

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Güler TANLI**

**MARUL İRİ DAMAR HASTALIĞI (*Lettuce Big Vein Disease*,  
LBVD)’NİN TAŞINMASI ve VEKTÖRÜ OLAN *Olpidium*  
TÜRLERİNİN MOLEKÜLER OLARAK SAPTANMASI**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**ADANA-2021**

## ÖZ

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### MARUL İRİ DAMAR HASTALIĞI (*Lettuce Big Vein Disease, LBVD*)'NİN TAŞINMASI ve VEKTÖRÜ OLAN *Olpidium* TÜRLERİNİN MOLEKÜLER OLARAK SAPTANMASI

Güler TANLI

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

Danışman : Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU  
Yıl: 2021, Sayfa: 71  
Jüri : Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU  
: Doç. Dr. D. Soner AKGÜL  
: Prof. Dr. Gülşen SERTKAYA

Bu çalışma 2017-2021 yılları sonbahar ve kış dönemlerinde Adana ve Mersin İlleri'nde yaygın olarak marul yetiştiriciliği yapılan alanlarda Marul iri damar hastalığı (*Lettuce big-vein disease, LBVD*)'nın saptanması ve bu hastalığa neden olan etmenler (*Lettuce Big-Vein Associated Virus, LBVaV* ve *Mirafiori Lettuce Big-Vein Virus, MiLBVV*)'in belirlenmesi ve bu etmenlerin taşınmasında rol alan vektörler (*O. brassicae*, *O. bornovanus* ve *O. virulentus*)'in moleküler olarak saptanması amacıyla yürütülmüştür. Arazi çıkışlarında simptomatolojik olarak LBVD (MiLBVV, LBVaV) ile infekteli olduğundan şüphelenilen ya da hiç bir belirti göstermeyen toplam 85 adet marul bitkisinden örnekleme yapılmış ve ELISA testleri sonucunda, MiLBVV, 18 bitkide saptanmıştır. RT-PCR çalışmalarında MiLBVV için MiLBVV(1) ve MiLBVV(2) primer çifti ile Seyhan, Tarsus ve Yumurtalık izolatlarından 233 bp; LBVaV'ye özgü VP-248 ve VP-249 primer çifti ile Seyhan, Tarsus, Yumurtalık ve Yüreğir izolatlarından 296 bp; *O. brassicae*'ya özgü OLPbraF ve OLPR primer çifti ile Tarsus izolatlarından 204 bp; *O. bornovanus*'a özgü OLPborF ve OLPR primer çifti ile Seyhan ve Tarsus izolatlarından 977 bp; *O. virulentus*'a özgü OLPvirF ve OLPR primer çifti ile Seyhan, Tarsus, Yumurtalık ve Yüreğir'den toplanan marul izolatlarına ait 579 bp büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir. PCR çalışmaları sonucunda, *O. brassicae* 5 bitkide, *O. bornovanus* 10 bitkide ve *O. virulentus* 79 bitkide saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Marul, LBVD, *Olpidium*, DAS-ELISA, RT-PCR,

## ABSTRACT

### MASTER'S THESIS

#### CARRY AND VECTOR OF *Lettuce Big Vein Disease*, LBVD AND MOLECULAR DETECTION OF *Olpidium* Species

Güler TANLI

CUKUROVA UNIVERSITY  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
PLANT PROTECTION DEPARTMENT

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU

Year: 2021, Page: 71

Jury : Assoc. Prof. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU

: Assoc. Prof. Dr. D. Soner AKGÜL

: Prof. Dr. Gülşen SERTKAYA

This study was carried out to determine the Lettuce big-vein disease (LBVD) in the areas where lettuce is grown in Adana and Mersin provinces in the autumn and winter periods of 2017-2021, the factors causing this disease (Lettuce Big-Vein Associated Virus, LBVaV, and Mirafiori Lettuce Big-Vein Virus, MiLBVV) and molecular determination of vectors (*O. brassicae*, *O. bornovanus* and *O. virulentus*) involved in the transmission of these factors. A total of 85 lettuce plants were sampled from a total of 85 lettuce plants that were suspected to be infected with LBVD (MiLBVV, LBVaV) or showed no symptoms at the exits of the field, and as a result of ELISA tests, MiLBVV was detected in 18 plants.

In RT-PCR studies, MiLBVV(1) and MiLBVV(2) primer pair for MiLBVV and 233 bp from Seyhan, Tarsus and Yumurtalık isolates; LBVaV specific primer pair VP-248 and VP-249 and 296 bp from Seyhan, Tarsus, Yumurtalık and Yüreğir isolates; *O. brassicae* specific OLPbraF and OLPR primer pair and 204 bp from Tarsus isolates; *O. bornovanus* specific OLPborF and OLPR primer pair and 977 bp from Seyhan and Tarsus isolates; with the OLPvirF and OLPR primer pair specific for *O. virulentus*, bands with a size of 579 bp were obtained from lettuce isolates collected from Seyhan, Tarsus, Yumurtalık and Yüreğir. As a result of RT-PCR studies, *O. brassicae* was detected in 5 plants, *O. bornovanus* in 10 plants and *O. virulentus* in 79 plants.

**Keywords:** Lettuce, LBVD, *Olpidium*, DAS-ELISA, RT-PCR,

## GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Sebzeler bol miktarda mineral ve vitamin barındırdıklarından dolayı insan beslenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Dünyada en fazla sebze üreten ülkelerden biri de Türkiye’dir. Çukurova Bölgesi iklimi, ekolojik koşulları ve tarıma elverişli arazilerin varlığından dolayı sebze üretiminde önemli bir yere sahiptir ve marul yaygın olarak üretimi yapılan, salata malzemesi olarak tüketimi gerçekleştirilen ve ekonomik olarak yüksek değeri olan bir sebze çeşididir. Türkiye de dahil olmak üzere birçok ülkede önemli sebzeler arasında ilk sıralarda yer alan Marul (*Lactuca Sativa*, Asteraceae) bitkisi birçok bakteriyel, fungal ve viral hastalık etmenleri tarafından olumsuz yönde etkilenmektedir (Koike ve ark., 2007).

Bu , Adana ve Mersin illerinde yaygın olarak marul yetiştiriciliği yapılan alanlarda Marul iri damar hastalığı (*Lettuce big-vein disease*, LBVD) ’nın saptanması ve bu hastalığa neden olan etmenler (*Lettuce Big-Vein Associated Virus*, LBVaV ve *Mirafiori Lettuce Big-Vein Virus*, MiLBVV)’in belirlenmesi ve bu etmenlerin taşınmasında rol alan vektörler (*Olpidium brassicae*, *Olpidium bornovanus* ve *Olpidium virulentus*)’in saptanması amacıyla yürütülmüştür. Arazi çıkışlarında simptomatolojik olarak LBVD (MiLBVV, LBVaV) ile enfekteli olduğundan şüphelenilen ya da hiçbir belirti göstermeyen toplam 85 adet marul bitkisinden örnekleme yapılmış ve ELISA testleri sonucunda, MiLBVV, 18 bitkide saptanmıştır. Virüsler için yapılan RT-PCR çalışmalarında MiLBVV için MiLBVV(1) ve MiLBVV(2) primer çifti ile Seyhan, Tarsus ve Yumurtalık izolatlarından 233 bp; LBVaV’ye özgü VP-248 ve VP-249 primer çifti ile Seyhan, Tarsus, Yumurtalık ve Yüreğir izolatlarından 296 bp büyüklüğünde bandlar elde edilmiştir. Funguslar için yapılan PCR çalışmalarında *O. brassicae*’ya özgü OLPbraF ve OLPR primer çifti ile Tarsus izolatlarından 204 bp; *O. bornovanus*’a özgü OLPborF ve OLPR primer çifti ile Seyhan ve Tarsus izolatlarından 977 bp; *O. virulentus*’a özgü OLPvirF ve OLPR primer çifti ile Seyhan, Tarsus, Yumurtalık ve Yüreğir’den toplanan marul izolatlarına ait 579 bp büyüklüğünde bandlar elde

edilmiştir. PCR çalışmaları sonucunda, *O. brassicae* 5 , *O. bornovanus* 10 ve *O. virulentus* 79 bitkide saptanmıştır.

Marul yetiştiriciliğinde önemli bir yere sahip olan Adana ve Mersin İlleri'nde yürütülen bu çalışma sonucunda viral hastalık etmenlerinin önemli ölçüde verim kaybına neden olduğu ve bu doğrultuda çok ciddi ekonomik zararlara yol açtığı tespit edilmiştir. Bu hastalıklara neden olan virüslerin özellikle kimyasal mücadelesinin olmaması ve vektör etmenler ile uzun yıllar süresince yetiştirme alanlarında barınabilmelerinden dolayı ayrı bir önem arz etmektedir. Bu nedenle virüs hastalıklarına karşı virüsten ari tohum ve üretim materyalinin kullanılması, toprak solarizasyonunun yapılması, koruyucu kültürel uygulamalar, dayanıklı veya tolerant çeşitlerin tercih edilmesi çok önemlidir. Bölgede bulunan üreticilerin bilinçlenmesi açısından virüs hastalıkları mücadelesi konusunda eğitimler düzenlenmelidir.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında değerli zamanını ayırıp bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Saygıdeğer Doç. Dr. Muharrem Arap KAMBEROĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Viroloji Laboratuvarı'nda yapmış olduğum tez dahilindeki çalışmalarında engin bilgilerinden faydalandığım Doç. Dr. D. Soner AKGÜL'e ve yardımlarından dolayı, Zir. Yük. Müh. Fatime DAŞ, Zir. Yük. Müh. Selda ÖZÇINAR'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamda her zaman yanımda olup bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen Zir. Yük. Müh. Havva Nur SAĞLAM'a teşekkür ederim.

