada yetiştirilmesi nedeniyle virüsün hıyarda fazla zararı görülmemiştir. Bu nedenle hıyar araştırma içerisine alınmamıştır. Çalışmalarda kullanılacak CMV'nün kaynağını araştırma alanlarında yapılan surveyler sırasında CMV semptomu gösteren bitkilerden alınan 60 adet kavun, 62 adet domates ve 35 adet biber olmak üzere toplam 157 örnek oluşturmuştur (Çizelge 3.1). Seçilen örneklerin semptomlu genç yaprakları toplandıktan sonra numaralandırılıp etiketlenerek buz kutusu içerisinde laboratuara getirilmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan bitkisel materyallerin illere göre dağılımı

Türkçe Adı	Latince Adı	Adana	Mersin	Hatay	Ş. urfa
Kavun	<i>Cucumis melo</i> L.	27	8	20	5
Domates	<i>Lycopersicum esculentum</i> Mill.	8	30	18	6
Biber	<i>Capsicum annum</i> L.	6	6	11	12
Toplam		41	44	49	23

3.1.2. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Materyal**3.1.2.1. DAS-ELISA ve İmmunodiffusion Çalışmaları**

Yapılan serolojik çalışmalarda kullanılan hıyar mozaik virüsü (CMV), karpuz mozaik virüsü-2 (WMV-2), kavun nekrotik leke virüsü (MNSV), kabak mozaik virüsü (SqMV), tütün mozaik virüsü (TMV), domates mozaik virüsü (ToMV), patates Y virüsü (PVY) antiserumları Bioreba firmasından satın alınmıştır. Ayrıca CMV ve kabak sarı mozaik virüsü (ZYMV) antiserumları Dr. Herve LECOQ'dan, domates noktalı leke solgunluk virüsü (TSWV) antiserumu ise Dr. Georges MARCHOUX (Station de Pathologie Vegetale Domaine St-Maurice - B.P. 94 F-84143 Montfavet Cedex INRA FRANCE)'dan temin edilmiştir.

3.1.3. Biyolojik Tanı Çalışmalarında Kullanılan Materyaller

Serolojik (DAS-ELISA) çalışmaları sonucunda sadece CMV antiserumuna karşı pozitif veren 5 adet kavun, 9 adet domates ve 6 adet biber örnekleri test bitkilerine (Çizelge 3.2) mekanik inokulasyon yolu ile aşılanmıştır. Bu aşılama sonucunda kavun, domates, biber ve test bitkileri birbirinden farklı semptom gösteren birer adet kavun, domates ve biber örnekleri CMV-K (kavun izolatu), CMV-D (domates izolatu) ve CMV-B (biber izolatu) şeklinde kodlanmıştır. Bu izolatlar biyolojik tanı çalışmalarının ve araştırmanın ana materyalini oluşturmuştur. Biyolojik tanı çalışmalarında kullanılan, kavun, domates, biber ve test bitkileri viroloji laboratuvarına ait sera ve iklimlendirme odalarında yetiştirilmiştir.

Ayrıca mekanik inokulasyon çalışmasında porselen havan ve havaneli, 0,02M fosfat tamponu için gerekli olan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MERCK), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MERCK) ve Mercaptoethanol (Merk) kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Mekanik inokulasyon çalışmasında kullanılan test bitkileri

Türkçe Adı	Latince Adı	Çeşit
Kavun	<i>Cucumis melo</i> L.	Hibrid
Domates	<i>Lycopersicum esculentum</i> Mill.	Standart
Biber	<i>Capsicum annum</i> L.	Standart
Tütün	<i>Nicotiana glutinosa</i> L. <i>Nicotiana tabacum</i> L. <i>Nicotiana tabacum</i> L. <i>Nicotiana tabacum</i> L. <i>Nicotiana tabacum</i> L.	''Xanthi NC'' ''Xanthi'' ''Samsun NN'' ''Samsun''

3.1.4. Virion Analizi Çalışmaları ve Total Nükleik Asitlerin Elde Edilmesinde Kullanılan Materyaller

Serolojik ve biyolojik tanı çalışmaları sonucunda CMV ile bulaşık kavun, domates ve biber bitkilerinden çalışmaya dahil edilen CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatları ile bulaşık kavun, domates, biber ve test bitkilerinden toplanan örnekler CMV'nün partiküllerinin arılaştırılması ve virion analizi çalışmalarının ana materyalini oluşturmuştur. Bu çalışma CMV izolatlarının virionlarının elektrikli ortamdaki hareket hızlarının belirlenmesi ve aralarındaki farkın ortaya konması amacıyla yapılmıştır.

Total nükleik asitlerin elde edilmesi çalışmalarında CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının kavun, domates, biber ve test bitkilerine inokulasyondan 13-15 gün sonra bu bitkilerin genç yapraklarından elde örnekler kullanılmıştır. Çalışmada ayrıca CMV'nün virion analizi çalışmaları sonucunda elde edilen saf virüs partiküllerinin inokule edildiği infekteli bitkiler de kullanılmıştır.

Virion analizi çalışmaları ve total nükleik asitlerin elde edilmesi için gerekli olan tampon çözeltileri viroloji laboratuvarında hazırlanarak kullanılmıştır.

3.1.5. RT-PCR ve RFLP Çalışmalarında Kullanılan Materyaller

Total nükleik asit ekstraksiyonu çalışmaları sonucunda elde edilen farklı izolatlara ait nükleik asitler, çoğaltılması istenilen hedef nükleik asit materyallerinin kaynağını oluşturmuştur.

RT-PCR çalışmaları 200 µl'lik PCR eppendorf tüpleri, izolatlara ait RNA'lerin çoğaltılması amacıyla komplementer DNA (cDNA)'e dönüştürülmesi için kullanılan Reverse Transcriptase enzimi (M-MLV, 200u/µl), Reverse Transcriptase buffer (M-MLV buffer 5X), RNase inhibitörü (40/µl), dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP (100mM)), RNA'in hedef bölgesine spesifik tek iplikli oligonükleotid reverse primeri (İyontek marka) ve ayrıca cDNA'in çoğaltılması amacıyla gerekli yüksek ısıya dayanıklı (Termostabil) DNA polimeraz enzimi (Taq polimeraz, 5u/µl), MgCl₂ (25mM), PCR buffer (10X), ve RNA'in hedef bölgesine spesifik tek iplikli oligonükleotid forvard primer (İyontek marka) PROMEGA firmasından satın alınmıştır. Nükleik asitlerin çoğaltım işlemleri TECHN marka termocyle aleti kullanılarak viroloji laboratuarında gerçekleştirilmiştir.

RFLP çalışmalarında kullanılan nükleik asit materyallerinin kaynağını RT-PCR çalışmaları sonucunda çoğaltılan PCR ürünleri oluşturmuştur. Bu çalışmada PCR ürünlerini enzimatik reaksiyonlar ile kesmek amacıyla kullanılan restriksiyon enzimleri (*Mlu* I (Promega), *Eco* RI (Promega), *Hind* III (Promega), *Bam* HI (Promega) ve *Msp* I (Promega)) ve gerekli olan moleküler kimyasallar PROMEGA firmasından satın alınmıştır.

3.1.6. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyaller

Agaroz jel elektroforez çalışmaları ile kontrol edilecek olan materyal olarak total RNA ekstraksiyonu sonucunda elde edilen CMV izolatlarına ait total RNA'ler, RT-PCR çalışmaları sonucunda çoğaltılan DNA materyalleri ve RFLP çalışması sonucunda elde edilen nükleik asit parçaları kullanılmıştır. RT-PCR ve RFLP ürünlerinin molekül ağırlıklarının kontrolü için kullanılan PCR marker, 100 bp DNA marker, 1 kb DNA marker PROMEGA firmasından satın alınmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Simptomolojik Gözlemler ve Örnekleme

Adana, Mersin, Hatay ve Şanlıurfa illeri ve ilçe'lerinin açık ve sera ekim alanlarında yapılan surveylerde kavun, domates ve biber bitkilerinde CMV'nün tipik belirtileri aranmış ve virüs ile bulaşık olduğundan şüphelenilen kavun, domates ve biber bitkilerinin genç yaprakları toplanmıştır. Örnek alma sırasında plastik torbalar üzerine; örneğin alındığı yer, bitki çeşidi ve tarih yazılarak numaralandırılmış ve örnekler laboratuara getirilmiştir.

Bu örnekler laboratuarda ELISA yöntemi ile testlendikten sonra sadece CMV antiserumuna pozitif sonuç veren bitkilerin simptom gösteren genç yapraklarından alınan örnekler mekanik inokulasyon yolu ile test bitkilerine (Çizelge 3.2) ve aynı zamanda kavun, domates ve biber bitkilerine aşılanmıştır. İnokulasyondan sonra simptomolojik gözlemlere devam edilmiş ve simptomolojik gözlemler sırasında kavun, domates, biber ve test bitkilerinde birbirinden farklı simptom oluşturduğu saptanan örnekler seçilerek araştırma materyalini oluşturmak üzere CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatları şeklinde kodlanmıştır. Daha sonra bu izolatların değişik test bitkilerinde oluşturduğu semptomlardaki farklılıklar ortaya konmaya çalışılmıştır. Virüs semptomu göstermeyen ancak semptomun maskelenebileceğinden şüphelenilen bitkiler de serolojik yöntemlerle testlenmiştir.

Simptom gösteren ve göstermeyen bitkilerden alınan örnekler çalışma başlayıncaya kadar +4 °C de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Test Bitkilerinin Yetiştirilmesi

Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan test bitkileri (Çizelge 3.2)'nin ve kavun, domates ve biber bitkilerinin tohumları önceden metil bromit ile fumige edilmiş 1:1:1 oranında hayvan gübresi, toprak ve Ürgüp taşı karışımından oluşan elenmiş fide toprağına ekilmiştir. Kavun doğrudan 10 cm çapında ve 8,5 cm derinliğindeki plastik saksılara, domates, biber ve diğer test bitkileri plastik laboratuvar küvetlerine ekilmiştir. Bu saksı ve küvetler tohumlar çimleninceye kadar

iklimlendirme odasında bekletilmiştir. Tohumlar çimlenip şaşırtma boyuna gelince domates, biber ve diğer test bitkileri 10 cm çapında ve 8,5 cm derinliğindeki plastik saksılara şaşırtılmıştır.

Bitkilerin sağlıklı büyümeleri için gerekli makro ve mikro besin elementleri sulama suyuna ilave edilerek bitkilere verilmiştir. Değişik hastalık ve zararlılara karşı gerektiğinde pestisit uygulamaları yapılmıştır (Anonymous, 2002b).

3.2.3. Virüsün Mekanik İnokulasyon Yöntemiyle Taşınması

Araştırma alanlarında yapılan surveyler sırasında CMV simptomsu gösteren bitkilerden alınan örnekler laboratuarda DAS-ELISA ile testlendikten sonra yalnızca CMV antiserumuna karşı pozitif sonuç veren bitkilerden alınan yaprak örnekleri %0,1'lik 2-mercaptoethanol içeren 0,02 M Fosfat tampon (pH 7,0)'nu ile 1:5 (w/v) oranında porselen havanda ezilmiştir. Elde edilen ekstrakt 2 katlı tülbent ile süzildikten sonra önceden karborandum tozu serpilerek hazırlanan test bitkilerinin (Çizelge 3.2) yapraklarına aşılanmıştır (Yılmaz ve Davis, 1984). Aynı şekilde arılaştırma ve virion analizi sonucunda satellit RNA'lerden ayrı olarak elde edilen saf virüs partikülleri de aynı test bitkilerine aşılanmıştır. İnokulasyondan sonra karborandum tozu ve bitki özsuyu artıklarını uzaklaştırmak için bitki yaprakları piset kullanılarak çeşme suyu ile yıkanmıştır. Bu bitkilere mekanik inokulasyon yapıldıktan sonra 24–25 °C sıcaklık ve % 70–80 nem koşullarında yaklaşık 8.000 lux gün ışığı koşullarında, 16/8 (aydınlık/karanlık) periyodunda muhafaza edilmiştir. Bitkiler 1 ay süre ile periyodik olarak kontrol edilmiştir.

Mekanik inokulasyon çalışmaları kavun, domates ve biberde zararlı CMV'nü biyolojik yöntemle tanılamak ve CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının test bitkilerindeki simptomolojik özelliklerini ortaya çıkarmak ve araştırmanın çeşitli aşamalarında kullanılacak virüs inokulumunu çoğaltmak amacıyla yapılmıştır.

3.2.4. Serolojik Çalışmalar

3.2.4.1. DAS-ELISA Testi Çalışmaları

Araziden toplanan kavun, domates ve biber örnekleri ve mekanik inokulasyon yöntemi ile virüsün aşılandığı test bitkilerinden aşılamadan 2 hafta sonra bitkilerin siptom gösteren genç yapraklarından alınan örneklerin virüs ile bulaşık olup olmadığı DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) yöntemi ile testlenmiştir (Clark ve Adams, 1977). DAS-ELISA testinde kullanılan tampon çözeltileri Ek.1 de verilmiştir.

ELISA testi uygulamasında izlenen basamaklar sırasıyla:

a- Kaplama tamponu ile kullanılacak optimum konsantrasyona göre sulandırılmış γ -globulinden ELISA platenin her bir çukuruna 200 μ l konmuş ve plate üzeri kapatılarak 37 °C de 4 saat inkübe edilmiştir.

b- İnkübasyondan sonra yıkama tamponu ile tüm çukurlar üç kez yıkanmıştır. Yıkama tamponu üç dakika süreyle çukurlarda bekletilmiş ve ters çevrilerek plate boşaltılmıştır.

c- Alt alta gelecek şekilde her çift çukura 200 μ l örnek tamponu ile hazırlanmış örnekler düzenlenmiş plana göre konmuş ve platin üzeri kapatılıp +4 °C de bir gece boyunca inkübe edilmiştir.

d- İnkübasyondan sonra plateler yıkama tamponu ile tüm çukurlar üç kez yıkanmıştır. Yıkama tamponu üç dakika süreyle çukurlarda bekletilmiş ve ters çevrilerek plate boşaltılmıştır.

e- Konjugate tamponu ile optimum kullanılacak konsantrasyona göre sulandırılmış konjugatdan her bir çukura 200 μ l konmuş ve plate 37 °C de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır

f- İnkübasyondan sonra yıkama tamponu ile tüm çukurlar üç kez yıkanmıştır. Yıkama tamponu üç dakika süreyle çukurlarda bekletilmiş ve ters çevrilerek plate boşaltılmış ve kağıt havlu üzerine vurarak kuruması sağlanmıştır.

g- Substrat tamponunda taze olarak hazırlanmış substrattan (1mg/ml p-nitrophenyl phosphate) her bir çukura 200 μ l konmuş ve 30-60 dk 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 Medispec ESR 200 marka ELISA okuyucusu ile 405 nm dalga boyunda yapılmıştır.

Pozitif sonuç veren örnekler test bitkilerine periyodik olarak aşılanmış ve bitkiler araştırma sonuna kadar periyodik olarak testlenmiştir. Testlerde sağlıklı bitki, negatif kontrol, pozitif kontrol ve tampon çözelti kontrol kullanılmıştır. Pozitif kontrole yakın değer veren yada sağlıklı kontrol için 405 nm de elde edilen absorbans değerinin en az iki katı ve daha fazla absorbans değeri veren örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir (Barbara ve Riccioni, 1993).

3.2.4.2. İmmunodiffusion Testi Çalışmaları

CMV izolatlarının aşılandığı ve ELISA çalışmalarında pozitif sonuç alınan *N. glutinosa* test bitkilerinin symptom gösteren genç yapraklarından toplanan örneklerden virüsün virion analizi çalışması sonucunda elde edilen virüs partikülleri immunodifüzyon testine tabi tutulmuştur (BALL, 1990). Çalışma sırasında kullanılan tampon çözeltileri Ek. 2 de verilmiştir.

Agar ortamı %0,75gr Noble agar, %0,5 Sodyum acid ve 0,7M Fosfat tamponunda (pH 7,4) hazırlanmıştır. Petrilere dökülen agar ortamı donduktan sonra biri ortada altı tanesi de çevrede olmak üzere birbirinden uzaklığı ve çapı 4 mm olacak şekilde bir şablon yardımı çukurlar açılmıştır. Açılan çukurlarda bulunan agar parçaları aspiratör ucuna bağlanmış pastör pipeti ile alınmıştır.

Testlenecek CMV izolatları ile bulaşık örnekler 1 gr doku için 1 ml 0,1 M fosfat tamponunda (pH 7,2) bir havan yardımıyla ezilerek santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Örneklerin bulunduğu tüpler 5000 devir/dakika da 5 dakika santrifüj edilmiş ve sıvı faz bu çalışmada kullanılmıştır. Testlenecek örneklerle (sıvı faz) 250µl % 10' luk SDS ilave edilmiştir. Örnekler oda sıcaklığında 45 dakika inkubasyondan sonra belirlenen çukurlara konulmuştur. Ortadaki çukura ise antiserum, sulandırmadan veya içerisine %0,85 NaCl, %5 Bovine Serum Albumine bulunan 0,05 M Tris (pH 7,2) ile 1/2 oranında sulandırılarak konulmuştur. Örnekler ve

antiserumun çukurlara konulmasından sonra petriler 24 °C de nemli bir ortamda inkübe edilerek sonuçlar gözlenmiştir. Bu çalışma ile CVM-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının CMV antiserumu ile karşılaştığı zaman jelde oluşan bantların şekline bakılarak izolatların serolojik benzerlikleri ortaya konulmaya çalışılmıştır.

3.2.5. Virion Analizi Çalışmaları

Virüs partiküllerinin arılaştırma (purifikasyon) çalışmalarında Rodriguez-Alvarado ve ark., (1995)'nın önerdiği yöntem kullanılmıştır. Arılaştırma sırasında kullanılan tampon çözeltileri Ek. 3 de verilmiştir.

Çalışmada CMV izolatlarının inokule edildiği ve ELISA testlerinde pozitif sonuç alınan *Nicotiana glutinosa* test bitkisinden toplanan yapraklar kullanılmıştır. Çalışmada izlenen basamaklar sırayla;

a- İnokulasyondan 10-12 gün sonra infekteli tütün bitkilerinin yapraklarından 1,0 g taze doku alınarak 4 µl 2-mercaptoethanol içeren soğuk 2 ml 0,2 M Sodyum citrat (pH 6,5) tampon çözeltisi içerisinde soğuk havan ve havan eli ile ezilmiştir.

b- Homojen bir şekilde ezilen bitki özsuğu 15 ml' lik santrifüj tüplerine aktarılmış ve buz üzerine konulmuştur. Daha sonra her örneğin içerisinde 1,5 ml chloroform ilave edilerek 30 sn çalkalanmıştır.

c- Örnekler daha sonra 10.000 devir/dakika da 10 dk santrifüj edildikten sonra sıvı faz temiz santrifüj tüplerine aktarılmıştır.

d- Sıvı faz üzerine 1 hacim (V/V) %14 polietilen glikol (PEG 8.000) çözündürülmüş 0,2 M Sodyum sitrat (pH 6,5) tampon çözeltisi ilave edilmiştir. Karışım +4°C de bir gece bekletilerek çöktürülmüştür.

e- Süspansiyon 5.000 devir/dakika da 30 dk santrifüj edilip sıvı faz uzaklaştırılmıştır.

f- Pellet daha sonra 1 ml 5mM EDTA (pH 7,0), %5 sakkaroz içerisinde çözündürüldükten sonra tekrar 5.000 devir/dakika da 30 dk santrifüj edilmiştir.

g- CMV'nün virionlarını içeren sıvı faz +4°C saklanmak üzere yeni tüplere aktarılmıştır.

Elde edilen CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarına ait virionların elektrikli ortamdaki hareket hızlarının saptanması ve izolatların gruplandırılmasının yapılması için virionlar agaroz jel elektroforez yöntemi ile kontrol edilmiştir.

Virionların elektrikli ortamdaki hareket hızlarının saptanmasında kullanılan agaroz jel elektroforez çalışmasında Rodriguez-Alvardo ve ark., (1995)'nın virion analiz çalışmasında kullandığı yöntem kullanılmıştır. Jel %1,2 oranında agaroz'un 1X TAE içerisinde eritilmesiyle hazırlanmıştır. Çalışmada izlenen basamaklar sırasıyla;

a-Agaroz 360 mg agaroz 30 ml 1X TAE içerisinde eritilmiş ve daha sonra 60 °C ye kadar soğuduktan sonra önceden tarak yerleştirilmiş olan elektroforez tankına dökülmüş ve jelin polimerize olması için 45 dakika bekletilmiştir.

c-Donmuş olan jelden tarak dikkatlice çıkarılmış ve tank 1X TAE ile doldurulmuştur.

d-Jelde oluşan her çukura 3 µl yükleme tamponu (Promega) ve 15 µl CMV virionu içeren örnek yerleştirilmiştir.

e-Örnekler Jel içerisinde 2 saat süreyle 60 V, serbest miliamperde koşulmuştur.

f-Koşum işlemi bittikten sonra jel ethidium bromide (50 ng/ml) ile 20 dk boyanmış ve jeldeki fazla ethidium bromide uzaklaşınca kadar 12 dakika saf su içerisinde tutulmuştur. Daha sonra bantların görüntülenmesi için jel transilluminatör de kontrol edilmiştir.

