

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**İZMİR İLİ KRİZANTEM ÜRETİM ALANLARINDA  
GÖRÜLEN VİRÜSLERİN SAPTANMASI; BİYOLOJİK  
VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**Nagehan GÖKDUMAN**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ**

**Bitki Koruma Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu:501.03.01**

**Sunuş Tarihi:4 Mayıs 2015**

**Bornova-İZMİR**

**Mayıs, 2015**



**NAGEHAN GÖKDUMAN** tarafından **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak sunulan **“İZMİR İLİ KRİZANTEM ÜRETİM ALANLARINDA GÖRÜLEN VİRÜSLERİN SAPTANMASI; BİYOLOJİK VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU”** başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve **04/05/2015** tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**İmza**

**Jüri Başkanı : Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ**

**Raportör Üye :Yrd. Doç. Dr. İsmail Can PAYLAN**

**Üye :Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ**



## EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum **“İZMİR İLİ KRİZANTEM ÜRETİM ALANLARINDA GÖRÜLEN VİRÜSLERİN SAPTANMASI; BİYOLOJİK VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU”** başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

Nagehan GÖKDUMAN



**ÖZET****İZMİR İLİ KRİZANTEM ÜRETİM ALANLARINDA GÖRÜLEN  
VİRÜSLERİN SAPTANMASI; BİYOLOJİK VE MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU**

GÖKDUMAN, Nagehan

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ

Mayıs 2015, 56 sayfa

Bu çalışma da 2013-2014 yıllarında İzmir'in Menderes ve Urla (Bademler) ilçelerinde yoğun olarak krizantem yetiştiriciliği yapılan üretim alanlarında enfeksiyon oluşturan viral etmenlerin saptanması ve bulunma durumlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Menderes ilçesinden 100 ve Urla ilçesinden 95 örnek olmak üzere 195 bitki örneğiyle yürütülmüştür. Alınan krizantem örneklerindeki viral etmenlerin tanınmasında moleküler ve biyolojik yöntemler kullanılmıştır. Toplanan örneklerden 5 viral etmenin varlığı RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Araştırma kapsamında testlenen toplam 195 örnekte viral enfeksiyon oranının RT-PCR yöntemi ile %16.5 olduğu görülmüştür. Menderes ilçesinden alınan örneklerde % 33 viral enfeksiyon saptanmıştır. Urla ilçesinden alınan örneklerde herhangi bir viral etmen saptanmamıştır. Çalışmada testlenen örneklerde en yaygın olarak *Cucumber mosaic virus*' ün (%9) bulunduğu ve bunu *Chrysanthemum B virus* (%7) ve *Tomato spotted wilt virus* (1 örnek) adlı virüslerin izlediği saptanmıştır. RT-PCR yöntemlerinin sonuçları değerlendirilerek biyolojik testler yürütülmüştür. Elde edilen veriler sonucunda RT-PCR ile izole edilen TSWV adlı viral etmen dünyadaki diğer izolatlarla benzerliğinin karşılaştırılması amacıyla sekanslamaya gönderilmiş, elde edilen nükleotid dizilimleri dünyadaki diğer izolatlarla kıyaslanmıştır. İzole edilen TSWV' nin KF146700 kodlu izolatla %94 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışma ülkemizde krizantem virüs hastalıklarının belirlenmesi için yapılan ilk çalışma olması yönünden önem taşımaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Krizantem, virüs, RT-PCR, karakterizasyon



**ABSTRACT****DETECTION, BIOLOGICAL AND MOLECULAR  
CHARACTERIZATION OF VIRUSES THAT FOUND  
CHRYSANTHEMUM PRODUCTION AREAS IN IZMIR CITY**

GÖKDUMAN, Nagehan

MSc in Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ

May 2015, 56 pages

This study was conducted to determine the presence and prevalence of viral infections on intensive chrysanthemum production areas in Menderes and Urla districts in 2013-2014. In order to identify viral agents, 100 samples from Menderes, 95 samples from Urla totally 195 samples were collected from symptomatic and asymptomatic plants and were tested by biological and molecular methods. 5 viral agents were investigated by RT-PCR method. The incidence of viral infections was found 33% with RT-PCR method. In Menderes district infection rate was found as 16.5 %. The result of detection studies in Urla district showed that there is no viral infection on samples. Following evaluation of conducted RT-PCR test, biological tests were carried out with 31 samples. *Cucumber mosaic virus* was the most prevalent virus (9%) in the sample of our work and followed by *Chrysanthemum B virus* (7%) and *Tomato spotted wilt virus* (1 sample). As a result of obtained data by RT-PCR detected TSWV isolate sequenced in order to compare similarities with other world isolates. Isolated TSWV agents showed 94% similarity with TSWV Chrysanthemum-16 isolate (GenBank accession number [KF146700](#)). Constituted phylogenetic trees with using a variety of programs showed that the isolate was situated in the same group with mentioned world isolates. The present study is important for being first study in our country about the detection virus diseases in chrysanthemum.

**Key Words:** Chrysanthemum, virus, RT-PCR, characterization



## TEŞEKKÜR

Bu çalışma sürecinde bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ'e, tez çalışmam boyunca yardımcı olan Sn. Yrd. Doç. Dr. İsmail Can PAYLAN'a, Sn. Zir. Yük. Müh. Ayşe ÇANDAR'a, Zir. Müh. İnci ŞAT'a, arazi çalışmalarımda yardımcı olan Sn. Zir. Yük. Müh. Erdal Şaşal ve S.S. Bademler Köyü Tarımsal Kalkınma Kooperatifi çalışanları ve çalışmalarım süresince benden yardımlarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.



**İÇİNDEKİLER****Sayfa**

|                                                                          |      |
|--------------------------------------------------------------------------|------|
| ÖZET .....                                                               | vii  |
| ABSTRACT .....                                                           | ix   |
| TEŞEKKÜR .....                                                           | xi   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                    | xv   |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                  | xvii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                                     | xix  |
| 1.GİRİŞ .....                                                            | 1    |
| 2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....                                                | 5    |
| 3.MATERYAL VE METOD .....                                                | 18   |
| 3.1 Materyal .....                                                       | 18   |
| 3.1.1 Bitkisel materyal .....                                            | 18   |
| 3.1.2 Test bitkileri .....                                               |      |
| 3.1.3.Total nükleik asit (TNA) ekstraksiyonunda kullanılan materyal..... | 19   |
| 3.1.4 Komplementer DNA (cDNA) sentesinde kullanılan materyal .....       | 19   |
| 3.1.5 PCR testlerinde kullanılan materyal .....                          | 19   |
| 3.1.6 Moleküler klonlanma çalışmasında kullanılan materyal .....         | 20   |
| 3.2 Metod .....                                                          | 20   |

## İÇİNDEKİLER (devam)

|                                                                                                              | <u>Sayfa</u> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.2.1 Araştırma alanı ve örneklerin toplanması .....                                                         | 20           |
| 3.2.2 Total nükleik asit (TNA) ekstraksiyonu .....                                                           | 21           |
| 3.2.3 Komplementer DNA (cDNA) sentezi .....                                                                  | 21           |
| 3.2.4 Reverse transcriptase (RT) PCR yöntemi .....                                                           | 22           |
| 3.2.5 Agaroz jel elektroforez yöntemi ve jel görüntüleme cihazında PCR sonuçlarının değerlendirilmesi .....  | 22           |
| 3.2.6 Test bitkilerinin yetiştirilmesi .....                                                                 | 22           |
| 3.2.7 Saptanan virüslerin moleküler klonlaması .....                                                         | 23           |
| 3.2.8 Klonlanmış PCR ürünlerinin DNA dizilemesi ve verilerin bioinformatik yöntemlerle analiz edilmesi ..... | 27           |
| 4. BULGULAR .....                                                                                            | 28           |
| 4.1 Belirtiler .....                                                                                         | 28           |
| 4.2 RT-PCR test sonuçları .....                                                                              | 30           |
| 4.3 Survey sonuçları .....                                                                                   | 37           |
| 5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER .....                                                                                | 39           |
| 6. KAYNAKLAR DİZİNİ .....                                                                                    | 45           |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                               | 56           |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sekil

### Sayfa

|                                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1.İzmir ilçelerindeki krizantem ekilen alan (m <sup>2</sup> ) .....                                                                                                                                                    | 2  |
| 1.2 İzmir ilçelerinin üretimdeki payı (adet) .....                                                                                                                                                                       | 2  |
| 3.1 Çalışmada kullanılan test bitkilerinin yetiştirilmesi ve bitkilerin genel görünümü .....                                                                                                                             | 23 |
| 3.2. Transformasyondan sonra gelişen mavi ve beyaz koloniler (Bu kolonilerden sadece beyaz olanlarda Plazmid+insert DNA bulunmaktadır) (a). Steril kürdan yardımı ile tek kolonilerin seçimi(b). ....                    | 26 |
| 4.1 Krizantemde yapraklarda renk değişikliği, deformasyon belirtisi.....                                                                                                                                                 | 28 |
| 4.2 Krizantemde görülen TSWV yeşil mozaik alanlar ve beneklenme.....                                                                                                                                                     | 29 |
| 4.3 Krizantemde görülen CVB enfeksiyonu sonucu oluşan bodurlaşma ve yaprak deformasyonu. ....                                                                                                                            | 29 |
| 4.4 İzmir'in Menderes ilçesinden toplanan örneklerle TSWV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunda virüsün varlığını gösteren 777 bp uzunluğunda bant (4'den 16. örneğe kadar olan sonuçlar). ....                    | 30 |
| 4.5 İzmir'in Menderes ilçesinden toplanan örneklerle CVB için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunda 621 bp uzunluğunda elde edilen bantlar (47'den 59. örneğe kadar olan sonuçlar).....                                 | 30 |
| 4.6 İzmir'in Menderes ilçesinden toplanan örneklerle CMV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunda, CMV ile enfekteli olduğunu gösteren 540 bp uzunluğundaki bantlar (61, 63'ten 74. örneğe kadar olan sonuçlar). .... | 31 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

### Sekil

### Sayfa

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.7 CMV ile mekanik olarak inokule edilmiş <i>Nicotiana clevelandii</i> bitkilerinin yapraklarında gözlenen belirtiler a) <i>N. clevelandii</i> yapraklarında mozaik b) <i>N. clevelandii</i> bitkisinde bodurlaşma.....                                                                                                           | 32 |
| 4.8 CVB ile mekanik olarak inokule edilmiş <i>Nicotiana clevelandii</i> bitkilerinin yapraklarında gözlenen belirtiler a) <i>Nicotiana clevelandii</i> yapraklarında damarlarda renk açılması ve mozaik b) <i>Nicotiana clevelandii</i> yapraklarında deformasyon c) <i>Nicotiana clevelandii</i> damarlarda renk açılmaları ..... | 32 |
| 4.9 TSWV ile mekanik olarak inokule edilmiş test bitkileri yapraklarında gözlenen bazı belirtiler a) <i>Nicotiana glutinosa</i> yapraklarında hafif klorotik lekeler b) <i>N. clevelandii</i> yapraklarında deformasyonlar .....                                                                                                   | 33 |
| 4.10 TSWV'nin çoğaltılan bölgesinin baz dizisi üzerinde çoğaltılan 777 bp'lik DNA fragmenti. Morla işaretli alanlar vektörün kollarını, mavi bloklu alan ise plazmide aktarılan TSWV'nin çoğaltılan bölgesinin baz dizisini göstermektedir.                                                                                        | 34 |
| 4.11 Krizantemden elde edilen TSWV izolatlarının kendi aralarında alignment yapılmış hali. ....                                                                                                                                                                                                                                    | 36 |
| 4.12. Çalışma kapsamında krizantemden elde edilen TSWV izolatının birbirleriyle akrabalığını gösteren filogenetik ağaç .....                                                                                                                                                                                                       | 37 |
| 4.13 Menderes ilçesinde krizantem üretim alanlarında tespit edilen virüsler ve yaygınlık oranları .....                                                                                                                                                                                                                            | 38 |

**ÇİZELGELER DİZİNİ****Çizelge****Sayfa**

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1. Biyolojik Testlerde Kullanılan Test Bitkileri ve Kullanıldıkları Dönemler...                      | 19 |
| 3.2. RT-PCR testlerinde kullanılan primerler.....                                                      | 20 |
| 4.1 İzmir İli Menderes ve Urla (Bademler) İlçelerinden 2013 ve 2014 Yıllarında Saptanan Etmenler ..... | 37 |
| 4.2 Menderes ilçesinde krizantem çeşitlerinde saptanan viral etmenler.....                             | 38 |



**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

| <u>Simgeler</u> | <u>Açıklama</u> |
|-----------------|-----------------|
| µg              | Mikrogram       |
| µl              | Mikrolitre      |
| g               | Gram            |
| mg              | Miligram        |
| ml              | Mililitre       |
| V               | Volt            |

Kısaltmalar

|           |                                                               |
|-----------|---------------------------------------------------------------|
| TSWV      | <i>Tomato spotted wilt virus</i>                              |
| CVB       | <i>Chrysanthemum B Carlavirus</i>                             |
| CMV       | <i>Cucumber mosaic virus</i>                                  |
| TAV       | <i>Tomato aspermy virus</i>                                   |
| INSV      | <i>Impatiens necrotic spot virus</i>                          |
| cDNA      | Komplementer Deoksiribonükleik asit                           |
| PCR       | Polymerase Chain Reaction                                     |
| RNA       | Ribonükleik asit                                              |
| rpm       | Dakikadaki Devir Sayısı                                       |
| RT        | Reverse Transcriptase                                         |
| TNA       | Total Nükleik Asit                                            |
| DAS-ELISA | Double Antibody Sandwich Enzyme Linked<br>Immunosorbent Assay |

## 1. GİRİŞ

İnsanlar için beslenme kadar zorunlu olmamakla birlikte çiçek, bir duygu ve düşünce ifadesidir. Bu özelliğinden dolayı, ticari anlamda çiçek üretimi ve satışı önem kazanmaktadır. Ülkemiz ekolojik koşulları ve barındırdığı birçok mikroklima nedeniyle değişik süs bitkilerinin yetiştiriciliğine imkan vermektedir. Türkiye’de ticari anlamda 20 farklı ilde yapılan süs bitkileri yetiştiriciliği, 15 bin dekar alan işgal etmektedir. İzmir yetiştiricilikte %28’lik pay ile ilk sırayı almaktadır. İzmir’i sırasıyla Antalya ve İstanbul izlemektedir. Kesme çiçek yetiştiriciliğine ayrılan 10 bin 365 dekar alanın 2/3’ünden fazlası örtülü alandan meydana gelmekte, 1/3’ü ise açıkta yapılmaktadır (Anonim, 2004a).

Ülkemizde ticari anlamda 1940’lı yıllarda başlayan kesme çiçek üretimi son yıllarda önemli gelişmeler kaydetmiştir. İhracatta da önemli artışlar gözlenmiştir (Anonim 2009a).

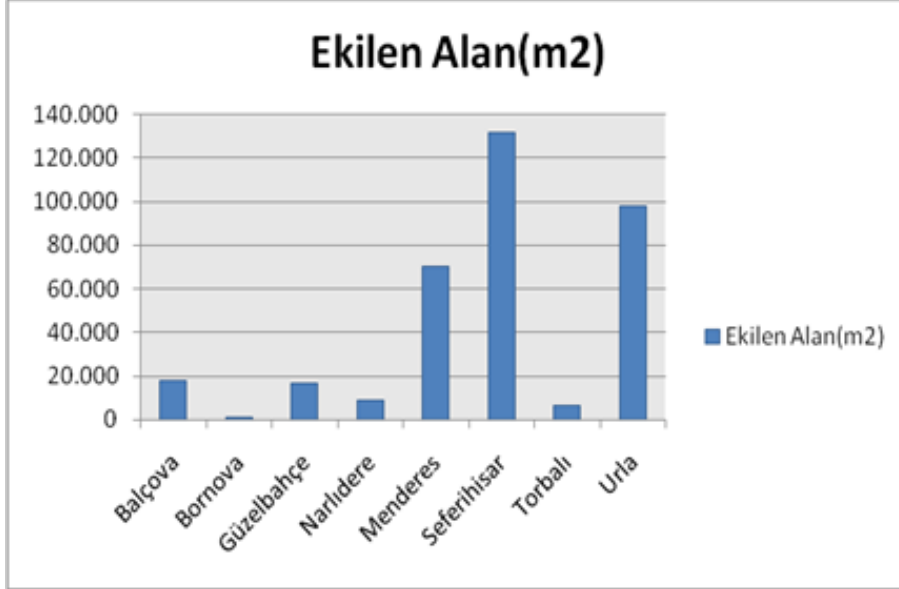
Türkiye’de kesme çiçek üretimi, iç ve dış pazara yönelik üretim olmak üzere iki grupta yoğunlaşmaktadır. İç pazara yönelik üretim Ege ve Marmara Bölgesi’nde dış pazara yönelik üretim ise daha çok Akdeniz Bölgesi’nde yoğunlaşmaktadır (Özkan ve Karagüzel, 1997).

Dünyada toplam süs bitkileri üretim alanları 2009 yılı itibari ile 1,512.221 hektardır. Türkiye süs bitkileri üretimi, dünya üretiminde yaklaşık % 0,7’lik paya sahiptir (Anonim, 2010b).

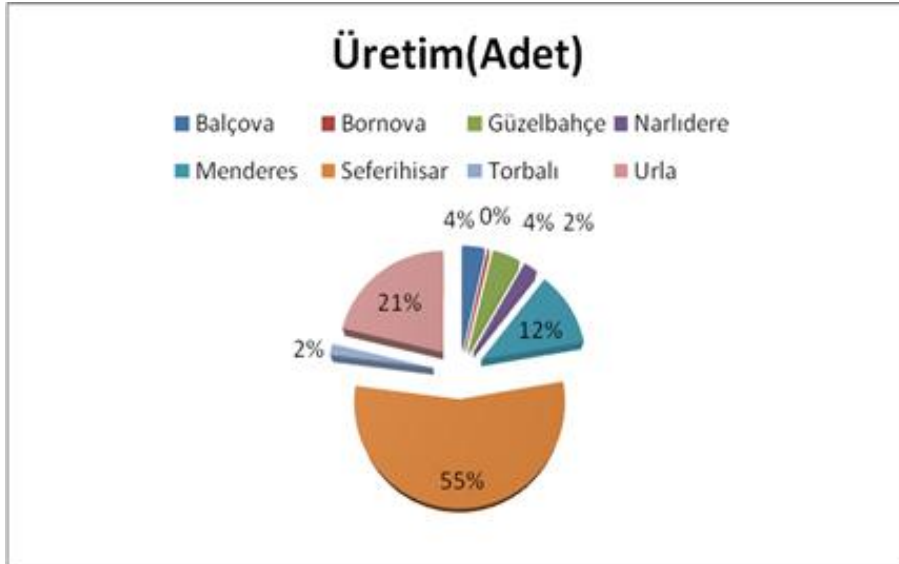
Yurtiçi kesme çiçek üretiminde en önemli kesme çiçek grubunu karanfil, gül ve krizantem oluşturmaktadır (Anonim, 2010b).