Ayrıca, çalışmalarım sırasında her türlü yardımı ve manevi desteklerini benden esirgemeyen sayın Zir. Müh. Cavit ÖZANANAR'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman maddi ve manevi olarak yanımda olup bana destek olan aileme teşekkür ederim.

Projemin yürütülmesinde çalışmalarına olanak sağlayan Ç.Ü. Bitki Koruma bölümüne teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

## SAYFA

|                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ÖZ .....                                                                                       | I   |
| ABSTRACT.....                                                                                  | II  |
| GENİŞLETİLMİŞ ÖZET .....                                                                       | III |
| TEŞEKKÜR.....                                                                                  | V   |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                              | VI  |
| ÇİZELGELER DİZİNİ                                                                              |     |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                          | XII |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                                                                   | XIV |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                 | 1   |
| 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....                                                                     | 13  |
| 3. MATERYAL VE METOT .....                                                                     | 19  |
| 3.1. Materyal.....                                                                             | 19  |
| 3.1.1. Çalışma Alanı ve Materyali Hakkında Bilgiler .....                                      | 19  |
| 3.1.2. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Materyal .....                                        | 21  |
| 3.1.3. Total Na Ekstraksiyonu Çalışmalarında Kullanılan Materyal.....                          | 23  |
| 3.1.4. DNA Ekstraksiyonu Çalışmalarında Kullanılan Materyal .....                              | 23  |
| 3.1.5. RT-PCR Çalışmalarında Kullanılan Materyal.....                                          | 23  |
| 3.1.6. PCR Çalışmalarında Kullanılan Materyal .....                                            | 24  |
| 3.1.7. Virüslerin Mekanik İnokülasyon ile Taşınma Çalışmalarında<br>Kullanılan Materyal.....   | 25  |
| 3.1.8. Virüslerin <i>Olpidium spp.</i> ile Taşınma Çalışmalarında Kullanılan<br>Materyal ..... | 25  |
| 3.1.9. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal.....                         | 25  |
| 3.2. Metot .....                                                                               | 26  |
| 3.2.1. Bitki Örneklerinin Toplanması ve Muhafazası.....                                        | 26  |
| 3.2.2. Test Bitkilerinin Yetiştirilmesi .....                                                  | 26  |
| 3.2.3. Virüslerin Taşınma Çalışmaları .....                                                    | 27  |

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.4. Serolojik Çalışmalar .....                                                   | 28 |
| 3.2.4.1. Örneklerin DAS-ELISA testine hazırlanması .....                            | 28 |
| 3.2.4.2. DAS-ELISA Testi .....                                                      | 28 |
| 3.2.5. Moleküler Çalışmalar .....                                                   | 30 |
| 3.2.5.1. Total Nükleik Asit (tNA) Ekstraksiyonu .....                               | 30 |
| 3.2.5.1.1. Total Nükleik Asit (tNA) Ekstraksiyonu Aşamaları ..                      | 30 |
| 3.2.5.2. DNA Ekstraksiyonu .....                                                    | 31 |
| 3.2.5.2.1. DNA Ekstraksiyonu Aşamaları .....                                        | 31 |
| 3.2.5.3. RT-PCR Çalışmaları .....                                                   | 32 |
| 3.2.5.4. PCR Çalışmaları .....                                                      | 33 |
| 3.2.5.5. Agaroze Jel Elektrophorez Çalışmaları .....                                | 34 |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....                                                       | 37 |
| 4.1. Survey Çalışmaları ve Gözlenen Simptomlar .....                                | 37 |
| 4.2. Serolojik Çalışmaları .....                                                    | 40 |
| 4.2.1. DAS- ELISA Testi Çalışmaları .....                                           | 40 |
| 4.3. Moleküler Çalışmaları .....                                                    | 42 |
| 4.3.1. Total Nükleik Asit (tNA) Ekstraksiyon Çalışmaları .....                      | 42 |
| 4.3.2. RT-PCR Çalışmaları .....                                                     | 42 |
| 4.3.3. DNA Ekstraksiyon Çalışmaları .....                                           | 45 |
| 4.3.4. PCR Çalışmaları .....                                                        | 45 |
| 4.3.5. Işık Mikroskopu ile <i>Olpidium spp.</i> 'nin Belirlenmesi Çalışmaları ..... | 50 |
| 4.3.6. Taşınma Çalışmaları .....                                                    | 52 |
| 4.3.6.1. Virüslerin Mekanik İnokülasyon ile Taşınma Çalışmaları .....               | 52 |
| 4.3.6.2. Virüslerin <i>Olpidium spp.</i> ile Taşınma Çalışmaları .....              | 52 |
| 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....                                                       | 53 |
| KAYNAKLAR .....                                                                     | 55 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                      | 65 |
| EKLER .....                                                                         | 67 |
| Ek 1. ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler .....                             | 69 |

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| Ek 2. Total RNA Analizlerinde Kullanılan Solüsyonlar .....         | 70 |
| Ek 3. AgaroZ Jel Elektroferezde Kullanılan Tampon Çözeltiler ..... | 71 |





## ÇİZELGELER DİZİNİ

## SAYFA

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 1.1. Marulun Taksonomisi .....                                                                                                                                  | 3  |
| Çizelge 1.2. Ülkelere Göre Dünya Marul Üretim Alanları ve Miktarları (Ton) .....                                                                                        | 4  |
| Çizelge 1.3. Türkiye Sebze Üretim Alanları (ha), Marul Üretim Miktarları (Ton)<br>ve Kişi Başı Marul Tüketim Miktarı (kg) .....                                         | 5  |
| Çizelge 1.4. Marul Bitkisinde Hastalık Yapan Viral Etmenler .....                                                                                                       | 6  |
| Çizelge 1.5. <i>Olpidium spp.</i> Tarafından Taşınan Virüsler .....                                                                                                     | 9  |
| Çizelge 1.6. Fungusun Taksonomisi .....                                                                                                                                 | 11 |
| Çizelge 3.1. Örneklerin Alındığı Yer ve Testlenen Bitki Sayısı .....                                                                                                    | 21 |
| Çizelge 3.2. RT-PCR Çalışmalarında Kullanılan Primer Çifti ve Band<br>Büyüklüğü .....                                                                                   | 24 |
| Çizelge 3.3. PCR Çalışmalarında Kullanılan Primer Çifti ve Band Büyüklüğü .....                                                                                         | 25 |
| Çizelge 3.4. MiLBVV ve LBVaV İçin Uygun Sıcaklıklar .....                                                                                                               | 33 |
| Çizelge 3.5. <i>Olpidium virulentus</i> , <i>Olpidium bornovanus</i> ve <i>Olpidium brassicae</i><br>İçin Uygun Sıcaklıklar .....                                       | 34 |
| Çizelge 4.1. DAS- ELISA Testi Sonucu MiLBVV ile İnfekteli Olduğu Saptanan<br>Bitkiler .....                                                                             | 41 |
| Çizelge 4.2. RT-PCR Testi Sonucu MiLBVV ve LBVaV ile İnfekteli Olduğu<br>Saptanan Marul Bitkileri .....                                                                 | 43 |
| Çizelge 4.3. PCR Testi Sonucu <i>Olpidium bornovanus</i> , <i>Olpidium brassicae</i> ve<br><i>Olpidium virulentus</i> ile İnfekteli Olduğu Saptanan Marul Bitkileri ... | 47 |
| Çizelge 4.4. DAS-ELISA, RT-PCR ve PCR Testleri Sonucunda Marul<br>Örneklerinin Alındığı Bölgeler ve Saptanan Etmenler .....                                             | 50 |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

## SAYFA

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 3.1. Çalışmanın Yürütüldüğü Adana İli ve İlçeleri.....                                                                           | 19 |
| Şekil 3.2. Çalışmanın Yürütüldüğü Mersin İli ve İlçesi.....                                                                            | 20 |
| Şekil 3.3. Arazi Çalışmalarında Şüpheli Olduğu Düşünülen ve Alınan Örnekler ..                                                         | 21 |
| Şekil 3.4. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Bitki Materyalleri .....                                                                  | 22 |
| Şekil 3.5. Mekanik İnokülasyon ve Taşıma Denemelerinde Kullanılan Test Bitkileri.....                                                  | 27 |
| Şekil 4.1. Bitkide Bodurluk (Yumurtalık/MiLBVV İnfeksiyonu).....                                                                       | 38 |
| Şekil 4.2. Yaprakta Kabarcıklaşma ve Nekroz (Yumurtalık/LBVaV İnfeksiyonu) .....                                                       | 38 |
| Şekil 4.3. Bitkide Bodurluk/Cücelik, Baş Oluşturamama, Yapraklarda Nekroz ve Damar Bantlaşması (Tarsus/MiLBVV+LBVaV İnfeksiyonu) ..... | 39 |
| Şekil 4.4. Yaprakta Damar Açılması, Buruşukluk, Deformasyon (Seyhan/MiLBVV+LBVaV İnfeksiyonu).....                                     | 40 |
| Şekil 4.5. MiLBVV'nin F ve R Nolu Primer Çifti ile Yapılan RT-PCR Bandları                                                             | 42 |
| Şekil 4.6. LBVaV'nin 248 ve 249 Nolu Primer Çifti ile Yapılan RT-PCR Bandları.....                                                     | 43 |
| Şekil 4.7. OLPvirF ve OLPR, OLPborF ve OLPR ve OLPbraF ve OLPR Primer Çiftleri ile Yapılan PCR Bandları .....                          | 45 |
| Şekil 4.8. OLPvirF ve OLPR Primer Çiftleri ile Yapılan PCR Bandları .....                                                              | 46 |
| Şekil 4.9. <i>Olpidium spp.</i> ' ye Ait Dinlenme Sporu .....                                                                          | 51 |
| Şekil 4.10. <i>Olpidium spp.</i> ' ye Ait Dinlenme Sporu .....                                                                         | 51 |