3.2.6. Total Nükleik Asitlerin Elde Edilmesi

Bu çalışmada birbirine çok yakın olan 2 yöntem kullanılmıştır. Mekanik inokulasyondan 12 gün sonra virüsün aktarıldığı kavun, domates, biber ve diğer test bitkilerinin ELISA ile testlenmesi sonucunda pozitif sonuç alınan bitkilerin genç yaprakları total RNA izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

İlk yöntemde Hu ve ark.,(1995)'nın modifiye ederek kullandığı Haididi ve ark., (1993)'nın yönteminde bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan tampon çözeltileri Ek.4 de verilmiştir.

a-Mekanik inokulasyondan 12-15 gün sonra infekteli bitkilerin genç yapraklarından alınan örnekler (0,1 g örnek için 0,5 ml) ekstraksiyon tamponu içerisinde soğuk havan içinde havan eli yardımı ile ezilerek homojenize edilmiştir. Elde edilen bitki özsuğu santrifüj tüplerine konulmuş ve üzerine 1 havim fenol / chloroform / izoamylalkol (25:24:1) ilave edilmiştir.

b-Bu karışımın ve örneklerin bulunduğu tüpler 30 dakika süreyle buz üzerinde çalkalayıcıda karıştırılmış ve 10.000 devir/dakika da 10 dakika santrifüj edilmiştir.

c-Sıvı faz alınarak yeni tüplere aktarılmış ve üzerine 3 hacim %95' lik etil alkol ilave edilmiştir. Daha sonra tüplere her 1ml için 50µl sodyum asetat (3M) ilave edilmiş ve karıştırılarak nükleik asidin çökmesi için -70 °C de bir gece bekletilmiştir.

d-Örnekler daha sonra -70 °C'den çıkartılarak 14.000 devir/dakika da 15 dakika santrifüj edilmiş ve sıvı faz ortamdan uzaklaştırılmıştır.

e-Pellet 1X TE ile çözündürülmüş ve üzerine yine 3 hacim %95' lik etil alkol ilave edilmiş ve tekrar 14.000 devir/dakika da 15 dakika santrifüj edilerek 2'inci defa alkolle çöktürme işlemi yapılmış ve sıvı faz ortamdan ayrılmıştır.

f-Sıvı faz uzaklaştırıldıktan sonra eppendorf tüpleri kurutma kağıtları ile dikkatlice kurulanmıştır.

g-Elde edilen total RNA'ler 100 µl TE içerisinde çözülmüş ve kullanılıncaya kadar -70 °C de muhafaza edilmiştir.

İkinci yöntemde White ve Kaper, (1989)'in yöntemi uygulanmıştır.

a-Mekanik inokulasyondan 12-15 gün sonra bitkilerin genç yaprakları (0,2g) toplandıktan hemen sonra yada -70°C bekletildikten sonra porselen havan içerisinde sıvı azot ile açık yeşil renk haline gelinceye kadar ezilmiştir.

b- Ektrakt üzerine DİECA-Na içermeyen 3 ml ekstraksiyon tamponu ve 3 ml %0.1' lik 8-hydroxyquinoline ve chloroform içeren tampon çözeltisi ile doyurulmuş phenol ilave edilmiştir.

b-Örnekler 30 dakika süreyle çalkalayıcıda sallanmış ve 10 dakika 10.000 devir/dakika da santrifüj edilmiştir.

c-Sıvı faz alınarak yeni tüplere aktarılmış ve üzerine 3 hacim %95' lik ethanol ilave edilmiştir. Sonra tüplere 50µl sodyum asetat (3M) ilave edilmiş ve vorteks yapılarak -70 °C de bir gece bekletilmiştir.

d-Örnekler 12.000 devir/dakika da 15 dakika santrifüj edilerek elde edilen pellet 400 µl taze ekstraksiyon tamponu ile resüspanse edilmiştir.

e-Daha sonra örnekler ikinci bir ethanol çöktürmesine tabii tutulmuş ve pellet 8 M üre ve %0.3' lük bromphenol blue içeren 100 µl 1x TAE içerisinde çözülmüş ve kullanılıncaya kadar -70 °C de muhafaza edilmiştir.

3.2.7. RT-PCR ve RFLP Çalışmaları

RT-PCR çalışmalarında CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının genetik karakterlerinin ve aralarındaki genetik farklarının ortaya konması için RNA-1, RNA-2, polimeraz proteinini (2a) kodlayan genlerin farklı bölgeleri ve satellit RNA'leri çoğaltılmıştır. Çoğaltılan nükleik asit bölgelerinin özellikleri restriksiyon enzimleri yardımı ile ortaya konmuştur. Çalışmalarda araştırmacılar tarafından daha önce yapılan ve önerilen yöntemler kullanılmıştır.

Farklı genler üzerinde yapılan PCR çalışmalarında araştırmacıların kullandığı yöntemlerde bazı değişiklikler yapılmıştır.

3.2.7.1. PCR İçin Materyalin Oluşturulması

3.2.7.1.(1). Hedef Nükleik Asitlerin Elde Edilmesi

CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatları ile bulaşık kavun, domates ve biber ve test bitkilerinin genç yapraklarından elde edilen total RNA'ler 1/20 (V/V) oranında 1X TAE ile sulandırılarak hedef nükleik asit olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu RNA'ler RT-PCR çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.7.1.(2). Primerlerin Oluşturulması

Çalışmanın yapıldığı bölgedeki izolatların farklı genleri üzerindeki baz dizilimleri bilinmediği için literatür taraması sonucunda çoğaltılmak istenen genlerin farklı bölgelerine spesifik primerler, daha önceki yapılan çalışmalarda farklı araştırmacıların kullandığı ve spesifik olarak ortaya koydukları primer baz dizilimleri referans alınarak dizayn edilmiş ve sentezlettilerle purifiye ettirilmiştir. Çalışmada farklı ülkelerdeki çalışmalarda kullanılan 8 çift primer kullanılmıştır.

Öncelikle RT-PCR-RFPL yöntemi ile 3 farklı CMV izolatının farkını bulmak yada tanılamak ve sınıflandırmak için izolatların gruplandırma içerisinde hangi alt gruba ait olduğunu belirlemek amacıyla Finetti-Sialer ve ark., (1999)'nın RT-PCR-RFLP yöntemi ile CMV izolatlarının farklılıklarının ortaya konması için yapmış oldukları çalışmada kullandıkları dejenere primerler kullanılmıştır. Kullanılan (RW8) 5'-GGTTCGAA(AG)(AG)(AT)ATAACCGGG-3' (77,47 pmol/ µl, RNA 2' nin 618-637 bölgesine komplementer), (RV11) 5'-GTTTATTTACAAG AGCGTACGG-3' (67,07 pmol/µl, RNA 2' nin 1-22 bölgesine komplementer) primer çifti CMV'nün RNA-2 geni üzerinde 650bp lik bölgeyi çoğaltmak amacıyla kullanılmış ve bu bölge üzerinde *MluI* restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği A▼CGCG T / T GCGC▲A bölgenin varlığı yada yokluğuna göre CMV'nün kavun, domates ve biber izolatlarının IA, IB yada II alt gruplarından hangisine ait olduğu saptanmıştır.

Başka bir RT-PCR-RFLP çalışmasında Paradies ve ark., (2000)'nın CMV izolatlarının kısmi karakterizasyonu için yapmış oldukları çalışmada kullandıkları primerler baz dizilemleri dikkate alınarak sentezlettilerle purifiye ettirilmiştir. Kullanılan (R1-3') 5'-CATAGTC(CT)TT(GATC)ATAGAGGGGAACC-3' (80,65 pmol/µl, CMV-Fyn ırkının RNA 1 geninin 1121-1098 bölgesine komplementer), (R1-5') 5'-TGAAGGG AACGATGATGTTTCG-3' (81,01 pmol/µl, CMV-Fyn ırkının RNA 1 geninin 714-734 bölgesine komplementer) primer çifti CMV'nün RNA 1 geni üzerinde 408nt' lik bölgeyi çoğaltmak amacıyla kullanılmış ve bu bölge üzerinde *MluI* (Promega) restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği A▼CGCG T /T GCGC▲A bölgenin varlığı yada yokluğuna göre CMV'nün kavun, domates ve biber izolatlarının IA, IB yada II alt gruplarından hangisine ait olduğu araştırılmıştır. Aynı çalışmada yine

Paradies ve ark., (2000)'nın yapmış oldukları çalışmada kullandıkları 5'-TTACC (AG)AACTCATCAGAGAGTA-3' (81,03 pmol/μl, CMV-Fny ırkının 2035-2056 bölgesine komplementer) ve 5'-TTTGC(ACT)TGGTG(CT)TA(CT)GACAC-3' (84,22 pmol/μl, CMV-Fny ırkının 1864-1883 bölgesine komplementer) primerler kullanılarak CMV'nün RNA 2 geni üzerinde bulunan ve 2a proteinin kodlandığı 194 bp lik bölge çoğaltılmıştır.

CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının hangi alt gruba ait olduklarının belirlemek amacıyla yapılan diğer çalışmada Singh ve ark. (1995)'nın CMV alt grup I izolatlarının tanımlanması için kullanmış oldukları primerler kullanılmıştır. Pr.(Downstream): 5'-GCCGTAAGCTGGATGGACAA-3' (79,31 pmol/μl) ve Pr.(Upstream): 5'-TATGATAAGAAGCTTGTTCGCG-3' (84,01 pmol/μl) primer çifti CMV alt grup II izolatlarında 499-502 bp, CMV alt grup I izolatlarında 486-488 bp uzunluktaki bir bölgeyi çoğaltmaktadır. Yapılan çalışmada *Eco* RI (Promega), *Hind* III (Promega), *Bam* HI (Promega) ve *Msp* I (Promega) restriksiyon enzimleri kullanılarak çoğaltılan bölgede *Eco* RI enziminin tanıdığı ve kestiği G▼AATT C / C TTAA▲G bölgesinin, *Hind* III enziminin tanıdığı ve kestiği A▼AGCT T / T TCGA▲A bölgesinin, *Bam* HI enziminin tanıdığı ve kestiği G▼GATC C / C CTAG▲G bölgesinin ve *Msp* I enziminin tanıdığı ve kestiği C▼CG G / G GC▲C bölgesinin varlığı yada yokluğuna göre CMV'nün CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının IA, IB yada II alt gruplarından hangisine ait olduğunu saptanmıştır.

CMV-K, CMV-D ve CMV-B ile bulaşık kavun, domates ve biber bitkilerinde CMV Satellit RNA' nın varlığının ve bu satellit RNA nın moleköl ağırlığının saptanması amacıyla Monti ve ark., (1999)'nın CMV Satellit RNA yı çoğaltmak amacıyla kullandıkları (Upstream): 5'-GTTTTGTTTG(AT)T(AG)GAGAATTGCG (CT)(AG)GAG-3' (68,70 pmol/μl) ve (Downstream): 5'-GGGTCCTGT(ATC)(CT) (ACGT)GGAATG-3' (76,88 pmol/μl) dejenere primer çifti kullanılmıştır. Aynı primerler (Primer B) AAGGATCCGTTTTGTTTG(AT)T(AG)GAGAATTGCG(C T)(AG)GAG-3' (95,70 pmol/μl ve (Primer A): 5'-AAGGATCCGGTCCTGT(AT

C)(CT)(ACGT)GGAAG-3' (103,2 pmol/μl) baz dizilimi halinde 5' ucuna *Bam* HI enziminin tanıyabildiği AAGGTCC bölgesi bağlanılarak kullanılmıştır.

3.2.7.1.(3). Amplifikasyon Sırasında Kullanılan Kimyasalların Optimum Konsantrasyonlarının Ayarlanması

RT-PCR çalışmaları 200 μl'lik PCR eppendorf tüplerinde yapılmıştır. RNA'nın komplementer DNA'ye (cDNA) dönüştürülmesi için yapılan Reverse Transcriptase (RT) aşamasında 25 μl son hacim, cDNA'nın çoğaltılması için yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) aşamasında farklı çalışmalara göre 50μl yada 100μl son hacim kullanılmıştır.

RT-PCR çalışmalarında kullanılan total RNA miktarları, nükleik asit izolasyonu sonucunda elde edilen konsantrasyon dikkate alınarak sulandırılmış ve farklı araştırmacıların daha önceki yaptıkları çalışmalar dikkate alınarak farklı (1μl-3μl) miktarlarda kullanılmıştır (Grieco ve ark., 1997).

CMV'nün farklı izolatlarının karakterizasyonu için farklı genlerindeki hedef bölgelerinin çoğaltılması amacıyla sentezlettirilen primerler farklı pmol/μl konsantrasyonlarında purifiye edilmişlerdir. Amplifikasyon sırasında her primer pmol/μl konsantrasyonu ayarlanarak kullanılmıştır.

Viral RNA'nın cDNA'ye dönüştürülmesi amacıyla çalışmanın Reverse Transcriptase aşamasında kullanılan Reverse Transcriptase (M-MLV, stok 200u/μl) enzimi çalışma son hacminde 10u-20u, M-MLV Buffer (stok 5X) çalışma son hacminde 1X, RNase inhibitörü (stok 40u/μl) çalışma son hacminde 15u olacak şekilde kullanılmıştır (Cillo ve ark., 2004).

Çalışma amacına uygun olan hedef bölgelerin çoğaltımı için gerekli olan ve 100'er mM olarak satın alınan Deoksinükleotid trifosfat (dTTP, dATP, dGTP, dCTP)' lardan 20' şer μl alınarak 25 mM olan 80μl lik dNTP karışımına 120μl ddH₂O ilave edilmek suretiyle 200 μl ye tamamlanmıştır. Bu karışım sonucunda dNTP' ler 10 mM olarak elde edilmiş ve farklı araştırmacıların daha önceki çalışmalarına göre farklı miktarlarda kullanılmıştır (Monti ve ark., 1999).

Reverse Transcriptase çalışması sonucunda elde edilen komplementer DNA'in (cDNA) çoğaltılması sırasında kullanılan 25 mM MgCl₂ stok solüsyonu çalışma hacminde 1,5 mM, Mg Free Buffer (10X) son hacimde 1X olacak konsantrasyonda, Taq DNA Polimeraz (5u/μl) enzimi çalışmalara göre farklı miktarlarda (2,5u-5u) ve son olarak ddH₂O son hacmi tamamlayacak miktarda kullanılmıştır.

3.2.7.2. Hedef Bölgelerin Çoğaltılması (Amplifikasyon)

3.2.7.2.(1). CMV-K, CMV-D ve CMV-B İzolatlarının Ait Oldukları Alt Grubun Viral RNA-2 Geni Üzerinde Bir Bölgeye Göre Belirlenmesi

Bu çalışmada Finetti-Sialer ve ark., (1999)'nın RT-PCR-RFLP yöntemi ile CMV altgruplarının farklılıklarının belirlenmesi amacıyla yapmış oldukları yöntem kullanılmıştır.

Hedef genin çoğaltılması ve RFLP çalışmalarının yürütülmesi için aşağıdaki sıra takip edilmiştir:

a-Öncelikle 200μl lik PCR eppendorf tüpüne 3μl total RNA, 2 μl primer (RW8) 5'-GGTTCGAA(AG)(AG)(AT)ATAACCGGG-3' (50 pmol/μl,) ve 10μl ddH₂O konularak termocycle aletinde 95 °C de 3 dakika bekletilerek nükleik asitlerin denatüre olması ve düz bir iplik haline gelmesi sağlanmıştır. Tüpler termocycle dan alınarak hemen buz içerisine konulmuştur. Bu sayede tüp içerisindeki reverse primerin RNA üzerindeki hedef bölgeye yapışması sağlanmıştır. Daha sonra tüp içerisine 10 μl reverse transcriptase karışımı (1μl ddNTP, 0,1 μl M-MLV 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 inkube edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

Bu karışımdan (cDNA) 10 μl alınarak 2 μl dNTP(ATP,GTP,CTP,TTP), 5 μl PCR buffer (10X), 3μl MgCl₂ (25 mM), 0,5 u Taq polimeraz enzimi (5u/μl), 1μl primer (RW8) 5'-GGTTCGAA(AG)(AG)(AT)ATAACCGGG-3' (25 pmol/μl,), 2 μl primer (RV11) 5'-GTTTATTTACAAGAGCGTACGG-3' (50 pmol/μl ve 26μl

ddH₂O ile karıştırılmış ve 50 µl lik son hacimde PCR tüpüne konulmuştur. PCR tüpleri daha önceden programlanmış olan thermocycle aletine yerleştirilmiştir. Örneklere uygulanan thermocycle programı;

94 santigrat derecede 4 dakika 1 döngü

bağlı

94 santigrat derecede 30 saniye

64 santigrat derecede 1 dakika 35 döngü

72 santigrat derecede 2 dakika

bağlı

72 santigrat derecede 10 dakika 1 döngü

Çalışma sonucunda çoğaltılan nükleik asit'lerin sonuçlarının kontrolü 1X TBE de hazırlanan % 1,2'lik agaroz jelde yapılmıştır.

b-RT-PCR çalışması sonucunda elde edilen ve agaroz jel elektroforez yöntemi ile kontrol edilen farklı izolatlara ait DNA örnekleri, izolatların alt grup tayini için RFLP çalışmasına tabi tutulmuştur. Bu çalışmada

Çalışmada 10 µl PCR ürünü 16,3 µl ddH₂O, 2 µl RE 10X buffer, 0,2 µl Acetylated BSA (10 µg/µl) ile karıştırıldıktan sonra üzerine 0,5 µl (5u) *Mlu* I restriksiyon enzimi (10 u/µl) ilave edilerek hacim 20 µl ye tamamlanmıştır. Örnekler 37 °C de 3 saat inkube edildikten sonra 1X lik TBE (pH 8,3) da hazırlanmış % 1,2 agaroz jelde kontrol edilmiştir. Bu çalışmada PCR sonucunda elde edilen farklı izolatlara ait DNA'ler üzerinde *Mlu*I restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği A▼CGCG T / T GCGC▲A bölgenin varlığı yada yokluğuna göre CMV'nün CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının IA, IB yada II alt gruplarından hangisine ait olduğu araştırılmıştır.

3.2.7.2.(2). CMV-K, CMV-D ve CMV-B İzolatlarının Ait Oldukları Alt Grubun Viral RNA-1 Geni Üzerinde Bir Bölgeye Göre Belirlenmesi ve Kısmi Karakterizasyonu

Çalışmada Paradies ve ark., (2000)'nın farklı CMV izolatlarının kısmi karakterizasyonu amacıyla yapmış oldukları araştırma sırasında kullandıkları yöntem kullanılmıştır.

Hedef genin çoğaltılması ve RFLP çalışmalarının yürütülmesi için aşağıdaki sıra takip edilmiştir:

a-Öncelikle 200µl lik PCR eppendorf tüpüne 3µl total RNA, 2 µl primer (R1-3') 5'-CATAGTC(CT)TT(GATC)ATAGAGGGAACC-3' (50 pmol/µl,) ve 10µl ddH₂O konularak termocycle aletinde 95 °C de 3 dakika bekletilerek nükleik asitlerin denatüre olması ve düz bir iplik haline gelmesi sağlanmıştır. Tüpler termocycle de alınarak hemen buz içerisine yerleştirilmiştir. Bu sayede tüp içerisindeki reverse primer RNA üzerindeki hedef bölgeye yapışması sağlanmıştır. Daha sonra tüp içerisine 10 µl reverse transcriptase karışımı (1µl ddNTP, 0,1 µl M-MLV 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 75 dakika inkube edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

Bu karışımdan (cDNA) 2,5 µl alınarak 2 µl dNTP (ATP, GTP, CTP, TTP) (10mM), 5 µl Mg Free Buffer (10X), 3µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 u Taq polimeraz enzimi (5u/µl), 1µl primer (R1-3') 5'-CATAGTC(CT)TT(GATC)ATAGAGGGAA CC-3' (25 pmol/µl), 1 µl primer (R1-5') 5'-TGAAGGG AACGATGATGTTTCG (25 pmol/µl) ve 35 µl ddH₂O ile karıştırılmış ve 50 µl lik son hacimde PCR tüpüne konulmuştur. PCR tüpleri daha önceden programlanmış olan thermocycle aletine yerleştirilmiştir. Örneklerle uygulanan thermocycle programı;

94 santigrat derecede 4 dakika 1 döngü

bağlı

94 santigrat derecede 1 dakika

58 santigrat derecede 1 dakika 35 döngü

72 santigrat derecede 1 dakika

bağlı

72 santigrat derecede 10 dakika 1 döngü

Çalışması sonucunda çoğaltılan nükleik asit'lerin sonuçlarının kontrolü 1X TBE de hazırlanmış %2' lik agaroz jel de yapılmıştır.

b-RT-PCR çalışması sonucunda elde edilen ve agaroz jel elektroforez yöntemi ile kontrol edilen farklı izolatlara ait DNA örnekleri, izolatların alt grup tayini için RFLP çalışmasına tabi tutulmuştur.

Çalışmada 10 µl PCR ürünü 16,3 µl ddH₂O, 2 µl RE 10X buffer, 0,2 µl Acetylated BSA (10 µg/µl) ile karıştırıldıktan sonra üzerine 0.175 µl (0,175u) *Mlu* I restriksiyon enzimi (10 u/µl) ilave edilerek hacim 20 µl ye tamamlanmıştır. Örnekler 37 °C de 90 dakika inkube edildikten sonra 1X lik TBE (pH 8,3) de hazırlanmış %2' lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. Bu çalışmada PCR sonucunda elde edilen farklı izolatlara ait DNA'ler üzerinde *Mlu*I restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği A▼CGCG T / T GCGC▲A bölgenin varlığı yada yokluğuna göre CMV'nün kavun, domates ve biber izolatlarının kısmi karakterizasyonu ve IA, IB yada II alt gruplarından hangisine ait olduğunu saptanması hedeflenmiştir.

Aynı araştırma içerisinde Paradies ve ark., (2000)'nın yapmış oldukları çalışmada kullandıkları 5'-TTACC(AG)AACTCATCAGAGAGTA-3' (50 pmol/µl) ve 5'-TTTGC(ACT)TGGTG(CT)TA(CT)GACAC-3' (50 pmol/µl) primerler kullanılarak CMV'nün RNA 2 geni üzerinde bulunan ve 2a proteinin kodlandığı 194 bp' lik bölge çoğaltılmıştır.