Krizantemin anavatanı Japonya’dır ve latince anlamı altın çiçek olan (*Chrysos*: Altın *Antemon*: Çiçek) krizantem Asteraceae familyasındadır. Bugün dünyada en geniş alanda krizantem yetiştiriciliği yapan ülke de Japonya’dır (Wikipedi, 2015).

2012 yılında krizantem çiçeğinin Türkiye’de toplam 429.165 m<sup>2</sup> ‘lık alanda 36.323.310 adet üretim yapılmıştır. Bu üretimde İzmir ilinin payı 350.800 m<sup>2</sup> ‘lık alanda (Şekil 1.1.) 30.017.500 (Şekil 1.2.) adettir (Tüik, 2012).



Şekil1.1 İzmir ilçelerindeki krizantem ekilen alan (m<sup>2</sup>)



Şekil1.2 İzmir ilçelerinin üretimdeki payı (adet)

Bazı ülkelerde yapılan araştırmalara göre, Tomato spotted wilt tospovirus (TSWV), Chrysanthemum B carlavirus (CVB), Cucumber mosaic cucumovirus (CMV), Tomato aspermy cucumovirus (TAV) ve Impatiens necrotic spot tospovirus (INSV) krizantemde zarara neden olan başlıca virüsler olarak

gösterilmektedir (Brierley, 1955; David et al., 1991; Hollings and Stone, 1971; Hakkaart and Maat, 1974; Hollings and Stone, 1972; Daughtrey et al., 1997; Govier, 1957; Srivastava et al., 1992).

Bitki virüs hastalıklarının belirlenmesinde serolojik, moleküler ve biyolojik yöntemler kullanılır. Bu yöntemlerin virüslerin tanınmasındaki duyarlılıkları farklılık göstermektedir. Serolojik bir yöntem olan ELISA ve moleküler yöntem olan PCR (Polymerase chain reaction) virüslerin tanınmasında en sık kullanılan yöntemlerdir. Bazı virüslerin saflaştırılmasında yaşanan sorunlar nedeniyle ELISA kitleri bulunmamaktadır. Bu nedenle daha güvenli ve kesin sonuçlar veren ve virüs konsantrasyonlarından daha az etkilenen PCR yöntemi kullanılmaktadır.

Virüs hastalıklarıyla mücadelede başarılı olabilmek için etmeni her yönüyle tanımak, konukçularını bilmek ve hızlı tanı yöntemleri ile etmeni saptamak çok önemlidir. Ülkemizde krizantemde yapılan çalışmalar bakteriyel ve fungal etmenler açısından değerlendirilmiştir. Özellikle İzmir ilinde geniş alanlarda üretimi yapılan ve önemli bir kesme çiçek türü olan krizantemde görülen virüs hastalıklarıyla ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Ülkemizde krizantem üretimi yapılan alanlarda görülen virüs hastalıklarının yoğunluğu ve zararı hakkında bilgi yoktur. Bu nedenle bu çalışma ayrı bir önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada, İzmir ili Menderes ve Urla (Bademler) ilçelerinde krizantem yetiştiriciliğinin en yoğun olarak yapıldığı alanlarda survey yapılarak belirti gösteren ve göstermeyen krizantem örnekleri alınmıştır. Bitkilerde görülen belirtilerin fotoğrafları çekilmiştir. Toplanan örneklerle; Tomato spotted wilt virus (TSWV), Chrysanthemum B virus (CVB), Cucumber mosaic virus (CMV), Tomato aspermy virus (TAV) ve Impatiens necrotic spot virus (INSV) için RT-PCR testleri uygulanmıştır. Daha sonra saptanan virüs etmenlerine karşı mekanik inokulasyon yöntemi kullanılarak test bitkilerine inokule edilmiştir. Bitkilerde belirti oluşup oluşmadığı gözlenmiş, değerlendirilip fotoğrafları kayıt altına alınmıştır.

Bu çalışma ülkemizdeki krizantem üretiminin %82,64'e yakın kısmını teşkil eden İzmir ilinde krizantemde zarara neden olan virüs hastalıklarını tespit etmek

ve bu hastalıklarla mücadelede önerilerde bulunmak amacıyla yapılmıştır. Krizantemde görülen virüs hastalıkları üzerine ülkemizde yapılan ilk çalışma olması ve daha sonra yapılacak çalışmalara veri oluşturması açısından önemlidir.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Dünya genelinde krizantemde 5 virüs türü rapor edilmiştir. Bu virüsler, *Tomato aspermy virus* (TAV; Brierley, 1955; David et al., 1991; Hollings and Stone, 1971), *Chrysanthemum B virus* (CVB; Hakkaart and Maat, 1974; Hollings and Stone, 1972), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV; Daughtrey et al., 1997), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV; Daughtrey et al., 1997) ve *Cucumber mosaic virus* (CMV; Govier, 1957; Srivastava et al., 1992)'dür. Bu virüslerden CVB ve TAV krizantemde zarar yapan en önemli virüslerdir (Bouwen and Zaayen, 1995).

*Chrysanthemum B virus*, *Carlavirus* grubunun bir üyesidir (Wetter and Milne, 1981). CVB yaklaşık 685 nm çapında ipliksi partiküllere sahiptir. Virüs vektörle taşınır. Bu vektörler; *Macrosiphoniella sanborni*, *Myzus persicae*, *M. solani* ve *Rhopalosiphum ruformaculatum*'dur. Etmen ilk olarak Hollanda'da *Chrysanthemum morifolium*'da Noordam tarafından 1952 yılında rapor edilmiştir (Noordam, 1952). Brierley and Smith (1958) krizantemde 8 mozaik virüs tanımlamıştır. CVB'nin straini *Gymnaster savatieri* de çiçekte renk kırılmalarına neden olmuştur, tanımlama virüs partikülün şekline, simptomatolojiye, serolojiye ve nükleik asidin moleküler ağırlığına dayandırılmıştır (Suastika et al., 1996).

CVB 5 dikotiledon familyanın yaklaşık 10 diğer türüne bulaştırılmıştır. Teşhis türleri *Petunia hybrida*, *Nicotiana glutinosa*, *N. clevelandii* ve *Tetragonia expansa*'dır (Hollings and Stone, 1972). CVB-ch 25-30°C' nin altında ve uzun gün fotoperiyodunda *N. benthamiana* ve *N. occidentalis* de sistemik simptomlara neden olmuştur (Chung et al., 1999). CVB yaprak kalitesinde hafif zarara, hafif yaprak beneklenmesine, damarlarda renk açılmasına neden olmaktadır (Hollings and Kassanis, 1957). *Chrysanthemum* cv. Miss Wilcon da, çiçeklerde sarı şeritler ortaya çıkmıştır. Source d'Or çeşidinde iken yapraklarda sarımsı-yeşil halkalar gelişmiştir. *Chrysanthemum* cv. Royal Bronze'nin enfekteli bitkilerinde çiçekler normal görünmüştür ve bitkiler sağlıklı görünmüştür. Birçok çeşitlere genellikle görünür belirti olmadan bitkilere tamamen bulaştırılmıştır (Noordam, 1952).

Good News ve Friendly Rival cv. Monument çeşitlerinde CVB belirgin kahverengi çizgiler meydana getirir, bu simptomlar sadece TAV ve CVB virüsleri

ile inokule edilmiş bitkilerde görülür (Brierley, 1955). Simptomlar virüs kaynağı ve çeşitlere göre değişir. cv. Fanfare çeşidinde damar bantlaşması, mozaik, şiddetli nekroz, buruşma ve hafif beneklenme; cv. Good News çeşidinde damar bantlaşması, mozaik ve buruşma; cv. Mistletoe çeşidinde damar bantlaşması, mozaik, nekroz ve buruşma; cv. Pink Marble çeşidinde mozaik ve symptomsuz enfeksiyonlar gözlenir (Hakkaart and Maat, 1974).

Hindistan'da 2005 yılında yapılan bir çalışmada *Chrysanthemum morifolium* cv. Regol Time bitkisinin CVB ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Meristem ucu kültürü, kemoterapi ve termoterapi uygulayarak CVB'den ari bitkiler elde edilmiştir. Bitkiler biyolojik testler, Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) ve Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) yöntemleriyle saptanmıştır. 38°C' de 30 dakika tutulduktan sonra sadece %12 virüsten ari bitki elde edilmiştir. RT-PCR metodu CVB'nin saptanmasında en güvenilir yöntem olduğunu göstermiştir (Ram et al., 2005).

Yapılan bir diğer çalışmada, krizantem üretimi yapılan alanlarda CVB yaygın olarak görülmektedir. 2000 yılından 2005 yılına kadar Tayvan'da krizantem plantasyonlarında CVB'nin bulunma durumuyla ilgili kapsamlı bir çalışma yapılmıştır. 9 farklı bölgeden 504 krizantem yaprak örneği toplanmıştır. 394 örnekte Indirect ELISA yöntemiyle CVB ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Tayvan'da krizantemde CVB' nin varlığını gösteren ilk kanıttır. Mevsimsel saha araştırması sırasında CVB' nin hava sıcaklığından etkilendiği bulunmuştur. 15 - 20°C arası sıcaklıklarda ELISA yöntemiyle bitkilerin CVB ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, CVB' nin tespitini yapmak için en uygun zamanın kış mevsimi olduğunu göstermiştir (Lin et al., 2005).

Hindistan'da krizantem alanlarında yapılan bir diğer çalışma sırasında çeşitli belirtiler görülmüştür. DAS-ELISA, Elektron mikroskop, Sitopatoloji, konukçu dizilimi ile etmenin CVB olduğu saptanmıştır. DAS-ELISA yöntemi ile 36 örnekten 7 tanesi negatif olarak saptanmıştır. CVB' nin oranını saptamak için birçok krizantem çeşidi yetiştirilmiştir. Bu hastalık oranının %40.26 ve % 94.66 arasında değiştiği görülmüştür. (Verma et al., 2003).

CVB Japon izolatının (CVB-S) tüm nükleotit sekansı belirlenmiştir. CVB-S' nin genomik RNA' sı 8.990 nükleotit uzunluğunda ve diğer Carlaviruslerde olduğu gibi 6 ORF (open reading frame) içerir. Çoklu hizalama ve filogenetik analizler Carlavirus genusu üyeleri arasında filogenetik akrabalığın çok farklı olduğunu göstermiştir (CVB' nin en yakın akrabası Phlox virus S) (Ohkawa et al., 2007).

Krizantem yetiştiriciliği yapılan alanlarda virüs hastalıkları ciddi bir sorundur. Virüsün tespiti ve tanınması virüsün yayılmasını önleme açısından önemlidir. Yüksek enfeksiyon özellikle virüslerin karışık enfeksiyonlarında hem tarlada hem de krizantemin kalitesinde önemli kayıplara neden olmaktadır. Böylece tanılama yapmak virüs yayılımını kontrol etme açısından önemlidir. Çin'de krizantem virüs hastalıklarının araştırılmasında toplanan örneklerden 2 virüs ve 2 viroid saptanmıştır. Tek aşamalı multiplex RT-PCR aynı anda 2 virüs: *Chrysanthemum virus B* ve *Tomato aspermy virus*; 2 viroid: *Chrysanthemum stunt viroid* ve *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*' i testlemek için geliştirilmiştir. Bazı örneklerde karışık enfeksiyonlar gözlenmiştir. Krizantemde enfekteli 2 virüs ve 2 viroidin tanınması için standart RT-PCR amplikasyonları geliştirilmiştir. Multiplex RT-PCR yöntemi ile de CVB, TAV, CChMVD ve CSVd aynı anda tanınması yapılmıştır. Ek olarak, multiplex PCR' ın tanınması ve verimliliği araştırılmıştır. Sonuçlar multiplex RT-PCR' ın ne kadar hassas olduğunu ortaya koymuştur. Sonuç olarak bu yöntem krizantem virüsleri ve viroidlerinin rutin tanınmasında yararlı bir yöntem olduğu saptanmıştır (Song et al., 2012).

Hill ve arkadaşları (1996) tarafından Avustralya'da yapılan çalışmada, krizantemde (*Dendranthema grandiflora*) *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), *Chrysanthemum carlavirus B* (CVB), *Tomato aspermy virus* (TAV) ve *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)' ün oranını saptamak için ELISA ve cDNA problemleri bağlantılı olarak kullanılmıştır. Saksıda, tarlada ve serada yetişen 2480 örnek Avustralya'nın 6 bölgesinden alınıp testlenmiştir. 4 patojenin tümü saptanmıştır. CVB (%39.2) ve TAV (%6.7) en sık görülen virüslerdir, CSVd (%0.7) sadece seradaki Queensland çeşidinde saptanmıştır. TAV (%1.4) Batı Avustralya'dan tarlada yetiştirilen krizantemlerde saptanmıştır.

*Tomato aspermy virus* (TAV), Cucumovirus genusuna aittir. TAV izometrik yapıda ve 30 nm çapındadır. Geniş bir konukçu dizinine sahiptir. Non-persistent yolla birçok afit türü ile kolayca taşınabilmektedir (Kaper and Waterworth, 1981). Virüs geniş bir alana yayılım göstermiştir. Genellikle krizantem çeşitlerinde görülür nadiren de domateslerde görülür. Etmen, 24 dikotiledon, 3 monokotiledon familyadan 100'den fazla türde zarara neden olmaktadır. Bunlardan en az 75 türü Chenopodiaceae, Compositae ve Solanaceae familyalarına aittir (Hollings and Stone, 1971). Tanılama türleri; *Nicotiana glutinosa*, *N.tabacum*, *Cucumis sativus*, *Lycopersicon esculentum*, *Phaseolus vulgaris*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* ve *Vigna sinensis*'dir. Fakat TAV, Blencowe ve Caldwell (1949) tarafından ilk rapor edildiğinde *C.sativus*'a bulaştırılmamıştır. TAV ilk olarak domateste 1949 yılında Blencowe ve Caldwell tarafından tanılanmıştır. Virüs krizantemde yaygın görülen bir virüs olmasına rağmen böyle isimlendirilmiştir. Çünkü virüs ilk olarak krizantem yetiştiriciliği yapılan alanın yanında yetişen domateslerden tanılanmıştır (Hollings, 1955).

TAV ve CMV genel olarak aynı özelliğe sahiptir (Harrison et al., 1971). TAV-V ve CMV-Q strainleri boyut, morfoloji, sedimentasyon oranı, RNA baz oranının birbirleriyle aynı olduğu rapor edilmiştir. Fakat iki virüsünde proteinlerinin amino asit bileşimi farklıdır (Habibi and Francki, 1974a). Buna göre serolojik olarak uzak akraba olduğu rapor edilmiştir (Habibi and Francki, 1974b). Rao et al. (1982) TAV ve CMV'nin Avustralya izolatları arasında uzak antijenik ilişki olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer olarak, TAV-ch kılıf proteini gen bölgesinde TAV-V straini ile aynı nükleotit sekansa sahip olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda CMV biber antiserumundan serolojik olarak farklı olarak gözlenmiştir (Choi et al., 1999).

TAV nadiren yaprak belirtileri görülür; ama bazen çiçeklerde hafif cücelikle beraber çiçeklerde kıvrılma ve dalgalanmalar görülür (Brierley, 1955). Virüs, şiddetli kırılmalar ve cücelik meydana getirir. Çoğu çeşitlerde bitki hemen hemen belirsiz kalmaktadır. TAV sadece bazı krizantem bitkisinde bozukluklara neden olmuştur ve diğer krizantem virüsleri tarafından belirtiler şiddetlenmiştir. Erken sezon enfeksiyonları sadece çiçeklerin miktarını

etkilemiştir. Takip eden sezonlarda hemen hemen tüm çiçeklerde simptomların arttığı gözlenmiştir (Hollings, 2008).

Hindistan'da yapılan bir çalışmada, Indirect ELISA, PCR ve kılıf protein gen sekans analizi yöntemleri kullanılarak *Chrysanthemum morifolium* çeşidinde sarı mozaik ve çiçek deformasyonlarının nedeni TAV olarak saptanmıştır (Raj et al., 2007). Çin'de yapılan bir çalışmaya göre, krizantemin en önemli virüsü TAV'dır. Ortalama enfeksiyon oranı: % 85.9'dur. Virüsü elimine etmek için çalışmalar yapılmıştır. Sonuç olarak, ikincil doku kültürü virüsün eliminasyonu için en etkili yöntem olduğu görülmüştür (Ruilin et al., 1999). Kore'de krizantem çeşidinde CVB-ch' in enfeksiyon oranı %49.8'dir ve ikili enfeksiyonda ortalama %17.0' dır (Chung et al., 1999). Avustralya'da CVB ve TAV'ın ortalama enfeksiyon oranı ise sırasıyla %81 ve %23'tür (Moran and Wilson, 1985).

Hindistan'da yapılan bir çalışmada, termoterapi, kemoterapi ve meristem ucu kültürü kullanılarak *Chrysanthemum morifolium* cv. Regol Time çeşidinden TAV, CVB ve CMV'nin tek başına enfeksiyonu ya da karışık enfeksiyonunda bitkilerden bu virüslerin yok edildiği saptanmıştır. Bitkiler biyolojik testler, ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile tanılanmıştır. Doku kültürü ile CMV, CVB ve TAV'dan arı krizantem bitkileri yetiştirilen alanlarda hastalıklı bitkilerle karşılaştırıldığında büyüme parametrelerinde önemli bir artış gözlenmiştir (Bitki boyu, filiz ve dal uzunluğu, bitkide filiz sayısı, filizdeki çiçek sayısı, bitkideki çiçek sayısı, çiçeğin sapı ve çiçeklenme süresi) (Ram et al., 2009).