## SİMGELER VE KISALTMALAR

|        |                                             |
|--------|---------------------------------------------|
| bp     | : Baz çifti                                 |
| °C     | : Santigrat derece                          |
| cDNA   | : Complementary deoxyribonucleic acid       |
| CP     | : Kılıf protein                             |
| dATP   | : Deoksiadenozintrifosfat                   |
| dd     | : Double distile                            |
| dGTP   | : Deoksiguanozintrifosfat                   |
| DNA    | : Deoksiribonükleik asid                    |
| dNTP   | : Deoksinükleotidtrifosfat                  |
| dTTP   | : Deoksitimidintrifosfat                    |
| EDTA   | : Ethylenediaminetetraacetic acid           |
| ELISA  | : Enzim-Linked Immunosorbent Assay          |
| FAO    | : Food and Agriculture Organisation         |
| g      | : Gram                                      |
| hg     | : Hekto gram                                |
| kDa    | : Kilo dalton                               |
| l      | : Litre                                     |
| LBVaV  | : <i>Lettuce big vein associated virus</i>  |
| LBVD   | : Lettuce big vein disease                  |
| M      | : Molar                                     |
| mg     | : Miligram                                  |
| MiLBVV | : <i>mirafiori lettuce big-vein virus</i> , |
| µl     | : Mikrolitre                                |
| ml     | : Mililitre                                 |
| mM     | : Milimolar                                 |
| nm     | : Nanometre                                 |
| NaCl   | : Sodyum klorür                             |

|        |                                                             |
|--------|-------------------------------------------------------------|
| NaOH   | : Sodyum hidroksid                                          |
| NCBI   | : National Center for Biotechnology Information             |
| PBS    | : Phosphate buffered saline (Potasyum fosfat-tuz çözeltisi) |
| pH     | : Çözeltinin asitlik bazlık seviyesi                        |
| PVP    | : Polyvinylpirrilodone                                      |
| RNA    | : Ribonükleik asit                                          |
| rpm    | : Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)          |
| RT     | : Reverse Transcriptase                                     |
| RT-PCR | : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction           |
| TAE    | : Tris Acetate EDTA Buffer                                  |
| Taq    | : Termo Stabil Polimeraz Enzimi                             |
| TBE    | : Tris Borate EDTA Buffer                                   |
| TÜİK   | : Türkiye İstatistik Kurumu                                 |
| UV     | : Ultraviole                                                |
| V      | : Volt                                                      |

## 1. GİRİŞ

Dünyada sebzeler üzerine yapılan çalışmalar, sebzelerin insan beslenmesindeki öneminin daha fazla anlaşılmasına olanak sağlamıştır. Bu çalışmalarla, özellikle bitki ıslahının sağladığı yararlar ortaya çıkmış ve böylece elde edilen başarılar olağanüstü boyutlara ulaşmıştır. Sebzelerin, sağlıklı beslenmedeki yerinin anlaşılmasından sonra insanların sebze tüketimine yönelimi artmıştır (Eşiyok, 2012). Kültüre alınmış veya doğal popülasyonlarından toplanarak tüketilebilen sebzeler, insan beslenmesinde içerdikleri vitamin, mineral maddeler, karbonhidrat, protein ve yağ bakımından önemli bir etkiye sahip olmaktadır (Vural ve ark., 2000).

Taze meyve ve sebzeler insan beslenmesinin önemli bileşenlerindendir. Vitamin ve mineraller açısından zengin olduğundan diyetin kalitesini yükseltmekte ve besleyici değerini arttırmaktadır (Yücel ve ark., 2009). Bu nedenden dolayı minimal işlem görmüş meyve ve sebzeler gelişmiş ülkelerde oldukça yaygındır ve gelişmekte olan ülkelerde ise tazelik ve kolay bulunabilirliğinden dolayı popülaritesi artmaktadır (Chaudry ve ark., 2004).

Marul, dünya üzerinde üretimi yaygın olarak yapılan ve sevilen bir salata malzemesi olarak tüketimi gerçekleştirilen, ekonomik olarak yüksek değeri olan bir sebze çeşididir. Salata gurubu sebzeler içerisinde en çok tüketilen sebze türü olup; yılın tamamında pazarlarda bulunabilen, tek senelik serin iklim sebzesidir (Aybak, 2002) ve genelde diğer sebzelerin yetiştirilemediği nispeten serin bölgelerde yetiştirilebilmesinin yanında, besleyici değer yönünden zengin olmakla birlikte 100 g marul %96 su, 13 cal enerji, 0,9 g protein, 0,1 g yağ, 2,9 g karbonhidrat, 330 IU A vitamini, 6 mg C vitamini, 0,06 mg Thiamine ve Riboflavin, 0,3 mg Niacin, 20 mg Ca, 22 mg P, 0,5 mg Fe, 9 mg Na ve 175 mg K içermektedir (Peirce, 1987).

Salata marulun anavatanı, Anadolu, Kafkasya, İran ve Türkistan olarak kabul edilmiştir. Marul önceleri tababette daha sonra da M.Ö. 4500 yıllarından itibaren de insan beslenmesinde kullanılmaya başlanmıştır. İlk zamanlarda

yetiştirilmeye başlanan marullar, baş meydana getirmeyen, açık yapraklı veya gevşek başlı tipler olmuştur. Eski Mısır mezar taşları üzerinde görülen Yedikule tipi marul gravürleri, marulun çok eski zamanlardan beri insan gıdası olarak kullanıldığının bir işaretidir. Yeni dünyanın ilk keşfi ile birlikte 1494 yıllarında Amerika'ya götürülmüştür. Günümüzde bilinen altı tipinde, daha önce Ortaçağ Avrupa'sında bugünkü haliyle varlığı, tarihi kayıtlardan anlaşılmaktadır (Şalk ve ark., 2008).

Tek yıllık serin iklim sebzesi olan marulun optimum gelişme sıcaklığı 15-18°C olup, sıcaklığın 20°C'yi geçmesi gelişmesini olumsuz etkilemektedir. Bunun yanında, marul 0°C altındaki -2 °C veya -3°C gibi düşük sıcaklıklara kısa süre dayanabilmektedir (Splittstoesser, 1990; Günay, 1992). Ayrıca fotoperiyot özelliği bakımından uzun gün bitkisi olup, yaz aylarında yüksek sıcaklığa bağlı olarak hızlı bir şekilde çiçeklenme gösterir (Ware and McCollum, 1975; Günay, 1992). Bu sebeplerle, marul yetiştiriciliği ülkemizde ılıman yörelerde sonbahar, kış veya erken ilkbahar döneminde yapılmaktadır (Eşiyok ve ark., 1996).

Ülkemizde ticari boyutta marul üretimi yaygın olarak Ege, Marmara ve Akdeniz bölgelerinde yaz ayları dışında her mevsimde yapılmaktadır (Polat ve ark., 2001).

Salata-marul besleyici özelliği olmayan, düşük kalorili fakat iştah açıcı özelliği sebebiyle sofralarımızın vazgeçilmez bir sebzesidir. Protein ve yağ oranları yok denecek kadar azdır ve nişasta bulundurmazlar. Ancak, iyi bir A vitamini ve C vitamini kaynağıdır. Yapraklarında anthosiyanın içeren renkli yapraklı tiplerinin de karotenoidlerce zengin olduğu bilinmektedir. Bu sebeple salata-marullar kalp ve dolaşım sistemi sağlığını koruması bakımından büyük öneme sahip, antioksidan özelliği yüksek olan sebzelerdendir (Şalk ve ark., 2008). 100 gr salata- marulun; 94-95 gramında su, 1-1,5 gramında protein, 0,2-0,4 gramında yağ, 1,5-2,5 gramında karbonhidrat ile 30 miligramında kalsiyum, 40 miligramında fosfor ve 1,5 miligramında demir bulunmaktadır (Dillingen, 1956; Günay, 2005). Özellikle yapraklarda nitrat birikiminin en yüksek olduğu sebzelerden biridir (Santamaria,

2006). Ayrıca kalite özellikleri üzerine iklim koşulları da önemli derecede etkilidir ( Dorais ve ark., 2001).

Marul, Astaraceae (Compositae) familyasının üyesi olup, bilimsel adı *Lactuca sativa* L. romana Gars'dır. Marulun morfolojik özellikleri arasında en önemli yeri tüketilen kısmı olan yaprak özellikleri almaktadır. Yaprakların düz veya kıvrıkcık oluşu ile yaprak rengi önemli birer ayırıcı faktördür. Ayrıca, yaprak şekli ve rengi yanında göbek ve baş oluşturma, yaprak etliliği, gevrekliği ve erkencilik gibi özellikler de ayırıcı faktörler arasında sayılabilir (Vural ve ark., 2000).

Çizelge 1.1. Marulun Taksonomisi

|          |                                             |
|----------|---------------------------------------------|
| Alem     | <i>Plantae</i>                              |
| Takım    | <i>Asterales</i>                            |
| Familiya | <i>Asteraceae</i> (syn. <i>Compositae</i> ) |
| Cins     | <i>Lactuca</i>                              |
| Tür      | <i>L. sativa</i> L.                         |

Bu tür genellikle 30-100 cm yükseklikte, tamamen tüysüz, sarı çiçekli, beyaz sütlü, otsu bir kültür bitkisidir (Baytop, 1999). Ayrıca 12-15 °C sıcaklığa sahip aylarda ve hafif asitli, verimli, pH'sı 5.8-7.0 olan topraklarda nispeten iyi gelişim göstermektedir (Soundy ve ark., 2005).