3.2.7.2.(3). CMV-K, CMV-D ve CMV-B İzolatlarının Ait Oldukları Alt Grubun Virüsün Kılıf Protein Geni Üzerinde Bir Bölgeye Göre Belirlenmesi

Çalışma Singh ve ark. (1995)'nın CMV alt grup I izolatlarının tanılanması amacıyla kullandığı yöntemeye göre yapılmıştır. Hedef genin çoğaltılması ve RFLP çalışmalarının yürütülmesi için aşağıdaki sıra takip edilmiştir:

a-Öncelikle 200µl lik PCR eppendorf tüpüne 3µl total RNA, 2 µl primer (Downstream): 5'-GCCGTAAGCTGGATGGACAA-3' (50 pmol/µl,) ve 10µl ddH₂O konularak termocycle aletinde 95 °C de 3 dakika bekletilerek nükleik asitlerin denatüre olması ve düz bir iplik haline gelmesi sağlanmıştır. Tüpler termocycle de alınarak hemen buz içerisine yerleştirilmiştir. Bu sayede tüp içerisindeki reverse primer RNA üzerindeki hedef bölgeye yapışması sağlanmıştır. Daha sonra tüp içerisine 10 µl reverse transcriptase karışımı (1µl ddNTP, 0,1 µl M-MLV 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 inkube edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu karışımdan (cDNA) 2,5 µl alınarak 2 µl dNTP (ATP, GTP, CTP, TTP) (10mM), 5 µl Mg Free Buffer (10X), 3µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 u Taq polimeraz enzimi (5u/µl), 1µl primer (Downstream): 5'-GCCGTAAGCTGGATGGACAA-3' (25 pmol/µl,), 1 µl primer (Upstream): 5'-TATGATAAGAAGCTTGTTTCGCG-3' (25 pmol/µl) ve 35 µl ddH₂O ile karıştırılmış ve 50 µl' lik son hacimde PCR tüpüne konulmuştur. PCR tüpleri daha önceden programlanmış olan termocycle aletine yerleştirilmiştir. Örneklere uygulanan termocycle programı;

94 santigrat derecede 4 dakika 1 döngü

bağlı

94 santigrat derecede 1 dakika

58 santigrat derecede 1 dakika 35 döngü

72 santigrat derecede 1 dakika

bağlı

72 santigrad derecede 10 dakika 1 döngü

Çalışması sonucunda çoğaltılan edilen nükleik asit'ler 1X lik TBE (pH 8,3) de hazırlanmış %2' lik agaroz jelde kontrol edilmiştir.

b-RT-PCR çalışması sonucunda elde edilen ve agaroz jel elektroforez yöntemi ile kontrol edilen farklı izolatlara ait DNA örnekleri, izolatların alt grup tayini için RFLP çalışmasına tabi tutulmuştur.

Çalışmada 6 µl PCR ürünü 6 µl ddH₂O sulandırılmış ve 2 µl RE 10X buffer, 0,7 µl (7u) restriksiyon enzimi (10 u/µl) ilave edilmiştir. Enzimin geni hedef noktadan kesmesi için örnekler 37 °C 2 saat inkube edildikten sonra örnekler 1X lik TBE (pH 8,3) de hazırlanmış %2' lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. RFLP çalışması *Eco* RI, *Hind* III, *Bam* HI ve *Msp* I restriksiyon enzimleri ile ayrı ayrı yapılmıştır. CMV'nün kavun, domates ve biber izolatları virüsün kılıf protein geninin spesifik primer kullanılarak çoğaltılan bölgesinde büyüklüğü ve bu bölgede *Eco* RI enziminin tanıdığı ve kestiği G▼AATT C / C TTAA▲G bölgesinin, *Hind* III enziminin tanıdığı ve kestiği A▼AGCT T / T TCGA▲A bölgesinin, *Bam* HI enziminin tanıdığı ve kestiği G▼GATC C / C CTAG▲G bölgesinin ve *Msp* I enziminin tanıdığı ve kestiği C▼CG G / G GC▲C bölgesinin varlığı yada yokluğuna göre IA, IB yada II alt gruplarından hangisine ait olduğu araştırılmıştır.

3.2.7.2.(4). CMV-K, CMV-D ve CMV-B İzolatları ile İnfekteli Kavun, Domates ve Biber Bitkilerinde Satelit RNA'lerin Varlığının ve Satelit RNA'lerin Molekül Ağırlıklarının Saptanması

Çalışmada CMV'nün kavun, domates ve biber izolatlarında CMV Satelit-RNA' nın varlığının ve bu satelit RNA nın molekül ağırlığının saptanması amacıyla Monti ve ark., (1999), Cillo ve ark., (2004) ve Grieco ve ark., (1997)'nın CMV satelit-RNA yı çoğaltmak amacıyla kullandıkları yöntemler modifiye edilerek kullanılmıştır.

Satellit RNA'in çoğaltılması için yapılan PCR çalışmalarının yürütülmesi için aşağıdaki sıra takip edilmiştir:

3µl total RNA, 1 µl primer (Downstream): 5'-GGGTCCTGT(ATC)(CT) (ACGT)GGAATG-3' (50 pmol/µl,) ve ve 11µl ddH₂O 200µl lik PCR eppendorf

tüpüne konularak termocycle aletinde 95 °C de 3 dakika bekletilerek nükleik asitlerin denatüre olması ve düz bir iplik haline gelmesi sağlanmıştır. Tüpler termocycle den alınarak hemen buz içerisine yerleştirilmiştir. Bu sayede tüp içerisindeki reverse primerin RNA üzerindeki hedef bölgeye yapışması sağlanmıştır. Daha sonra tüp içerisine 10 µl reverse transcriptase karışımı (1µl ddNTP, 0,1 µl M-MLV enzimi, 5 µl RT-buffer, 0,3 µl RNase inhibitörü, 3,6 µl ddH₂O) ilave edilerek son hacim 25 µl ye tamamlanmıştır. Örnekler 37 °C de 1 saat inkube edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

Bu karışımdan (cDNA) 10 µl alınarak 2 µl dNTP (ATP, GTP, CTP, TTP) (10mM), 10 µl Mg Free Buffer (10X), 6µl MgCl₂ (25 mM), 1 u Taq polimeraz enzimi (5u/µl), 2µl primer (Downstream): 5'-GGGTCCTGT(ATC)(CT)(ACGT)GGAATG-3' (50 pmol/µl), 2 µl primer (Upstream): 5'-GTTTTGTTTG(AT)T(AG)GA GAATTGCG(CT)(AG)GAG-3' (25 pmol/µl) ve 67 µl ddH₂O ile karıştırılmış ve 100 µl'lik son hacimde tüplere konulmuştur. PCR tüpleri daha önceden programlanmış olan thermocycle aletine yerleştirilmiştir. Uygulanan thermocycle programı;

94 santigrat derecede 1 dakika

42 santigrat derecede 1 dakika 2 döngü

72 santigra derecede 1 dakika

bağlı

94 santigrat derecede 1 dakika

55 santigrat derecede 1 dakika 35 döngü

72 santigrat derecede 1 dakika

bağlı

72 santigrat derecede 10 dakika 1 döngü

Çalışması sonucunda çoğaltılan edilen satellit RNA'lar 1X lik TBE (pH 8,3) de hazırlanmış %1,5' lik agaroz jelde kontrol edilmiştir.

3.2.8. Agaroz Gel Elektroforez Çalışmaları

Agaroz jel elektroforez çalışması (Galitelli ve Minafra, 1994)'nın önerdiği yöntem dikkate alınarak yapılmıştır. Çalışmada kullanılan solüsyonlar Ek.5 de verilmiştir. İşlemler aşağıda belirtildiği sıraya göre yürütülmüştür.

a-Agaroz miktarı çalışmalara göre (%1,2 için 360 mg; %2 için 600 mg; %1,5 için 450 mg olacak şekilde) 30 ml 1x TBE yada 1x TAE içerisine konulmuştur.

b-Agaroz-TBE karışımı kaynayınca ve agaroz eriyinceye kadar mikrodalgalı bir fırın içerisinde ısıtılmış ve sonra hacim 30 ml' ye ayarlanmıştır.

c-Karışım tekrar 60 °C ye kadar soğumaya bırakılmış ve tank içerisine boşaltılarak tarak geçirilmiştir.

d-Jel donduktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkartılmıştır. Daha sonra jel'in üzerini 1-2 mm kadar kaplayınca kadar tank içerisine TBE ilave edilmiştir.

e- 15 µl örnek üzerine 3 µl yükleme tamponu ilave edildikten sonra toplam 18 µl karışım jel deki çukurlara dikkatli bir şekilde yerleştirilmiştir. İlk çukura araştırmalara göre değişik ticari markerlar (1µl yükleme tamponu +5µl marker) konulmuştur. Yükleme tamponundaki turuncu renk (orange G) jelin sonuna gelene kadar jel tankına 40V elektrik akımı verilmiştir.

f-Running işlemi tamamlandıktan sonra jel, oda sıcaklığında 10 dakika 100 ml H₂O +30 µl (10mg/ml saf su) ethidium bromide karışımı içerisinde boyanmıştır. Jeldeki fazla ethidium bromide uzaklaştırınca kadar 5 dakika saf su içerisinde tutulmuştur.

Sonuçlar transilluminatör de kontrol edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Dünyada ve Ülkemizde üretimi yapılan tek ve çok yıllık kültür bitkilerinde virüsler verdiği zarar, neden oldukları ürün kayıpları ve mücadelesindeki zorlukları bakımından hastalık etmenleri içerisinde ilk sırada yer almaktadır. Fungus, bakteri ve mikoplasma gibi hastalık etmenlerinin mücadelesinde kültürel kontrol yöntemlerinin dışında kimyasal kontrol yöntemleri kullanılabilmektedir. Virüslerin kontrolünde ise bu mümkün değildir. Virüslerin kontrol altına alınması veya zararın alt seviyeye indirilmesi ancak farklı kontrol yöntemlerinin birlikte kullanılması ile mümkün olabilmektedir. Çalışmanın yürütüldüğü kültür bitkilerinde CMV'nün hastalık oluşturması virüsün direk olarak kendisinden kaynaklandığı gibi satellit RNA olarak isimlendirilen ve CMV'nün yardımı ile bitkilerde çoğalan RNA'lerden da kaynaklanmaktadır. Satellit RNA'lerin bitkilerde CMV tarafından çoğaltılması belirti ve hastalık şiddetini etkilemekte ve zararı bir kat daha artırmaktadır. Bazı durumlarda satellit RNA'ler hastalığın şiddetini azaltmaktadır. Bu durum CMV'nün farklı alt gruplar içerisinde bulunan farklı ırklarına göre değişiklik göstermekte ve çoğaltıkları satellit RNA'lerin molekül ağırlıkları da birbirilerinden farklılık göstermektedir.

Çalışma süresince CMV'nün farklı izolatlarının hangi alt grup'a dahil oldukları, satellit RNA'lerin çoğalmasını destekleyip desteklemedikleri ve satellit RNA'lerin bu izolatlar üzerinde nasıl bir etkiye sahip oldukları biyolojik (mekanik inokulasyon), serolojik (ELISA ve İmmunodiffizyon testleri) ve moleküler (RT-PCR ve PCR ve RFLP) tanılama yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır.

Çalışma sonucunda elde edilen bulgular aşağıda açıklanmaktadır;

4.1. Simptomolojik Çalışmalar

Çalışmanın yapıldığı bölgedeki gözlemlerde CMV-K ile bulaşık kavun bitkisinde bitkinin vejetasyon döneminin başlarında yapraklarda kıvrılma, sistemik mozaik, yaprak deformasyonu, bitkide bodurlaşma ve gelişme geriliği gibi belirtiler ve bitki ölümleri gözlenmiştir. DMV-D ile bulaşık domates bitkilerinde yaprak

ayasının daralması, ayakkabı bağı oluşumu, eğrelti otu (fearn leaf), ve sistemik mozaik belirtileri, CMV-B ile bulaşık biber bitkilerinin yapraklarında kıvrılmalar, yaprak deformasyonu ve sistemik mozaik belirtileri gözlenmiştir.

4.1.1. CMV-K, CMV-D ve CMV-B İzolatlarının Test Bitkilerinde Neden Oldukları Hastalık Belirtileri

CMV izolatları klima odalarında hem izolatın elde edildiği kavun (*C. melo*), domates (*L. esculentum*), biber (*C. annum*) bitkilerine, hem de tanılamada kullanılan diğer test bitkilerine aşılanmıştır. CMV'nün konukçuları içerisinde bulunan *N. glutinosa*, *N. tabacum* "Xanthi NC", *N. tabacum* "Xanthi", *Nicotiana tabacum* "Samsun NN", *Nicotiana tabacum* "Samsun" gibi bütün bitkileri mekanik inokulasyon çalışmasında kullanılmıştır.

İzolatların bitkilere aşılandıktan sonra yapılan gözlemlerde kavun, domates, biber ve bütün test bitkilerinde CMV'nün tipik belirtileri ve buna ilaveten CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının test bitkilerinde çok az oranda farklı belirtiler oluşturdukları saptanmıştır (Çizelge 4.1.).

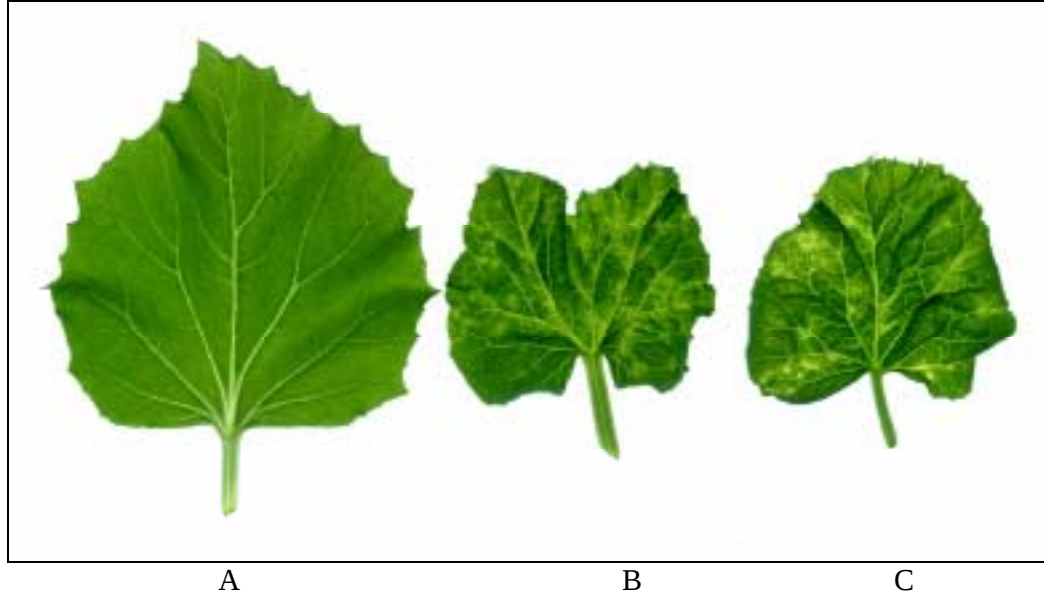
Çizelge 4.1. CMV-K, CMV-D ve CMV-B İzolatlarının tanılanmasında kullanılan test bitkilerinin isimleri ve neden oldukları belirtiler

Türkçe Adı	Latince Adı	Belirtiler		
		CMV-K	CMV-D	CMV-B
Kavun	<i>C.melo</i>	yd, yk, sm	yad, sm, ö	yad, sm, ö
Domates	<i>L. esculentum</i>	hyd, yad, sm	ysb, ab, fl, sm	yşb, ab, sm
Biber	<i>C.annum</i>	yk, yad, hsm	yk, yad, hsm	yk, db, hsm
Tütün	<i>N.glutinosa</i>	yşb, yad, yu, db, sm	yşb, yad, yu, yk, db, sm	yşb, yad, db, sm
	<i>N. tabacum</i> "Xanthi NC"	sm	sm	sm
	<i>N. tabacum</i> "Xanthi"	sm	sm	sm
	<i>N. tabacum</i> "Samsun nn"	sm	sm	sm
	<i>N. tabacum</i> "Samsun"	sm	sm	sm

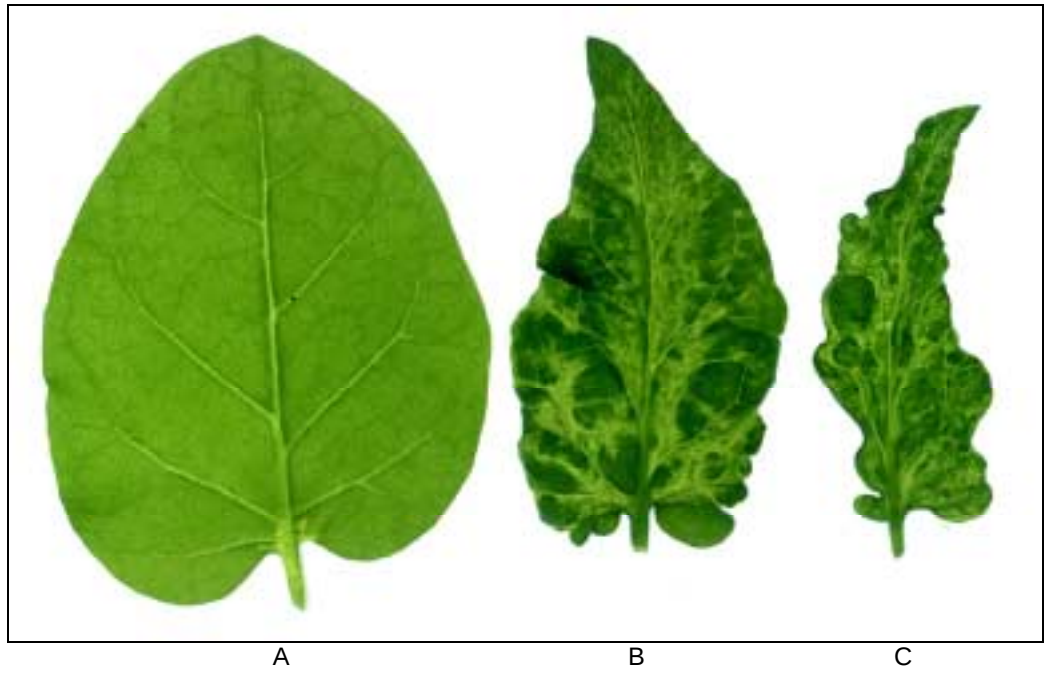
ab: ayakkabı bağı oluşumu, **db:** damar bandlaşması **fl:** fearn leaf,, **hsm:** hafif sistemik mozaik, **hyd:** hafif yaprak deformasyonu, **sm:** sistemik mozaik, **ö:** bitki ölümü, **yd:** yaprak deformasyonu, **yad:** yaprak ayası daralması, **ysb:** yaprak simetrisinin bozulması, **yşb:** yaprak şeklinin bozulması, **yk:** yaprak kıvrılması, **yu:** yaprak uzaması.

CMV-K izolatının kavun bitkilerinde yaprak deformasyonu, yaprak kıvrılması ve sistemik mozaik simptomsu oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1). *N. glutinosa* bitkisinde ise yaprak şeklinin bozulması, yaprak ayasının daralması ve uzaması, damar bantlaşması ve sistemik mozaik simptomsu (Şekil 4.2). *N. tabacum* ''Xanthi NC'', *N. tabacum* ''Xanthi'', *N. tabacum* ''Samsun nn'', *N. tabacum* L test bitkilerinde sadece sistemik mozaik simptomsu oluşturduğu saptanmıştır (Şekil 4.3; 4.4). Bu izolatın domates ve biber bitkisine aşılınması ile domateslerde hafif yaprak deformasyonu, yaprak ayasının daralması ve sistemik mozaik, biberde yaprak kıvrılması, yaprak ayasının daralması ve hafif sistemik mozaik simptomsu meydana getirmiştir.

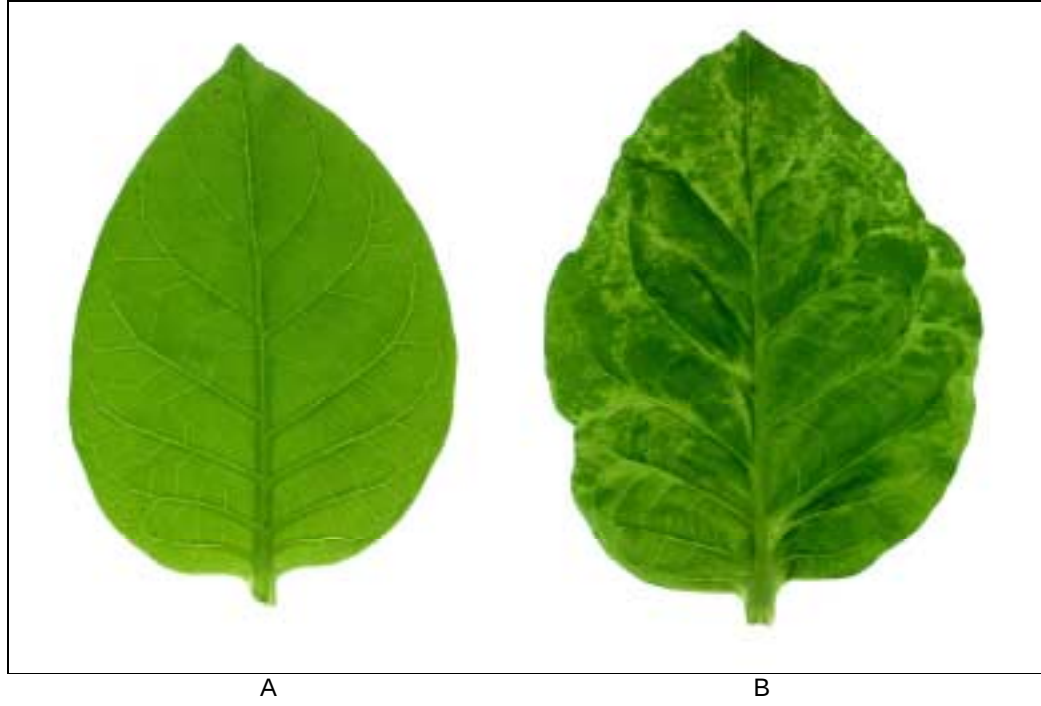
Paradies ve ark., (2000)'nın biyolojik ve moleküler karakterizasyonu yaptıkları ve araştırma sonucunda alt grup IA ya dahil ettikleri CMV-YA200, CMV-L43 ve CMV-OR izolatlarının bitkilerde oluşturduğu simptomsu ile elde ettiğimiz simptomsu benzediği görülmektedir. Önceki çalışmalarda belirtildiği gibi CMV-YA200 izolatı *N. glutinosa*'da sistemik mozaik ve sistemik yaprak deformasyonu, *N. tabacum* ''Xanthi'' de sistemik mozaik ve sistemik nekrosis; CMV-L43 izolatının *N. glutinosa*'da sistemik mozaik ve sistemik yaprak deformasyonu, *N. tabacum* ''Xanthi''de sistemik hafif mozaik ve CMV-OR izolatının *N. glutinosa*'da sistemik mozaik ve sistemik yaprak deformasyonu, *N. tabacum* ''Xanthi''de sistemik mozaik simptomsu oluşturmaktadır. Araştırmızda CMV-K izolatı ile ilgili olarak elde ettiğimiz simptomsolojik bulgular bu izolatın alt grup IA'ya ait olduğu fikrini kuvvetlendirmektedir. Aynı şekilde Rodriguez ve ark., (1995)'nin yaptıkları çalışmada da alt grup I'e dahil ettikleri CMV-35, CMV-SD1, CMV-Gi, CMV-Ke, CMV-Or, CMV-SD2 izolatlarının konukçularda mozaik ve yaprak deformasyonu oluşturdıkları saptanmıştır. Araştırmacıların sonuçları ile sonuçlarımızın benzerlik göstermesi CMV-K'nın alt grup I'e ait olduğunu göstermektedir.