Yeni Zelanda'da 1956 yılında yapılan ilk çalışmalarda, Auckland, Christchurch ve Wanganui çeşitlerinden alınan 32 bitkiden 11'inde TAV saptanmıştır. Virüs kadife çiçeği, latin çiçeği, yıldız çiçeği, kırmızı biber, krizantem, marul, domates, *Nicotiana glutinosa*, *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn, tütün, siyah üzüm, Yeni Zelanda ıspanağı ve zinya çiçeğine aktarılmıştır. Virüs şeftali yaprakbiti ile taşınmaktadır. Yapılan ilk çalışmalarda konukçu dizini ve virüsün fiziksel özellikleri tam olarak bilinmemekteydi fakat daha sonra yapılan çalışmalarda konukçu dizini ve fiziksel özellikleri saptanmıştır (Procter, 1975).

TAV, krizantemin önemli virüs patojenlerinden biridir. Hindistan'ın çeşitli bölgelerinden benekler ve deforme çiçeklenme görülen krizantem bitkilerinden DAS-ELISA yöntemiyle bu etmen saptanmıştır. Testlenen 15 bitkinin 11' inde (%73.3) TAV ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Mekanik inokulasyonda *Chenopodium amaranticolor*, *C. albüm*, *C. quinoa* ve *Cucumis sativus*'da lokal lezyonlar gözlemiştir. *Nicotiana clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. megalosiphon* ve *N.tabacum* da sistemik olarak şiddetli mozik, yaprak deformasyonlarına neden olmuştur. *Myzus persicae* ve *Aphis gossypii* ile non-persistent ile taşınmaktadır. Virüs, RT-PCR ve kılıf proteini genin nükleotit sekans yöntemi ile tanılanmıştır. 657 bp fragment uzunluğu ile diğer TAV izolatlarının CP sekansı ile %97 oranında benzer olduğu gözlenmiştir. TAV Hint izolatının CP genin yüksek genetik benzerliği ile diğer izolatların akraba oldukları belirlenmiştir (Verma et al., 2004).

Krizantemde şiddetli mozaik, klorotik halka lekeler ve çiçek deformasyonları 2006 Kasım ayından 2007 Şubat ayına kadar Hindistan'ın Lucknow (UP), Dhanbad (MP) ve Kolkata (WB) Bölgelerinde gözlenmiştir. Spesifik primerler kullanılarak RT-PCR ve ELISA testleriyle, TAV saptanmıştır. Bu TAV izolatları mekanik olarak afitlerle (*Aphis gossypii*) test bitkilerine inokule edilmiştir. Her TAV izolatu klonlanmış, sekanslanmış ve baz dizisinin 2386 nükleotit uzunluğunda olduğu belirlenmiştir. Bu baz dizisinin 741 nükleotidinin hareket proteini (MP), 627 nükleotidinin kılıf protein (CP) , 246 ve 218 nükleotidinin ise amino asit bölgelerine ait olduğu belirlenmiştir. Hint izolatının RNA 3 sekanslarında TAV'ın dünya çapında diğer 7 strainleriyle çoklu olarak dizinlenmiştir. Hint izolatu TAV'ın KC, V, P, B, I ve C strainleri kendi aralarında %98-99 oranında benzer bulunmuştur. Filogenetik analizler TAV'ın Lucknow ve Kolkata izolatları birlikte gruplandırılmıştır ve Güney Kore'de KC-TAV straini ile yakın akraba olduğu görülmüştür. Dhanbad izolatu bağımsız bir grup oluşturmuştur ve Avustralya ve İspanya'dan V-TAV izolatlarına yakınlık göstermiştir. Rekombinasyon olayları Dhanbad izolatlarının CP bölgesinde gözlenmiştir. Bu çalışma 3 TAV Hint izolatının RNA 3 sekansının ilk raporudur (Raj et al., 2008).

TAV'ın V strainine ait RNA 2 bölgesinin CMV Q ve Fnystrainine %62, *Brome mosaicvirus*'e %42 ve *Cowpea chlorotic mottle virus*'e %40 benzerlik gösterdiği gözlenmiştir. Amino asit sekansları karşılaştırıldığında üç farklı bölge ayırt edilebilmiştir. Moleküllerin hidrofobisite modeli ve protein kodlarının bazik ve asidik amino asit dağılımları V-TAV RNA 2, Q-CMV RNA 2 ve Fny-CMV minus- için 5'→3' RNA'nın kodlayıcı bölgesinin olmadığı bulunmuştur (Moriones et al., 1991).

*Tomato spotted wilt virus* (TSWV), ilk olarak 1915 yılında Brittlebank (1919) tarafından Avustralya'da tespit edilen TSWV' ün ülkemize domatesin en yoğun olarak yetiştirildiği Akdeniz Bölgesi'nden girdiği bildirilmektedir. TSWV, 15 monokotiledon, 69 dikotiledon familyaya ait 1090 bitki türünde hastalık oluşturabilmektedir (Edwardson and Chrsitie, 1997; Parrella et al., 2003). TSWV, Bunyaviridae familyasında bulunan Tospovirus cinsine ait bir virüstür. Genom yapıları tek iplikçikli RNA' dan meydana gelmektedir ( Parrella et al., 2003). Diğer birçok *Tospovirus*' de olduğu gibi TSWV, tripslerle persistent olarak taşınmaktadır (Rosello et al., 1996). Ülkemizde TSWV' nin yayılmasında etkili olan iki önemli vektör, *Frankliniella occidentalis* ve *Thrips tabaci* olup tarla ve sera ürünlerinde hastalığın yayılmasına neden olmaktadır (Lodos, 1982; Tunç, 1985; Tunç ve Göçmen, 1995; Coutts and Jones, 2003). TSWV, mekanik yollarla da taşınabilmektedir, fakat kök kaynaşması, tohum ve polenile taşınma olmamaktadır (Güldür vd., 1995). TSWV'ün teşhisi için birçok yöntem geliştirilmiştir. RT-PCR en yaygın kullanılan yöntemdir (Fukuta et al., 2004).

TSWV ekonomik açıdan önemli süs bitkileri, sebzeler ve endüstriyel ürünlerde çeşitli semptomlara neden olabilir. Bu semptomlar, nekrotik veya klorotik lokal lezyonlar, halka lekeler, konsantrik halkalar, yeşil mozaik alanlar, kökte renk değişikliği, solma, bodurluk, beneklenme, bronzlaşma, kloroz ve nekrozdur. Bitkinin yaşı, çeşidi, çevre şartlarındaki değişiklikler aynı konukçuda TSWV' nin farklı izolatları arasında semptomlar değişir (EPPO, 1999; Mumford et al., 1996).

Japonya'da 1990'ların sonlarından beri, krizantem yetiştiriciliği (*Dendranthema grandiflora*) yapılan alanlarda TSWV büyük bir sorun haline

gelmiştir (Fuji et al, 1998). Krizantemde en sık rastlanan TSWV belirtileri üst yapraklar üzerinde klorotik lekeler ve sonrasında solma, yapraklar ve çiçek sapında şiddetli nekroz gelişimi, bodurluk ve genç bitkilerde ölme şeklindedir (Matteoni and Allen, 1989; Dal Bo et al., 1995; Daughtrey et al., 1997).

Japonya’ da krizantemde TSWV enfeksiyonu ilk kez 1998 yılında bir çiftçinin tarlasında görülmüştür. Bu yıldan beri krizantem (*Dendranthema x grandiflora*) yetiştiriciliği yapılan alanlarda TSWV ciddi bir şekilde zarara sebep olmaktadır. Krizantemde TSWV ile enfekteli belirsiz bitkilerde latent enfeksiyonu tespit etmek için DAS-ELISA yöntemi yeterince güvenilir bir yöntemdir. Krizantem yetiştirilen alanlarda *Frankliniella occidentalis*’ in (baskın vektör) yoğun olduğu durumlarda latent enfeksiyonun varlığında hastalık oranının da yüksek olduğu görülmüştür. Latent enfeksiyonlu bitkilerin varlığına rağmen thrips oranı düşükse hastalık oranında düşük olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar gösteriyor ki, vektör thripslerin yoğunluğu krizantem yetiştirilen alanlarda latent enfekteli bitkilerden şiddetli ikincil yayılmaya sebep olmaktadır (Matsuura et al., 2002). Aynı araştırmacılar tarafından, 2006 yılında krizantemde TSWV’ in oranını saptamak için bir çalışma daha yapılmıştır. Batı çiçek thripsinin varlığının tuzak ürün olarak mine çiçeğine etkileri araştırılmıştır. Krizantem bitkilerinin %17-25 oranında serada *Verbana* cvs. Pink Parfait ve/veya Fancy Parfait, *Chrysanthemum* cv. Jimba’nın yanında yetiştirilmiştir. Mine çiçeği bitkileri vektör thripsleri çektiği gözlenmiştir. Çiçek tomurcuğu başlangıcına kadar krizantemden Batı Çiçek Thrips popülasyonunu azaltmıştır ve çiçeklenmeye kadar krizantemde TSWV oranını belirgin bir şekilde bastırıldığı gözlenmiştir. Sonuçlara göre, tuzak bitki olarak mine çiçeğinin ekimi, krizantemde TSWV’in thrips ile taşınımı kontrol altına almak için entegre zararlı yönetimi programlarında yararlı olabileceği düşünülmektedir (Matsuura et al., 2006).

2011-2012 yıllarında İran’da, krizantemin önemli virüs hastalığı *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)’ e karşı bir çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmada önemli yetiştiricilik yapılan bir alandan 108 krizantem bitkisi toplanmıştır. Toplanan bu örnekler double-antibody sandwich enzyme-linked assay (DAS-ELISA) yöntemi ile testlenmiştir. Testlenen 108 krizantem (*Chrysanthemum morifolium*) bitkisinin 48’inde TSWV ile enfekteli olduğu gözlenmiştir. Enfekteli

örnekler mekanik inokulasyon ile test bitkilerine aktarılmıştır. *Chenopodium amaranticolor*, *Petunia hybrida*, *Tagetis spp.*'de klorotik lokal lezyonlar; *Datura metel*, *Datura steramonium*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum* cv. Withe burley ve *Petunia hybrida*'da nekrotik lokal lezyonlar gözlenmiştir. Mozaik ve yaprak deformasyonlarından bir hafta sonra, *Capsicum annuum*, *Gomphrenaglobosa*, *Petunia hybrida* ve *Nicotiana rustica*'da sistemik nekrotik lekeler ve klorotik halkalar 20 gün sonra gözlenmiştir. *Vigna unguiculata*'da simptom gözlenmemiştir. PCR analiz sonuçlarına göre krizantemin 3 ticari çeşidinde (Bella Rosa, Bonfire Yellow ve Dark Flomenco) virüs saptanmıştır. Bu çalışma İran'da krizantemde TSWV'ün saptanmasında yapılan ilk moleküler çalışmadır (Nour et al., 2013).

Hollanda'da TSWV ilk kez 1931 yılında saptanmıştır (Noordam, 1943). 1983 yılından beri virüs birçok bitkide gözlenmiştir. *F.occidentalis* çok yaygın ve kontrolü çok zor olan bir zararlıdır (Mantel and Van de Vrie, 1988). Baskın olan bu thrips türleri seralarda 1980'lerin sonunda TSWV enfeksiyonlarında artışa neden olmuştur. Başlangıçta yetiştiriciler tarafından epidemiyolojisi ve simptomatolojisi bilinmediği için enfeksiyonun etkisinin yüksek olduğu gözlenmiştir (Verhooven and Roenhorst, 1998). TSWV krizantemde en sık görülen simptomlar; solmanın ardından üst yapraklarda klorotik lekeler, yapraklarda şiddetli nekroz gelişimi, bodurluk ve genç bitkilerde ölüm gözlenir (Matteoni and Allen,1989; Dal Bo et al., 1995; Alexandra et al., 1996; Daughtrey et al.,1997). Krizantem bitkileri TSWV ile ciddi etkilenebilmesine rağmen hastalıklı bitkiler üzerinde simptomlar genellikle yavaş gelişir ve birkaç yaprak ve/veya kök parçaları ile sınırlı kalır. Enfekteli krizantem bitkileri simptomsuz da kalabilir (Matteoni and Allen, 1989). Krizantem TSWV'ün duyarlılığını saptamak için 3 yöntem karşılaştırılmıştır. Mekanik,thrips inokulasyonu ve yaprak testleridir. TSWV ile enfekteli bitkiler ELISA ile tanılanmıştır. 15 krizantem çeşidi test edilmiştir. Bitki başına 6 thrips inokule edildiğinde bitkilerde %100 virüs enfeksiyonu ortaya çıkmıştır. Tek bir dişi veya erkek thrips inokule edildiğinde %50'nin üzerinde bitkinin enfekteli olduğu saptanmıştır. Bu deney, bütün bitkilere thrips inokulasyonu ile krizantem çeşitlerinde TSWV 'ün duyarlılığını değerlendirmek için tercih edilmiştir (van de Wetering et al., 1999).

*Agrobacterium* temellitransformasyon metodu kullanılarak *Schizosaccharomyces pombe*' den çift sarmal RNA spesifik ribonükleaz gen (pac1) olarak ifade edilen transgenik krizantem (*Dendranthema grandiflora*) bitkileri üretilmiştir. Pac 1 proteini içeren 3 transgenik hat seçilmiştir. Kontrol bitkilerinden TSWV' e karşı önemli ölçüde daha düşük enfeksiyonlar gözlenmiştir. Virüs enfeksiyonu, belirtilen bu transgenin ticari kullanımı *Dendranthema*'nın yabani türlerinde virüslerin yayılmasını durdurmuştur. Virüs enfeksiyonu transgenik bitkilerde bastırılmıştır. Bu çalışma, transgenik bitkilerde tek bir tolerans genin hem viroid hem de virüs hastalıklarını azaltabileceğini gösteren ilk çalışmadır (Ogawa et al., 2005).

Matteoni ve arkadaşları (1988) tarafından yapılan bir çalışmada 29 krizantem çeşidinde TSWV tarafından oluşan belirtiler mekanik inokulasyondan sonra sera ve iklim odasından ve thripsler tarafından doğal inokulasyondan sonra ticari serada çalışılmıştır. Bitki dokularında virüsün varlığı ELISA yöntemiyle tanılanmıştır. En yaygın görülen semptom, bronzlaşma ve kök kanserleri, iç nekrozlar ve bodurlaşmadır. Viral enfeksiyonlar, sürgündeki kök başına çiçeklerin sayısı ve taze çiçek yaprağı sayısında önemli azalmalar görülmektedir. Tüm belirtiler tüm çeşitlerde gözlenmiştir. Oran %1 ile 100 arasında değişmektedir ve yakın akraba çeşitlerde benzer semptomlar yaygın olarak görülmektedir (tüm çeşitler için oran % 39'ur).

TSWV, Polonya'da 1999-2002 yılları boyunca, incelenen seraların herbirinde krizantem bitkilerinde DAS-ELISA yöntemi kullanılarak tanımlanmıştır. 1999 yılında TSWV ile enfekteli krizantem bitkilerinde en yüksek seviyede % 91-93 oranında iki serada kaydedilmiştir. TSWV'ün en düşük enfeksiyonu %16.3 oranında kaydedilmiştir. Diğer Tospovirusler sadece özel testlerle tanımlanmıştır. İncelenen 5 seranın 3'ünde INSV tanımlanmıştır (300 örnekten 2-12 örnekte). TSWV enfeksiyon düzeylerindeki farklılıklar testlenen çeşitlerin bazıları arasında kaydedilmiştir (Balukiewicz and Kryczynski., 2005).

*Cucumber mosaic virus* (CMV), elmasa benzer (icosahedral) tek iplikçikli RNA virüsüdür ve Cucumovirus grubunun üyesidir (Correll et al., 1994). *Chrysanthemum* cv. Regol Time çeşidinde yapraklarda karakteristik klorotik

lekeler ve bitkide bodurlaşma görülmüştür. Virüs, mekanik inokulasyon ile *Chenopodium amaranticolor* ve *Cucumis sativus*'a aktarılmıştır. DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleriyle etmen CMV olarak tanımlanmıştır. Meristem ucu kültürü kullanılarak krizantem bitkilerinden virüs elimine edilmiştir. Virüsten arı bitkiler elde edilmiştir. %72 bitkilerde CMV ile bulaşık olmadığı saptanmıştır. RT-PCR yöntemi ile, virüs tanılmasında RT-PCR'ın güvenilir bir yöntem olduğu da ortaya çıkmıştır (Verma et al., 2003).

*Chrysanthemum morifolium*'un 10 çeşidinde görülen bodurlaşma, klorotik lekeler, mozaik ve aspermy'nin taze ağırlık, çiçek çapı ve kök uzunluğuna etkileri araştırılmıştır. Klorotik lekeler, mozaik ve aspermy test edilmiş çeşitlerin büyümesini önemli ölçüde azaltmıştır. Fakat bodurlaşma diğer hastalık belirtilerinden daha şiddetli bir şekilde büyümeyi durdurmuştur (Horst et al., 1976).

*Chrysanthemum morifolium* bitkisinde dağınık kloroz, damarlara yakın klorotik noktalar ve bodurluk gözlenmiştir. CMV krizantem straini (CMV-CI) diğer konukçu Cucumovirus grupları ile konukçu reaksiyonu, in vitro özellikleri, tanecik morfolojisi (29 nm) kılıf proteinin moleküler ağırlığı (24.5 kDa), nükleik asit (5 RNA türü) ve serolojik ilişkilerine bağlı olarak karakterizasyonu yapılmıştır. *Chrysanthemum mild mottle virus* Japonya'da krizantemde rapor edilmiştir. Bu virüs TAV ile serolojik olarak akraba olduğu saptanmıştır. TAV, CAV ve CMMV yakın akrabadır ve bir virüs straini olarak kabul edilmiştir. Krizantem doğal olarak CMV straini tarafından enfekteli değildir. Bu nedenle bitki CMV ve TAV veya CAV arasındaki ayrım için teşhis açısından faydalı bir konukçu bitkisi olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte, inokulasyon boyunca CMV straini konukçu olarak kaydedilmiştir. 1988-89 yılları boyunca Lucknow, Hindistan National Botanical Research Institute Bahçelerinde, doğal koşullar altında yetiştirilen krizantemin birçok çeşidi üzerinde hastalık belirtileri gözlenmiştir. TAV veya CAV tarafından oluşan semptomlardan farklı semptomlar görülebilmektedir. (Srivastava et al., 1991).