Çelikel ve Tunar (1996)' a göre, *Lactuca sativa* 4 varyete altında toplanmaktadır. Bunlar;

1. *Lactuca sativa* (L.) var. *angustana* (Kuşkonmaz salataları): Bu gruba dahil olan bitkilerde baş teşekkül etmez, kalın bir sap meydana gelir. Bu sap kısmı yendiği için adına kuşkonmaz salatası denir.

2. *Lactuca sativa* (L.) var. *crispa* (Kıvrıkcık yapraklı salata): Baş bağlamayan bu bitkiler bol miktarda kıvrıkcık şekilli ve yeşil sarı arasında değişik

yapraklara sahip yapraklar oluştururlar. Yapraklar koparılarak veya kesilerek yenir. Ülkemizde uzun zamandan beri kültürü yapılmaktadır. Kıvırcık yeşil salata olarak tanınır.

3. *Lactuca sativa* (L.) var. *longifolia* (Marul): Yaprakları birbiri üzerine örtülür, gevrek ve dik bir baş oluşturur. Yapraklar tamamen uzun ve ters yumurta şeklindedir. İç Yapraklar beyaz renkte olup, esas yenen kısmı oluştururlar. Marulun halen iki formu vardır. Birisi gevşek kapanan baş marul, diğeri son zamanlarda ortaya çıkmış baş bağlamayan ve yaprakları pişirilerek yenen maruldur.

4. *Lactuca sativa* (L.) var. *capitata* (Göbekli baş salatalar): Ülkemizde son zamanlarda yetiştiriciliği hızla gelişen ve baş salata olarak adlandırılan salatadır . Gevşek rozet yapraklara veya kapalı bir başa sahiptir. Başın gevşek olması arzulanan bir özelliktir. Sıkı başlı formlar kendi arasında ikiye ayrılır. Yaprakları düz ve yağlı olanlara Butterhead, yaprakları az yağlı veya yağsız kıvırcık olanlara ise Iceberg tipi denmektedir (Öztürk, 2011).

Tüm dünyadaki 2019 yılı marul üretimini kapsayan verileri incelediğimiz zaman, Türkiye marul yetiştiriciliğinde 214.170 hg'lık bir üretimde bulunarak, 5. sırada yer alırken, 23.335 ha marul ekim alanı ile 6. sırada bulunmaktadır (Çizelge, 1.2).

Çizelge 1.2. Ülkelere Göre Dünya Marul Üretim Alanları (ha) ve Miktarları (hg)  
(Anonymous, 2020 )

| Ülke      | Ekilen Alan (ha) | Üretim (hg) |
|-----------|------------------|-------------|
| ABD       | 105.100          | 350.953     |
| İspanya   | 35.360           | 285.580     |
| Çin       | 66.8714          | 243.968     |
| İtalya    | 33.690           | 225.283     |
| Türkiye   | 23.335           | 214.170     |
| Hindistan | 199.778          | 63.205      |

Türkiye'nin 2019 yılı marul üretimi ve tüketimine bakıldığında; 779.000 hektarlık alanda yaklaşık olarak 31,2 milyon ton sebze üretimiyle Türkiye dünyanın en fazla sebze üreten ülkelerinden biri olmuştur. Bu üretimin içerisinde Marul (Kıvırcık 207.234 ton, Göbekli 225.639 ton ve Aysberg 87.278 ton) 520.151 ton üretim ile yaklaşık olarak %2'lik bir paya sahiptir. Ayrıca kişi başı marul tüketimi 2019 ve 2020 yıllarında 5,2 kg olarak hesaplanmıştır (Çizelge, 1.3).

Çizelge 1.3. Türkiye Sebze Üretim Alanları (ha), Marul Üretim Miktarları (Ton) ve Kişi Başı Marul Tüketim Miktarı (kg) (Anonim, 2020a; b)

| Yıl       | Ekilen Alan (ha) | Üretim (Ton) | Kişi başına tüketim (Kg) |
|-----------|------------------|--------------|--------------------------|
| 2015-2016 | 804.000          | 447 492      | 4,9                      |
| 2016-2017 | 798.000          | 478 442      | 5,2                      |
| 2017-2018 | 784.000          | 490 423      | 5,3                      |
| 2018-2019 | 790.000          | 487 543      | 5,2                      |
| 2019-2020 | 779.000          | 499 766      | 5,2                      |

Son yıllarda yapılan çalışmalarda virüslerin, diğer bitki hastalık etmenlerine göre daha fazla hastalık oluşturduğu bildirilmiştir (Yardımcı, 2013). Ayrıca Kimyasal mücadelesinin olmaması nedeniyle bitki virüs hastalıkları, diğer hastalık etmenlerinden farklı olarak kontrol edilmesi oldukça zordur ve vektörleri sayesinde sezon boyunca enfeksiyon oluşturabilmekle beraber marullarda yaprak kalitesini olumsuz yönde etkileyerek bitkilerin satışına engel olmaktadır. Bunların yanı sıra iklim, çevresel koşullar ve kültürel kontroller gibi etkilere bağlı olarak, marul bitkilerinde %100'e varan kayıplara neden olabilmektedirler (Pavan ve ark., 2008).

Türkiye'nin de içinde yer aldığı birçok ülkede önemli sebzeler arasında yer alan marulda hastalığa neden olan birçok viral etmen rapor edilmiştir (Rosello ve ark., 1996; Moreno ve ark., 2004; Yılmaz ve ark., 1995; Candresse ve ark., 2007;

Sertkaya ve ark., 2012; Kamberoğlu ve Alan, 2011; Erkan ve ark., 2013; Sertkaya, 2015).

Çizelge 1.4. Marul Bitkisinde Hastalık Yapan Viral Etmenler (Alan, 2012)

| <b>Viral Etmenin Türkçesi</b>     | <b>Tespit Edilen Viral Etmen</b>                 |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------|
| Yonca mozaik virüsü               | <i>Alfalfa mosaic virus (AMV)</i>                |
| Şekerpancarı batı sarılık virüsü  | <i>Beet western yellows virus (BWYV)</i>         |
| Şekerpancarı sarı bodurluk virüsü | <i>Beet yellow stunt virus (BYSV)</i>            |
| Bidens mozaik virüsü              | <i>Bidens mosaic virus (BMV)</i>                 |
| Bakla solgunluk virüsü            | <i>Broad bean wilt virus (BBWV)</i>              |
| Hıyar mozaik virüsü               | <i>Cucumber mosaic virus (CMV)</i>               |
| Marul iri damar virüsü            | <i>Lettuce big vein virus (LBVV)</i>             |
| Marul iri damar virüsü            | <i>Mirafiori lettuce big vein virus (MiLBVV)</i> |
| Marul bulaşıcı sarılık virüsü     | <i>Lettuce infectious yellows virus (LIYV)</i>   |
| Marul mozaik virüsü               | <i>Lettuce mosaic virus (LMV)</i>                |
| Marul nekrotik bodurluk virüsü    | <i>Lettuce necrotic stunt virus (LNSV)</i>       |
| Marul nekrotik sarılık virüsü     | <i>Lettuce necrotic yellows virus (LNYV)</i>     |
| Marul nokta beneklenme virüsü     | <i>Lettuce speckles mottle virus (LSMV)</i>      |
| Sowthistle sarı damar virüsü      | <i>Sowthistle yellow vein virus (SYVV)</i>       |
| Tütün rattle virüsü               | <i>Tobacco rattle virus (ToRV)</i>               |
| Tütün halkalı leke virüsü         | <i>Tobacco ringspot virus (ToRV)</i>             |
| Domates benekli solgunluk virüsü  | <i>Tomato spotted wilt virus (TSWV)</i>          |
| Şalgam mozaik virüsü              | <i>Turnip mosaic virus (TuMV)</i>                |

Marul iri damar (LBV) hastalığının etiyolojisinin anlaşılması oldukça yavaş seyretmiş, ilk olarak Jagger ve ark. (1934) Amerika’da bu hastalığa bir virüsün neden olduğunu bildirmişlerdir. Daha sonra, Araya ve ark. (2011)’ı bu virüsler üzerinde çalışarak; hastalığın, dünyada özellikle ılıman veya Akdeniz iklimine sahip bölgelerde yaygın olduğunu göstermişlerdir. Hastalık adını, yaprak

deformasyonları ve esas olarak yaprakların damarları boyunca klorofillerin bozulmasıyla oluşan renk açılması ile beliren ‘iri damar’ görüntüsünden almıştır (Falk, 1997; Vetten ve ark., 1987). En tipik belirtileri damarlarda bantlaşma ve kıvrılma ile yaprak deformasyonlarının oluşmasıdır. Bu simptomlar, baş oluşumunu önleyerek veya geciktirerek ve baş boyutunda küçük kalmaya neden olarak hasat edilebilir bitki oranını azaltabildikleri için büyük bir ekonomik öneme sahiptir (Ryder, 1980; Walsh, 1992).

Son yıllarda ülkemizde ekonomik olarak önemli kayıplara neden olan marul iri damar hastalığına neden olan etmenle ilgili çalışmalara, 2000’li yıllarda beklenmedik bir gelişme eklenmiştir; hastalığın başlangıçta varikosavirüs, Marul big vein virüsü (LBVV)’nün enfeksiyonuna bağlı olduğu düşünülmekteyken; ilerleyen yıllarda yapılan çalışmalar başka bir virüs olan Ophiovirus, Mirafiori latent virus (MiLV)’in, LBVV ile enfekte olmuş bitkilerde mevcut olduğu bildirilmiştir (Roggero ve ark., 2000).