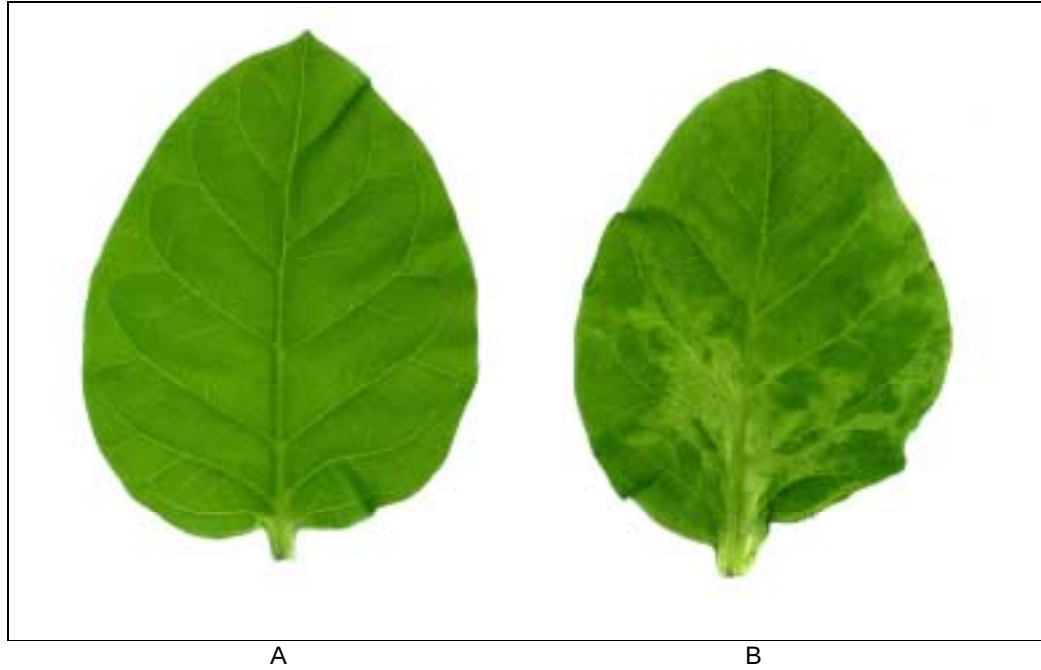
şekil 4.1. Sağlıklı (A) ve CMV-K ile bulaşık (B,C) kavun



şekil 4.2. Sağlıklı (A) ve CMV-K ile bulaşık (B,C) *N. glutinosa*



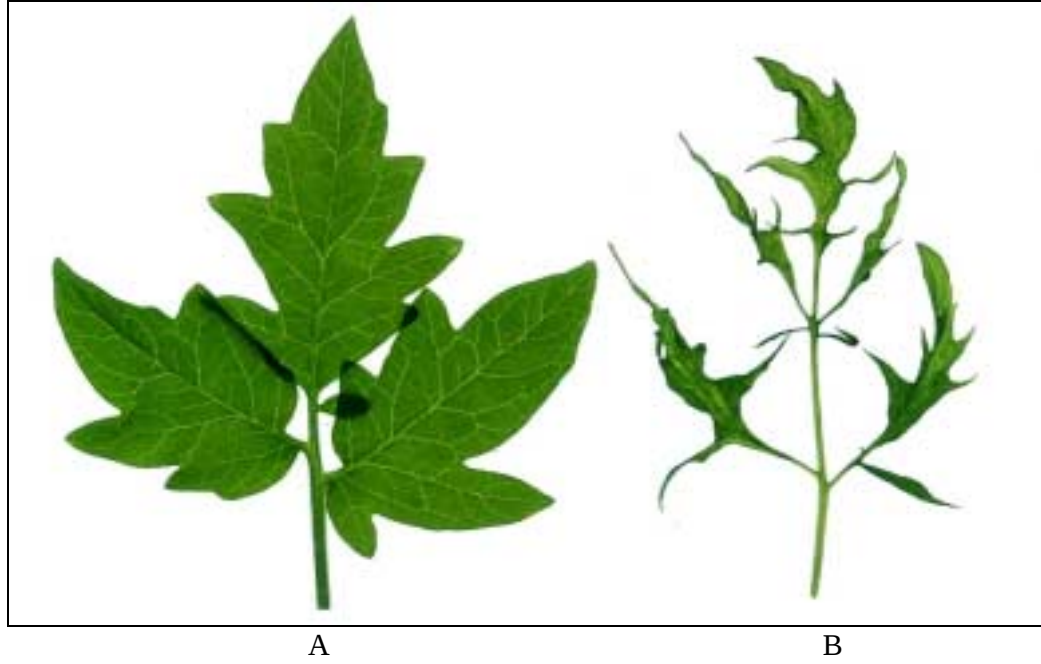
şekil 4.3. Sağlıklı (A) ve CMV-K ile bulaşık (B) *N. tabacum* “Samsun”



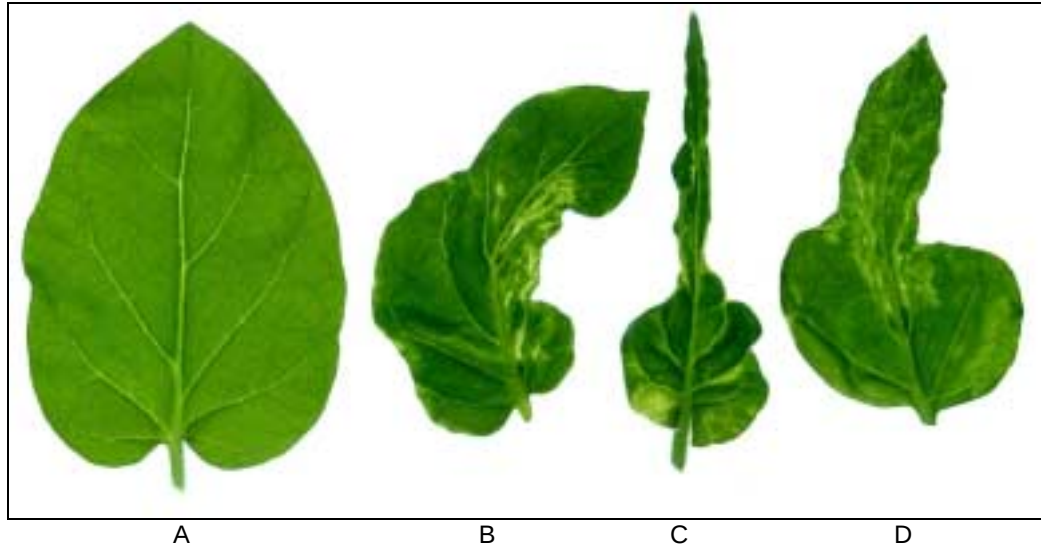
şekil 4.4. Sağlıklı (A) ve CMV-K ile bulaşık (B) *N. tabacum* “Xanthi”

CMV-D izolatu domates bitkilerinde yaprak simetrisinin bozulması, ayakkabı bağı şekli, fearn leaf ve sistemik mozaik simptomları oluşturmuştur (Şekil 4.5). Bu izolat *N. glutinosa* bitkisinde CMV-K izolatının oluşturduğu gibi yaprak şeklinin bozulması, yaprak ayasının daralması ve uzaması, yaprağın kıvrılması, damar bantlaşması ve sistemik mozaik (Şekil 4.6), *N. tabacum* ''Xanthi NC'', *N. tabacum* ''Xanthi'', *N. tabacum* ''Samsun NN'', *N. tabacum* bitkilerinde sadece sistemik mozaik simptomu oluşturduğu saptanmıştır. (Şekil 4.7; 4.8). Bu izolatın kavun ve bibere aşılması sonucunda kavun bitkilerinde sistemik mozaik, yaprak deformasyonu ve bitki ölümlerine, biberde yaprak kıvrılması ve sistemik mozaik simptomları meydana gelmiştir.

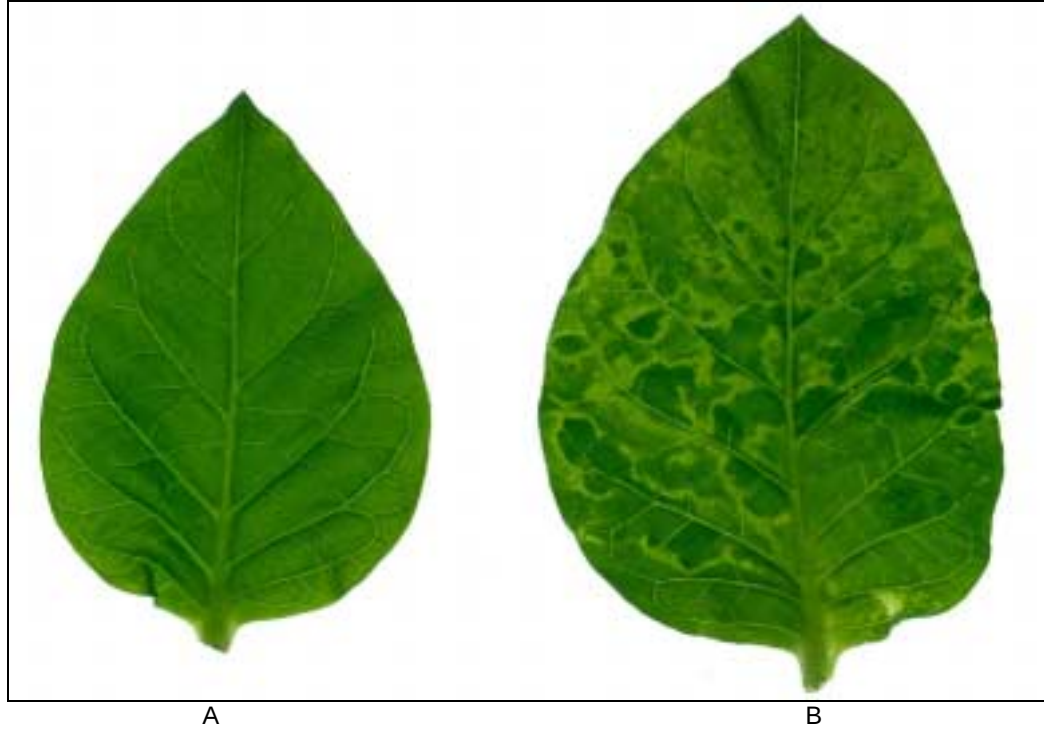
Araştırmada CMV-D izolatının bitkilerde oluşturduğu simptomlar ile Paradies ve ark., (2000)'nın alt grup IA ya dahil ettikleri CMV-YA200, CMV-L43 ve CMV-OR izolatlarının bitkilerde oluşturduğu simptomlar benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlar CMV-D izolatında alt grup IA'ya ait olduğu fikrini kuvvetlendirmektedir. Rodriguez ve ark., (1995)'nin alt grup I'e dahil ettikleri CMV-35, CMV-SD1, CMV-Gi, CMV-Ke, CMV-Or, CMV-SD2 izolatlarının konukçularda oluşturdukları sistemik mozaik ve yaprak deformasyonu simptomları CMV-D'nin alt grup I'e ait olduğunu desteklemektedir.



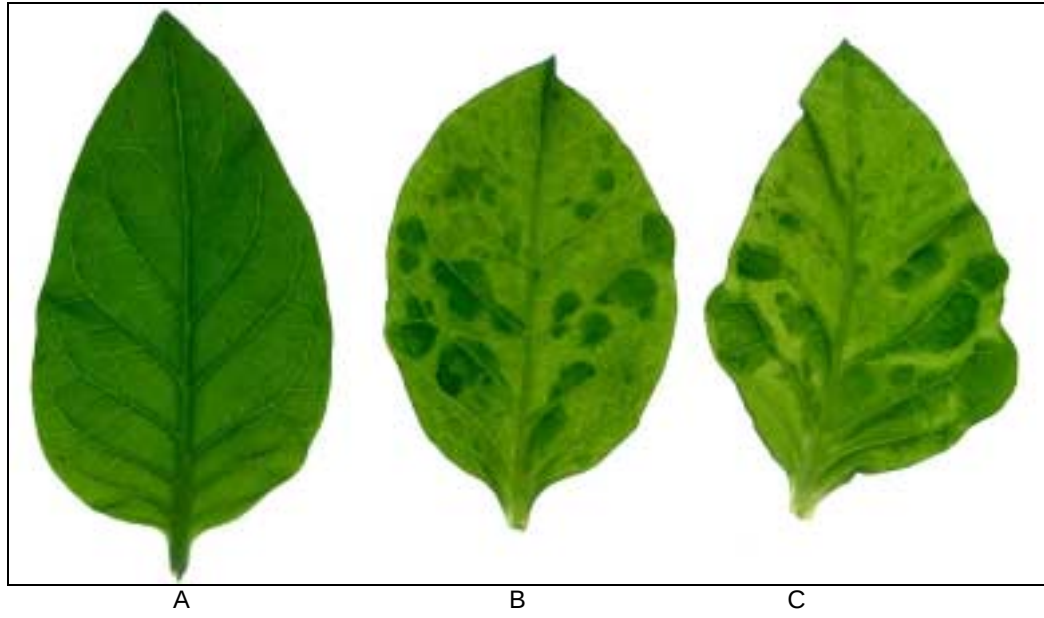
şekil 4.5. Sağlıklı (A) ve CMV-D ile bulaşık (B) domates



şekil 4.6. Sağlıklı (A) ve CMV-D ile bulaşık (B,C,D) *N. glutinosa*



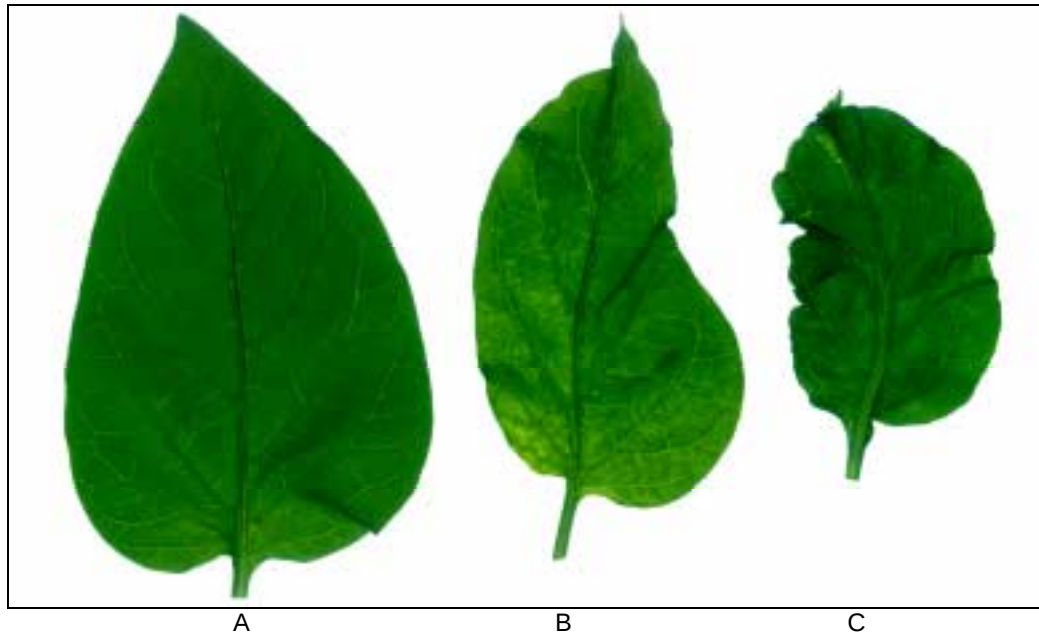
şekil 4.7. Sağlıklı (A) ve CMV-D ile bulaşık (B) *N. tabacum* ‘‘Samsun’’



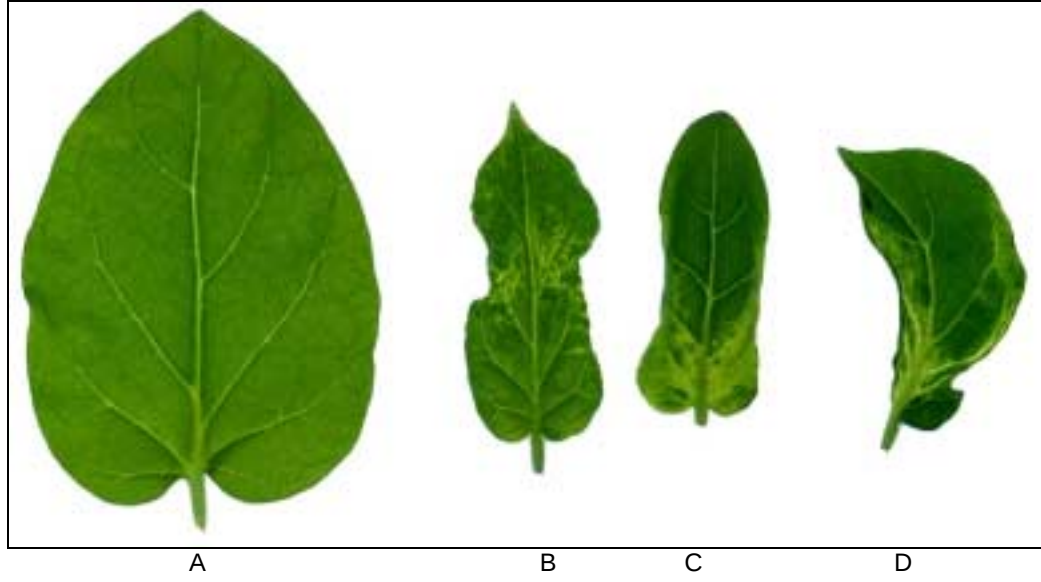
şekil 4.8. Sağlıklı (A) ve CMV-D ile bulaşık (B,C) *N. tabacum*.’’Xanthi’’

CMV-B izolatu biber bitkilerinde yaprak kıvrılması, damar bantlaşması ve sistemik mozaik semptomları oluşturmuştur (şekil 4.9). Bu izolat *N. glutinosa* bitkisinde CMV-K ve CMV-D izolatlarının oluşturdukları gibi yaprak şeklinin bozulması, yaprak ayasının daralması, damar bantlaşması ve sistemik mozaik semptomları (şekil 4.10), *N. tabacum* ''Xanthi NC'', *N. tabacum* ''Xanthi'', *N. tabacum* ''Samsun nn'', *N. tabacum* bitkilerinde ise sadece sistemik mozaik semptomu oluşturmuştur (şekil 4.11; 4.12). Bu izolatu kavun ve domatese aşılanması sonucunda kavun bitkilerinde sistemik mozaik, yaprak deformasyonu ve bitki ölümlerine, domateste yaprak simetrisinin bozulması, ayakkabı bağı şeklinde ve sistemik mozaik semptomları oluşturmuştur.

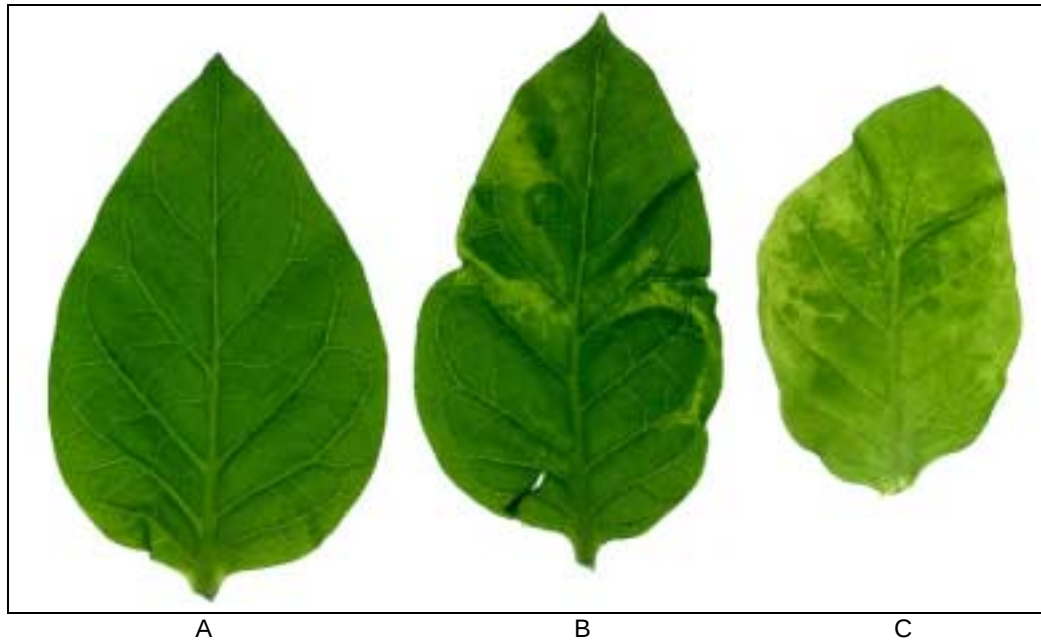
CMV-B izolatuının da semptomolojik olarak alt grup IA ya ait CMV-YA200, CMV-L43 ve CMV-OR izolatlarının ve alt grup I'e ait CMV-35, CMV-SD1, CMV-Gi, CMV-Ke, CMV-Or, CMV-SD2 izolatlarının oluşturdukları semptomlar ile aynı olması CMV-K ve CMV-D gibi CMV-B' ninde alt grup IA'ya dahil olabileceğini desteklemektedir.