CMV ve TAV'ın karışık enfeksiyonu, *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. Pooja bitkisinde DAC-ELISA ve RT-PCR yöntemleri kullanılarak

tanılanmıştır. CMV ve TAV sürgün meristem kültürü kullanılarak elimine edilmiştir. %78.1 oranında CMV ve TAV'dan arı bitkiler elde edilmiştir. Hastalıklı bitkilere oranla daha iyi büyüme kalitesi görülmüştür (Kumar et al., 2009).

*Impatiens necrotic spot virus* (INSV), Tospovirus genusuna ait bir virüstür. Yetiştiricilik yapılan alanlarda önemli kayıplara neden olmaktadır (Daughtrey et al., 1997),krizantemde de birçok ülkede zarara sebep olmuştur (Balukiewicz and Kryczynski 2005; Mavric and Ravnika 2001; Mertelik et al., 2002; Ochoa et al., 1996; Shahraeen et al., 2002). INSV, TSWV' e göre EPPO ve Avrupa Bölgelerinde, Asya, Kuzey Amerika, Orta Amerika ve Karayiplerde daha kısıtlı bir coğrafyada yayılım göstermektedir ( EPPO, 1999a). Tohumla taşınmadığı rapor edilen INSV, TSWV'e göre daha sınırlı konukçu dizinine sahiptir, ancak kaydedilen doğal konukçu türlerinin sayısı gittikçe artmaktadır (Roggero et al., 1999).INSV ve TSWV'nin simptomları aynı ve karışık enfeksiyonlar meydana getirebilmektedirler (EPPO, 1999a).

INSV, süs bitkilerinde sebzelere oranla daha sık zarara rastlanmaktadır (EPPO,1999b). Bu süs bitkileri; cam güzeli, kaplan boğan, alstromerya, anemon çiçeği, aslanağzı, begonya, bouvardia çiçeği, saray patı, columnea, siklamen, yıldız çiçeği, krizantem, lisyantus, iran menekşesi, gerbera, glayöl, sahil karanfili, düğün çiçeği, sinerarya, gloksinya, gelinçiçeğidir. Sebzelerdeki konukçuları; biber, hindiba, hıyar, marul, fesleğen, domatestir (EPPO,1999b; Finetti et al., 2000).

Hollanda' da yapılan bir çalışmada INSV' nin Avrupa içinde belirtilen konukçu dizini aralığı, 41 bitki türünü enfekte ettiği saptanmıştır (Verhoeven and Roenhorst, 1998).Konukçu dizini genişliği ve simptomları etkileyen değişiklikler ele alınmıştır ve tüm TSWV ve INSV konukçu bitkileri için kapsamlı bir konukçu dizini vermek mümkün değildir (Daughtrey, 1996; Chatzivassiliou et al., 2000; Lisa et al., 1990; Yeh et al., 1992).

Tospovirus izolatları serolojik farklılıklara dayalı olarak tespit edilmiştir ve serogrup sınıflandırma sistemi Serogrup I 'in tek üyesi TSWV, Serogrup III' ün

tek üyesi INSV olarak saptanmıştır. Tospovirus türleri ayrıca moleküler verilere göre sınıflandırılır (de Avila et al., 1993), Tospovirus türleri thripsler (Thysanoptera: Thripidae) tarafından doğal yayılım gösterir ve taşınır. Bu virüsler yarı küresel zarflı partiküller 70-110 nm çapa sahiptir.

2009'da Japonya'da yapılan bir çalışmada krizantem bitkisinde klorotik lekeler ve nekrozlar saptanmıştır. Virüs test bitkilerine inokule edilmiştir. Test bitkilerinde görülen symptomların parçacık şekilleri, protein yapıları ve thripsler ile taşınımı tarafından ortaya çıkan belirtilerin, *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) ile benzer olduğu görülmüştür. Nükleokapsid protein geninin kısmi nükleotid sekanslarının %99 oranında INSV izolatu ile benzer olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada INSV' nin krizantemde görülen enfeksiyonlarının ilk raporudur (Kundo et al., 2011).

Japonya'da INSV ile enfekteli krizantemlerde henüz bir rapor bulunmamıştır, fakat diğer Tospovirusler problem olan virüslerdir. 2009'da *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Jimba yapraklarında nekrozlar ve klorotik benekler, TSWV enfeksiyonlarını andıran symptomlar görülmüştür. Simptomlu bitkilerin INSV için pozitif olduğu, TSWV, CMV, *Tobacco mosaic virus* için negatif bulunmuştur. Hastalığa INSV enfeksiyonunun neden olduğunu saptamak için, virüs izole edilmiştir ve biyolojik ve moleküler özellikleri incelenmiştir (Agdia, Elkhart, IN, USA).

Ontario'da seralarda *Tomato spotted wilt virus* ve *Impatiens necrotic spotvirus* en yaygın görülen Tospovirus grubu virüsleridir. TSWV, sebzelerde ve süs bitkilerinde zarar yaptığı saptanmıştır. INSV ise süs bitkilerinde daha yaygın görülür ve birçok türde INSV'nin zararı görülür. Genel symptomlar; bodurluk, bronzlaşma, yapraklarda kıvrılma ve bozulmalar, yapraklarda halka lekeler ve çizgiler, nekrotik lezyonlar, damarlarda siyah çizgiler, bazı çeşitlerde bitki ölümleri görülür (Murphy et al., 2014).

### **3. MATERYAL METOD**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Bitkisel Materyal**

İzmir ilinde bulunan Menderes ve Urla (Bademler) ilçelerinde krizantem üretim alanlarında, Menderes ilçesinde Beyaz Karışık, Selevret Sarı, Tutan Kırçılı, Zebila Sarı, Zebila Beyaz, Yeşil, Yeşil 2, Kiremit, Kırmızı, Ritmo Pembe, Dolce Beyaz, Bakardi Sarı, Bakardi Beyaz ve Salinas Beyaz çeşitlerinde ve Urla ilçesinde Easygoing, 0-300, Momentum, Tequila, Vatican, Celebrate, Salinas, Jazzy, Swan, Woodpecker, Redfire, Ritmo, Bacardi, Bacardi Pearl, Bacardi Cream ve Charming çeşitlerinde virüs ile enfekteli olduğundan şüphelenilen, belirti gösteren ve göstermeyen (simptomsuz) krizantemlerden alınan bitki örnekleri çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

##### **3.1.2. Test Bitkileri**

Virüslerin tanımlanmasına yardımcı olmak amacıyla mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan test bitkileri Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji serasında yetiştirilmiştir. Bu amaçla virüslerin tanımlanmasında kullanılacak olan test bitki setleri oluşturulmuştur. Bu bitkilerin bilimsel isimleri, familyaları, kullanılacakları dönem, Çizelge 3.1’ de verilmiştir (Noordam, 1943; Gümüş, 1998; Descriptions of Plant Viruses, 2014).

Çizelge 3.1 Biyolojik Testlerde Kullanılan Test Bitkileri ve Kullanıldıkları Dönemler

| Bilimsel Adı                                     | Türkçe Adı | Familiya              | Dönem              |
|--------------------------------------------------|------------|-----------------------|--------------------|
| <i>Chenopodium amaranticolor</i><br>Coste & Reyn | Kaz Ayağı  | <i>Chenopodiaceae</i> | 6 yapraklı<br>evre |
| <i>Nicotiana clevelandii</i>                     | Tütün      | <i>Solanaceae</i>     | 4 yapraklı<br>evre |
| <i>N. glutinosa</i>                              | Tütün      | <i>Solanaceae</i>     | 4 yapraklı<br>evre |
| <i>N. tabacum</i> cv. Samsun                     | Tütün      | <i>Solanaceae</i>     | 4 yapraklı<br>evre |

### 3.1.3. Total Nükleik Asit (TNA) Ekstraksiyonunda Kullanılan Materyal

RNA ekstraksiyonunda Sigma D 37520 marka santrifüj, çözeltiler, ETG MBT 250 marka ısıtıcı, -30°C' ye kadar soğutabilen derin dondurucu kullanılmıştır.

### 3.1.4. Komplementer DNA (cDNA) Sentezinde Kullanılan Materyal

Daha önce hazırlanmış olan TNA örnekleri, Fermantas marka cDNA sentez kiti, ısıtıcı, shaker (Heidolph Unimax 2010) ve inkübatör (Nüve ES500) materyal olarak kullanılmıştır.

### 3.1.5. PCR Testlerinde Kullanılan Materyal

GeneAMP PCR System marka thermocycler, solüsyonlar, çözeltiler ve virüs primerleri kullanılmıştır. RT-PCR' da kullanılan primerler Çizelge 3.2 ' de görülmektedir. Consort marka elektroforez ünitesi PCR thermocycler'dan çıkan örneklerin agaroz jele yüklenmesinde kullanılmıştır. Jeli görüntülemek için DNR marka görüntüleme cihazı kullanılmıştır.

**Çizelge 3.2** RT-PCR testlerinde kullanılan primerler

| Primer | Primer Dizilimi           | Baz Uzunluğu | Literatür                                                    |
|--------|---------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------|
| TSWV-F | ATGTCTAAGGTTAAGCTCAC      | 777bp        | Nour et al., 2013.                                           |
| TSWV-R | TTAAGCAAGTTCTGCGAGTT      |              |                                                              |
| CVB-F  | AGTCACAATGCCTCCCAAAC      | 621 bp       | Song et al., 2012.                                           |
| CVB-R  | CATACCTTTCTTAGAGTGCTATGCT |              |                                                              |
| CMV-F  | GTAGACATCTGTGACGCGA       | 540 bp       | De Blas et al., 1994;<br>Samuitiene and Navalinskiene, 2008. |
| CMV-R  | GCGCGAAACAAGCTTCTTATC     |              |                                                              |
| TAV-F  | CCATCCCTTCAACATCCGAC      | 494 bp       | Song et al., 2012.                                           |
| TAV-R  | GTTGAAGCGGAAGGAATACG      |              |                                                              |
| INSV-F | GTAGCATTAAACATGCTGTAAATG  | 777 bp       | Chung et al., 2006.                                          |
| INSV-R | GTCAAGCTTTTGACTCAATCTGAT  |              |                                                              |

### 3.1.6. Moleküler Klonlanma Çalışmasında Kullanılan Materyal

Virüslerin elde edilmesi için Fermentas *Pfu* DNA polimerase enzimi ve adenin ekleme aşamasında Promega marka dATP kullanılmıştır. Transformasyonda *Escherichia coli* bakterisine ait JM 109 ırkı, purifikasyonda Bioline Isolate II PCR and Gel Kit, dATP eklenmiş DNA fragmentlerinin temizlenmesinde de Bioline Isolate II PCR and Gel Kit, ligasyon işleminde Promega firmasından temin edilen kit (pGEM T-Easy Vector), plazmid purifikasyonunda Bioline Isolate II Plasmid Mini Kit kullanılmıştır.

## 3.2. Metod

### 3.2.1. Araştırma Alanı ve Örneklerin Toplanması

İzmir ili Menderes ve Urla ilçelerinde krizantem üretimi yapılan alanlar gezilerek virüs hastalıkları belirtisi gösteren üretim alanlarında gözlemler yapılmış, belirti gösteren krizantemlerden bitki örnekleri alınarak örnekleme yapılmıştır. Örnek alınan yerler ve örneklerin özellikleri kayıt edilmiştir. Toplana

krizantem örnekleri polietilen torbalara konularak numaralandırılmış ve testleri yapılana kadar -20°C’de çalışan derin dondurucuda saklanmıştır.

### 3.2.2. Total Nükleik Asit (TNA) Ekstraksiyonu

TNA ekstraksiyonunda silica methodu kullanılmıştır. Her izolat için yaklaşık 10mg/yaprak kullanılarak, 1 ml %1 mercapto-etanol içeren ekstraksiyon tampon çözeltisi varlığında steril örnek poşetleri içinde homojenize edilmiştir. Tüpler ısıtıcıda 70°C 10 dakika inkube edildikten sonra 5 dakika buzda bekletilmiş ve daha sonra örnekler 1400 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvıdan 300 µl alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. Tüplere 150 µl etanol, 300 µl 6M NaI, 25 µl silika süspansiyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkubasyona tabi tutulmuştur. Tüpler 6000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılmış ve tüpün içinde kalan silika partiküllerinin yıkanması için 500 µl yıkama tampon çözeltisi eklenmiştir. Bu işlemin ardından tüpler 6000 rpm’ de santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi iki kez yapılmıştır. Yıkamadan sonra silika partikülleri içeren tüplere 150 µl RNase’ dan arı steril su eklenmiştir. 70°C’ de 4 dakika ısıtıcıda inkube edilen tüpler 13000 rpm’ de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün üst kısmında kalan sıvıdan 200 µl alınarak yeni tüplere aktararak TNA ekstraksiyonu tamamlanmıştır. Örnekler cDNA sentez ve RT-PCR uygulamaları yapılncaya kadar -20°C’ de derin dondurucuda saklanmıştır (Foissac et al., 2001).

### 3.2.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Örneklerin TNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Fermentas marka cDNA sentez kiti firmanın belirlediği prosedüre göre uygulanılarak sentez yapılmıştır.

Bu yöntemle göre ilk önce eppendorf tüplerin içerisine 0,1-5 µl total RNA, 1 µl oligo (dt) primer konulmuş ve DEPC su ile 11 µl’ ye tamamlanmıştır. 65°C’ de 5 dakika inkubasyon uygulandıktan sonra tüpler buz üzerine konulmuş ve sırasıyla içlerine 4 µl 5X Reaction Buffer, 1 µl Ribolock Ribonuclease Inhibitor, 2 µl 10mM dNTP mix, 2 M-MuLV reverse transcriptase eklenerek 20 µl hacime çıkarılmıştır. Kısa süreli santrifüj uygulandıktan sonra 37°C’ de 60 dakika ve

70°C’ de 5 dakika inkubasyona tabi tutularak cDNA sentez aşaması tamamlanmıştır.

#### **3.2.4. Reverse Transcriptase (RT) PCR Yöntemi**

RT-PCR işlemi ticari firmanın önerdiği prosedüre göre 25 µl hacimde yapılmıştır. Steril PCR tüplerine 12.5 µl 2x PCR master mix, 1 µl primer 1, 1 µl primer 2, 2 µl cDNA ve 8.5 µl nuclease free su eklenmiştir. Tüpler PCR cihazına yerleştirilerek test edilecek virüs için spesifik olan program uygulanmıştır. Tüm işlemler boyunca eldiven kullanılmıştır. Daha sonra örnekler PCR thermal cyclerda spesifik PCR programlarında çoğaltma işlemine alınmıştır.

#### **3.2.5. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi ve Jel Görüntüleme Cihazında PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

100 ml 1X TAE tamponu içine 1,5 g agaroz konularak karışım mikrodalga fırında 3.5 dakika bekletilerek eriyik haline getirilmiştir. Elektroforez koşumu, 100 V’ da yatay düzeneğe 60 dakika süreyle ve 1X TAE çözeltisi içerisinde uygulanmıştır. Jel yükleme yapılmadan önce örneklerle (10 µl örneğe) 2 µl yükleme tamponu ilave edilmiştir. Ethidium bromide ile boyanan jel, DNR Bio-Imaging marka Jel Dokümantasyon ve Analiz Sistemi ile fotoğrafı çekilerek kayıt edilmiştir.

#### **3.2.6 Test Bitkilerinin Yetiştirilmesi**

Biyolojik testler için kullanılan test bitkileri serada Şekil 3.1’de görüldüğü gibi yetiştirilmiştir. Tohumların ekildiği ve fidelerin şaşırtıldığı küvet ve saksılarda yetiştirme ortamı olarak kullanılan harç 1:1 oranında toprak ve torf karışımı ile hazırlanmıştır. Fidler uygun gelişme dönemlerine geldikleri zaman (10 cm çaplı plastik) saksılara şaşırtılmıştır ve daha sonra inokule edilmiştir (Nogay, 1983; Matthews, 1991).



**Şekil 3.1** Çalışmada kullanılan test bitkilerinin yetiştirilmesi ve bitkilerin genel görünümü

### 3.2.7. Saptanan Virüslerin Moleküler Klonlaması

RT-PCR çalışmalarında pozitif olarak bulunan TSWV ile enfekteli örneğin cDNA'sı klonlama çalışmalarında kullanılmıştır. Klonlama çalışmaları aşağıda anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.7.1. Transformasyonda kullanılan bakterinin çoğaltımı, purifikasyonu ve kompetan hücrelerin hazırlanması**

Transformasyonda ampisiline dayanıklılığı olmayıp transformasyondan sonra vektör üzerinde bulunan ampisilin'e dayanıklılık geni sayesinde dayaklı hale gelebilen *Escherichia coli* bakterisinin JM109 ırkı kullanılmıştır. Eksi 80 °C'deki *E. coli* bakterisine ait JM 109 ırkı katı Laura Bertani (LB) ortamına ekilmiştir (Promega, USA).

Bakteri katı LB ortamda 37 °C' de bir gece inkübe edildikten sonra ertesi güne kadar gelişen kolonilerden steril kürdan yardımı ile tek koloni seçilerek 10 ml sıvı besi yerine ekilmiştir. Bakteri daha sonra 10 ml' lik sıvı LB ortamı'na ekilmiş ve bir gece boyunca 250 rpm'de 37 °C' de inkübe edilerek sıvı besi

ortamında klon oluşturulmuştur. Elde edilen saf klon ertesi gün 1 litrelik erlenlerde bulunan 1 litre sıvı LB ortamına ekilerek ve 250 rpm'de 37 °C' de çoğalmaya bırakılmıştır. Erlenlere ekimden 1 saat sonra bakteri yoğunluğunun optik yoğunluk (OD) 0.6–0.9 aralığında olması için spektrofotometrede düzenli ölçümler yapılmaya başlanmıştır. Ve OD 0.6–0.7 aralığına ulaşınca kadar bakteri çoğaltımına devam edilmiştir. Bu aralığa ulaştığında bakteri 37 °C' den alınmış ve daha fazla bakteri gelişimini engellemek için hemen buza daldırılmıştır.