Bulgular, İri damar hastalığına neden olan virüslerin konukçuda oluşturdukları simptom ile ilgili bazı farklılıklar içermektedir; Roggero ve ark. (2000)’nin sonuçlarına göre; tek başına MiLV ile enfekte olmuş bitkiler tipik marul iri damar hastalığı sergilerken, sadece LBVV ile enfekte olmuş bitkilerin hiçbir simptom göstermediği bildirilmiştir. Diğer yandan Lot ve ark. (2002); Sadece MiLV enfekte edilen marul, LBVV’nin varlığından veya yokluğundan bağımsız olarak sürekli iri damar simptomları geliştirdiğini bildirmişlerdir ve benzer bir çalışma da Sasaya ve ark. (2008) ile Araya ve ark. (2011)’ı MiLBVV’ nin tek başına LBVD simptomları için yeterli olduğunu göstermiştir. Hayes ve ark. (2006)’ a göre ise MiLBVV ve LBVaV’nin her ikisinin birlikte bulunduğu zamanlarda enfeksiyon oluştuğu gözlenmiştir.

Allen (1948), hastalığa neden olan etmenin vektör yardımı olmadan kök enfeksiyonuna neden olan bir virüs olduğu görüşünü benimserken iki yıl sonra Haeske (1950), iri damar ile infekteli bitki köklerinde çubuk şeklinde virüs benzeri parçacıklar olduğunu rapor etmiştir. İlerleyen yıllarda ise iki farklı araştırmacı grubu

(Fry, 1958; Grogan ve ark., 1958) *O. brassicae* ve iri damar hastalığı arasında güçlü bir ilişki olduğu sonucuna varmıştır. Daha sonra Campbell 1962 yılında, *O. brassicae*'yi virüsün bitkiden bitkiye olası bir taşıyıcısı olarak tanımlamıştır (Campbell, 1962). Aynı yıl Tomlinson ve Garrett (1962), *O. brassicae* zoosporlarının hastalığın taşıyıcısı olabileceğini öne sürmüştür. Bir yıl sonra Campbell ve Grogan, iri damar virüsünün (BVV) marul bitkilerine iletimiyle ilgili çalışmalar yapmışlardır (Campbell ve Grogan, 1963). 1964 yılında Tomlinson ve Garrett, çapraz aşılama denemeleri yapmıştır ve viruliferous olmayan *O. brassicae*'nin, virüsü, virüs ile infekteli marul köklerinden elde ettiğini ve daha sonra hastalığı sağlıklı marullara iletebildiğini göstermiştir (Tomlinson ve Garrett, 1964). Teakle (1962) *O. brassicae*'nin tütünde, TNV'nin ve Hiruki (1964, 1965) TSV'nin vektörü olarak görev aldığını bildirmişlerdir. Bitkileri infekte eden iki virüsü taşıma kabiliyeti göz önüne alındığında, o zaman bilinen adıyla *O. brassicae* bir vektör olarak tanımlanmıştır. İlerleyen yıllarda yapılan çalışmalar ise *O. brassicae*'nin Marul iri damar hastalığı bulunan bitkilerden *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MLBVV) ve *Lettuce big-vein associated virus* (LBVaV)'ü taşıdığını göstermiştir (Kuwata ve ark., 1983; Huijberts ve ark., 1990; Lot ve ark., 2002). Çizelge 1.5.'te *Olpidium spp.* tarafından bulaştığı bilinen veya şüphelenilen virüsler listelenmektedir.

Çizelge 1.5. *Olpidium spp.* tarafından taşınan virüsler

| Virüs                            | Kısaltma | Cins                   | Fungal Vektör                               | Edinim Ortamı | Referans                                                                                  |
|----------------------------------|----------|------------------------|---------------------------------------------|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tombusviridae                    |          |                        |                                             |               |                                                                                           |
| Cucumber necrosis virus          | CNV      | <i>Tombusvirus</i>     | <i>O. bornovanus</i>                        | In vitro      | (Dias, 1970)                                                                              |
| Cucumber leaf spot virus         | CLSV     | <i>Aureusvirus</i>     | <i>O. bornovanus</i>                        | In vitro      | (Campbell ve ark., 1991)                                                                  |
| Cucumber soilborne virus         | CSBV     | <i>Carmovirus</i>      | <i>O. bornovanus</i>                        | In vitro      | (Campbell ve ark., 1995)                                                                  |
| Melon necrotic spot virus        | MNSV     | <i>Carmovirus</i>      | <i>O. bornovanus</i>                        | In vitro      | (Campbell ve ark., 1991)                                                                  |
| Squash necrosis virus            | SqNV     | <i>Carmovirus</i>      | <i>O. bornovanus</i>                        | In vitro      | (Campbell ve ark., 1991)                                                                  |
| Red clover necrotic mosaic virus | RCNMV    | <i>Dianthovirus</i>    | <i>O. bornovanus</i>                        | In vitro      | (Lange ve ark., 1977; Macfarlane, 1982)                                                   |
| Chenopodium necrosis virus       | ChNV     | <i>Necrovirus</i>      | <i>O. brassicae</i>                         | In vitro      | (Tomlinson ve ark., 1983)                                                                 |
| Lisianthus necrosis virus        | LNV      | <i>Necrovirus</i>      | <i>O. brassicae</i>                         | In vitro      | (Iwaki ve ark., 1987)                                                                     |
| Tobacco necrosis virus-A         | TNV-A    | <i>Necrovirus</i>      | <i>O. brassicae</i><br><i>O. virulentus</i> | In vitro      | (Fry ve ark., 1996; Temmink ve ark., 1970; Hiruki, 1965; Lot ve ark., 2002; Teakle, 1962) |
| Tobacco necrosis virus-D         | TNV-D    | <i>Necrovirus</i>      | <i>O. brassicae</i><br><i>O. virulentus</i> | In vitro      | (Fry ve ark., 1996; Temmink ve ark., 1970; Hiruki, 1965; Lot ve ark., 2002; Teakle, 1962) |
| Viruses in unassigned families   |          |                        |                                             |               |                                                                                           |
| Mirafiori lettuce virus          | MILBV    | <i>Ophiovirus</i>      | <i>O. brassicae</i><br><i>O. virulentus</i> | In vivo       | (Lot ve ark., 2002; Hiruki, 1965; Teakle, 1962)                                           |
| Tulip mild mottle mosaic virus   | TMMMV    | <i>Ophiovirus</i>      | <i>O. brassicae</i>                         | In vivo       | (Morikawa ve ark., 1995)                                                                  |
| Freesia leaf necrosis virus      | FLNV     | <i>Varicosaviruses</i> | <i>O. brassicae</i>                         | In vivo       | (Bouwen, 1994; Milne, 2002; Van Dorst ve ark., 1988)                                      |
| Lettuce big vein virus           | LBVaV    | <i>Varicosaviruses</i> | <i>O. brassicae</i><br><i>O. virulentus</i> | In vivo       | (Lin ve ark., 1970; Lot ve ark., 2002; Hiruki, 1965; Teakle, 1962)                        |
| Lettuce ring necrosis virus      | LRNV     | <i>Varicosaviruses</i> | <i>O. brassicae</i>                         | In vivo       | (Bos ve ark., 1996; Campbell ve ark., 1996)                                               |
| Tobacco stunt virus              | TSV      | <i>Varicosaviruses</i> | <i>O. brassicae</i><br><i>O. virulentus</i> | In vivo       | (Fry ve ark., 1996; Temmink ve ark., 1970; Hiruki, 1965; Lot ve ark., 2002; Teakle, 1962) |

İn vivo olarak yapılan çalışmalar virüs-vektör ilişkisini; bünyesinde virüs bulundurmeyen vektörün (bitkinin vejetatif organlarında virüsün yaşam döngüsü devam ettiği sürece) konukçu bitkinin köklerinden virüsü elde ettiğini, Sporangia'dan salınan zoosporların virüsü protoplastlarında taşıdığını ve sağlıklı köklere ilettiğini, ayrıca virüsün vektörün dinlenme sporlarına girdiğini ve böylece konukçu bir bitkinin yokluğunda yıllarca varlığını devam ettirebildiğini bildirmiştir (Campbell, 1962-1985-1996). Campbell, TNV ve LBVV'nin *O. brassicae* ile taşınmasına dayanan çalışmalarında iki tür virüs-vektör ilişkisi tanımlamıştır (Campbell, 1996; Campbell ve ark., 1966); Bunlardan birincisi İn vitro edinimdir ve bu şekildeki taşınmada; virüs, dışardaki toprak/su ortamında bulunan viruluferus zoosporların bitki kök sistemine penetrasyonu ile elde edilir ve burada dinlenme sporlarında virüs mevcut değildir. İkinci olarak İn vivo edinimde virüs, bitki içinde çoğalır ve fungus tarafından alınır ve virüs fungusun, dinlenme sporları ve muhtemelen zoosporlar içinde de bulunur.

Günümüzde bitki virüslerinin vektörleri olarak bilinen altı zoosporik organizma türü vardır. Funguslar içinde üç tür; *Olpidium bornovanus* (= *O. radicale*), *O. brassicae* (Campbell ve ark., 1994) ve *O. virulentus* (Sasaya ve Koganezawa, 2006)'dur. Bitki virüs vektörleri olan plasmodiophorid türleri ise *Polymyxa graminis*, *P. betae* ve *Spongospora subterranea*'dır. Son rDNA sekans analizleri, plazmodioforidlerin funguslar ile yakından ilişkili olmayan, ancak protistler içinde ayrı bir grup olduğunu ve en çok diyatomlar ve lifli alglerin parazitleri ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir (Bulman ve ark., 2001; Dick, 2001; Kanyuka ve ark., 2003; Ward ve Adams, 1998).