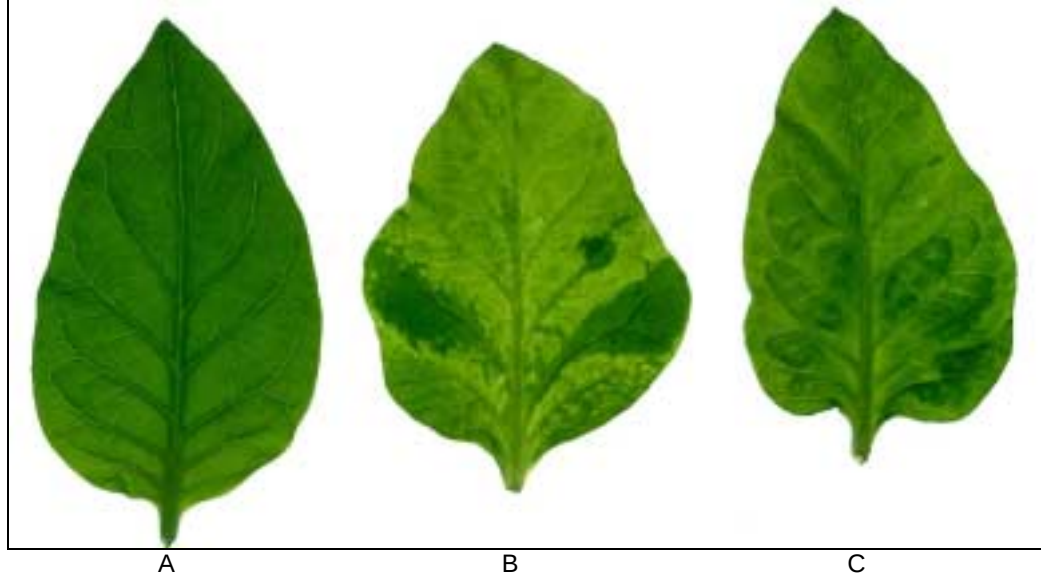
şekil 4.9. Sağlıklı (A) ve CMV-B ile bulaşık (B,C) biber



Şekil 4.10. Sağlıklı (A) ve CMV-B ile bulaşık (B, C, D) *N. glutinosa*



Şekil 4.11. Sağlıklı (A) ve CMV-B ile bulaşık (B,C) *N. tabacum* "Samsun"



Şekil 4.12. Sağlıklı (A) ve CMV-B ile bulaşık (B,C) *N. tabacum* ''Xanthi''

4.2. Serolojik Çalışmalar

4.2.1. DAS-ELISA Testi Çalışmaları

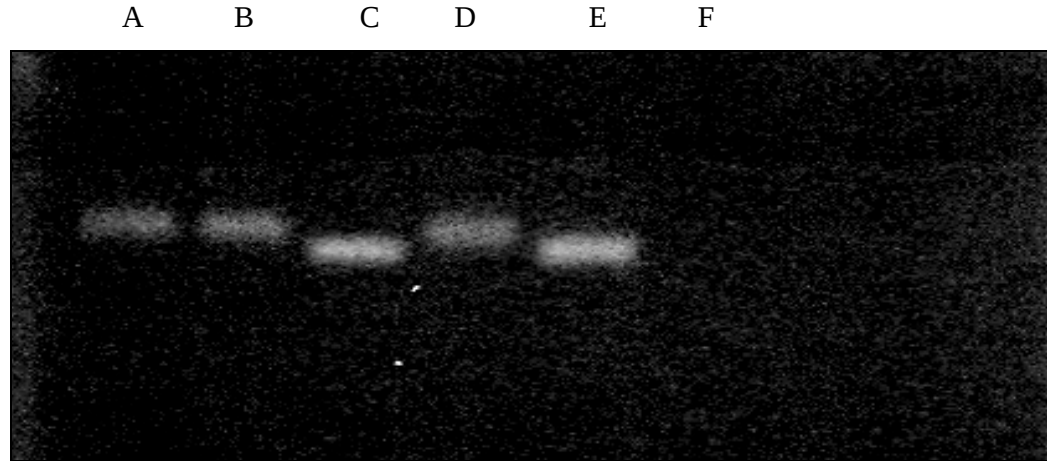
Çalışmanın yapıldığı arazilerdeki surveylerde virüs ile bulaşık olduğundan şüphelenilen ve 60 adet kavun, 62 adet domates ve 35 adet biber bitkilerinden toplanan örnekler ELISA ile testlenmiştir. Testler sonucunda 5 adet kavun, 9 adet domates ve 6 adet biber örnekleri sadece CMV antiserumuna pozitif sonuç vermiş ve bunların yalnızca CMV ile bulaşık olduğu saptanmıştır. Biyolojik ve moleküler çalışmalar bu örnekler üzerinde yapılmıştır. Pozitif sonuç veren örnekler daha sonra mekanik inokulasyon yolu ile aşılandıklarında test bitkilerinden CMV'ne karşı pozitif sonuçlar alınmıştır. Sadece CMV ile bulaşık olduğu saptanan örnekler dışındaki diğer bitkilerde karışık infeksiyonlar saptanmıştır. Bunlardan kavun bitkilerinin CMV'nden başka ZYMV, WMV-2, MNSV, SqMV antiserumları ile testlendiğinde bazı örneklerin ZYMV ve SqMV ile, domates bitkilerinin TSWV, TMV, ToMV antiserumları ile testlendiğinde bazı domates örneklerinin TSWV, TMV ve ToMV ile, biber bitkilerinin de TMV, TSWV ve PVY antiserumları ile testlendiğinde bazı biberlerin TMV ve TSWV ile bulaşık olduğu saptanmıştır.

4.2.2. İmmunodiffusion Çalışmaları

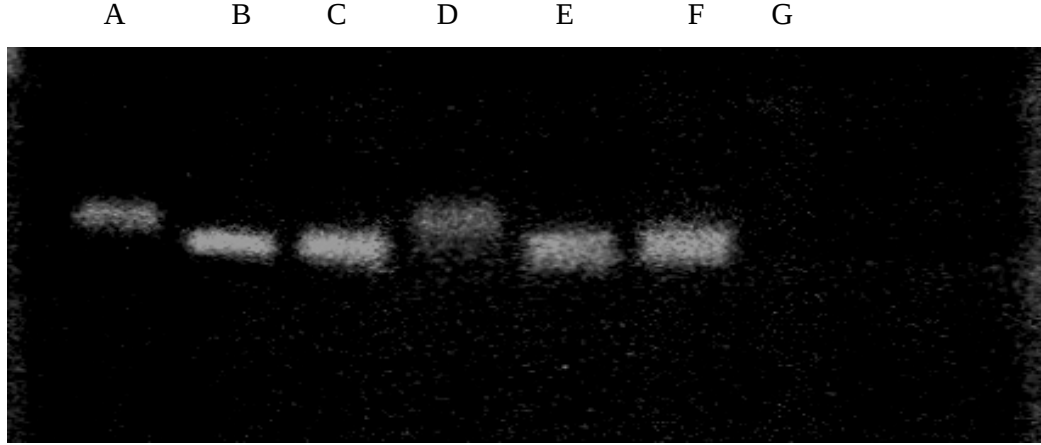
ELISA testi ile sadece CMV ile bulaşık olduğu saptanan ve bunlardan seçilen üç izolat kavun, domates, biber ve diğer test bitkilerine aşılanmıştır. Aşılanan bu bitkilerden CMV simptomu gösteren genç yapraklarından elde edilen tam ve yarı purifiye materyaller CMV antiserumu kullanılarak Agar Double Diffüsyon testine tabi tutulmuştur. Testler sonucunda her üç izolatta serolojik reaksiyona girdiği ve oluşan bantlarda bir spur'un meydana gelmediği gözlenmiştir. Buda sonuçlar her üç izolatın serolojik olarak aynı olduğunu göstermiştir.

4.3. Viron Analizleri

Mekanik inokulasyon çalışmaları sonucunda CMV simptomu gözlenen ve ELISA çalışmasıyla pozitif sonuç alınan CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatları ile bulaşık test bitkilerinden toplanan örneklerden CMV'nün virionları saflaştırılmış ve üç izolatın virionlarının elektrikli ortamdaki hareket hızlarının belirlenmesi ve aralarındaki farkın olup olmadığı ortaya konulmuştur (Şekil 4.13; Şekil 4.14.).



Şekil 4.13. CMV-K (A,B,D), CMV-D (C) ve CMV-B (E) izolatlarının virion analizleri, negatif kontrol (F)



Şekil 4.14. CMV-K (A,D), CMV-D (B,E) ve CMV-B (C,F) izolatlarının virion analizleri, negatif kontrol (G)

Araştırmada CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının virionlarının elektrikli ortamda hareket hızları kontrol edildiğinde her üç izolatta yavaş, ancak CMV-K izolatının diğer iki izolata göre çok az oranda daha yavaş hareket ettiği ortaya saptanmıştır. Farklı alt gruplara ait CMV izolatlarının virionlarının elektrikli ortamdaki hareket hızlarını karşılaştırılmak amacıyla Rodriguez ve ark., (1995) CMV-35, CMV-SD1, CMV-Gi, CMV-Ke, CMV-Or, CMV-SD2 izolatlarını, kontrol olarak, elektrikli ortamda hızlı CMV-S (alt grup II) ve yavaş hareket eden CMV-P (alt grup I) izolatu kullanmışlardır. Çalışma sonucunda CMV-35, CMV-SD1, CMV-Gi, CMV-Ke, CMV-Or, CMV-SD2 izolatlarının virionları CMV-P (alt grup I) izolatu virionları ile aynı hızda hareket ettiği saptanmıştır. Bu sonuçla araştırmacılar bu izolatların alt grup I' e ait olduğunu bildirmişlerdir.

Araştırmada kontrol olarak hızlı CMV-S (alt grup II) ve yavaş CMV-P (alt grup I) izolatu kullanma imkanı bulunmamış olmakla birlikte elde edilen sonuçlar CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının CMV-P (alt grup I) gibi yavaş hareket ettiğini göstermektedir. Bu sonuçlar her üç izolatin alt grup I'e ait olduğunu göstermektedir. CMV-K izolatının sonuçta görülen farkı ve aynı grup içerisindeki farklı izolatların farkları ile örtüşmektedir. Bu nedenle bu fark CMV-K'nın farklı bir alt grupta olması gerektiği fikrini ortadan kaldırmaktadır.

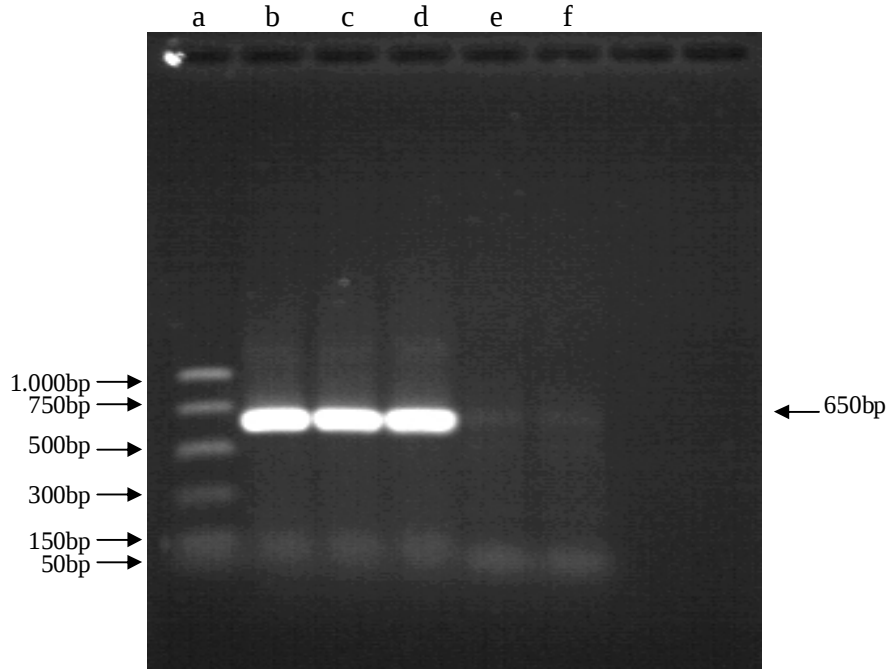
4.4. Moleküler Çalışmalar

4.4.1. CMV-K, CMV-D ve CMV-B İzolatlarının RT-PCR ve RFLP İle Farklılıklarının Saptanması ve Alt Grup Analizi

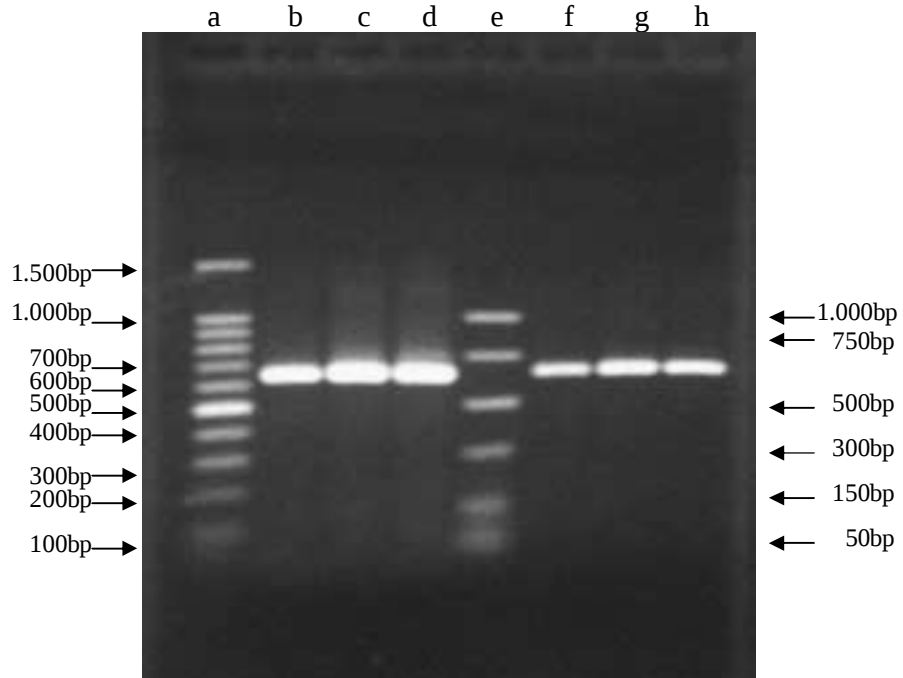
CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının farkını bulmak ve gruplandırma içerisinde hangi alt gruba ait olduğunu belirlemek amacıyla yapılan RT-PCR çalışmasında (RW8) ve (RV11) dejenere primer çifti kullanılarak RNA-2 geni üzerinde 650 bp lik bölge çoğaltılmıştır. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi ile jelde her üç izolat içinde beklenen 650 bp'lik DNA bandı gözlenmiştir (Şekil 4.15).

İzlatlara ait PCR ürünlerinin RFLP çalışmasıyla *MluI* restriksiyon enzimiyle muamele edilmesi ile *MluI* restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği A▼CGCG T / T GCGC▲A bölgenin varlığı yada yokluğu kontrol edilmiştir. RFLP çalışması sonucunda elde edilen ürünler agaroz jelde kontrol edilmiş ve primerler kullanılarak her üç izolatın RNA-2 geni üzerinde çoğaltılan 650 bp lik bölgede enzimin tanıyıp kestiği bölge saptanamamıştır (Şekil 4.16).

Araştırma sonuçları Sialer ve ark., (1999) CMV'nün alt grupları konusunda yaptıkları çalışma sonuçlarıyla karşılaştırıldığında CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının alt grup IA' ya dahil olduğu saptanmıştır. Önceki çalışmalarda rapor edildiği gibi Sialer ve ark., (1999) ellerinde bulunan CMV-TTS, CMV-FL ve CMV-77 izolatlarının hangi alt grup'a dahil olduğunu saptamışlardır. Kontrol olarak ta CMV-Fny (alt grup IA), CMV-Tfn (alt grup IB), CMV-S (alt grup II), izolatlarını kullanmışlardır. Aynı primerleri kullanarak bu izolatların RNA-2 geni üzerinde 650 bp'lik bölgeyi çoğaltmışlar ve bu PCR ürünlerini *MluI* restriksiyon enzimi ile muamele etmişlerdir. RFLP çalışması sonucunda CMV-TTS, CMV-FL izolatlarında 470 bp ve 160 bp'lik iki fragment elde etmişler ve bu izolatları alt grup IB ye, CMV-77 izolatında kesilen fragment saptayamamış ve bu izolatı alt grup IA ya dahil etmişlerdir. Araştırmada CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarında CMV-77 gibi aynı sonucu vermiş *MluI* restriksiyon enzimi ile kesilememiştir. Bu sonuçlar her üç izolatın CMV-77 gibi alt grup IA'ya dahil olduğunu ortaya koymuştur.



Şekil 4.15. PCR Marker (a) ve 650 bp'lik CMV-K (b), CMV-D (c), CMV-B (d) DNA bantları, negatif kontrol (e), PCR mix (f)



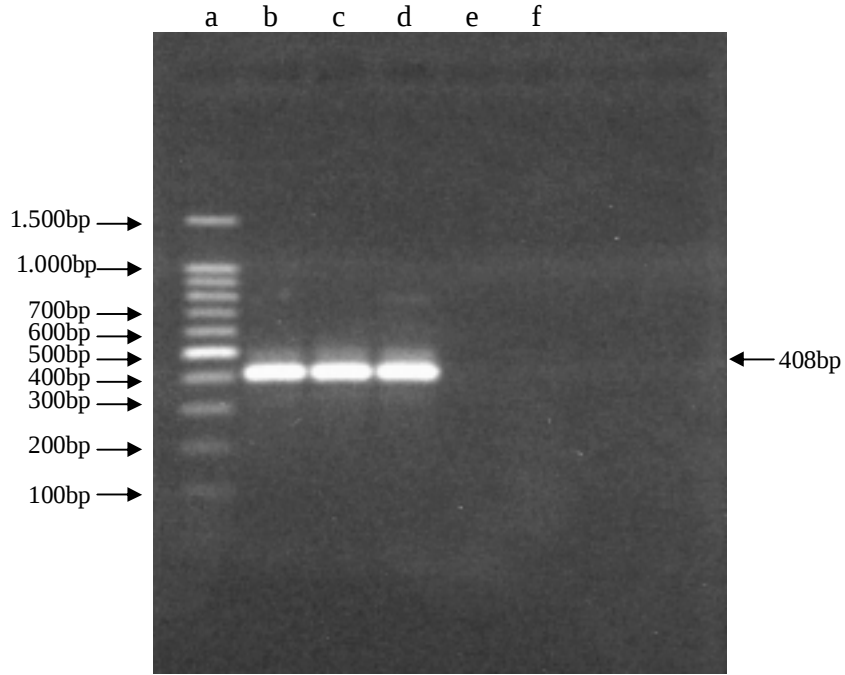
Şekil 4.16. DNA Marker 100 bp (a) ve 650 bp'lik CMV-K (b), CMV-D (c), CMV-B (d) DNA bantları. PCR Marker (e), *MluI* Enzimiyle muamele edilmiş CMV-K (f), CMV-D (g), CMV-B (h) DNA bantları

CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının gruplandırma içerisinde hangi alt gruba ait olduğunu belirlemek amacıyla yapılan diğer RT-PCR-RFLP çalışmasında Paradies ve ark., (2000)'nın CMV izolatlarının karakterizasyon'u için yapmış oldukları çalışmada kullandıkları primerler (R1-3') ve (R1-5') primer çifti kullanılarak CMV'nün RNA-1 geni üzerinde 408 nt lik bölge çoğaltılmıştır. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi ile jelde her üç izolat içinde beklenen 408 bp lik DNA bandı gözlenmiştir (Şekil 4.17).

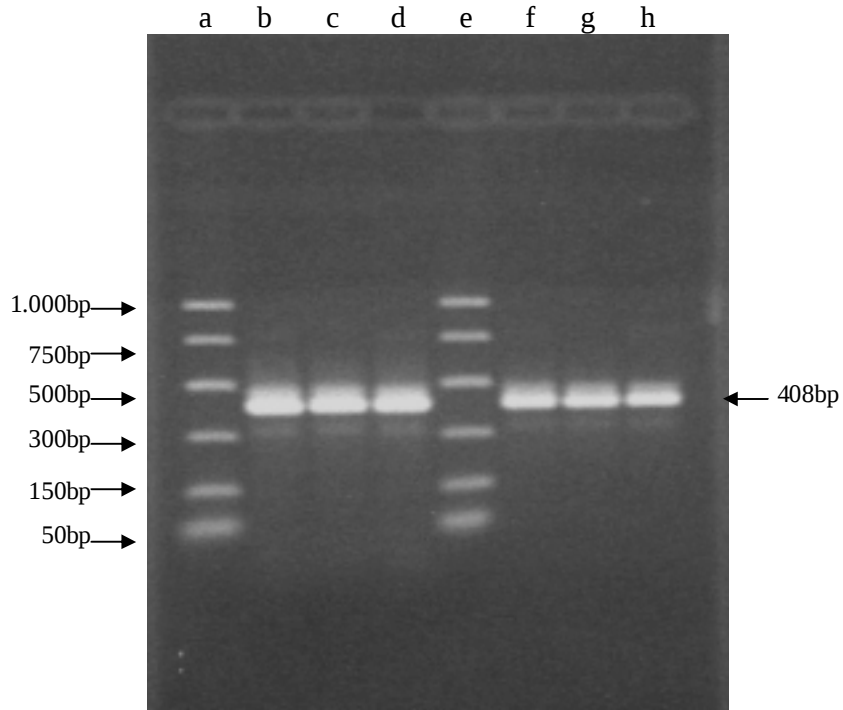
Her üç izolata ait PCR ürünlerinin RFLP çalışmasıyla *MluI* restriksiyon enzimi ile muamele edilerek enziminin tanıdığı ve kestiği A▼CGCG T / T GCGC▲A bölgenin varlığı yada yokluğu kontrol edilmiştir. RFLP çalışması sonucunda elde edilen ürünler agaroz jelde kontrol edilmiş ve primerler kullanılarak her üç izolatın RNA-1 geni üzerinde çoğaltılan 408 bp lik bölgede enzimin tanıyıp kestiği bölge saptanamamıştır (Şekil 4.18).