Buza daldırılan bakteri süspansiyonu yaklaşık 30 dk bakteri çoğalmasının durması için bekletilmiş ve ardından bakteri süspansiyonu falkon tüplerde dengelendikten sonra 6.000 rpm de 15 dk santrifüj edilmiştir. Supernatant atılmış, pellet buzda bekletilen steril soğuk su ile yeniden süspansiyon edilmiştir. Tüpler 6.000 rpm' de 15 dk santrifüj edildikten sonra supernatant atılarak çökelti 5–10 ml soğuk su ile vortekste resüspanse edilmiştir. Ardından tüpler toplamda yarım litre olacak şekilde yarıya kadar soğuk su ile doldurulup dengelenip 6.000 rpm' de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvı atılmıştır. Tüpler 20 ml %10 lük soğuk glycerol ile resuspanse edildikten sonra 6.000 rpm' de 15 dk santrifüj edilerek üst sıvı atılarak yaklaşık 2-3 ml %10'luk glycerol ile sulandırılmıştır. Elde edilen kompetan hücre süspansiyonu 100 µl'lik sıvılar halinde 0.5 ml hacimli steril PCR tüplerine taksim edilerek kullanılıncaya kadar -80 °C 'de saklanmıştır (Promega, USA).

### **3.2.7.2.Pfu DNA polimeraz enzimi (Thermo, USA) ile küt uçlu DNA fragmentlerinin elde edilmesi ve agoroz jelden yeniden elde edilmesi**

DNA fragmentlerinin jelden temizlenmesinde Bioline Isolate II PCR and Gel Kit kullanılmıştır. Bu işlem firmanın bildirdiği prosedüre göre uygulanmıştır. DNA purifikasyonu sonrasında elde edilen küt uçlu DNA fragmentlerinin 3' uçlarında çengel (overhang) yapı oluşturmak için firmanın protokolüne göre dATP uygulaması yapılmıştır (Promega, USA).Uçlarına dATP eklenmiş DNA fragmentleri dATP ekleme esnasında farklı enzim ve tamponlar içerisinde bulunduğundan klonlama çalışmalarının olumsuz etkilenmemesi için bu bileşenlerin uzaklaştırılması amacı ile ticari Bioline Isolate II PCR and Gel Kit ile

saflaştırılmıştır (Bioline, USA). Konsantrasyon ölçümünden sonra DNA fragmentleri ligasyon işleminde kullanılmıştır.

### **3.2.7.3. DNA'nın plazmide aktarılması (Ligasyon)**

Bu aşamada küt uçlu elde edilen ve dATP eklenmesiyle çengel yapılı hale dönüştürülen viroid DNA (insert)'sı DNA ligase enzimi ile plazmidin DNA'sına entegre edilmiştir. Sözü edilen işlemlerin gerçekleştirilmesi için Promega pGEM-T Easy Vector adlı kit kullanılmış ve çalışma yine firmanın protokolüne göre gerçekleştirilmiştir (Promega, USA). Ligasyon aşaması virüs örnekleri ve bir de pozitif kontrol için (kontrol insert ile hazırlanır) hazırlandıktan sonra 1 gece boyunca 4 °C'de inkübe edilmiş transformasyonda kullanılmıştır.

### **3.2.7.4. Rekombinant plazmidin bakteriye aktarılması (Transformasyon)**

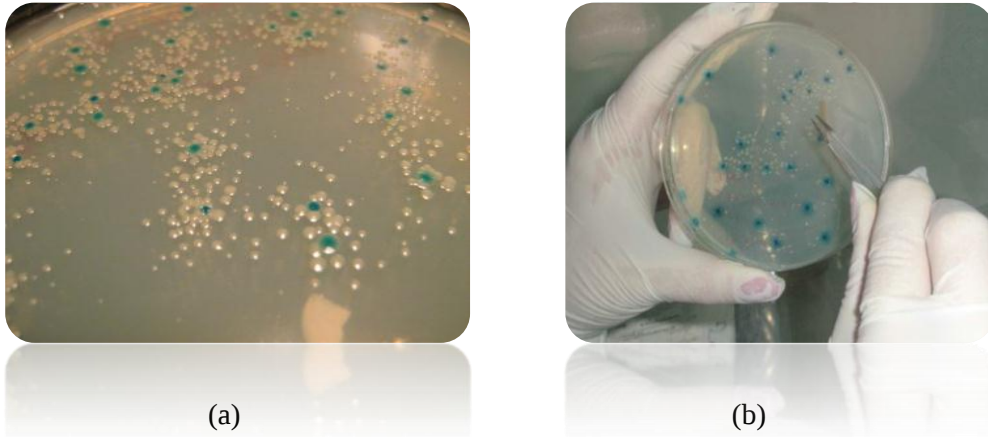
Ligasyon aşamasında plazmide aktarılan DNA fragmenti ile elde edilen rekombinant plazmid bu aşamada 100 µl kompetan bakteri süspansiyonuna eklenerek transformasyon gerçekleştirilmiştir. Bunun için 4-5 µl rekombinant plazmid mikropipet yardımı ile kompetant hücrelerle karıştırıldıktan sonra 5 dk buzda inkübe edilmiştir. Micropulser ile elektroşok uygulaması 0.2'lik spesifik kuvvetler içinde gerçekleştirilmiştir. Şok evresi olarak nitelendirilen bu aşamadan sonra küvetteki bakteri süspansiyonuna hızla 900 µl SOC solüsyonu (Ek 2) eklenerek karışım 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Böylece elektrik şoku uygulanmış bakterilerin yaşamaları sağlanmıştır.

Diğer yandan ampicilin içeren LB petrilere buzdolabından alınarak 1 saat 37 °C'de inkübe edilmiş ve 10 µl IPTG (1M) ve 30 µl X-GAL solüsyonu (Ek 2) eklenerek petri yüzeylerine yayılmıştır. Hazırlanan petrilere 1 saat süren inkübasyonun ardından direkt bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak her bir numune için iki plate ekim yapılmıştır. Transformasyondan sonra yapılan inkübasyon sonrası SOC solüsyonu içinde çoğalan bakteri süspansiyonu steril baget yardımı ile petrilere yayılmış ve 37 °C'de bir gece ters çevrilerek inkübe

edilmişlerdir. Transforme edilen bakteride ampiciline dayanıklılık geni bulunmamaktadır.

Eğer plazmidde PCR ürünü DNA aktarılmış ise bu insert DNA plazmidin Lac Z bölgesine yerleşmektedir ve bakteriye alındığında X-Gal ve IPTG kimyasalını kullanamamaktadır ve beyaz renkli proteinlerin oluşmasına neden olmaktadır. Öte yandan sadece plazmidi bünyesine alan bakteriler ise içerdikleri plazmid üzerindeki Lac Z bölgesi zarar görmediği için X-Gal ve IPTG kimyasallarını kullanmakta, bunun sonucunda mavi renkli proteinler oluşturmakta ve kolonilerin rengi de mavi olmaktadır. Bu nedenle gelişen kolonilerden beyaz olanlar seçilerek kültür oluşturulmaktadır.

Transforme olmuş bakterilerden geliştirilen tek kolonilerden beyaz olanlar insert DNA taşıdıklarından her bir koloniye steril kürdan temas ettirilmiş ve 100 µl/ml ampicilin ile %0.8 glycerol içeren 2 ml sıvı LB bulunan eppendorf tüplerine daldırılmak suretiyle sıvı ortama ekimleri yapılmıştır (Şekil 3.2). Çalışma steril kabin içinde gerçekleştirilmiştir. Ekimden sonra kürdanlar atılmış eppendorf tüplerinin kapakları kapatılarak 37 °C’de bir gece inkübe edilmiştir. Ortamdaki ampicilin bünyesine plazmid olmayan bakterinin gelişmesine engel olması amacıyla kullanılmıştır.



**Şekil 3.2.** Transformasyondan sonra gelişen mavi ve beyaz koloniler (Bu kolonilerden sadece beyaz olanlarda Plazmid+insert DNA bulunmaktadır) (a). Steril kürdan yardımı ile tek kolonilerin seçimi(b).

Bir gecelik inkübasyon ile transforme olmuş bakterilerin çoğaltılmasından sonra kolonilerde var olan plazmid Bioline Isolate II Plasmid Mini Kiti ve firmanın protokolü kullanılarak purifiye edilmiştir. Purifiye edilmiş rekombinant plazmidde insertin bulunup bulunmadığı virüse spesifik primerle gerçekleştirilen RT-PCR testleri ile belirlenmiştir.

### **3.2.8. Klonlanmış PCR ürünlerinin DNA dizilemesi ve verilerin bioinformatik yöntemlerle analiz edilmesi**

Plazmid purifikasyonunun ardından plazmid üzerindeki dizilerin tespiti hizmet alımı şeklinde BM Laboratuvar Sistemleri A.Ş.'ye yaptırılmıştır.

Sekans benzerliği için virüslerin farklı ülkelerdeki izolatlarının nükleotid dizilerine gen bankasından Blast programı ile ulaşılmıştır. Türkiye izolatlarının tüm nükleotid dizilerinin dizi analizi Vector NTI Software Program (Invitrogen, USA) kullanılarak yapıldıktan sonra diğer ülkelerdeki izolatlarla CLC RNA Workbench Version 6.8.2 (CLC bio, Denmark) programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bu şekilde gerçekleştirilen filogenetik analiz sonucunda virüslerin diğer ülkelerde bulunan aynı virüslerle benzerlik ve farklılıklarını göstermek adına soy ağaçları yine aynı program kullanılarak oluşturulmuştur.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Belirtiler

Yapılan çalışmada, 2013 ve 2014 yıllarında Menderes ve Urla (Bademler) ilçelerinde önemli krizantem yetiştiricilik yapılan alanlardan krizantemde görülen virüslerin bulunma durumlarını belirlemek amacıyla virüs belirtisi gösteren ve belirti göstermeyen (simptomsuz) 195 örnek toplanmıştır. *Tomato spotted wiltvirus* (TSWV), *Chrysanthemum B carlavirus* (CVB), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato aspermy virus* (TAV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV)' lerin varlığı RT-PCR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Aşağıdaki şekillerde (4.1, 4.2, 4.3) krizantem bitkilerinde gözlenen virüs belirtileri görülmektedir. Üst yapraklar üzerinde klorotik lekeler, yeşil mozaik alanlar, kloroz ve sonrasında solma görülmektedir.



Şekil 4.1 Krizantemde yapraklarda renk değişikliği, deformasyon belirtisi.



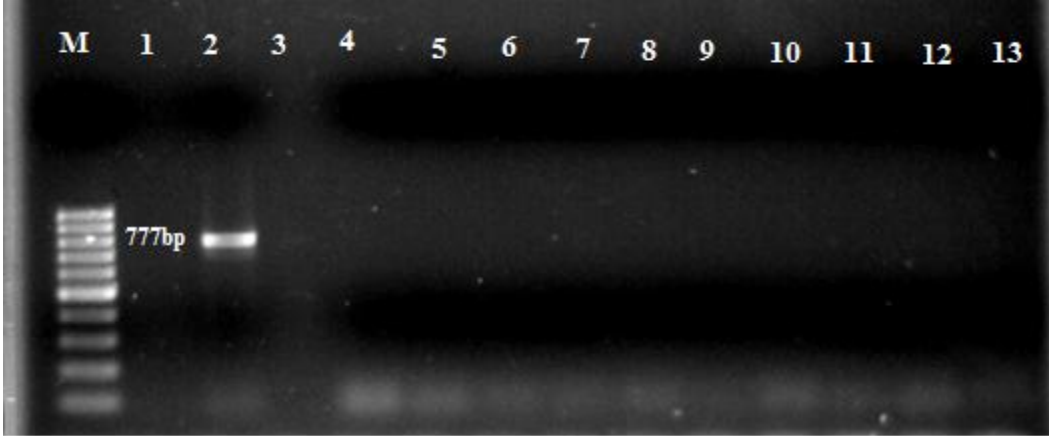
**Şekil 4.2**Krizantemde görülen TSWV yeşil mozaik alanlar ve beneklenme.



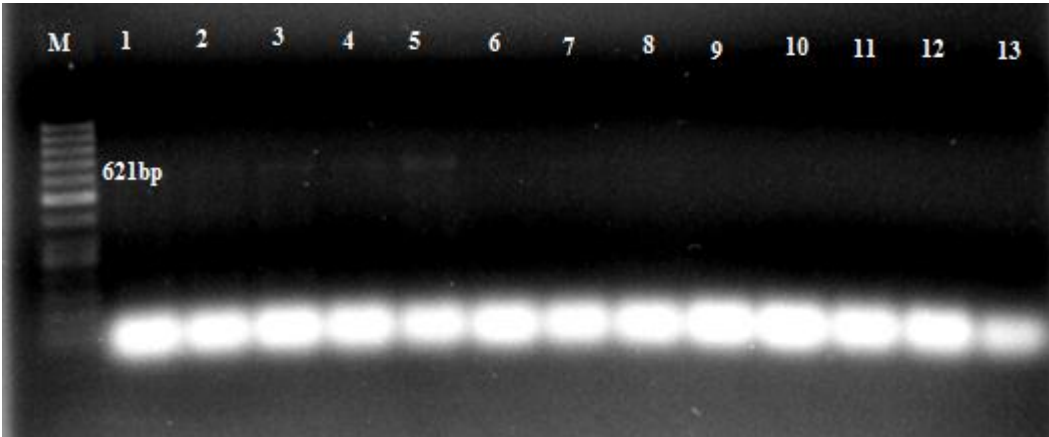
**Şekil 4.3**Krizantemde görülen CVB enfeksiyonu sonucu oluşan bodurlaşma ve yaprak deformasyonu.

#### 4.2. RT-PCR Sonuçları

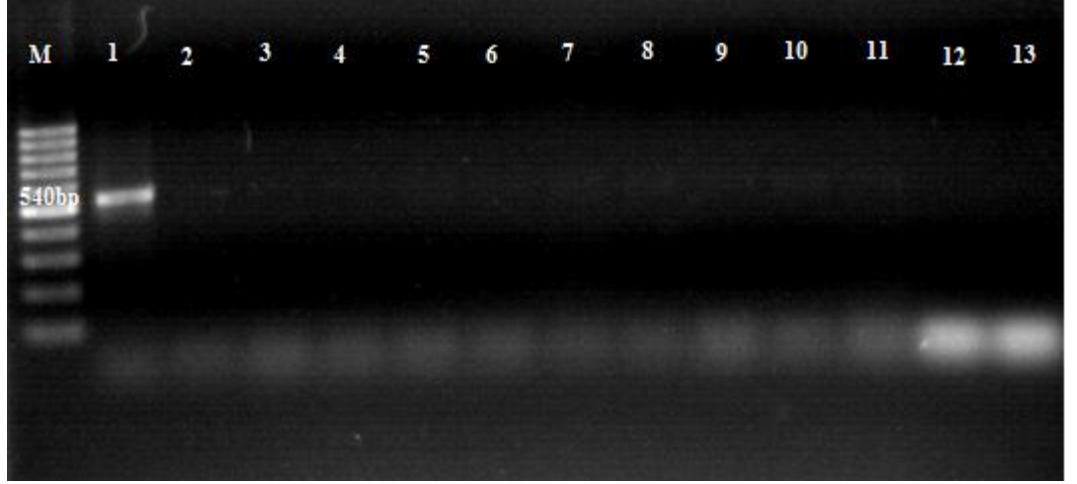
Yapılan RT-PCR testleri sonucunda TSWV için 777 bp (M: 100 bp, DNA ladder; Fermentas, Germany), (Şekil 4.4), CVB için 621 bp (M: DL2000 Marker; TaKaRa) (Şekil 4.5), CMV için 540 bp (M: 50 bp, DNA ladder; Fermentas, Germany) (Şekil 4.6) uzunluğunda bantlar elde edilmiştir.



**Şekil 4.4**İzmir'in Menderes ilçesinden toplanan örneklerle TSWV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunda virüsün varlığını gösteren 777 bp uzunluğunda bant (4'den 16. örneğe kadar olan sonuçlar),



**Şekil 4.5**İzmir'in Menderes ilçesinden toplanan örneklerle CVB için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunda 621 bp uzunluğunda elde edilen bantlar (47'den 59. örneğe kadar olan sonuçlar).



**Şekil 4.6**İzmir'in Menderes ilçesinden toplanan örneklerle CMV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunda, CMV ile enfekteli olduğunu gösteren 540 bp uzunluğundaki bantlar (61, 63'ten 74. örneğe kadar olan sonuçlar).

### **Biyolojik Testlerde Gözlenen Belirtiler**

Yürütülen RT-PCR yöntemlerinin sonuçlarına göre virüs ile enfekteli olduğu saptanan örnekler gruplandırılmış, her grubu temsil edecek sayıda örnek seçilerek biyolojik testler yürütülmüştür.

Gerçekleştirilen mekanik inokulasyonlar sonucunda genel olarak test bitkilerinde mozaik, yaprak deformasyonları gözlenmiştir.

CMV ile enfekteli örneklerle hazırlanan ekstraktlar test bitkilerine aktarılmıştır. İnokulasyon sonucunda *Nicotiana clelandii* bitkilerinde sistemik mozaik, damarlar arası renk açılması ve bodurlaşma göze çarpan belirtiler olmuştur (Şekil.4.7).



**Şekil 4.7** CMV ile mekanik olarak inokule edilmiş *Nicotiana clevelandii* bitkilerinin yapraklarında gözlenen belirtiler a) *N. clevelandii* yapraklarında mozaik b) *N. clevelandii* bitkisinde bodurlaşma

CVB ile enfekteli örneklerle hazırlanan ekstraktlar duyarlı test bitkilerine aktarılmıştır. *Nicotiana clevelandii* bitkilerinde yaprak damarlarında renk açılmaları ve yaprak deformasyonları gözlenmiştir (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8** CVB ile mekanik olarak inokule edilmiş *Nicotiana clevelandii* bitkilerinin yapraklarında gözlenen belirtiler a) *Nicotiana clevelandii* yapraklarında damarlarda renk açılması ve mozaik b) *Nicotiana clevelandii* yapraklarında deformasyon c) *Nicotiana clevelandii* damarlarda renk açılmaları

TSWV ile enfekteli örneklerle hazırlanan ekstraktlar duyarlı test bitkilerine aktarılmıştır. *Nicotiana glutinosa*'da sistemik hafif nekrozlar ve yaprak deformasyonları gözlenmiştir.