Çizelge 1.6. Fungusun Taksonomisi

|         |                         |
|---------|-------------------------|
| Şube    | <i>Chytridiomycota</i>  |
| Sınıf   | <i>Chytridiomycetes</i> |
| Takım   | <i>Chytridiales</i>     |
| Familya | <i>Olpidiaceae</i>      |
| Cins    | <i>Olpidium</i>         |

*Olpidium spp.* ve plazmodioforidler, her ikisi de bitki köklerinde zorunlu hücre içi parazitleri olmaları bakımından benzerdir; yaşam döngüsü içerisinde duvarsız, hareketli zoosporlar ve çevre koşullarına dirençli dinlenme sporları üretirler (Barr, 1980; Braselton, 1988). *O. bornovanus* ve *O. brassicae* zoosporları, posterior olarak yerleştirilmiş tek bir flagelluma sahiptir ve karakteristik bir “sarsıntılı” yüzme deseni sergiler ve birbirinden kolayca ayırt edilebilir; *O. bornovanus*'un zoosporları daha uzun kamçıya sahiptir, zoosporangia daha büyüktür ve dinlenme sporları yıldızdan ziyade pürüzsüzdür (Barr, 1968). Plazmodioforid zoosporlar, morfolojik olarak olpidium zoosporlarından oldukça farklıdır; iki adet, eşit olmayan, öne yerleştirilmiş kamçıya sahip olmaları buna örnek olarak verilebilir (Braselton, 1995).

Vektörün, dinlenme sporları ile virüsü taşıma mekanizması halen bilinmemekle beraber; Şimdiye kadar, in vivo iletilen virüsler için dinlenme sporlarında virüs varlığına ilişkin en iyi kanıt 1996 yılında Campbell tarafından, virülifer vektöre ait sporlarının sert kimyasal muameleden sonra bile virülifer olduğu ve dinlenme sporların doğada on yıllar boyunca virülifer olarak kaldığını gösteren bulgulardır (Campbell, 1996).

*Olpidium* türlerinin; salatalık, marul, havuç, brokoli ve lahanalar gibi birçok farklı bitkiyi infekte ettiği bilinmektedir (Campbell ve ark., 1994).

Tüm bu bilgiler ışığında Marul İri-Damar Hastalığı (Lettuce Big-Vein Disease, LBVD) Adana ve Mersin İlleri'nde marul yetiştiriciliği yapılan alanlarda yaygın olarak bulunarak üreticiler için ekonomik açıdan önemli kayıplara neden

olmaktadır ve vektörleri hakkında çok az bilginin bulunması bu tez çalışmasının konusunu oluşturmuştur.



## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Pek çok çalışma, virüsün zoosporun yüzeyine adsorbe olduğu ve virüs ile zoospor arasındaki ilişkinin spesifik olduğu fikrini desteklemektedir (Adams, 1991; Campbell, 1996). Virüsün zoospor adsorbsiyonu, olası bir in vitro ortamda bulaşan virüsler için taşınma yolu olarak görülsede, edinilmiş virüsün daha sonra kök hücrelere bulaşma şekli bilinmemektedir. Çalışmalarda encysted oöpidium zoosporların protoplastı kök hücre sitoplazmasına enjekte edilmiştir ve sonra zoosporun kist duvarının, tonoplastının ve plazmalemmasının geride kaldığı görülmüştür. Bu, zoospor plazmalemmasına adsorbe edilen virüsün kök sitoplazmasına nasıl girdiğini açıklamaktadır. Benzer birçok çalışma da, zoospor flagellumunun aksonemal kılıfına bağlanan virüsün, kamçı retraksiyonu sırasında zoospor sitoplazmasına girdiğini bildirmektedir (Campbell, 1996; Stobbs ve ark., 1982; Temmink, 1971).

*O. brassicae* zoosporları ile yapılan bir çalışma, flagellumun aksonemal kılıfının, kamçı retraksiyonu sırasında aksoneme ile birlikte zoosporlara çekildiğini ve böylece zoospor gözeneklerine sitoplazmaya alınmasını sağlayan bir mekanizmaya izin verdiğini göstermektedir (Temmink, 1971). Bunun ardından Stobbs ve ark. (1982), *O. bornovanus* ile yaptıkları CNV bulaşma çalışmalarında, daha önce CNV parçacıkları ile inkübe edilen zoosporlarda, kamçı retraksiyonu sonrasında zoospor içinde oluşan zarların kıvrımları arasında büyük miktarlarda virüs parçacıkları bulunduğunu göstermişlerdir.

Üreme, morfoloji, konukçu özelleşmesi ve virüs taşıyabilme yetenekleri bakımından *Oöpidium virulentus* ve *O. brassicae* farklılık göstermektedir (Sahtiyanci, 1962; Temmink ve ark., 1970; Koganezawa ve ark., 2004; Koganezawa ve ark., 2005). Barr'a (1968) göre *O. brassicae* ve *O. bornovanus* kolaylıkla ayırt edilebilir. *O. bornovanus* zoosporlarının gövdesi elipsoidal ve yaklaşık 4.5 x 8 µm iken, *O. brassicae* zoosporu küreseldir ve sadece yaklaşık 3.3 x

5.6 um'dir. *O. bornovanus*'un zoosporları daha uzun flagella'ya sahiptir, zoosporangia daha büyüktür ve dinlenme sporları yıldızdan ziyade pürüzsüzdür.

2009 yılındaki bir çalışma, *O. virulentus* ve *O. bornovanus*'un aynı bitkileri aynı anda infekte edebildiklerini gösterirken, *O. brassicae*'nin bitkilerde, diğer *Olpidium* türleri ile birlikte ortak enfeksiyon gerçekleştiremediğini göstermiştir. (Herrera-Vasquez ve ark., 2009).

Fry ve Campbell (1966), *Olpidium* spp.'nin üremesinin, duyarlı çeşitlerde, toleranslı olanlardan, daha yüksek olduğunu açıklamışlardır.

Campbell ve ark. (1995), *O. bornovanus*'un farklı izolatlarının belirli bir virüsü farklı verimlilikle ilettiğini bildirmişlerdir.

*Olpidium* yaşam döngüsünün mevcut anlayışının çoğu Temmink tarafından açıklanan ilk çalışmalardan gelmektedir (Temmink, 1971). Zoospor tarafından virüs ediniminin ilk aşaması büyük olasılıkla flagellum'un (aksoneme ve aksonemal kılıftan oluşur) zoospor gövdesi içine çekilmesi ile gerçekleşmektedir; bununla birlikte, flagellum'un gelişmekte olan kistin etrafına sarılma olasılığı da göz ardı edilmemelidir. Yeni oluşmuş zoosporlar elektron mikroskoplarında genellikle kist içindeki plazmalemma ile ilişkili olarak gelişen bir "zar" olarak görülmektedir (Stobbs ve ark., 1982; Temmink, 1971). Bu, flagellumun aksonemal kılıfının, aksoneme ile birlikte zoospor gövdesine çekilebildiğini ve aksonemal kılıfın, bu işlem sonrasında bir zara dönüştüğünü göstermektedir. Konukçu hücre penetrasyonu sonucunda, fungus enfeksiyonuna yanıt olarak, konukçu hücre tarafından üretilen değişken boyutlu bir papillum üretimi oluşmaktadır ve buna ek olarak, kistte papillumun birleştiği yerde bir delik oluşmaktadır. Daha sonra kist protoplastının, konukçu hücre plazma zarındaki bir delikten konukçu hücre sitoplazmasına hareket ettiği görülmektedir. Kist sitoplazması, yeni oluşturulmuş bir plazmalemma ile birlikte, orijinal plazmalemma, tonoplast ve kist duvarının ardında bırakılarak konukçu hücreye salınır. Thallus, bir sonraki iki gün içinde genişler, yine de konukçu sitoplazmasından sadece ince bir zar ile ayrılır. Zoosporangiye dönüşecek olan Tali çok çekirdekli hale gelir ve plazmalemma

dışında etrafında kalın bir duvar oluşturur. Vasiküler bölünme yaklaşık bir gün sonra gerçekleşir ve daha sonra zoosporangiumun zoosporlarını oluşturmak için gelişir. Olgun zoosporangiumun oluşumunu, zoosporangiumun su ile temasından sonra birçok olgun zoosporun serbest bırakıldığı bir çıkış tüpünün oluşması takip eder. Thallus ayrıca dinlenme sporlarına dönüşebilir, ancak bu durumda çok çekirdekli hale gelmez. Dinlenme sporunun oluşumunun üreme aşamasıyla ilgili olduğuna inanılmamaktadır.

Pek çok çalışma, virüsün zoosporun yüzeyine adsorbe olduğu ve virüs ile zoospor arasındaki ilişkinin spesifik olduğu fikrini desteklemektedir (Adams, 1991; Campbell, 1996). Adsorbsiyon için ilk belirtilerden biri, zoosporların, birkaç yıkamasının ardından virüsü iletme kapasitesini hala koruduğudur, bu virüs/zoospor karışımlarının yıkama suyunda neredeyse hiç virüs bulunamamıştır (Campbell, 1996). Buna ek olarak, birçok çalışma, virüs antiserumunun, virüs çözeltisine zoosporların boşalmasıyla birlikte ya da kısa bir süre (5-10 dakika) sonra eklenmesi durumunda bulaşmanın önlendiğini, ancak antiserumun daha uzun bir süre sonra eklenmesi durumunda (zoospor boşaltımından itibaren 15 dakikadan daha fazla) iletimin engellenemediğini göstermiştir. Bu veriler, virüsün zoosporlarla karıştırıldıktan sonra 5-10 dakika içinde zoosporlara adsorbe olduğunu göstermektedir. Ayrıca, Campbell ve Fry (1996)'ın çalışması, hem fungus hem de virüs ile infekte olmuş bitkilerden zoosporların antiserum içeren tampon içine boşaltılması, yem bitkilerine taşınmanın önlendiğini göstermiştir. Bu çalışmalar, virüsün komşu bitkilere bulaşmasını, köklerden salınma sırasında mantar vektörü ile dahili veya harici olarak bağlantılı olan virüsten ziyade, iki kez infekte olmuş bitkilerden bağımsız olarak salınan zoosporlara virüsün adsorbe olduğu fikrini desteklemektedir.