Elde edilen sonuçlar Paradies ve ark., (2000)'nın sonuçları ile karşılaştırıldığında CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının alt grup IA'ya dahil olduğunu bir kez daha ortaya çıkarmıştır. Paradies ve ark., (2000)'nın rapor ettikleri gibi CMV-YA200, CMV-L43 ve CMV-OR izolatlarının hiçbirisinde *MluI* ve *SspI* enzimlerinin kestiği fragment gözlenememiş bu izolatlar alt grup IA ya dahil edilmiştir. CMV-S (alt grup II) izolatu da *MluI* enzimi ile muamele edilmiş, sonuçta 250 bp ve 150 bp lik iki fragment elde edilmiş ve bu izolatta alt grup II içerisindeki yerini korumuştur. Buradan CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının Paradies ve ark., (2000)'nın Türkiye'den temin ettiği YA200, CMV-L43 ve İtalya'dan temin ettiği CMV-OR izolatları ile aynı özelliklere sahip olduğu yada aynı izolatlar olduğu sonucuna varılmıştır.

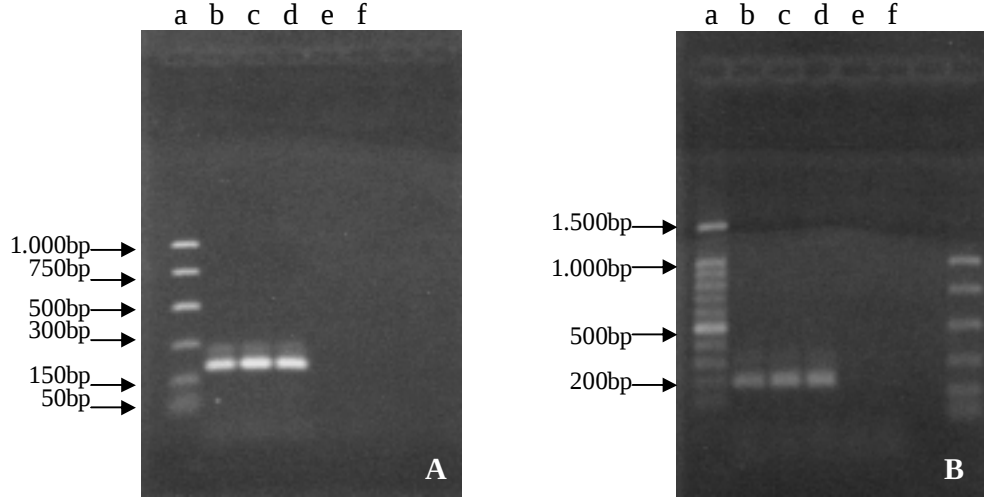
Araştırmalar sırasında yapılan diğer bir çalışma yine Paradies ve ark., (2000)'nın yapmış oldukları çalışmada kullandıkları 5'-TTACC(AG)AACTCATCA GAGAGTA-3' ve 5'-TTTGC(ACT)TGGTG(CT)TA(CT)GACAC-3' primerler kullanılarak CMV'nün RNA-2 geni üzerinde bulunan ve 2a proteinin kodlandığı 194 bp'lik bölge çoğaltılmış ve sonuçlar agaroz jelde kontrol edilmiştir (şekil 4.19).



Şekil 4.17. DNA Marker 100 bp (a) ve 408 bp'lik CMV-K (b), CMV-D (c), CMV-B (d) DNA bantları, negatif kontrol (e), PCR mix (f)



Şekil 4.18. PCR Marker (a) ve 408 bp'lik CMV-K (b), CMV-D (c), CMV-B (d) DNA Bantları; PCR Marker (e), *MluI* Enzimiyle muamele edilmiş CMV-K (f), CMV-D (g), CMV-B (h) DNA bantları

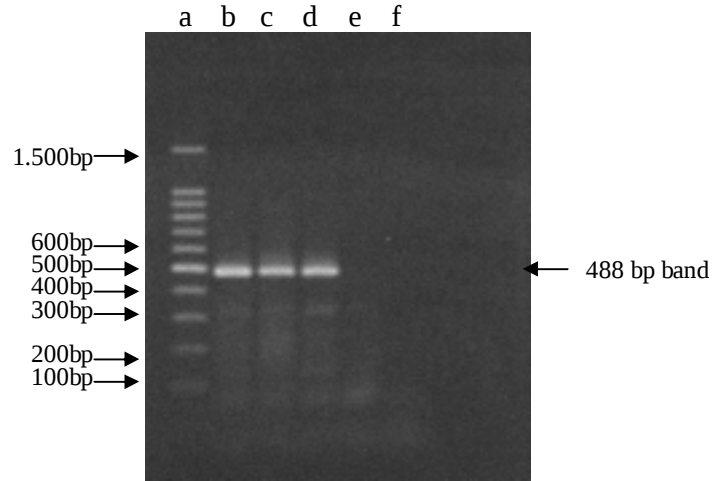


Şekil 4.19. (A) PCR Marker, (B) DNA marker 100 bp (a) ve 194 bp’lik CMV-K (b), CMV-D (c), CMV-B (d) DNA bantları, negatif kontrol (e), PCR mix (f)

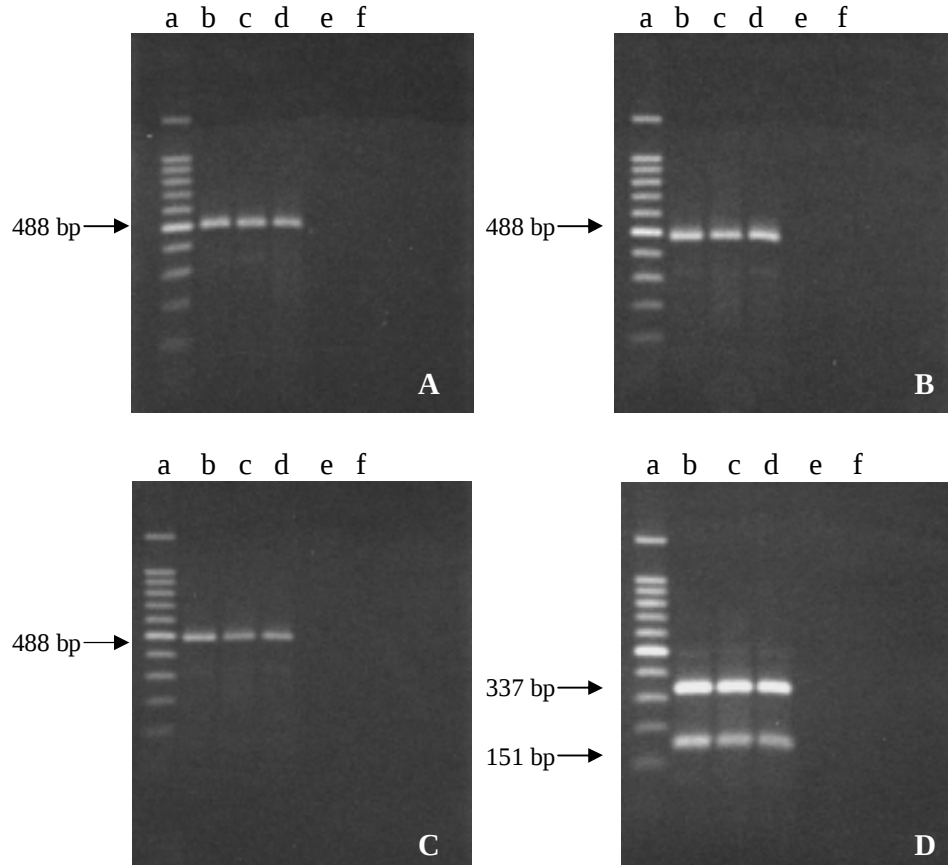
Çalışma Singh ve ark. (1995)’nın CMV alt grup I izolatlarının tanılanması için kullandığı ve önerdiği yöntemle CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının virüsün kılıf protein geni üzerinde bir bölgeye göre dahil oldukları alt grubun saptanması ile ilgili olarak yapılan çalışma sonucunda çoğaltılan 488 bp’lik DNA bantları % 2’lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.20).

RT-PCR çalışması ile elde edilen ve agaroz jel elektroforez yöntemi ile kontrol edilen farklı izolatlara ait DNA örnekleri, izolatların alt grup tayini için RFLP çalışmasına tabi tutulmuştur. RFLP çalışması ile DNA örneklerinin *Eco* RI, *Hind* III, *Bam* HI ve *Msp* I restriksiyon enzimleri ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen nükleik asit fragmentleri her emzim için ayrı ayrı agaroz jelde kontrol edilerek alt grup analizi yapılmıştır.

Araştırma sonucunda izolatlara ait ve kılıf protein geni üzerinde çoğaltılan bölgede *Eco* RI, *Hind* III ve *Bam* HI enzimlerinin kestiği bölgenin bulunmadığı, ancak her üç izolatda da *Msp* I enziminin tanıdığı ve kestiği bölgenin bulunduğu ve bu enzimin izolatlarda çoğaltılan bölgeyi keserek 337bp ve 151bp lik iki fragmente ayırdığı sonucu elde edilmiş ve agaroz jelde kontrol edilmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.20. DNA Marker 100 bp (a) ve 488 bp'lik CMV-K (b), CMV-D (c), CMV-B (d) DNA bantları, negatif kontrol (e), PCR mix (f)



Şekil 4.21. İzolatların çoğaltılan 488 bp'lik DNA'larının *Eco* RI (A), *Hind* III (B), *Bam* HI (C) ve *Msp* I (D) ile muamelesiyle elde edilen sonuçlar.

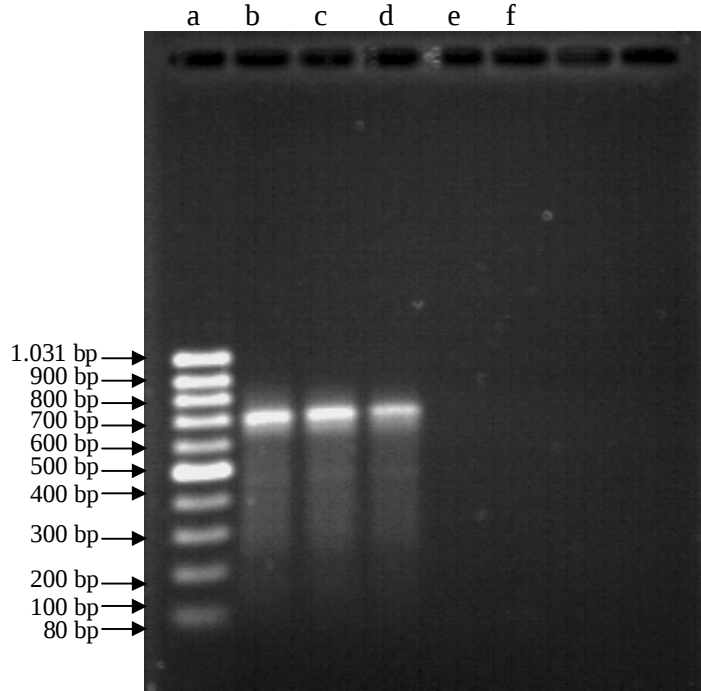
İzolatların kılıf protein geni üzerinde bir bölgeye göre dahil oldukları alt grupun saptanması amacıyla yapılan çalışmanın sonuçlarını Singh ve ark. (1995)'nın sonuçları ile karşılaştırdığımızda CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının alt grup I 'e ait oldukları saptanmıştır. Araştırmada testlenen üç izolatta Singh ve ark. (1995)'nin çalışmalarında kullandıkları alt grup I içerisinde bulunan CMV-SL (alt grup I) ve CMV-B izolatları ile aynı oldukları görülmektedir.

4.4.2. Satellit RNA Analizleri

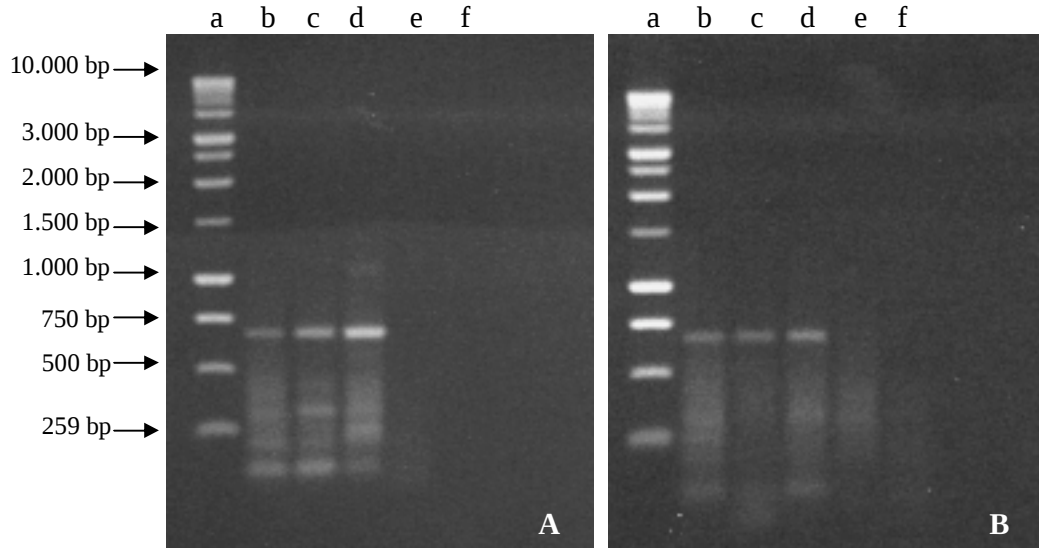
Çalışmanın yapıldığı kavun, domates ve biber ekim alanlarında doğada satellit RNA'lerin varlığı ve CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının satellit RNA'lerin bitkilerde çoğalması için yardımcı virüs fonksiyonuna sahip olup olmadığı araştırılmıştır. Testlerde Monti ve ark., (1999)'nın kullandıkları (Upstream): ve (Downstream) dejenere primer çifti kullanıldığında CMV-K'nın kavun, *N. glutinosa* ve *N. tabacum* "Xanthi"; CMV-D'nin domates, *N. glutinosa* ve *N. tabacum* "Xanthi"; CMV-B'nin biber, *N. Glutinosa* ve *N. tabacum* "Xanthi" 700bp lik satellit RNA'yi çoğalttığı ve üç izolatta satellit RNA için yardımcı virüs olduğu sonucu elde edilmiş ve Satellit RNA'ye ait bantlar agaroz jelde kontrol edilmiştir (Şekil 4.22; 4.23)

Satellit RNA'lerin CMV'nün bitkilerde simptom oluşumuna etkisini saptamak amacıyla yaptığımız çalışmada CMV satellit RNA ile infekteli virüs izolatlarının virionları arılatılmıştır. Arılatılan virionlar mekanik inokulasyon yöntemi ile test bitkilerine aşılanmış ve izolatların bitkilerdeki simptomları kontrol edilmiştir. Araştırmada CMV-K izolatının saf virionlarının bitkilerde simptom oluşturmadığı, CMV-D ve CMV-B izolatlarının saf virionlarının bitkilerde daha önce elde edilen tipik CMV simptomlarını oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.24).

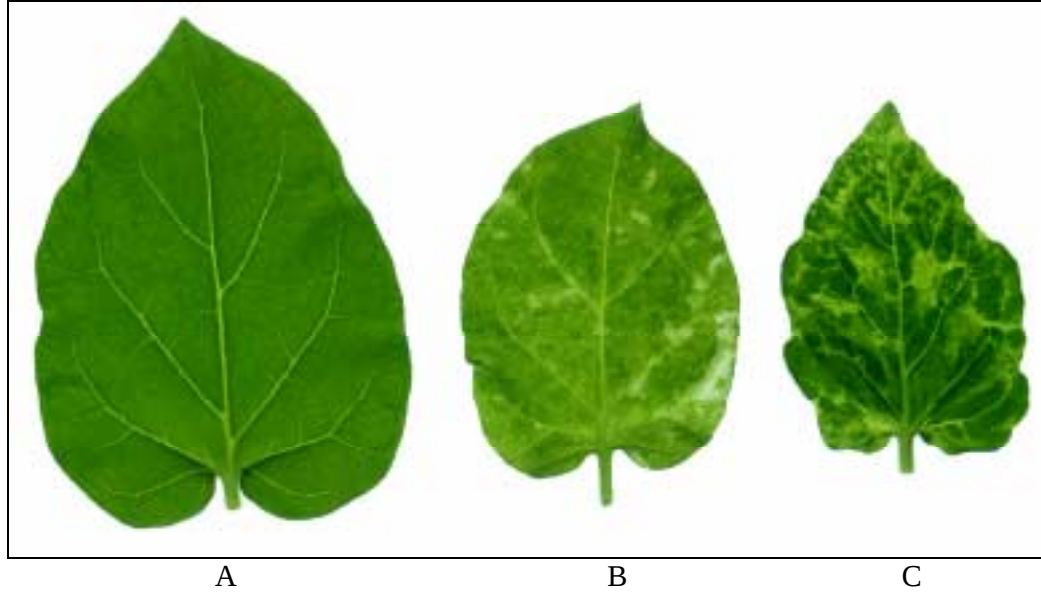
İzolatların bitkilerde oluşturduğu simptomların Satellit RNA'lerden kaynaklanıp kaynaklanmadığı ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile araştırılmıştır. Testler sonucunda bu bitkilerin CMV-K, CMV-D ve CMV-B ile infekteli olduğu sonucu elde edilmiş ve izolatlara ait RNA-2 bantları görüntülenmiştir (Şekil 4.25).



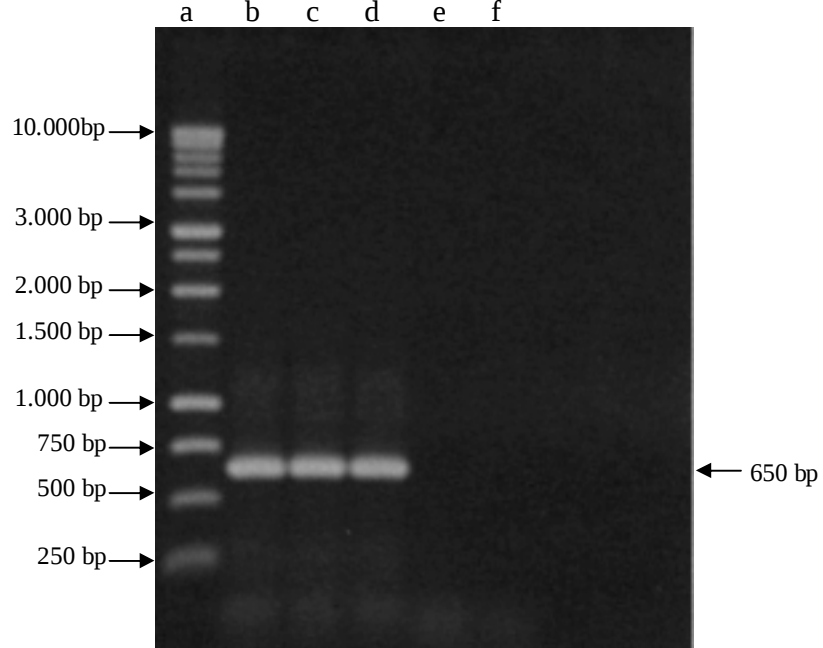
Şekil 4.22. DNA Marker 100 bp (a) ve 700 bp'lik CMV-K (b) kavun, CMV-D (c) domates, CMV-B (d) biber CMV-Satellit RNA, negatif kontrol (e), PCR mix (f)



Şekil 4.23. CMV izolatları ile infekteli *N. glutinosa* (A) ve *N. tabacum* "Xanthi" (B) bitkilerinde satellit RNA. DNA Marker 1 kb (a) ve 700 bp'lik CMV-K (b), CMV-D (c), CMV-B (d) CMV-satellit RNA, negatif kontrol (e), PCR mix (f)



Şekil 4.24. CMV-K (A), CMV-D (B) ve CMV-B (C) ile bulaşık *N. glutinosa*



Şekil 4.25. Marker 1 kb (a) ve CMV-K, CMV-D ve CMV-B ile infekteli *N. glutinosa* de 650 bp'lik CMV-K (b), CMV-D (c), CMV-B (d) RNA-2 bantları, negatif kontrol (e), PCR mix (f)

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Üretimi yapılan kültür bitkilerinde bakteri, fungus, virüs ve viroid gibi çok sayıda hastalık etmeni zararlara neden olmaktadır. Bu etmenler içerisinde virüsler mücadele zorluğu ve ürüne verdiği zarar düzeyini dikkate alındığında ayrı bir öneme sahiptir. Konukçunun duyarlılığı, virüsün virülensliği, ırkı ve genetik yapısı hastalığın şiddetini ve zarar seviyesini etkilemektedir. Virüslerin konukçu dizisi göz önüne alındığında TMV ve CMV hem çok sayıda bitkide hastalık oluşturmaları, hem de çok sayıda ırka sahip olması nedeniyle bitki virüsleri içerisinde en yaygın ve en zararlı virüslerdir. TVM'nü bir kenara bıraktığımızda hem tek yıllık hem de çok yıllık bitkilerde neden olduğu ekonomik zararı göz önüne alınarak CMV araştırma konusu olarak seçilmiş ve biyolojik, serolojik ve moleküler çalışmalar başlatılmıştır. Son yıllarda bölgemizde tarımı ekonomik olarak gittikçe artan bitkilerde değişik simptomlar görülmesi nedeniyle bu simptomlara neden olan CMV'nün kavun, domates ve biber bitkilerinde zararlarını ve değişik simptomlara neden olan karakterlerini ortaya koymak amacıyla bu araştırma yapılmıştır.

Araştırmada CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının biyolojik, serolojik ve moleküler karakterizasyonu yapılarak Adana, Merin, Hatay ve Şanlıurfa illerinde bulunan CMV izolatlarının birbirilerinden farklılıkları saptanmıştır.