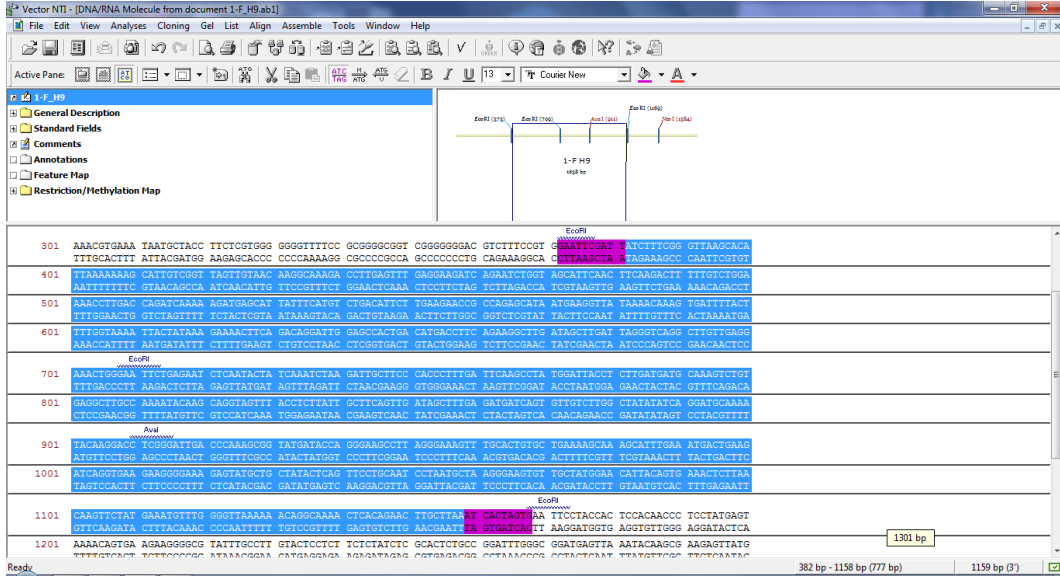


**Şekil 4.9** TSWV ile mekanik olarak inokule edilmiş test bitkileri yapraklarında gözlenen bazı belirtiler a) *Nicotiana glutinosa* yapraklarında hafif klorotik lekeler b) *N. clelandii* yapraklarında deformasyonlar

#### **Dizi analizi ve filogenetik sınıflandırma çalışmaları**

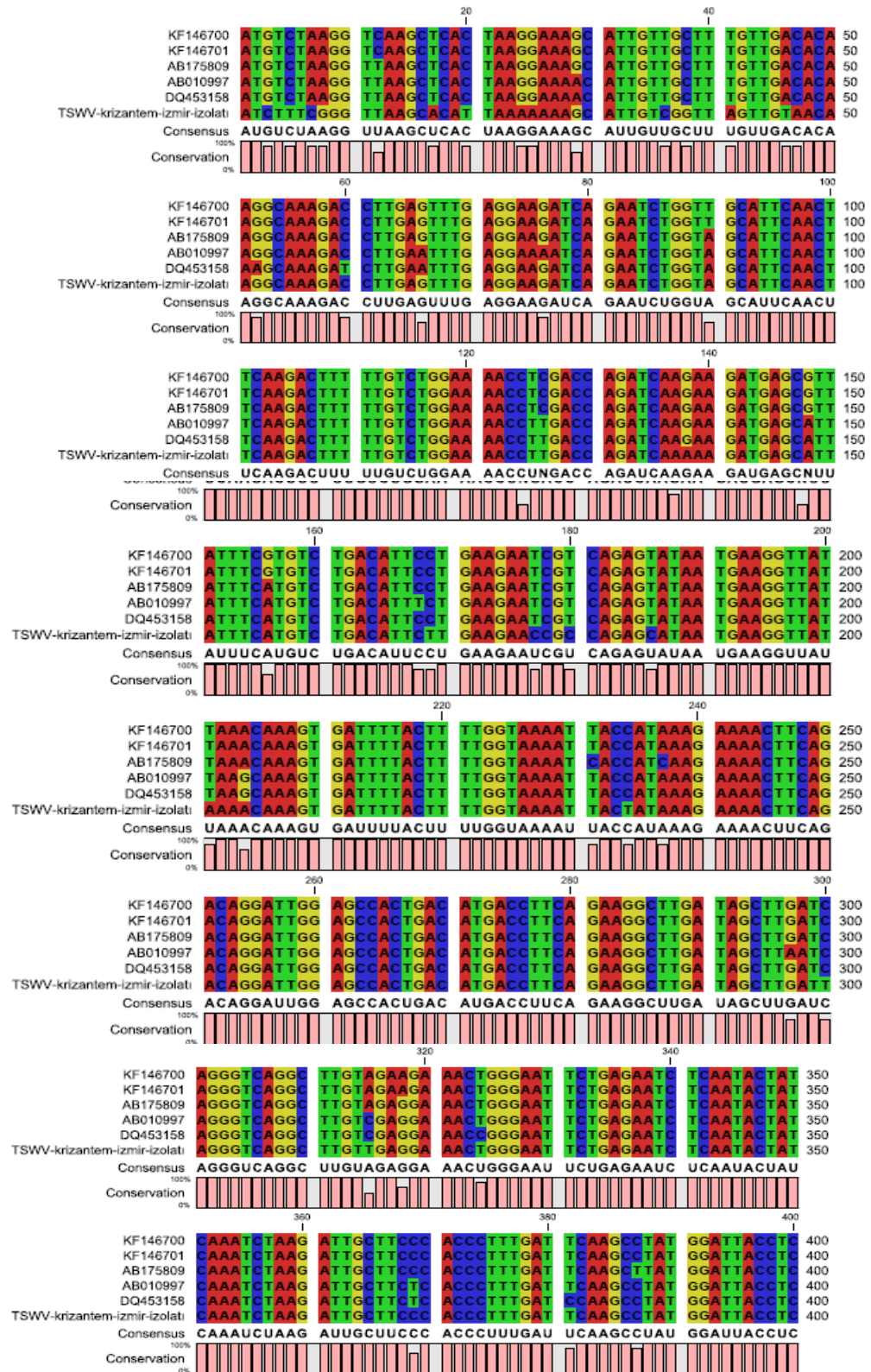
Plazmid purifikasyonundan sonra plazmid üzerindeki dizilerin tespiti hizmet alımı şeklinde BM Laboratuvar Sistemleri A.Ş.'ye yaptırılmıştır. Firmadan gönderilen verilerden yararlanarak filogenetik analizler Vector NTI, Blast ve CLC RNA Workbench programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

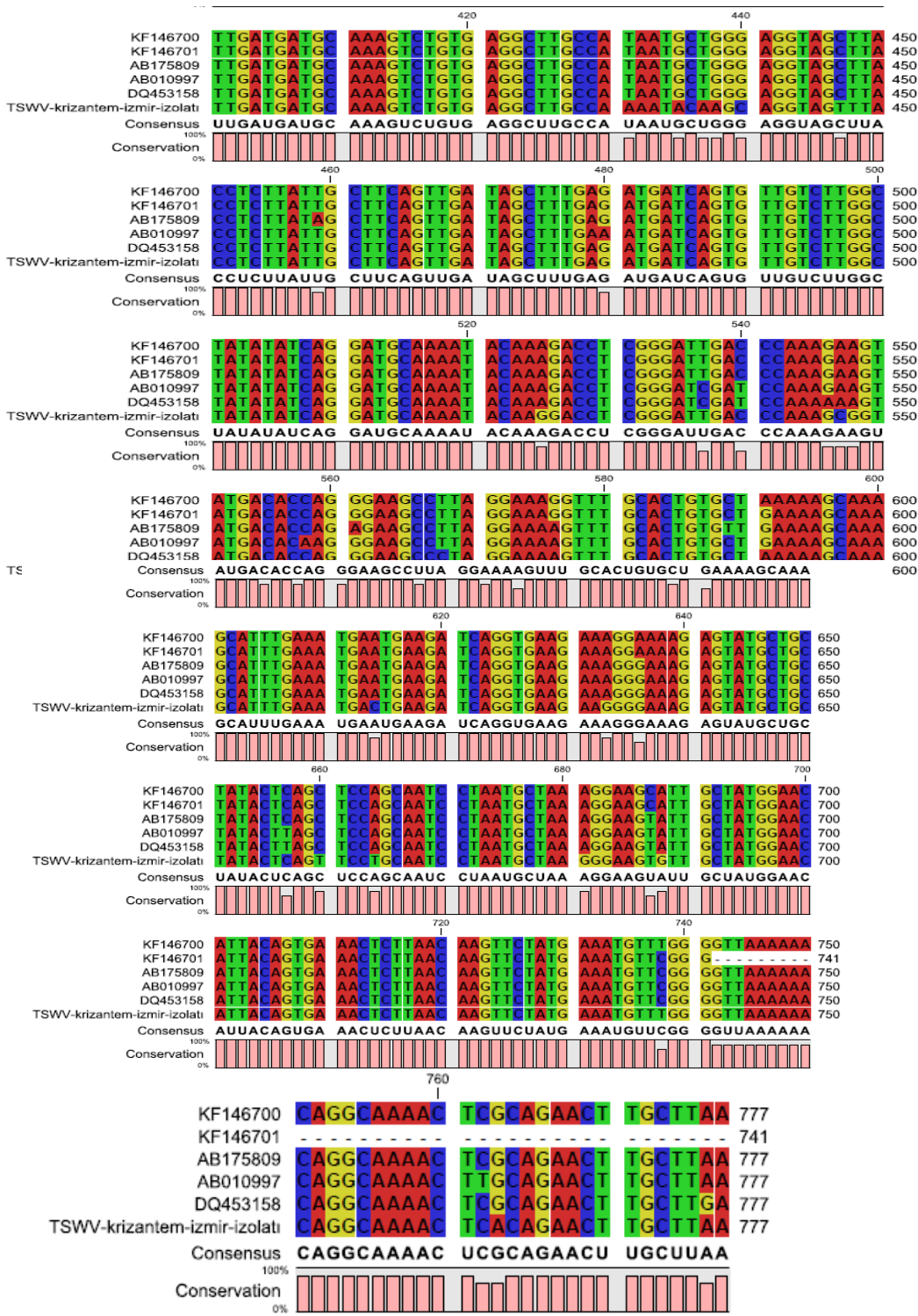
Dizisi belirlenen virüse aktarılmış plazmidler Vector NTI programında açılarak virüsün vektör üzerindeki yeri belirlenmiştir. Bunun için dizi üzerinde ilk önce vektöre ait uçlar saptanmış ve işaretlenmiştir. Vektörün iki kolu arasında kalan dizi klonlanan dizi olarak saptanmıştır (Şekil 4.10).



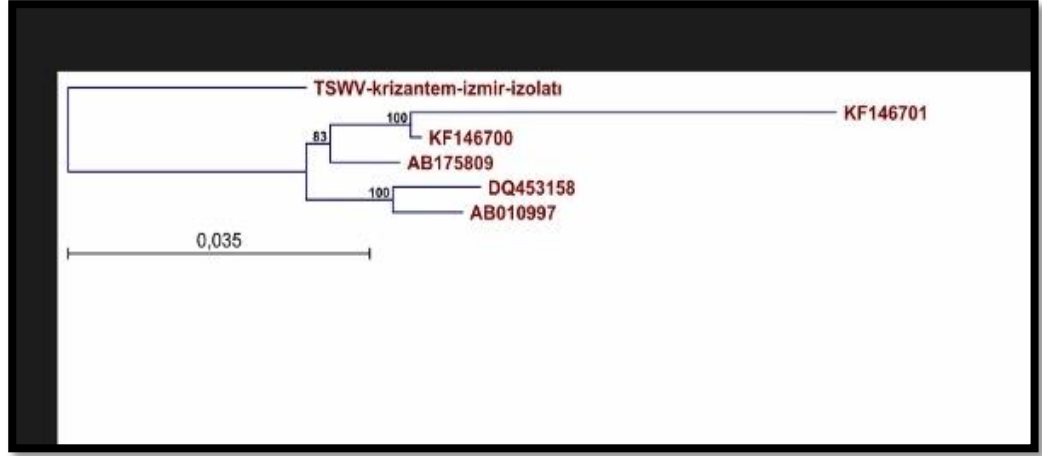
**Şekil 4.10** TSWV'nin çoğaltılan bölgesinin baz dizisi üzerinde çoğaltılan 777 bp'lik DNA fragmenti. Morla işaretli alanlar vektörün kollarını, mavi blokları ise plazmide aktarılan TSWV'nin çoğaltılan bölgesinin baz dizisini göstermektedir.

Soy ağacı (Filogenetik ağaç) eldeki izolatın dünya izolatlarıyla benzerliklerini ortaya koymaktadır. TSWV için yürütülen çalışmada İzmir'den izole edilen ve sekanslamaya gönderilen etmen TSWV-Krizantem-İzmir izolatı olarak adlandırılmıştır. İzolatlar birbirleriyle align edilip akrabalıklarının belirlenmesi amacıyla filogenetik ağaç çizildikten sonra TSWV izolatlarının benzerlik oranları yine Vector NTI programı aracılığıyla incelenmiştir. Bunun sonucunda farklı çeşitlerden elde edilen izolatların birbiriyle olan benzerlikleri % 93-94 arasında değişmiştir. %94'lük benzeme oranıyla gen dizilimi birbirine en yakın olan izolat KF146700kodu ile kayıtlı Tomato spotted wilt virus isolate Chrysanthemum-16 nucleocapsid (N) gene, complete cds ve AB175809kodu ile kayıtlı Tomato spotted wilt virus N gene for nucleoprotein, complete cds izolatı ile aynı grupta yer alır. İzolatların birbirlerine olan yakınlık derecelerinin nasıl olduğunu Şekil 4.12'de verilen filogenetik ağaçtan da anlamak mümkündür. Sözü edilen filogenetik ağaçta, izolatların birbirleriyle bağlantısını sağlayan kollar üzerindeki rakamlar iki izolatın birbirine olan yakınlık derecesini ortaya koymaktadır.





Şekil 4.11 Krizantemden elde edilen TSWV izolatlarının kendi aralarında alignment yapılmış hali.



**Şekil 4.12.** Çalışma kapsamında krizantemden elde edilen TSWV izolatının birbirleriyle akrabalığını gösteren filogenetik ağaç

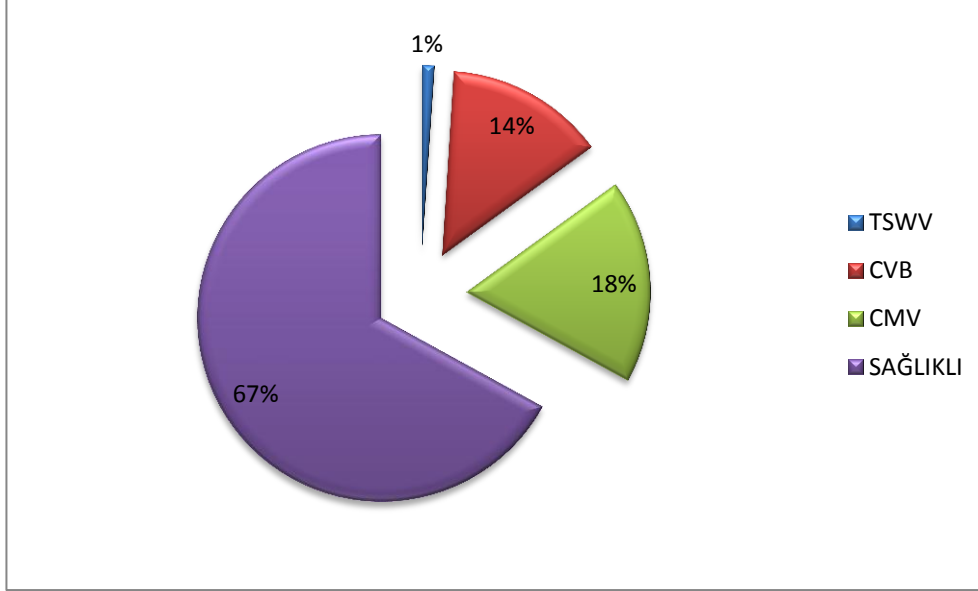
### 4.3 Survey Sonuçları

2013 ve 2014 yıllarında İzmir ili Menderes ve Urla (Bademler) ilçelerinde krizantem yetiştirilen alanlarda yapılan çalışmada 195 örnek testlenmiştir. Yapılan RT-PCR testleri sonucunda Menderes’den alınan 95 örnekten 31 ‘inin virüslerle enfekteli olduğu bulunmuştur. TSWV 1 örnekte; CVB 13 farklı örnekte; CMV ise 17 farklı örnekte rastlanmıştır. TAV ve INSV enfeksiyonları tespit edilememiştir. Urla (Bademler) ilçesinden alınan 100 örnekte TSWV, CVB, CMV, TAV ve INSV enfeksiyonlarının hiçbirine saptanmamıştır.

**Çizelge 4.1** İzmir İli Menderes ve Urla (Bademler) İlçelerinden 2013 ve 2014 Yıllarında Saptanan Etmenler

| Örnek<br>Alınan İlçe | Testlenen<br>Örnek | Sağlıklı<br>Örnek | Enfekteli<br>Örnek | Saptanan Virüsler |           |          |
|----------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-----------|----------|
|                      |                    |                   |                    | CMV               | CVB       | TSWV     |
| Menderes             | 95                 | 64                | 31                 | 17                | 13        | 1        |
| Urla                 | 100                | 100               | 0                  | 0                 | 0         | 0        |
| <b>Toplam</b>        | <b>195</b>         | <b>164</b>        | <b>31</b>          | <b>17</b>         | <b>13</b> | <b>1</b> |

Bu verilere göre Menderes ilçesinde %1 oranında TSWV, %14 oranında CVB, %18 oranında CMV tespit edilmiştir. %67'lik kısmında herhangi bir virüse rastlanmamıştır. Virüsler ve yaygınlık oranları Şekil 4.13'de görülmektedir. Menderes ilçesinden alınan krizantem çeşitlerinde saptanan viral etmenler Çizelge 4.1 'de verilmiştir.