İn vitro yolla bulaşan virüslerin başarılı bir enfeksiyon oluşturmaları için en az iki ayrı aşama gerekmektedir. Bunlardan ilki, virüs parçacıklarının, bitki köklerinin dışında bulunan ortamdaki zoosporların yüzeyine adsorbe edildiği bir edinim aşaması, ikincisi ise virüsün (veya infekteli materyal), virüsün bağlı olduğu

zoosporların başarılı bir şekilde bitki köklerinin sitoplazma hücrelerine encyst olarak iletimin sağlanması aşamasıdır. *O. bornovanus* tarafından CNV taşınma çalışmaları, farklı aşamaların dahil olduğunu ve bu aşamaların farklı viryon bileşenleri gerektirdiğini; zoosporlarda CNV mutantlarının eksik olduğunu yanı sıra verimli bir şekilde bağlanan ancak iletim yapmayan CNV mutantları da varlığının tespit edildiği bildirilmiştir (Kakani ve ark., 2001; Robbins, 2000).

Bir virüsün in vivo bulaşıp bulaşmadığını değerlendirmenin bir başka yöntemi, virüsün mikroskopi teknikleri kullanılarak zoosporlarda veya dinlenme sporlarında bulunup bulunmadığını doğrudan belirlemektir. İmmünogold etiketleme, zoospor ve sporangiadaki BNYVV ve BaMMV partiküllerinin tespit edilmesinde kullanılmıştır (Chen ve ark., 1991; Dubois ve ark., 1996; Rysanek ve ark., 1992).

İn vivo edinimde, virüsün, çimlenen dinlenme sporlarında veya sporangia'dan çıktığı zaman zoosporların içinde bulunulduğuna inanılmaktadır. İn vitro edinimde olduğu gibi, virüsün protoplast enjeksiyonunu takiben bitki köklerinin hücre sitoplazmasına girme yöntemi bilinmemektedir. BNYVV ve BaMMV (Chen, 1991; Dubois ve ark., 1994; Rysanek ve ark., 1992) ile ilgili çalışmalarda, zoosporlarda ve sporangia'da virüs varlığına dair doğrudan kanıtlar elde edilmiş olmakla birlikte, dinlenme sporlarında virüs tespit etme girişimleri başarılı olmamıştır. Şimdiye kadar, in vivo bulaşan virüsler için dinlenme sporlarında virüsün varlığına dair en iyi kanıt, iki kat infekte edilmiş bitkilerin dinlenme sporlarının sert kimyasal işlemlerden sonra bile virüse sahip olmaları ve dinlenme sporlarının onlarca yıl doğada virüsle birlikte yaşayabilmeleridir (Campbell, 1996). Dinlenme sporlarındaki virüs partiküllerini doğrudan gözlemleyememe, belki de geçirimsiz dinlenme sporlarını boyama ve görüntüleme güçlükleri, spor başına düşük partikül sayısı ve/veya partikül içeren sporların düşük oranı gibi teknik faktörlerden kaynaklanmaktadır (Campbell, 1996). Öte yandan, bazı virüs/vektör kombinasyonlarında virüs partikülleri dinlenme sporlarında mevcut olmayabilir. Örneğin, 2003 yılında Driskel ve arkadaşlarının, toprak

kaynaklı buğday mozaik virüsü (SBWMV) ve *P. graminis* ile gerçekleştirdiği çalışmada, SBWMV'nin hareket proteini tespit edilmesine ve viral RNA'nın dinlenme sporlarında da bulunabilmesine rağmen, plazmodia ve dinlenme sporlarında SBWMV partiküllerinin varlığına dair kanıt bulunamamıştır yani dinlenme sporunun bulaşıcı bileşeninin bir virüs parçacığı değil, belki de bir viral RNA/ hareket protein kompleksi olabileceğini ortaya koymuşlardır (Driskel ve Verchot-Lubicz, 2003).



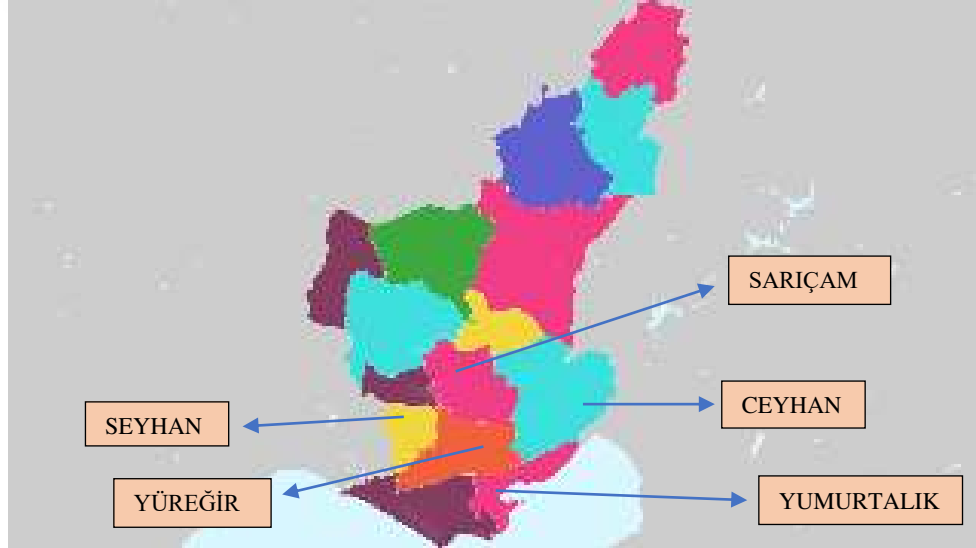


### 3. MATERYAL VE METOT

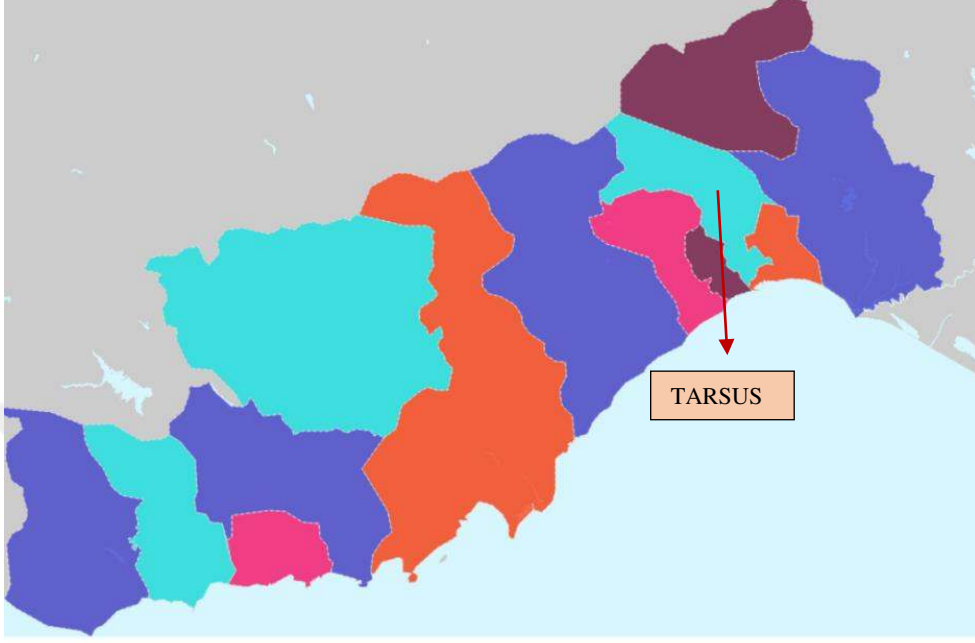
#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışma Alanı ve Materyali Hakkında Bilgiler

Survey çalışmaları, 2018-2021 yılları arasında sonbahar ve kış aylarında Adana İli'nin Seyhan, Yüreğir, Ceyhan, Yumurtalık, Sarıçam ve Çukurova ilçeleri ile Mersin İli'nin Tarsus ilçesinde marul yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlarda yürütülmüştür.



Şekil 3.1. Çalışmanın Yürütüldüğü Adana İli ve İlçeleri



Şekil 3.2. Çalışmanın Yürütüldüğü Mersin İli ve İlçesi

Arazi çalışmalarında semptomatolojik gözlemler sonucu LBVD ile bulaşık olduğu düşünülen 85 adet marul bitkisinin yaprak, kök ve kök bölgesindeki toprakları materyal olarak kullanılmıştır. Örneklerin alındığı yer ve testlenen bitki sayısı Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Tez süresince yapılan çalışmalarda, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarı ve kontrollü klima odaları kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Örneklerin Alındığı Yer ve Testlenen Bitki Sayısı

| İL     | İLÇE       | TARLA SAYISI | TESTLENEN BİTKİ SAYISI |
|--------|------------|--------------|------------------------|
| Adana  | Seyhan     | 7            | 26                     |
|        | Yüreğir    | 3            | 7                      |
|        | Yumurtalık | 6            | 25                     |
|        | Sarıçam    | 1            | 4                      |
| Mersin | Tarsus     | 8            | 23                     |



Şekil 3.3. Arazi Çalışmalarında Şüpheli Olduğu Düşünülen ve Alınan Örnekler

### 3.1.2. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Materyal

Serolojik çalışmalarda, Adana ve Mersin illerinin tez kapsamı dahilindeki ilçelerinde/mahallelerinde MiLBVV ve LBVaV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen marullardan alınan yapraklar, kökler ve kök bölgesindeki topraklar materyal

olarak kullanılmıştır. Bunlara ilaveten, ticari olarak satışı yapılan marul fideleri de ELISA testine tabi tutulmuştur.