Biyolojik bulgulara CMV-K izolatı kavun bitkilerinde yaprak deformasyonu, yaprak kıvrılması ve sistemik mozaik, *Nicotiana glutinosa* L. bitkisinde yaprak şeklinin bozulması, yaprak ayasının daralması ve uzaması, damar bantlaşması ve sistemik mozaik simptomlarına neden olmuştur. *Nicotiana tabacum* L.''Xanthi NC'', *Nicotiana tabacum* L.''Xanthi'', *Nicotiana tabacum* L.''Samsun nn'', *Nicotiana tabacum* L test bitkilerinde sadece sistemik mozaik, domateslerde hafif yaprak deformasyonu, yaprak ayasının daralması ve sistemik mozaik, biberde yaprak kıvrılması, yaprak ayasının daralması ve hafif sistemik mozaik simptomlarına neden olmuştur. Bu simptomlar Paradies ve ark., (2000)'nın biyolojik ve moleküler karakterizasyonu yaptıkları araştırma sonucunda alt grup IA ya dahil ettikleri CMV-YA200, CMV-L43 ve CMV-OR izolatlarının ve Rodriguez ve ark., (1995)'nin yaptıkları bir çalışma ile alt grup I'e dahil ettikleri CMV-35, CMV-SD1, CMV-Gi,

CMV-Ke, CMV-Or, CMV-SD2 izolatlarının bitkilerde oluşturduğu belirtiler ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır. CMV-YA200 izolatı *N.glutinosa*'da sistemik mozaik ve sistemik yaprak deformasyonu, *N.tabacum* "Xanthi"de sistemik mozaik ve sistemik nekrosis; CMV-L43 izolatı *N.glutinosa*'da sistemik mozaik ve sistemik yaprak deformasyonu, *N.tabacum* "Xanthi"de sistemik hafif mozaik ve CMV-OR izolatı *N.glutinosa*'da sistemik mozaik ve sistemik yaprak deformasyonu, *N.tabacum* "Xanthi"de sistemik mozaik belirtisi oluşturmaktadır. Sonuçların benzerliği CMV-K izolatının belirtilolojik olarak alt grup IA'ya ait olduğunu göstermektedir.

CMV-D izolatı domates bitkilerinde yaprak simetrisinin bozulması, ayakkabı bağı şeklinde, fearn leaf ve sistemik mozaik belirtillerine neden olmuştur. *Nicotiana glutinosa* L. bitkisinde yaprak şeklinin bozulması, yaprak ayasının daralması ve uzaması, yaprağın kıvrılması, damar bantlaşması ve sistemik mozaik belirtillerine neden olmuştur. *Nicotiana tabacum* L.'Xanthi NC'', *Nicotiana tabacum* L.'Xanthi'', *Nicotiana tabacum* L.'Samsun nn'', *Nicotiana tabacum* L bitkilerinde sadece sistemik mozaik, kavunda sistemik mozaik, yaprak ayasının daralması ve bitki ölümlerine, biberde yaprak kıvrılması ve yaprak ayasının daralması ve hafif mozaik belirtillerine neden olmuştur. Elde edilen belirtiler Paradies ve ark., (2000)'nın alt grup IA ya dahil ettikleri CMV-YA200, CMV-L43 ve CMV-OR izolatlarının ve Rodriguez ve ark., (1995)'nin alt grup I'e dahil ettikleri CMV-35, CMV-SD1, CMV-Gi, CMV-Ke, CMV-Or, CMV-SD2 izolatlarının konukçularda oluşturdukları belirtiler ile benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlar CMV-D izolatının da belirtilolojik olarak alt grup I A'ya ait olduğunu göstermektedir.

CMV-B izolatının biber bitkilerinde yaprak kıvrılması, damar bantlaşması ve hafif mozaik belirtillerine neden olmuştur. *Nicotiana glutinosa* L. bitkisinde CMV-K ve CMV-D izolatlarına benzer şekilde yaprak şeklinin bozulması, yaprak ayasının daralması, damar bantlaşması ve sistemik mozaik belirtillerine neden olmuştur. *Nicotiana tabacum* L.'Xanthi NC'', *Nicotiana tabacum* L.'Xanthi'', *Nicotiana tabacum* L.'Samsun NN'', *Nicotiana tabacum* L bitkilerinde sadece sistemik mozaik, kavun bitkilerinde sistemik mozaik, yaprak ayasının daralması ve bitki ölümlerine, domateste yaprak simetrisinin bozulması, ayakkabı bağı, fear leaf

oluşumu ve sistemik mozaik simptomlarına neden olmuştur. Elde edilen simptomlojik bulgular bu izolatında simptomolojik olarak CMV-K ve CMV-D gibi alt grup IA'ya ait olduğunu desteklemektedir.

CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının virionlarının arılaştırılmasından sonra elektrikli ortamda hareket hızları kontrol edildiğinde her üç izolatında yavaş, ancak CMV-K izolatının diğer iki izolattan az oranda daha yavaş hareket etmesi ve Rodriguez ve ark., (1995)'nin yaptıkları çalışmada kullandıkları CMV-P (alt grup I) izolatı ile benzerlik göstermesi CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının CMV-P (alt grup I) izolatı gibi alt grup I'e ait olduğunu göstermiştir.

İzolatların genetik yapılarına göre alt grup içerisindeki yerinin belirlenmesi amacıyla yapılan moleküler çalışmalarda da her üç izolatın alt grup IA'ya ait olduğu sonucu ortaya çıkmıştır.

CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının ait oldukları alt grubun virüsün RNA-2 geni üzerinde bir bölgeye göre belirlenmesi için (RW8) ve (RV11) dejenere primer çiftini kullanarak yapılan PCR çalışması sonucunda beklenen 650 bp'lik DNA bandı agaroz jelde gözlenmiş ve izolatların hangi alt grup içinde olduğunu saptamak için yapılan RFLP çalışması sonucunda RNA-2 geni üzerinde 650 bp'lik bölgede *MluI* restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği A▼CGCG T / T GCGC▲A bölgenin olmadığı saptanmıştır. Benzer sonuçlar daha Sialer ve ark., (1999) tarafından alınmış ve aynı enzimlerin kullanılması ile elde ettiği sonuçlarla paralellik göstermiştir. Araştırmacıların çalışmalarında kullandıkları kontrol CMV-Fny (alt grup IA) ve testleme sonucunda *MluI* restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği bölgesi bulunmayan ve alt grup IA' dahil ettikleri CMV-77 izolatları gibi CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarında alt grup IA'a dahil olduğu yada Fny ve 77 izolatı ile aynı ırk oldukları sonucu ortaya çıkmıştır.

Alt grub'un RNA-1 geni üzerinde bir bölgeye göre saptanması için Paradies, ve ark., (2000)'nin kullandıkları (R1-3') ve (R1-5') primer çiftini kullanarak yapılan PCR çalışması sonucunda 408nt lik DNA bandını agaroz jelde görüntülenmiş ve bu bölgede de *MluI* restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği A▼CGCG T / T GCGC▲A bölgenin olmadığı ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçlar araştırmacıların aynı primerleri kullanarak elde ettiği 408nt luk DNA bandı ve *MluI*

enzimi kullanarak elde ettikleri sonuçların aynısı olup CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının önceki çalışmalarda rapor edilen CMV-Ya, CMV-OR ve CMV-L43 izolatları gibi alt grup IA' ya ait olduğu yada bu izolatlarla aynı ırk olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Aynı çalışma içerisinde CMV-Fny (alt grup IA) ırkının RNA-2 geni üzerinde bulunan ve 2a proteinini kodlayan 194 bp'lik bölgeye özel primerler kullanılarak bu çoğaltılmış ve agaroz jelde görüntülenmiş ve CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının CMV-Fny ile örtüştüğü kanıtlanmıştır.

Alt grub'un kılıf protein geni üzerinde bir bölgeye göre saptanması amacıyla yaptığımız ve Singh ve ark. (1995)' nın araştırmalarında kullandığı CMV alt grup II izolatlarında 499–502 bp, CMV alt grup I izolatlarında 486–488 bp uzunluktaki bir bölgeyi çoğaltan (Downstream): ve (Upstream) primer çiftini kullanarak yapılan PCR çalışması sonucunda 488 bp'lik DNA bandı agaroz jelde görüntülenmiştir. Çoğaltılan bu bölgede *Eco* RI enziminin tanıdığı ve kestiği G▼AATT C / C TTAA▲G bölgenin, *Hind* III enziminin tanıdığı ve kestiği A▼AGCT T / T TCGA▲A bölgenin, *Bam* HI enziminin tanıdığı ve kestiği G▼GATC C / C CTAG▲G bölgenin ve *Msp* I enziminin tanıdığı ve kestiği C▼CG G / G GC▲C bölgenin olup olmadığını saptamak amacıyla yapılan RFLP çalışması sonucunda *Eco* RI, *Hind* III ve *Bam* HI enzimlerinin çoğaltılan bölgede bir noktayı kesmediği buna karşın *Msp* I enziminin çoğaltılan bölgeyi kestiği 337 ve 151 bp'lik iki fragmente ayırdığı saptanmış ve agaroz jelde görüntülenmiştir. Araştırma sonuçları Singh ve ark. (1995)'nın sonuçları ile örtüşmekte ve CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının araştırmacıların RFLP çalışmalarında kullandıkları enzimlerden *Msp* I enzimi ile keserek 337 bp ve 151 bp'lik iki fragment elde ettikleri CMV-SL ve CMV-MR izolatları gibi alt grup I içerisinde olduğu yada bu izolatlar ile aynı olduğunu göstermiştir.

Araştırmalar sonunda elde edilen biyolojik, virion analizleri ve moleküler sonuçlar dikkate alındığında CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının grup IA'ya ait olduğu sonucu belirlenmiştir.

Bu izolatların doğada bitkilerde hastalık oluşturduğu zaman kavun, domates ve biber ekim alanlarında ELISA ile testlemelerde CMV ile infekteli olduğu saptanan bitkiler ve bu bitkilerden alınan örneklerin iklimlendirme odalarında mekanik

inokulasyon yöntemi ile test bitkilerine, kavun, domates ve biber bitkilerine aşılması sonucunda elde edilen infekteli bitkilerde satellit RNA'lerin varlığı ve satellit RNA'lerin CMV izolatlarının simptom şiddeti üzerindeki etkileri araştırılmıştır. CMV-K, CMV-D ve CMV-B infekteli kavun, domates ve biber bitkilerinde CMV Satellit RNA'nın varlığının ve bu satellit RNA'nın molekül ağırlığının saptanması amacıyla yapılan PCR çalışmalarında Monti ve ark., (1999)'nın ve Grieco ve ark., (1997)'nin kullandıkları primer çiftleri kullanılmıştır. PCR çalışmaları sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jelde kontrol edilmesi sonucunda 700 bp'lik Satellit RNA'lerden elde edilen DNA bantları görüntülenmiştir. Araştırma sonuçları daha önce bildirilen CMV-satellit RNA'lerin büyüklükleri göz önünde tutulduğu zaman farklılık göstermektedir. Diğer araştırmacıların buldukları sonuçlar daha çok CMV-satellit RNA'lerin 300 bp ile 400 bp arasında olduğu ve bu güne kadar CMV'nin bu büyüklükte satellit RNA'nın çoğalmasını desteklediği yönündedir. Örneğin Grieco ve ark., (1997) çalışmaları sonucunda 334-340 nt luk satellit RNA amplifiye ettiklerini ve başka araştırmacıların bildirilerine dayanarak CMV-TTS (alt grup IB)'nin 339 nt, CMV-Tfn (alt grup IB)'nin 390 nt satellit RNA'nın çoğalmasını sağladığını bildirmişlerdir. Monti ve ark.,(1999) da CMV-14-3 izolatında 337-344 bp'lik satellit RNA saptanmıştır. Önceki çalışmalarda belirtilen satellit RNA'lerin çoğunlukla alt grup IB içerisinde bulunan CMV ırkları tarafından çoğaltıldığı dikkat çekmektedir. Fakat bu çalışmada testlerde kullanılan ve karakterize edilen izolatların üçüde alt grup IA içerisinde bulunmaktadır. Buradan Türkiye'de araştırma bölgemizde kavun, domates ve biberlerde hastalık oluşturan CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının diğer alt gruplar içerisindeki CMV ırklarından farklı olarak 700 bp'lik satellit RNA'nın çoğalmasına yardımcı olduğu sonucu çıkmaktadır.

Saptanan satellit RNA'lerin CMV'nün virülensliği üzerine etkisini araştırmak için yürütülen çalışmalarda CMV-K izolatında satellit RNA'nın hastalığı şiddetlendirdiği hatta bu izolatın bitkilerdeki oluşturduğu simptomların tamamen satellit RNA'den kaynaklandığı sonucu çıkmıştır. Bu çalışmada CMV-K, CMV-D ve CMV-B ile infekteli bitkilerden virüsün partikülleri virion analizi yöntemi ile arılatılmış ve satellit RNA'leri içermediği düşünülen saf virionlar mekanik

inokulasyon yöntemi ile *Nicotiana glutinosa* L. bitkilerine aşılanmıştır. Simptomoljik gözlemler sonucunda CMV-K'nın saf virionları ile aşılanan bitkilerde symptom gözlenmediği halde CMV-D ve CMV-B izolatlarının saf virionları ile aşıladığımız bitkilerde virüsün tipik symptom oluşturduğu saptanmıştır. Daha sonra aşılanan bu bitkiler ELISA ve PCR ile testlendiğinde bütün bitkilerin virüsle infekteli olduğu saptanmıştır. CMV-K, CMV-D ve CMV-B saf virionları ile infekteli bitkiler PCR yöntemiyle satellit RNA'ye karşı testlendiğinde bitkilerin hiçbirisinde beklenen 700 bp'lik satellit RNA elde edilememiştir. CMV-K'nın saf virionları ile infekteli bitkide virüsün varlığı ve çoğalması, buna karşın satellit RNA'lerin çoğalmayışı bu izolatta symptom oluşumunun tamamen satellit RNA'den kaynaklandığını göstermektedir. CMV-D ve CMV-B saf virionları ile infekteli bitkilerde symptom oluşturmaları, virüsün var olması ve satellit RNA'in olmayışı bu iki izolatın symptom oluşturmada satellit RNA'lerin birincil etken olmadığı sonucu çıkarmaktadır. CMV-D ve CMV-B izolatları Şanlıurfa izolatları olup virionların elektrikli ortamdaki hareket hızları bakımından Adana'dan toplanan CMV-K izolatından az oranda farklılık göstermektedir. Üç izolatta saflaştırılan virionlarının bitkilere aşılması sonucunda virüsün bitkide çoğalması ancak satellit RNA'in bulunamayışı araştırma sonucunda saptanan 700 bp'lik satellit RNA'in CMV tarafından desteklenen bir satellit virüs olabileceği ve kendi protein kılıfı içerisinde paketlenildiği yada doğada var olan yeni satellit RNA olabileceği şüphesini doğurmuştur.

CMV-K saf virionları ile infekteli *Nicotiana glutinosa* L. Bitkisine ilk inokulasyondan 15 gün sonra bu izolat ve CMV-D ve CMV-B izolatları arılaştırılmamış halde mekanik inokulasyon yolu ile aşılanmış ve 15 gün süreyle iklimlendirme odasında kontrol edilmiştir. Daha önce ön inokulasyon yapılan bitkilerde sonradan aşılanan virüsün symptom oluşturmadağı sonucunu görülmüştür. Bu sonuç CMV-K izolatının zayıf ırk olduğunu ve bitkide çoğalabildiğini ayrıca sonradan olabilecek bulaşmalarda bitkiyi şiddetli ırka karşı (çapraz-koruma) koruyabileceği ortaya koymuştur. Elde edilen sonuç Montasser ve ark., (1998)'nın zayıf ırkların şiddetli ırkların kontrolü için kullanılabileceği fikri ile örtüşmektedir. Önceki çalışmalarda belirtildiği gibi araştırmacılar ılımlı satellit RNA'i zayıf ırk olan CMV-S ırkı ile birlikte bitkilere inokule etmişler ve bu yolla biber ve kavun

bitkilerinde zayıf ırk CMV-S'in şiddetli CMV-D ve CMV-16 ırklarının kontrol altına alınmasında kullanılabileceğini saptamışlardır.

Sonuç olarak araştırmada kavundan izole edilen CMV-K, domatesten izole edilen CMV-D ve biberden izole edilen CMV-B izolatları kullanılmıştır. Her üç izolat biyolojik ve moleküler özellikler bakımından birbirinin aynısı olup ve CMV alt gruplandırılmasında her üç izolat da alt grup IA'ya dahil izolatlardır. Partiküllerin elektrikli ortamdaki hareket hızları bakımından CMV-D ve CMV-B izolatları aynı olup, CMV-K diğer iki izota göre yavaş hareket etmesi nedeniyle farklılık göstermektedir. Bu izolatların hepsi kavun, domates ve biberde ve üzerinde çalışılan test bitkilerinde 700 bp molekül ağırlığında satellit RNA'nın çoğalması için yardımcı virüstür. CMV-K izolatı 700 bp'lik satellit RNA'nın yokluğunda bitkilerde hastalık oluşturmamakta ve latent olarak kalmaktadır. Ancak satellit RNA ile birlikte olduğu zaman simptomsu neden olmaktadır. Satellit RNA'nın varlığı CMV-K izolatı için simptomsu ana nedenidir. Saptanan 700 bp'lik satellit RNA CMV-D ve CMV-B izolatlarında simptomsu şiddetini etkilememektedir. CMV-D ve CMV-B izolatları satellit RNA'nın yokluğunda da bitkilerde simptomsu neden olmaktadır. Ayrıca CMV-K izolatına ait saf virionların satellit RNA'den bağımsız olarak bitkiye inokule edilmesinden 13–15 gün sonra olacak CMV enfeksiyonlarını ve hastalık oluşumunu engellediği ve CMV-K'nın zayıf bir ırk olduğu ortaya çıkmıştır.

Bilindiği gibi bitkilerde hastalık oluşturan virüsler ile mücadele etmek ve etkili bir şekilde onları kontrol altına almak kolay değildir. CMV'nin kontrolünde de bütün virüslerde olduğu gibi kültürel yöntemlerin kullanımı, temiz üretim materyali, vektörlerle mücadele etmenin önemi büyüktür. Belirtilen bütün bu yöntemlerle dahi virüsler yeterince kontrol altına alınamamaktadır. Bu nedenle CMV ile mücadelede hastalığa sebep olan asıl etmeni saptayıp onunla mücadele etme gereği ortaya çıkmaktadır. Bu araştırmada bazı izolatların (CMV-K) mücadelesinde satellit RNA'nın kontrol altına alınması gerektiği, bazı izolatlarda da (CMV-D ve CMV-B) asıl virüsün kontrol altına alınması gerektiği sonucuna varılmıştır. CMV-K izolatları ile mücadele etmek için CMV-K'nın çapraz-koruma yolu ile şiddetli ırklara karşı kullanılabileceği ve gen transferi yolu ile simptomsu neden olan satellit RNA'lerin bitkide bloke edilmesi tavsiye edilebilir.

KAYNAKLAR

- AGRIOS, G. N., 1997. Plant diseases caused by viruses. *In Plant Pathology*. p: 479-556.
- ANONYMOUS, 2002a. International Committee on Taxonomy of Viruses, Cucumovirus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB>
- ANONYMUS, 2002b. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı İzmir İl Müdürlüğü. Bitki Koruma El Kitabı.No:352 İZMİR, s.536.
- ANONYMUS, 2003. Tarımsal Yapı (Üretim, Fiyat, Değer). Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü. ANKARA
- AHMAD, I.B., and SCOTT, H.A., 1985. Identification and serotyping of cucumber mosaic and peanut stunt viruses from Arkansas. *Plant Disease* 69: 891-893.
- ALONSO-PARADOS, J. L., ARANDA, M. A., MALPICA, J. M. , GARCIA-ARENAL, F., and FRAILE, A., 1998. Satellite RNA of cucumber mosaic cucumovirus spread epidemically in natural populations of its hepler virus. *Phytopathology* 88: 520-524.
- ARANDA, M.A., FRAILE, A., and GARCIA-ARENAL, F., 1993. Genetic variability and evolution of the satellite RNA of cucumber mosaic virus during natural epidemics. *Journal of Virology*, Vol. 67 (10): 5896-5901.
- BALL, E., 1990. Agar double diffusion, plates (ouchterlony): viruses, in, serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. (Eds, R. Hampton; E, Ball; S.De Boer), APS Press, USA, p.111-120.
- BARBARA, M, and RICCIONI, I., 1993. Improvement of diagnostic methods to detect plum pox virus in apricot plants. *Agriculture*, 139-141.
- BERNAL, J.J. and GARCIA –ARENAL, F., 1994. Complex interactions among several nucleotide positions determine phenotypes defective for long-distance transport in the satellite RNA of cucumber mosaic virus. *Virology* 200, 148-153.

- BLANCARD, D., 1988. Maladies de la tomate: observer, identifier, lutter. Rev Hort INRA.
- BRUNT, A., CRABTREE, K. & GIBBS, A., 1990. Viruses of Tropical Plants. 225-229.
- BURGYAN, J. and GARCIA-ARENAL, F., 1998. Template-independent repair of the 3' end of cucumber mosaic virus satellite RNA controlled by RNAs 1 and 2 of helper virus. *Journal of Virology*, Vol. 72, No. 6, p. 5061-5066.
- CANTO, T., PRIOR, D.A.M., HELLWALD, K.H., OPARKA, K.J., and PALUKAITIS, P., 1997. IV Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of cucumber mosaic virus. *Virology* 237, 237-248.
- CILLO, F., FINETTI-SIALER, M. M., PAPANICE, M. A., and GALLITELLI, D., 2004. Analysis of mechanisms involved in the cucumber mosaic viruses satellite RNA-mediated transgenic resistance in tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* Vol. 17 (1), pp. 98-108.
- CLARK, M.F., and ADAMS, A.N., 1977. Characteristic of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses, *J.Gen.Virol.*, 34: 475-483.
- COHEN, J., LOEBENSTIEN, G., and SPIEGEL, S., 1988. Infection of sweet potato by cucumber mosaic virus depends on the presence of sweet potato feathery mottle virus. *Plant Disease* 72:583-585.
- COLLMER, C.W., and KAPER, J.M., 1985. Double-stranded RNAs of cucumber mosaic virus and its satellite contain an unpaired terminal guanosine: implications for replication. *Virology* 145, 249-259.
- CRESCENZI, A., BARBAROSSA, L., CILLO, F., DI FRANCO, A., VOVLAS, N., and GALLITELLI, D., 1993. Role of cucumber mosaic virus and its satellite RNA in the etiology of tomato fruit necrosis in Italy. *Arch. Virol.* 131: 321-333.
- DANIELS, J., and CAMPBELL, R.N., 1992. Characterization of cucumber mosaic virus isolates from California. *Plant Dis.*, 76, 1245-1250.