Şekil 4.13 Menderes ilçesinde krizantem üretim alanlarında tespit edilen virüsler ve yaygınlık oranları

Çizelge 4.2 Menderes ilçesinde krizantem çeşitlerinde saptanan viral etmenler

| ÖRNEK SAYISI | ÇEŞİT          | TSWV | CMV | CVB |
|--------------|----------------|------|-----|-----|
| 1            | BEYAZ KARIŞIK  | +    |     |     |
| 1            | SELEVRET SARI  |      |     | +   |
| 2            | TUTAN KIRÇILLI |      |     | +   |
| 4            | ZEBLA BEYAZ    |      |     | +   |
| 2            | YEŞİL          |      | +   |     |
| 1            | YEŞİL          |      |     | +   |
| 4            | KİREMİT        |      | +   |     |
| 5            | KIRMIZI        |      | +   |     |
| 5            | RİTMO PEMBE    |      | +   |     |
| 1            | DOLCE BEYAZ    |      | +   |     |
| 2            | DOLCE BEYAZ    |      |     | +   |
| 3            | BAKARDİ SARI   |      |     | +   |

## 5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Yetiştiriciliği yapılan birçok süs bitkisinde olduğu gibi krizantemde de kaliteyi etkileyen birçok hastalık ve zararlı mevcuttur. Araştırma kapsamında son yıllarda yetiştiriciliği artan krizantemin İzmir ilinde 2013-2014 yıllarında krizantem yetiştiriciliği yapılan alanlardan alınan örneklerde enfeksiyon oluşturan viral etmenlerin simptomatolojik, biyolojik ve moleküler yöntemler ile tanıları yapılmış ve viral etmenlerin bulunma durumları belirlenmiştir (Şekil 1.1).

Menderes ve Urla ilçelerinde krizantem yetiştiriciliği yapılan alanlardan yapraklarda nekrotikleşme, küçülme, klorotik beneklenme, yaprak deformasyonu, damarlarda renk açılması, çiçek deformasyonu, yapraklarda şekil bozuklukları gösteren ve belirti göstermeyen toplam 195 bitki örneği alınmıştır. Virüs benzeri belirti gösteren veya göstermeyen örneklerle daha sonra yürütülen biyolojik ve moleküler test sonuçları, bitkilerde görülen belirtilerin virüslerden kaynaklanmış olabileceği gibidiğer bitki patojenleri veya abiyotik etkenler tarafından da oluşabileceği yapılan çalışmalar sonucunda ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte belirti göstermeyen örneklerle de latent virüs enfeksiyonları da olabileceği çalışmalar sırasında gözlenmiştir.

*Chrysanthemum B carlavirus*, Menderes ilçesinden alınan 95 örnekten 13 örnekte Selevret Sarı, Tutan Kırçilli, Zebila Beyaz, Yeşil, Dolce beyaz ve Bacardi Sarı çeşitlerinde etmen saptanmıştır. CVB yaprak kalitesinde hafif zarara, hafif yaprak beneklenmesine, damarlarda renk açılmasına neden olmaktadır (Hollings and Kassanis,1957). Bazı çeşitlerde, enfekteli bitkilerde çiçekler normal ve sağlıklı görünmüştür (Noordam, 1952). Bir diğer çalışmada bazı çeşitlerde mozaik ve symptomsuz enfeksiyonlar gözlenir (Hakkaart and Maat, 1974). Dolce Beyaz çeşidinde symptomsuz olduğu düşünülen örnekte CVB' ye saptanmıştır. Bu bulgular bizim çalışmamızla büyük ölçüde paralellik göstermektedir. 15 -20°C arası sıcaklıklarda bitkilerin CVB ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, CVB' nin tespitini yapmak için en uygun zamanın kış mevsimi olduğunu göstermiştir (Lin et al., 2005). Bu çalışmada da Kasım-Aralık aylarında örnekler araziden alınmıştır. Simptomlar virüs kaynağı ve çeşitlere göre değişir(Hakkaart and Maat, 1974). Yapılan çalışmalarda,Tayvan'da krizantem üretimi yapılan alanlarda CVB yaygın olarak görülmektedirRT-PCR metodu CVB'nin

saptanmasında en güvenilir yöntem olduğunu göstermiştir (Ram et al., 2005).Avustralya’da CVB (%39.2)en sık görülen virüslerden biridir. Batı Avustralya’dan tarlada yetiştirilen krizantemlerde saptanmıştır(Hill et al., 1996).Hindistan’da bu hastalık oranının %40.26 ve % 94.66 arasında değiştiği görülmüştür. (Verma et al., 2003).Kore’de krizantem çeşidinde CVB-ch’ ın enfeksiyon oranı %49.8’dir(Chung et al., 1999). Bu çalışmada ise CVB’nin bulunma oranının %7 olduğu saptanmıştır.

Enfekteli bulunan örneklerden seçilen örnekler ile yürütülen biyolojik test sonucunda test bitkilerinde gözlenen belirtiler önceki yıllarda gerçekleştirilen bulgular ile paralellik göstermektedir (Descriptions of Plant Viruses, 2014). Duyarlı test bitkilerine gerçekleştirilen mekanik inokulasyon sonucunda bitkide *Nicotiana clevelandii* bitkilerinde yaprak damarlarında renk açılmaları ve yaprak deformasyonları gözlenmiştir (Şekil 4.8).

*Tomato spotted wilt virus*, Menderes ilçesinden alınan 95 örnekten sadece 1 örnekte, Beyaz Karışık çeşidinde, etmene rastlanmıştır.TSWV krizantemde çeşitli belirtilere sebep olabilmektedir. Bu belirtiler, yeşil mozaik alanlar, nekrotik veya klorotik lokal lezyonlar, halka lekeler, konsantrik halkalar, solma, bodurluk, beneklenme, bronzlaşma, kloroz ve nekrozdur. Bitkinin yaşı, çeşidi, çevre şartlarındaki değişiklikler aynı konukçuda TSWV’ nin farklı izolatları arasında belirtiler değişir (EPPO, 1999a; Mumford et al., 1996).Bu çalışmada krizantem bitkisinde yeşil mozaik alanlar, beneklenme, deformasyon belirtilerine rastlanmıştır. Görülen belirtiler, daha önce yapılan çalışmalarda TSWV belirtileri ile örtüşmektedir (Şekil 4.2). Başka bir çalışmada krizantem bitkileri TSWV ile ciddi etkilenebilmesine rağmen hastalıklı bitkiler üzerinde belirtiler genellikle yavaş gelişir ve birkaç yaprak ve/veya kök parçaları ile sınırlı kalır. Enfekteli krizantem bitkileri belirtilsuz da kalabilmektedir (Matteoni and Allen, 1989).

Krizantem yetiştirilen alanlarda *Frankliniella occidentalis*’ in (baskın vektör) yoğun olduğu durumlarda latent enfeksiyonun varlığında hastalık oranının da yüksek olduğu görülmüştür.Latent enfeksiyonlu bitkilerin varlığına rağmen thrips oranı düşüğe hastalık oranıda düşük olduğu gözlenmiştir. (Matsuura et

al.,2002). Bu çalışmada bu bilgiler kıyaslandığında TSWV etmenine sadece 1 örnekte saptanması vektör oranının düşük olduğunu düşündürmektedir.

Enfekteli bulunan örnek ile yürütülen biyolojik test sonucunda test bitkilerinde gözlenen simptomlar önceki yıllarda gerçekleştirilen bulgular ile paralellik göstermektedir (Descriptions of Plant Viruses, 2014). TSWV ile mekanik olarak inokule edilmiş test bitkileri yapraklarında *Nicotiana glutinosay* yapraklarında hafif klorotik lekeler, *N. clevelandii* yapraklarında deformasyonlar (Şekil 4.9) saptanmıştır. Etmen Japonya’da 1990’ların sonlarından beri, krizantem yetiştiriciliği (*Dendranthema grandiflora*) yapılan alanlarda büyük bir sorun haline gelmiştir (Fuji and Nakamae, 1998). Polonya’da 1999-2002 yılları boyunca, incelenen seraların herbirinde krizantem bitkilerinde TSWV ile enfekteli krizantem bitkilerinde en yüksek seviyede % 91-93 oranında iki serada kaydedilmiştir. İran ve Hollanda’da da yetiştiricilik yapılan alanlarda büyük bir sorun haline gelmiştir. Bu çalışmada ise TSWV bulunma oranı %0.5 olarak kaydedilmiştir.

Çalışma kapsamında etmene spesifik primerler ile izole edilen TSWV izolatları, ülkemizde krizantemde yeni tespit edilen virüstür. Bu amaçla, izolatin nükleotid dizilerinin belirlenmesi, dünya izolatlarıyla karşılaştırılması ve filogenetik ağaç oluşturulması için çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmada izole edilen TSWV izolatu sekanslama için İontek firmasına gönderilmiştir. Elde edilen nükleotid dizilimleri NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information, 2015) kullanılarak dünya izolatlarıyla kıyaslanmıştır. Bunun sonucunda farklı çeşitlerden elde edilen izolatların birbiriyle olan benzerlikleri % 93-94 arasında değişmiştir. %94’lük benzeme oranıyla gen dizilimi birbirine en yakın olan izolat KF146700kodu ile kayıtlı Tomato spotted wilt virus isolate Chrysanthemum-16 nucleocapsid (N) gene, complete cds ve AB175809kodu ile kayıtlı Tomato spotted wilt virus N gene for nucleoprotein, complete cds izolatu ile aynı grupta yer alır.

*Cucumber mosaic virus*, Menderes ilçesinden alınan 95 örnekten 17 örnekte Yeşil, Kiremit, Kırmızı, Ritmo Pembe ve Dolce Beyaz çeşitlerinde etmene rastlanmıştır. Kırmızı ve Ritmo Pembe çeşitlerden alınan tüm bitki örneğinde

etmene rastlanmıştır. Bu da bu çeşitlerin CMV' ye karşı duyarlı olduklarını düşündürmektedir. *Chrysanthemum* cv. Regol Time çeşidinde yapraklarda karakteristik klorotik lekeler ve bitkide bodurlaşma görülmüştür (Verma et al., 2003). Bir diğer çalışmada *Chrysanthemum x morifolium* bitkisinde dağınık kloroz, damarlara yakın klorotik noktalar ve bodurluk gözlenmiştir (Srivastava et al., 1991). Başka bir çalışmada *Chrysanthemum morifolium*' un 10 çeşidinde görülen bodurlaşma, klorotik lekeler, mozaik ve aspermy' nin taze ağırlık, çiçek çapı ve kök uzunluğuna etkileri araştırılmıştır. Klorotik lekeler, mozaik ve aspermy test edilmiş çeşitlerin büyümesini önemli ölçüde azaltmıştır. Fakat bodurlaşma diğer hastalık belirtilerinden daha şiddetli bir şekilde büyümeyi durdurmuştur (Horst et al., 1976). Bu çalışmada araziden alınan örneklerde; renk değişimi, nekroz, gelişme geriliği, yapraklarda asimetri gibi belirtiler gösteren örneklerde etmene rastlanmıştır. Ayrıca yine bu çalışmada krizantemde CVB enfeksiyonu sonucu oluşan bodurlaşma ve yaprak deformasyonu (Şekil 4.3) literatürdekine benzer belirtiler olduğunu ortaya koymuştur. Kiremit ve Ritmo Pembe çeşitlerinde semptomsuz olduğu düşünülen bitki örneklerinde de etmene rastlanmıştır. Yine Dolce Beyaz çeşidinde farklı örneklerde fakat aynı çeşitte iki viral etmene rastlanmıştır. Bunlardan biri CMV diğerinin ise CVB olduğu gözlenmiştir.

CMV ile mekanik olarak inokule edilmiş *Nicotiana clevelandii* bitkilerinin yapraklarında mozaik ve bodurlaşma (Şekil 4.7) önceki yıllarda gerçekleştirilen bulgular ile paralellik göstermektedir (Descriptions of Plant Viruses, 2014).

Hindistan'da, doğal koşullar altında yetiştirilen krizantemin birçok çeşidi üzerinde hastalık belirtileri gözlenmiştir. (Srivastava et al., 1991). CMV birçok ülkede olduğu bizim ülkemizde de zarara neden olmaktadır. Bu çalışmada bu oranın % 9 olduğu saptanmıştır. RT-PCR yöntemi ile, virüs tanılmasında RT-PCR' in güvenilir bir yöntem olduğu da ortaya çıkmıştır (Verma et al., 2003).

CVB ve CMV etmenleri de RT-PCR yöntemi ile saptanmıştır. Fakat etmene özel spesifik primerler kullanılarak izole edilmesine rağmen sonuç alınamamıştır. Bunun nedeni olarak ya TNA çoğaltım aşamasında meydana gelen bir sıkıntıdan ya da primerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

*Tomato aspermy virus*, krizantemde zarar yapan en önemli virüslerden biridir (Bouwen and Zaayen, 1995). Hindistan'da yapılan bir çalışmada, *Chrysanthemum morifolium* çeşidinde sarı mozaik ve çiçek deformasyonlarının nedeni TAV olarak saptanmıştır (Raj et al., 2007). Çin'de yapılan bir çalışmaya göre de, krizantemin en önemli virüsü TAV'dır. Ortalama enfeksiyon oranı: % 85.9'dur (Ruilin et al., 1999). Avustralya'da ise TAV'ın ortalama enfeksiyon oranı ise %23'tür (Moran and Wilson, 1985). Yeni Zelanda'da 1956 yılında yapılan ilk çalışmalarda, Auckland, Christchurch ve Wanganui çeşitlerinden alınan 32 bitkiden 11'inde TAV saptanmıştır (Procter, 1975). Hindistan'ın çeşitli bölgelerinden benekler ve deforme çiçeklenme görülen krizantem bitkilerinden DAS-ELISA yöntemiyle bu etmen saptanmıştır. Testlenen 15 bitkinin 11'inde (%73.3) etmen saptanmıştır (Verma et al., 2004). Krizantemde şiddetli mozaik, klorotik halka lekeler ve çiçek deformasyonları 2006 Kasım ayından 2007 Şubat ayına kadar Hindistan'ın Lucknow (UP), Dhanbad (MP) ve Kolkata (WB) Bölgelerinde gözlenmiştir. Spesifik primerler kullanılarak RT-PCR ve ELISA testleriyle, TAV saptanmıştır. (Raj et al., 2008). Literatürde görüldüğü üzere TAV krizantemde önemli bir patojen fakat bu çalışmada testlenen 195 bitki örneğinde bu etmene rastlanmamıştır.

*Impatiens necrotic spot virus*, 2009'da Japonya'da yapılan bir çalışmada krizantem bitkisinde klorotik lekeler ve nekrozlar saptanmıştır. Virüs test bitkilerine inokule edilmiştir ve etmenin INSV olduğu saptanmıştır (Kundo et al., 2011). Aslında INSV süs bitkilerinde daha yaygın görülür ve birçok türde de zarar yaptığı bildirilmiştir (Murphy et al., 2014). Fakat bu çalışmada TAV 'da olduğu gibi INSV'ye de rastlanmamıştır.

Krizantem yetiştiriciliği yapılan alanlarda virüs hastalıkları ciddi bir sorundur. Virüsün tespiti ve tanınması virüsün yayılmasını önleme açısından önemlidir. Yüksek enfeksiyon özellikle virüslerin karışık enfeksiyonlarında hem tarlada hem de krizantemin kalitesinde önemli kayıplara neden olmaktadır. Böylece tanılama yapmak virüs yayılımını kontrol etme açısından önemlidir. Çünkü virüsün hangi virüs olduğunu bilmek bize onun taşınma yolları ve özellikleri hakkında bilgi verir. Virüsün taşınma yolu ve özellikleri bilinirse ancak mücadele ve korunma mümkün olacaktır.

2013-2014 yıllarında yürütülen bu çalışmanın tamamlanması ile İzmir ili krizantem üretim alanlarında enfeksiyon oluşturan viral etmenler ve bulunma oranları saptanmıştır. Türkiye’de krizantem virüsleri hakkında yürütülen ilk kapsamlı çalışma olan bu araştırma ile krizantemde enfeksiyon oluşturan viral etmenlerin ülkemizdeki durumları hakkında önemli bir açığın kapatılmasında ilk adım atılmış ve literatüre katkı sağlamıştır. Bu araştırma sonuçlarının gelecekte yapılacak olan araştırmalara yol göstereceği düşünülmektedir.

Araştırmadan elde edilen sonuçların değerlendirilmesiyle aşağıdaki önerilerin yapılması uygun görülmüştür:

- Viral enfeksiyonların neden olduğu verim kayıpları hakkında net veriler bulunmamakta, bu konuda araştırmacılar teşvik edilmelidir.
- Hastalıktan arı üretim materyali kullanımı enfeksiyondan korunmanın en etkili faktör olduğu göz önünde bulundurularak temiz üretim materyali kullanımı teşvik edilmelidir.
- Saptanan viral etmenlerin yayılmasında ve taşınmasında etkili olan vektör böcekler ve yabancı otların yok edilmesi enfeksiyonların önlenmesinde önemli bir diğer faktördür.
- Yapılan bu çalışma da RT-PCR’ın güvenilir bir yöntem olduğu bir kez daha ortaya çıkmıştır.
- Virüs hastalıkları, mücadele ve önlem olanakları hakkında üreticilere eğitim çalışmalarının yapılması önemlidir.

**KAYNAKLAR DİZİNİ**

- Alexandre, MAV., Rivas, EB., Duarte, LML., and Okuyama, MH.,** 1996. Serological survey of tospovirus on chrysanthemum sp. crops in Sao Paulo State, Brazi. *Fitopatologia Brassleira* 21, 80- 4.
- Anonim.,**2004a, <http://www.bahceder.org.tr>.
- Anonim.,**2009a.Antalya İhracatçı Birliği Kesme Çiçek Sektör Raporu (<http://www.aib.org.tr/raporlar/kc/kcsektorsubat2009.pdf>) (erişim: 01.02.2012).
- Anonim.,**2010b.T. C. Ekonomi Bakanlığı (erişim: 02.02.2012).
- Balukiewicz, A., and Kryczyski, S.,** 2005, Tospoviruses in chrysanthemum mother stock plants in Poland, *Phytopathol Pol.* 37: 59-67.
- Bouwen, I., and van Zaayen, A. Z.,** 1995. Chrysanthemum, p. 396-408. In: G. Loebenstein, R.H. Lawson and A. A. Brunt (eds.). *Virus and virus-like diseases of bulb and flower crops.* John Wiley & Sons, N.Y.
- Brierley, P.,** 1955. Symptoms induced in chrysanthemums on inoculation with the viruses of mosaics, aspermy and flower distortion. *Phytopathol.* 45:2-7.
- Brierley, P. and Smith, F.F.,** 1958. Some characteristics of eight mosaic and two rosette viruses of chrysanthemum. *P1. Dis. Repr.* 42:752-763.
- Brittlebank, C.C.,** 1919, Tomato diseases, *Journal of Department of Agriculture of Victoria Australia*, 17:231-235.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Chatzivassiliou E.K., Weekes R., Morris J., Wood K.R., Barker I., and Katis N.,** 2000. Tomato spotted wilt virus (TSWV) in Greece: its incidence following the expansion of *Frankliniella occidentalis* and characterisation of isolates collected from various hosts. *Annals of Applied Biology*, 137, 127-134.
- Chung, B. N. Choi, G. S. and Choi, Y.M.,**1999. Identification of Tomato aspermy virus (TAV) and Chrysanthemum virus B (CVB) from *Dendrenathema grandiflorum* in Korea. *Plant Pathol. J.* 15:119-123.
- Choi, S.K., Choi, J.K., Park, W.M., Ryu, H.K.,** 1999. RT-PCR detection and identification of three species of cucumoviruses with a genus-specific single pair of primer. *J. Virol. Methods*, 83. pp:67-73.
- Dal Bo E., Ronco, L., Alippi, A.M., and Fernandez, R.,** 1995. Tomato spotted wilt virus on chrysanthemum in Argentina. *Plant Disease*, 79, 538.
- Daughtrey M.L.,** 1996. Detection and Identification of Tospoviruses in Greenhouses. *Açta Horticulturae* 431, 90-98.
- Daughtrey, M.L., Jones, R.K. Moyer, J.W., Daub, M.E. and Baker, J.R.,** 1997. *Plant Dis.* 81:1220-1230.
- David, O., Chris, J.R.T. and Robert, H.A.C.,**1991. Tomato aspermy virüs has an evolutionary relationship with other tripartite RNA plant viruses. *J. Gen. Virol.* 72:1-7.
- De Avila, A.C., De Haan, P., Karmelink, R., Resende, R., de, O., Goldback, R.W., and Peters, D.,** 1993. Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *J. Gen. Virol.* 74, 153-159.

## KAYNAKLAR DİZİNİ(Devam)

**Descriptions of Plant Viruses, 'DPV Name Index',**  
 (<http://www.dpvweb.net/dpv/dpvnameidx.php>) (Erişim tarihi: 8  
 Temmuz 2013).

**EPPO, 1999a.** Tomato spotted wilt tospovirus. EPPO Bulletin 29, 465-472.

**EPPO, 1999b.** Impatiens necrotic spot tospovirus. EPPO Bulletin 29,473-476.

**Finetti Sialer M.M. and Gallitelli D., 2000.** The occurrence of Impatiens necrotic spot virus and Tomato spotted wilt virus in mixed infection in tomato. Journal of Plant Pathology 82 (3) 243-244.

**Foissac, X., Svanella-Dumas, L., Dulucq, M.J., Candresse, T., and Gentit, P., 200.** Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). Acta Horti 550, 37-43.

**Fuji, S., Ohishi, K., Nakamae, H., 1990.** Detection of tomato spotted wilt virus in chrysanthemum by immunocapture RT-PCR assay. Proc Kansai Plant Prot 40:111-112.

**Govier D.A., 1957.** The properties of Tomato aspermy virus and its relationship with Cucumber mosaic virus. Ann. Appl. Biol. 45(1):62-73.

**Gümüş, M., 1998.** İzmir ilinde biberlerdeki viral hastalık etmenlerinin ve oranlarının saptanması ve bazı biber çeşitlerinin bu virüslere reaksiyonların belirlenmesi üzerine araştırmalar, Doktora tezi, Ege Üniversitesi, Ziraat Fak., Bornova, İzmir.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ(Devam)**

- Hill, M.F., Giles, R.J., Moran, J.R., and Hepworth, G.,** 1996. The incidence of Chrysanthemum Stunt Viroid, Chrysanthemum B Carlavirus, Tomato Aspermy Cucumovirus and Tomato Spotted Wilt Tospovirus in Australian chrysanthemum crops, Australasian Plant Pathology 25 (3): 174-178.
- Hollings, M. and Kassanis, B.,** 1957. The cure of chrysanthemums from some viruses by heat. J. Roy. Hort. Soc. 82:339-42.
- Habili, N., and Francki, R.I.B.,** 1974a. Comparative studies on Tomato aspermy virus Cucumber mosaic virus I. Physical and chemical properties. Virology 57:392-401.
- Habili, N., and Francki, R.I.B.,** 1974b. Comparative studies on Tomato aspermy virus Cucumber mosaic virüs. III. Further studies on relationship and construction of a virus from parts of the two viral genomes. Virology 61:443-449.
- Hakkaart, F.A., and Maat, F.Z.,** 1974. Variation of Chrysanthemum virus B. Neth. J. Pl. Pathol. 80:97-103.
- Harrison, B.D., Finch, J.T., Gibbs, A.J., Hollings, M., Shepherd, R.J., Valenta, V., and Wetter, C.,** 1971. Sixteen groups of plant viruses. Virology 45: 356-363.
- Hollings, M.,** 1955. Investigation of chrysanthemum viruses. 1. Aspermy flower distortion. Ann. Appl. Biol. 43:86-102.
- Hollings, M., and Stone, O.M.,** 1971. Tomato aspermy virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No:79.
- Hollings, M. and Stone, O.M.,**1972. Chrysanthemum virus B. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 110.

## KAYNAKLAR DİZİNİ(Devam)

- Hollings, M.,** 2008. Investigation of Chrysanthemum Viruses 1. Aspermy flower distortion, *Annals of Applied Biology*, DOI:10-111.
- Horst, R.K., Langhans, R.W., and Smith, S.H.,** 1976, Effects of Chrysanthemum stunt, chlorotic mottle, aspermy and mosaic on flowering and rooting of chrysanthemums, *Phytopathology* 67:9-14.
- Kaper, J.M. and Waterworth, H.E.,** 1981. *Cucumoviruses*, p.257-332. In: E. Kurstak (ed.). Handbook of plant virus infectious and comparative diagnosis. Elsevier/North- Holland Biochemical Press.
- Kumar, S., Khan, M.S., Raj, S.K., and Sharma, A.K.,** 2009. Elimination of mixed infection of Cucumber Mosaic and Tomato Aspermy Virus from *chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Pooja by shoot meristem culture, *Scientia Horticulturae* 119:108-112.
- Kundo, T., Yamashita, K., and Sugiyama, S.,** 2011. First report of Impatiens Necrotic Spot Virus infecting chrysanthemum (*chrysanthemum morifolium*) in Japan, *J. Gen. Plant Pathol* 77:263-265.
- Lin, M.J., Chang, C.A., Chen, C.C., and Cheng, Y.H.,** 2005. Occurrence of Chrysanthemum Virus B in Taiwan and preparation of its antibody against coat protein expressed in bacteria, *Plant Pathology Bulletin* 14:191-202.
- Lisa V., Vaira M.A. Milne R.G., Luisoni and Rapetti S.,** 1990. Tomato spotted wilt virus in cinque specie coltivate in Liguria. *Informatore Fitopatologico*. 12. 34-41.
- Mantel., N.A., and van de Vrie, M.,** 1988. De Californische trips, *Frankliniella occidentalis*, een nieuwe schadelijke tripsoort in de tuinbouw onder glas in Nederland. *Entomologische Berichten* 48, 140-4.

## KAYNAKLAR DİZİNİ(Devam)

- Matthews, R.E.F.**, 1991. Plant Virology, 3rd ed., Acad. Pres, New York, 897 pp.
- Matsuura, S., Hoshino, S., Hayashi, H., Kohguchi, T., Hagiwara, K., and Omura, T.**, 2002. Effects of latent infection of stock plants and abundance of thrips on the occurrence of Tomato Spotted Wilt Virus in chrysanthemum fields, J. Gen. Plant Pathol. 68:99-102.
- Matsuura, S., Hoshino, S., and Koga, H.**, 2006. Verbena as a trap crop to suppress thrips-transmitted Tomato Spotted Wilt Virus in chrysanthemums, J. Gen. Plant Pathol 72:180-185.
- Matteoni, J. A., A.B. Broadbent, and W.A. Allen.**,1988. Status of tomato spotted wilt virus/western flower thrips complex in Ontario. Tomato Spotted Wilt Virus Newsletter 1: 1-5.
- Matteoni, J.A., and Allen, W.R.**, 1989. Symptomatology of Tomato Spotted Wilt Virus infection in florist's chrysanthemum, Can. J. Plant Pathol, 11:373-380.
- Mavric, I., and Ravnikar, M.**, 2001. *Iris yellow spot tospovirus* in Slovenia. In: (eds Catara, A., Albanese, G., Catora, V., La Rosa, R., Polizzi, G., and Tessitori, M.,) Proceedings of the 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology: Biodiversity in Plant Pathology, Taormina-Giardini Naxos, Italy, 18-22 Sept. 2000, Societa Italiana di Patologia Vegetale, pp: 223-225.
- Mertelik, J., Mokra, V., Gotzova, B., and Gabrielova, S.**, 2002. Occurrence and identification of *Impatiens necrotic spot virus* in the Czech Republic. Acta Horticulturae 568:79-83.
- Moran, J.R. and Wilson, J.M.**, 1985. Rates of reinfection with virus in commercial carnation, chrysanthemum and gladiolus crops. ActaHort. 164:325-332.

### KAYNAKLAR DİZİNİ(Devam)

- Mumford R.A., Barker I., and Wood K.R.,** 1996. An improved method for the detection of Tospoviruses using the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*. 57, 109-115.
- Murphy, G., Ferguson, G., and Shipp, L.,** 2014. Thrips in greenhouse crops- biology, damage and management. Factsheet 14-001. AGDEX 290/621. January, 2014.
- Nogay, A.,** 1983. Marmara bölgesi cucurbitaceae familyası kültür bitkilerinde görülen virüs hastalıklarının tanılanması, tohumla geçiş durumlarının ve konukçu dizilerinin saptanması üzerinde araştırmalar. (Doktora tezi). Erenköy-İstanbul, 120s.
- Noordom,D.,** 1943. Over het voorkomen van ‘spotted wilt’ in Nederland. *Tijdschrift Over Plantenziekten* 49, 117-9.
- Noordam, D.,** 1952. Virusziekten bij chrysanten in Nederland. *Tijdschr. P1. Ziekt.* 58:121-190.
- Nour, S.M., Maleki, M., and Ghotbi, T.,** 2013. Biological and serological detection of TSWV on three commercial cultivars *Chrysanthemum morifolium* in Markazi province of Iran, *Annals of Biological Research*, 4(4): 112-119.
- Ochoa, M.D.L., Zavaleta-Mejia, E., Johansen, N.R.M., Herrera, G.A., and Cardenas Soriano, E.,** 1996. Tospoviruses, weeds and thrips associated with chrysanthemum (*Dendranthemum grandiflora* cv. Polaris). *International Journal of Pest Management* 42, 157-9.

## KAYNAKLAR DİZİNİ(Devam)

- Ogawa, T., Toguri, T., Kudoh, H., Okamura, M., Momma, ., Yoshioka, M., Kato, K., Hagiwara, Y., and Sano, T.,** 2005. Double-stranded RNA-specific ribonuclease confers tolerance against Chrysanthemum Stunt Viroid and Tomato Spotted Wilt Virus in transgenic chrysanthemum plants, *Breeding Science* 55:49-55.
- Ohkawa, A., Yamada, M., Sayama, H., Sugiaoma, N., Okuda, and S., Natsuaki, T.,**2007. Complete nucleotide sequence of a Japanese isolate of Chrysanthemum Virus B (genus carlavirus), *Arch Virol* 152:2253-2258.
- Özkan, B., ve Karagüzel, O.,** 1997.Antalya'da Kesme Çiçek Üretiminin Mevcut Durumu. *Derim Dergisi*, 14 (2): 50-61 ss. Antalya.
- Parrella, G., Gognalons, P., Gebre-Selassie, K., Volvas, C. and Marchoux, G.,** 2003. An Update of The Host Range of Tomato Spotted Wilt Virus, *Journal of Plan Pathology*, Italy, 85:227-264.
- Procter, C.H.,** 1975. Studies on Tomato Aspermy Virus from *Chrysanthemum indicum* L. in New Zealand, Plant Disease Division, DSIR, P.B., Auckland, New Zealand.
- Raj, S.K., Kumar, S., and Choudhari, S.,** 2007. Identification of Tomato Aspermy Virus as the cause of yellow mosaic and flower deformation of chrysanthemums in India, *Australasian Plant Pathology Society* 2:1-2.
- Raj, S.K., Kumar, S., Choudhari, S., and Verma, D.K.,** 2008. Biological and molecular characterization of three isolates of Tomato Aspermy Virus infecting chrysanthemums in India, *J. Phytopathology* 157: 117-125.

### KAYNAKLAR DİZİNİ(Devam)

- Ram, R., Verma, N., Singh, A.K., Singh, L., Hallan, V., and Zaidi, A.A.,** 2005. Indexing and production of virus-free chrysanthemums, *Biologia Plantarum* 49(1):149-152.
- Ram, R., Verma, N., Singh, A.K., and Zaidi, A.A.,** 2009. Virus-free chrysanthemums:production and quality management, *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 42(10):940-949.
- Rao, A.L.N., Hatta, T. and Francki, R.I.B.,** 1982. Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses. *Virology* 116:318-326.
- Roggero P., Cuiffo M., and Dellavella.,** 1999. Additional ornamental species as hosts of *Impatiens necrotic spot tospovirus* in Italy. *Plant Disease* 83, 967.
- Ruilin, S., Xiaoxia, W., and Rujian, W.,** 1999. Elimination of Tomato Aspermy Virus (TAV) in chrysanthemum, *Fujian Journal of Agricultural Science* 01.
- Shahraeen, N., Sh. Farzadfar, D.-E. Lesemann,** 2002. Report on incidence of canola (*Brassica napus*) viruses in Iran. VIIIth International Plant Virus Epidemiology Symposium, pp.119. Aschersleben, Germany, May 12-17 2002.
- Srivastava, K.M., Raj, S.K., and Singh, B.P.,** 1991. Properties of a Cucumber Mosaic Virus strain naturally infecting chrysanthemum in india, *Plant Disease/Vol.76 No.5*.
- Srivastava, K.M., Raj, S.K. and Singh, B.P.,** 1992. Properties of a Cucumber mosaic virus strain spontaneously infecting chrysanthemum in India. *Plant Dis.* 76:474-477.

## KAYNAKLAR DİZİNİ(Devam)

**Song, A., You, Y., Chen, F., Li, P., Jiang, J., and Chen, S., 2012.** A multiplex RT-PCR for rapid and simultaneous detection of viruses and viroids in chrysanthemum, Letters in Applied Microbiology ISSN 0266-8254.

**Suastika, G. Kurihara, J. Natsuaki, K.T. and Tomaru, K., 1996.** A strain of chrysanthemum B carlavirus causing flower colour breaking on *Gymnaster savatieri* (Makino) Kitamura. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 63:1-7.

**Türkiye İstatistik Kurumu, 2012.** ‘Bitkisel Üretim İstatistikleri’ (<http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>) (Erişim tarihi: Nisan 2013).

**Wetter, C. and Milne, R.G., 1981.** Carlavirus, p. 695-730. In: E. Kurstak (ed.). Handbook of plant virus infectious and comparative diagnosis. Elsevier/North-Holland Biochemical Press.

**Wikipedi, 2015.** Kasımpatı (Erişim: 27.03.2015). (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Kas%C4%B1mpat%C4%B1>)

**van de Wetering, F., Posthuma, K., Goldbach, R., and Peters, D., 1999.** Assessing the susceptibility of chrysanthemum cultivars to tomato spotted wilt virus, Plant Pathology 48:693-699.

**Verhoeven, J., and Roenhorst, J.M., 1998.** Occurrence of tospoviruses in the Netherlands. In: Peters D, Goldbach R, eds. Recent Progress in Tospoviruses and Thrips Research. Department of Virology, WAU, Wageningen, The Netherlands: 77-80.

**Verma, N., Sharma, A., Ram, R., Hallan, V., Zaidi, A.A., and Garg, I.D., 2003.** Detection, identification and incidence of Chrysanthemum B carlavirus in chrysanthemum in India, Crop Protection 22:425-429.

**KAYNAKLAR DİZİNİ(Devam)**

- Verma, N., Ram, R., Hallan, V., Kumar, K., and Zaidi, A.A.,** 2004. Production of cucumber mosaic virus-free chrysanthemum by meristem tip culture, Crop Protection 23:469-473.
- Yeh S.D., Lin Y.C., Cheng Y.H., Jih C.L., Chen M.J. and Chen C.C.,** 1992. Identification of tomato spotted wilt-like virus on watermelon in Taiwan. Plant Disease 76:835-840.

**ÖZGEÇMİŞ**

07.10.1989 tarihinde Salihli’de doğdu. İlköğrenimini Sart Mustafa İlköğretim Okulu’nda, liseyi Salihli Türkbirliği Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi’nde tamamladı. 2007 yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ziraat Mühendisliği bölümüne girdi. 2010-2011 yıllarında Erasmus Programı ile Università Degli Studi di Modena e Reggio Emilia İtalya’da eğitim aldı. 2013 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilimdalı, Fitopatoloji Bilimdalında yüksek lisans eğitimine başladı.