- DAVIS, R. F., WEBER, Z., POSPIESZYN, H., SILBERNAGEL, M., and HAMPTON, R. O., 1981. Seedborne cucumber mosaic virus in selected *Phaseolus vulgaris* germ plasm and breeding lines in Idaho, Washington, and Oregon. *Plant Disease* 65:492-494.
- DIAZ-RUIZ, J.R. and KAPER, J. M., 1977. Cucumber mosaic virus-associated RNA 5. III. Little nucleotide sequence homology between CARNA 5 and helper RNA. *Virology* 80, 204-213.
- DING, S.-W., ANDERSON, B.J., HAASE, H. R., and SYMONS, R. H., 1994. New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genom. *Virology* 198, 593-601.
- ESCRIU, F., FRAILE, A., and GARCIA-ARENAL, F., 2000. Evolution of virulence in natural populations of the Satellite RNA of cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 90: No:5, 480-485.
- FINETTI-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.
- GAL-ON, A., CAPLAN, I., ROOSINCK, M. J., and PALUKAITIS, P., 1994. The kinetics of infection of zucchini squash by cucumber mosaic virus indicate a function for RNA1 in virus movement. *Virology* 205, 280-289.
- GAL-ON, A., CAPLAN, I., and PALUKAITIS, P., 1995. Differential effects of satellite RNA on the accumulation of cucumber mosaic virus RNAs and their encoded proteins in tobacco vs zucchini squash with two strains of CMV helper virus. *Virology* 208, 58-66.
- GALLITELLI, D., 1991. Present status of controlling cucumber mosaic virus. In: Khetarpal R. K., Koganzawa, Haididi A. (eds), *Control of Plant Disease*, pp. 507-523. APS Press, st. Poul, MN.
- 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.
- GALLITELLI, D., GRIECO, F. and CILLO, F., 1997. The Potential of a beneficial satellite RNA of cucumber mosaic cucumovirus to acquire deleterious Functions: Nature *Versus* Greenhouse. Pages 100-106 in: *Virus-resistant transgenic plants: Potential ecological impact*. M. Tepfer and E. Balasz, eds. Springer-Verlag, Berlin and INRA, Paris.
- GALLITELLI, D., and MINAFRA, A., 1994. Electroforesis. Course on Plant Virus Diagnosis, 15-30 October 1994. Adana-Turkey. Page: 89-99.
- GARCIA-ARENAL, F., ZAITLIN, M., and PALIKAITIS, P., 1987. Nucleotide sequence of analysis of six satellite RNAs of cucumber mosaic virus: Primary sequence and secondary structure alteration do not correlate with differences in pathogenicity. *Virology* 158, 339-347.
- GONSALVES, D., PROVIDENTI, R., and EDWARDS, M. C., 1982. Tomato white leaf: the relation of an apparent satellit RNA and cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 72, 1533-1538.
- GORDON, K.H. J. and SYMON, R.H., 1983. Satellite RNA of cucumber mosaic virus forms a secondary structure with partial 3'-terminal homology to genomic RNAs. *Nucleic Acids Research*, Volume 11 Number 4.
- GOULD, A. R., PALUKAITIS, P., SYMONS, R. H. and MOSSOP, D. W., 1978. Characterization of a satellite RNA associated with cucumber mosaic virus. *Virology* 84, 443-455.
- GRAVES, M.V. and ROOSSINCK, M.J., 1995. Characterization of defective RNAs derived from RNA 3 of the fny strain of cucumber mosaic cucumovirus. *Journal of Virology*, Vol. 69, No. 8, p. 4746-4751.
- GRIECO, F., LANAVE, C. and GALLITELLI, D., 1997. Evolutionary dynamics of cucumber mosaic satellite RNA during natural epidemics in Italy. *Virology* 229, 166-174.

- HAIDIDI, A., MONTASSER, M. S., LEVY, L., GOTH, R. W., CONVERSE, R. H., MADKOUR, M. A., and SKRZECKOWSKI, L. J., 1993. Detection of potato leafroll and strawberry mild yellow-edge luteoviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. *Plant Dis.* 77:595-601.
- HIDAKA, S., HANADA, K., ISHIKAWA, K. and MURA, K.-I., 1988. Complete nucleotide sequence of two new satellite RNAs associated with cucumber mosaic virus. *Virology* 164, 326-333.
- 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.
- HU, J. S., LI, H. P., BARRY, K., WANG, M., and JORDAN, R., 1995. Comparison of dot blot, ELISA, and RT-PCR assays for detection of two cucumber mosaic virus isolates infecting banana in Hawaii. *Plant Dis.* 79:902-906.
- KAPER, J.M. and DIAZ-RUIZ, J.R., 1977. Molecular weights of the double-stranded RNAs of cucumber mosaic virus strains s and its associated RNA 5. *Virology* 80, 214-217.
- KAPER, J.M., GELETKA, L. M., WU, G. S., and TOUSIGNANT, M. E., 1995. Effect of temperature on cucumber mosaic virus satellite-induced lethal tomato necrosis is helper virus strain dependent. *Arch. Virology* 140: 65-74.
- KAPER, J. M. and TOUSIGNANT, M. E., 1977. Cucumber mosaic virus-associated RNA 5. I. Role of host plant and helper strain in determining amount of associated RNA 5 with virions. *Virology* 80, 186-195.
- KAPER, J.M., TOUSIGNANT, M. E. and STEEN, M. T., 1988. Cucumber mosaic virus-associated RNA 5. XI. Comparison of 14 CARN 5 variants relates ability to induce tomato necrosis to a conserved nucleotide sequence. *Virology* 163, 284-292.
- 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.

- KEARNEY, C. M., GONSALVES, D., and PROVVIDENTI, R., 1990. A severe strain of cucumber mosaic virus from china and associated satellite RNA. *Plant Disease*, 74:819-823.
- KUCHAREK, T.A., PURFICULL, D.E., and CHRISTIE, R.G., 1998. Disease notes. The association of severe epidemics of cucumber mosaic in commercial fields of pepper and tobacco in north Florida with inoculum in *Commelina benghalensis* and *C. communis*. *Plant Disease* 82: 1172.
- KURATH, G. and PALUKAITIS, P., 1989. RNA Sequence heterogeneity in natural populations of three satellite RNAs of cucumber mosaic virus. *Virology* 173, 231-240.
- KURATH, G. and PALUKAITIS, P., 1990. Serial Passage of the infectious Transcripts of a Cucumber Mosaic Virus Satellite RNA Clone Results in Seguece Heterogeneity. *Virology* 176, 8-15.
- KUWITE, C.A., and PURFICUL, D.E., 1982. Some properties of a cucumber mosaic virus strain isolate from winged bean in Florida. *Plant Disease* 66:1071-1073.
- LOT, H. and KAPER, J. M., 1976. Further studies on the RNA component distributon among the nucleoproteins of cucumber mosaic virus. *Virology* 74, 223-226.
- MARTELLI, G.P., 2003a. New classification of plant virüses. Course on ntegrated Pest Management of Mediterranean Fruit Crops in IAM-B (CHIAM).pp.1-36
- MARTELLI, G.P., 2003b. Applied Virology. Course on Integrated Pest Management of Mediterranean Fruit Crops in IAM-B (CHIAM).pp.1-44
- MONTASSER, M.S., TOUSIGNANT, M.E., and KAPER, J.M., 1998. viral satellite RNAs fort he prevention of cucumber mosaic virus (CMV) disease in field-grown pepper and melon plants. *Plant Dis.* 82:1298-1303.

- MONTI, M.M., VALANZUOLO, S., CASSANI, G. and COLOMBO, M., 1999. transgenic tomatoes expressing a cucumber mosaic virus satellite RNA; Field testing and analysis of satellite RNA spread. *Journal of Plant Pathology*, 81(2), 113-122.
- MOOSOP, D. W., and FRANCKI, R. I. B., 1978. Survival of a satellite RNAs *in vivo* and its dependence on cucumber mosaic virus for replication. *Virology* 86, 562-566.
- MOOSOP, D. W., and FRANCKI, R. I. B., 1979. comparative studies on two satellite RNAs of *cucumber mosaic virus*. *Virology* 95, 395-404.
- MORIONES, E., DIAZ, I., RODRIQUEZ-CEREZO, E., FRAILE, A., and GARCIA-ARENAL, F., 1991. Differential interactions among strains of tomato aspermy virus and satellite RNAs of *cucumber mosaic virus*. *Virology* 186, 475-480.
- NOGANO, H., MISE, K., OKUNO, T. and FURUSAWA, I., 1999. The cognate coat protein is required for cell-to-cell movement of a chimeric brome mosaic virus mediated by the cucumber mosaic virus movement protein. *Virology* 265, 226-234.
- OWENS, J. and PALUKAITIS, P., 1988. Characterization of cucumber mosaic virus. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. *Virology* 166, 495-502.
- OWENS, J. and KAPER, J.M., 1977. Cucumber mosaic virus-associated RNA 5. II. *In vitro* translation in a wheat germ protein-synthesis system. *Virology* 80, 196-203.
- PALUKAITIS, P. and ROSSINCK, M. J., 1995. Variation in the hypervariable region of cucumber mosaic virus satellite RNAs is accepted by the helper virus and the initial sequence context. *Virology* 206, 765-768.
- PALUKAITIS, P., ROSSINCK, M. J., DIETZGEN, R. G., and FRANCKI, R. I. B., 1992. Cucumber mosaic cucumovirus, In advance in virus research (Maramorosch; K., Murphy, F. A., and Shatkin, A. J., eds), Academic, San Diego, pp. 281-348.

- PALUKAITIS, P. and ZAITLIN, M., 1984. Satellite RNAs of cucumber mosaic virus: Characterization of two new satellites. *Virology* 132, 426-435.
- PARADIES, F., FINETTI SIALER, M., GALLITELLI, D., CASTELLANO, M.A., DI FRANCO, A., DIGIARO, M., MARTELLI, G. P. and YILMAZ, M. A., 2000. Partial characterization of *cucumber mosaic virus* isolates from citrus and grapevine. *Journal of Plant Pathology*, 82 (2), 133-145.
- PEDEN, K. W. C. and SYMON, R. H., 1973. Cucumber mosaic virus contains a functionally divided genom. *Virology* 53, 487-492.
- PERRY, K.L., ZHANG, L., SHINTAKU, M.H. and PALUKAITIS, P., 1994. Mapping determinants in cucumber mosaic virus for transmission by *aphis gossypii*. *Virology* 205, 591-595.
- PERRY, K.L., ZHANG, L., and PALUKAITIS, P., 1998. Amino acid changes in the coat protein of cucumber mosaic virus differentially affect transmission by the aphide *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *Virology* 242, 204-210.
- POLLARD, D.G., 1973. Plant penetration by feeding aphids (Hemiptera: Aphidoidea): a review. *Bull. Entomol. Res.* 62, 631-714.
- RICHARDS, K. E., JONARD, G., JACQUEMOND, M. and LOT, H., 1978. Nucleotide sequence of cucumber mosaic virus-associated RNA 5. *Virology* 89, 395-408.
- RODRIGUEZ-ALVARDO,G., KURATH,G., and DODDS, J. A., 1995. Heterogeneity in pepper isolates of cucumber mosaic virus. *Plant Dis.* 79:450-455.
- ROSSINCK, M.J., 2001. Cucumber mosaic virus, a model for RNA virus evolution. *Molecular Plant Pathology* 2(2), 59-63.
- ROOSSINCK, M.J., 2002. Evolutinary history of *cucumber mosaic virus* deduced by phylogenetic analyses. *Journal of Virology*, 76 (7), 3382-3387.
- ROSSINCK, M.J., and PALUKAITIS, P., 1991. Differential replication in zucchini squash of a cucumber mosaic virus satellite RNA maps to RNA 1 of the helper virus. *Virology* 181, 371-373.

- ROOSSINCK, M.J., ZHANG, L., and HELLWALD, K., 1999. Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of cocumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *Journal of Virology*, 73 (8), 6752-6758.
- SCHWINGHAMER, M. W. and SYMON, R. H., 1977. Translation of the four major RNA species of cucumber mosaic virus in plant and animal cell-free systems and toad oocytes. *Virology* 79, 88-108.
- SHUKLA, D.D., TEAKLE, D.S, and GOUGH, K.H., 1980. Periwinkle, a latent host for broad wilt and cucumber mosaic viruses in australia. *Plant Disease* 64:802-803.
- SINGH, Z., JONES, R.A.C., and JONES, M.G.K., 1995. Identification of cucumber mosaic virus subgroup i isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR. *Plant Dis.* 79:713-716.
- SUZUKI, M., KAWATA, S., KATAOKA, J., MASUTA, C., NITTA, N., and TAKANAMI, Y., 1991. Functional analysis of deletion mutants of cucumber mosaic virus RNA 3 using an *in vitro* transcription system. *Virology* 183, 106-113.
- TAKANAMI, Y., 1981. A Striking change in symptoms on cucumber mosaic virus-infected tobacco plants induced by a satellite RNA. *Virology* 109, 120-126.
- TALIANSKY, M. and GARCIA-ARENAL, F., 1995. Role of cucumber capsid protein in long-distance movement within the infected plant. *Journal of Virology* 69 (2), 916-922.
- TANNE, E., and ZIMMERMAN-GRIES, S., 1980. cucumber mosaic virus on eggplant in Israel. *Plant Disease* 64:371-372.
- VARGÜN, Z. ve ERTUNÇ, F., 1995. Sera koşullarında hıyar mozayik ve zucchini sarı mozayik virüslerinin kabak bitkisinde karşılıklı etkileşimleri üzerine araştırmalar. 7. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 26–29 Eylül, 1995, Adana. Bildiriler, 387–392

- WHITE, J. L. and KAPER, J. M., 1989. A Simple method for detection of viral satellite RNAs in small plant tiissue sample. *Journal of Virology Meythods*, 23, 83-94.
- WHITE, P. S., MORELAS, F. J., and ROOSSINCK, M. J., 1995. Interspecific reassortment in the evolution of a cucumovirus. *Virology* 207, 334-337
- XU, Z., and BARNETT, O.W., 1984. Identification of cucumber mosaic virus strain from naturally infected peanuts in China. *Plant Disease* 68:386-389.
- YILMAZ, M. A., 1976. Akdeniz bölgesinde muzlarda muz mozayik virüsü ve özçürüklüğü yapan fungal etmenler üzerine araştırmalar. Ç.Ü. Bitki Kruma Bölümü, Doçentlik Tezi, s.125.
- YILMAZ, M. A., and DAVIS, R. F., 1984. Purification and particle morphology of TMV, CMV, and ZYMV isolated from various cultivated crops grown along the Mediterranean Coast of Turkey. *J. Turkish Phytopathology* 13(1), 29-38.
- YILMAZ, M.A., DAVIS, R.F., and VARNEY, E.H., 1993. Viruses on vegetable crops along the Mediterranean Coast of Turkey. *Phytopathology*, 73, 378.
- YILMAZ, M. A., KAŞKA, N., GEZEREL, Ö., ÇINAR, A., 1979. Turfanda domateslerde ekim ve dikim zamanlarının virüs hastalıklarına etkisi. TÜBİTAK Proje no: ABBAÜ-11.

ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Adana'nın Tufanbeyli ilçesinde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Tufanbeyli'de, lise öğrenimimi Adana'da tamamladım. 1992 yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünden Ziraat Mühendisi olarak mezun oldum. 1993-1994 yılları arasında Çukobirlik Erzin Kooperatif'inde bir yıl süreyle teknik eleman olarak çalıştım. 1995-1997 yılları arasında üç yıl süreyle Tufanbeyli Belediyesi'nde Yazı İşleri Müdürlüğü ve Fen Memurluğu görevlerini yürüttüm. 1998 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Entitüsü'ne Bitki Koruma Anabilim Dalı'nın Yüksek Lisans öğrencisi olarak kaydoldum. 24-28 Kasım 2001 tarihleri arasında Morocco-Rabat'da düzenlenen (CTV Detection and Strain Typing by PCR Based Methods) isimli kursa katıldım. 2002 yılında Yüksek Lisan çalışmamı tamamladım ve Ziraat Yüksek Mühendisi ünvanını aldım. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Entitüsü'ne Bitki Koruma Anabilim Dalı'nın Doktora öğrencisi olarak kaydoldum. 2003-2004 yıllarında İtalya'da Akdeniz ülkelerinin üye olduğu CHIEAM'a bağlı The Mediterranean Agronomic Institute of Bari (MAIB) de 9 ay süreyle Integrated Pest Management of Mediterranean Fruit Crops konusundaki kursa katıldım.

1998 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde göreve başladım ve halen bölümde çalışmaktayım.

EKLER

Ek 1.

ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

1-Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4 (Fosfat tamponu)

8.0 gr	NaCl
0.2 gr	KH ₂ PO ₄
2.9 gr	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O veya
	2.3 gr Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O
	1.44. gr Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O
	1.15 gr Na ₂ HPO ₄ (anhdrous)

0.2 gr KCl

0.2 gr NaN₃

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH sı 0.1 N NaOH veya 0.1 N HCl ile ayarlanmış ve 4 °C de saklanmıştır.

2-Coating buffer pH 9.6 (Kaplama tamponu)

1.59 gr Na₂CO₃

2.93 gr NaHCO₃

0.2 gr NaN₃

Yukarıda miktarı verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH sı ayarlanmış ve 4 °C de saklanmıştır.

3-Washing Buffer (Yıkama tamponu)

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

4-Sample Extraction Buffer (Örnek tamponu)

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

5-Enzyme Conjugate Buffer (Konjugat tamponu)

Bir litre örnek tampon çözeltisine 2 gr ovalbumin (egg albumin) ilave edilerek hazırlanmıştır.

6-Substrat Buffer pH 9.8 (Substrat tamponu)

97 ml Diethanolamine 800 ml saf su içine ilave edildikten sonra 0.2 gr NaN_3 konmuş ve HCl ile pH 9.8'e ayarlanarak 1 litreye tamamlanmıştır.

Ek. 2

İmmunodiffusion Testi Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

1-Fosfat tamponu (0.7M, pH: 7.4)

Sodyum dihidrojenfosfat (0.35M) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5.460 gr
Sodyum hidrojenfosfat (0.35M) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	12.534 gr

Yukarıdaki miktarları verilen kimyasallar 80 ml saf su içerisinde eritilip pH ayarlandıktan sonra son hacim 100 ml ye tamamlanmıştır.

2-Fosfat tamponu (0.1M, pH: 7.2)

Sodyum dihidrojenfosfat (0.05M) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.8 gr
Sodyum hidrojenfosfat (0.05M) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	17.9 gr

Yukarıdaki miktarları verilen kimyasallar 80 ml saf su içerisinde eritilip pH ayarlandıktan sonra son hacim 100 ml ye tamamlanmıştır.

3-SDS (% 10)

5 gr Sodyum dodesil sülfat 50 ml saf su içerisinde ısıtılarak eritilmiştir.

4-Tris (0.05 M, pH 7.2)

0.394 gr Tris-HCl 80 ml saf su içerisinde eritilip pH sı ayarlandıktan sonra son hacim 100 ml ye tamamlanmıştır.

Ek. 3

Virion Analizleri Çalışmalarında kullanılan Çözeltiler

1-Sodyum citrat (0.2M, pH:6.5)

2.94 gr Sodyum citrat 40 ml saf su içerisinde eritildi. pH: 6.5 olarak ayarlandıktan sonra son hacim 50 ml ye tamamlandı.

2-EDTA (5mM, pH:7,0)

0.093 gr EDTA 40 ml saf su içerisinde eritildi. pH:7,0 olarak ayarlandıktan sonra son hacim 50 ml ye tamamlandı

Ek. 4

Total RNA Analizlerinde Kullanılan Çözeltiler

1-Ekstraksiyon bufferı (0.1M glycine-NaOH, pH.9,0; 50mM NaCl; 10mM EDTA; 2% sodium dodecyl sulfate [SDS]; 0,2% sodium diethyldithiocarbamate [DİECA-Na]; ve 1% sodium lauryl sarcosine).

0.750 gr glycine 80 ml saf su içerisinde eritilmiş ve NaOH kullanılarak pH'sı 9,0 olarak ayarlanmıştır. Daha sonra bunun üzerine 0.292 gr NaCl ve 0.288 gr EDTA ilave edilerek eriyinceye kadar karıştırılmıştır. Karışım iyice eridikten sonra üzerine 2 gr SDS, 0,2 gr DİECA ve 1 gr sodium lauryl sarcosine ilave edilmiş bütün karışımlar eridikten sonra son hacim 100 ml ye tamamlanmıştır.

2-Phenol/chloroform/isoamylalkol (25:24:1)

25 ml 1X TAE buffer ile sature edilmiş phenol, 24 ml chloroform ve 1 ml isoamylalkol karıştırılmıştır.

3-Sodyum asetate CH₃COONa(3M)

40.824 gr sodium asetate 60 ml su içerisinde çözülmüş ve volum 100 ml ye tamamlanmıştır.

4- 1X TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH 8,0)

0.157 gr Tris-HCl ve 0.037 gr EDTA 80 ml saf su içerisinde eritilmiştir. Çözeltinin pH sı 8,0 olarak ayarlanıp sonra son hacim 100 ml ye tamamlanmıştır.

Ek. 5

Agarose Gel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

1- TBE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acide, 2 mM EDTA) (pH: 8,3)

1X TBE buffer hazırlamak için 10.777 gr Tris-Base, 5.502 gr boric acide ve 0.744 gr EDTA 900 ml saf su içerisinde eritilmiştir. Çözeltinin pH sı 8,3 olarak ayarlandıktan sonra son hacim 1000 ml ye tamamlanmıştır.

2-TAE buffer (10mM Tris, 5mM Sodium acetate, 0,5 mM EDT (pH: 8.3)

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

3-Farklı konsatrasyonlarda agaroz jel hazırlamak için;

% 1,2'lik agaroz jel için 360 mg agaroz 30 ml 1x TBE yada TAE içerisinde

% 2'lik agaroz jel için 600 mg agaroz 30 ml 1x TBE yada TAE içerisinde

% 1,5'lik agaroz jel için 450mg agaroz 30 ml 1x TBE yada TAE içerisinde

4-Ethidium bromide

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