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



Şekil 3.4. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Bitki Materyalleri

**3.1.3. Total Na Ekstraksiyonu Çalışmalarında Kullanılan Materyal**

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

Total NA ekstraksiyonu çalışmalarında; ekstraksiyon paketleri (BIOREBA), steril havan ve havan eli, tampon çözeltiler (Ek 2), ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları, ependorf tüpleri, Universal 320R marka masa tipi soğutmalı santrifüj cihazı kullanılmıştır.

**3.1.4. DNA Ekstraksiyonu Çalışmalarında Kullanılan Materyal**

Vektörleri tespit etmek amacıyla yapılan DNA ekstraksiyonu çalışmalarında marul bitkilerinin kılcal kök dokuları kullanılmıştır.

DNA ekstraksiyonu çalışmalarında; GS solüsyonu, petri kapları, tampon çözeltiler (Ek 2), ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları, ependorf tüpleri, Universal 320R marka masa tipi soğutmalı santrifüj cihazı kullanılmıştır.

**3.1.5. RT-PCR Çalışmalarında Kullanılan Materyal**

MiLBVV ve LBVaV'nin moleküler tanısı amacıyla virüs ile bulaşık olan ve olmayan marullara ait yaprak dokularından elde edilen toplam nükleik asitler çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

RT-PCR uygulamalarında, Moloney Murine Leukaemia Virus'den oluşan Revert Aid Reverse Transcriptase enzimi (M-MLV 200 U/μl, 10000 U, Thermo Scientific) ve 5X Reaction Buffer for RT, Taq polimeraz enzimi (Taq DNA polimeraz enzimi, 500 U, 5 U/μl, Thermoscientific), dNTP set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 4X25 μmol, Thermoscientific), MgCl<sub>2</sub>, DNA Ladder marker (100 bp, Solis

Biodyne ve 100 bp Gene Direx), pipet ve steril pipet uçları, PCR tüpleri, saf su ve Çizelge (3.2.)’de verilen virüslere spesifik primerler (10 µM) kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. RT-PCR Çalışmalarında Kullanılan Primer Çifti ve Band Büyüklüğü

| Primer Çiftleri          | Dizi                                                                   | Moleküler Büyüklüğü (bp) |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| LBVaV (1)<br>LBVaV (2)   | ‘GTT TTT GAC CCT GAT AG ‘<br>‘GTC GAC TCT AGA CAC TTG TTG TTT GTC GTG’ | 296                      |
| MiLBVV (1)<br>MiLBVV (2) | ‘TAT CAG CTC ACA TAC TCC CTA TCG’<br>‘CAA CTA GCT CAG AAT ACA TGC AG’  | 233                      |

### 3.1.6. PCR Çalışmalarında Kullanılan Materyal

*Olpidium virulentus*, *Olpidium bornovanus* ve *Olpidium brassicae*’nın moleküler tanısı amacıyla virüs ile bulaşık olan ve olmayan marullara ait kök dokularından elde edilen toplam nükleik asitler çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

PCR uygulamalarında, Moloney Murine Leukaemia Virus’den oluşan Revert Aid Reverse Transcriptase enzimi (M-MLV 200 U/µl, 10000 U, Thermo Scientific) ve 5X Reaction Buffer for RT, Taq polymerase enzimi (Taq DNA polimeraz enzimi, 500 U, 5 U/µl, Thermoscientific), dNTP set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 4X25 µmol, Thermoscientific), MgCl<sub>2</sub>, DNA Ladder marker (100 bp, Solis Biodyne ve 100 bp Gene Direx), pipet ve steril pipet uçları, PCR tüpleri, saf su ve Çizelge (3.3.)’de verilen funguslara spesifik primerler (10 µM) kullanılmıştır.

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

Çizelge 3.3. PCR Çalışmalarında Kullanılan Primer Çifti ve Band Büyüklüğü

| Primer Çiftleri | Dizi                                                                 | Moleküler Büyüklüğü (bp) |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| OLPborF<br>OLPR | 'CCG AGG AAA TGA GAG AGA TGA CA'<br>'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GCT TA' | 977                      |
| OLPvirF<br>OLPR | 'AAC CCA AGA CCT GCC CCC AAA AG'<br>'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GCT TA' | 579                      |
| OLPbraF<br>OLPR | 'AGC TAT AGC TCA CCC TCT TT'<br>'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GCT TA'     | 204                      |

### 3.1.7. Virüslerin Mekanik İnokülasyon ile Taşınma Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Taşıma çalışmalarında, serolojik ve moleküler olarak LBVD ile bulaşık olduğu saptanan marul bitkilerine ait yaprak dokuları materyal olarak kullanılmıştır.

### 3.1.8. Virüslerin *Olpidium spp.* ile Taşınma Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Taşıma çalışmalarında, serolojik ve moleküler olarak LBVD ile bulaşık olduğu saptanan marul bitkileri (özellikle kökler) ile toprak örnekleri materyal olarak kullanılmıştır.

### 3.1.9. Agaroz Jel Elektrophorez Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Agaroz jel elektrophorez çalışmalarında, RT-PCR çalışmalarından elde edilen PCR ürünleri materyal olarak kullanılmıştır.

Agaroz jel elektrophorez uygulamasında, agaroz (Sigma), tampon çözeltiler (Ek-3), BIORAD marka Mini Sub. DNA Cell Elektrophorez cihazı, güç kaynağı ve UV ışık kaynağı olarak UVP Ultraviolet Transilluminator marka ışık kaynağından ve jel görüntüleme sisteminden yararlanılmıştır.

### 3.2. Metot

#### 3.2.1. Bitki Örneklerinin Toplanması ve Muhafazası

Adana ve Mersin illerinde 2018-2021 yıllarında sonbahar ve kış aylarında marul yetiştirilen bölgelerde LBVD ve taşıyıcısı olan *Olpidium virulentus*, *Olpidium bornovanus* ve *Olpidium brassicae*'nin tanınması ve karakterizasyonu amacıyla şüpheli bulunan ve bulunmayan örnekler toplanmıştır.

Arazide öncelikle simptomatolojik gözlemler yapılarak LBVD ile bulaşık olduğundan şüphelenilen marul bitkileri, kökleri ve kök bölgesindeki toprağı da dahil olmak üzere bütün olarak alınmıştır. Örnek alınan bitkilerde marul bitkilerinin yapraklarında damar dokusu çevresinde klorotik alanlar, damar genişlemesi, şiddetli yaprak deformasyonları, gelişmede azalma, ve baş gelişiminde bozulma belirtileri aranmış, bu belirtilerden en az birini gösteren marul bitkileri ile etrafındaki semptom göstermeyen marul bitkileri toprakları ile birlikte bütün olarak alınarak çalışmalarda kullanılmıştır.

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

#### 3.2.2. Test Bitkilerinin Yetiştirilmesi

Taşıma denemelerinde ve mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılacak marul bitkileri, ticari olarak üretilen fideliklerden temin edilip Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarı'nda uygun zamanda 10 cm çaplı plastik saksılara şaşırtılmışlardır.

Bitkilerin sağlıklı büyümeleri için gerekli makro ve mikro besin elementleri sulama suyuna ilave edilerek bitkilere verilmiştir. Değişik hastalık ve zararlılara karşı gerektiğinde periyodik olarak amaca uygun pestisit uygulamaları yapılmıştır.



Şekil 3.5. Mekanik İnokülasyon ve Taşıma Denemelerinde Kullanılan Test Bitkileri

### 3.2.3. Virüslerin Taşınma Çalışmaları

Uygun şekilde yetiştirilen test bitkilerine pH 7,4 olan fosfat tamponu kullanılarak şüpheli bitki yapraklarının özsuyu çıkarılarak 2-6 yapraklı dönemlerdeki test bitkilerine mekanik olarak bulaştırmak üzere mekanik inokülasyon çalışması yapılmıştır.

Sürveyler sırasında toplanan marul bitkilerine ait kök bölgesindeki topraklar ve kılcal kökler marul bitkilerinin taşınma denemelerinde kullanılmıştır. Alınan topraklar 1:4 oranında steril kum ile karıştırılıp plastik saksılara konularak, her birine 3'er adet LBVD'e hassas marul fideleri dikilmiştir. Saksılar iklim odasında yerleştirilip 25°C gündüz ve 18°C gece sıcaklığında tutulmuştur. Her bir saksı 6 haftalık yetiştirme periyodundan sonra hasat edilerek, bitki kökleri musluk suyunda yıkanarak topraktan arındırılmıştır.

Daha sonra, bitkilerin yaprak ve kök bölgeleri alınarak, ELISA testi ve Total NA ekstraksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere ayrı ayrı etiketlenerek -20°C'deki derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

**3.2.4. Serolojik Çalışmalar**

Serolojik çalışmalarda araziden toplanan marul bitkileri ile taşıma denemeleri ve mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan marul bitkilerinin yaprak ve kök örneklerinde MiLBVV'nin varlığının ortaya konulması amacıyla, Double Antibody Sandwich (DAS) ELISA yöntemi ile testlenmiştir.

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

**3.2.4.1. Örneklerin DAS-ELISA testine hazırlanması**

MiLBVV ile bulaşık olduğu düşünülen örneklerden 1'er g tartılarak porselen steril havan, veya ekstraksiyon paketleri içerisinde 1:10 oranında ekstraksiyon tampon eklenerek ezilmiştir. Homojen şekil alana kadar ezilen bitki ekstraktları numaralandırılan eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Testlemelerde kullanılmaya hazır halde buzdolabında +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

**3.2.4.2. DAS-ELISA Testi**

DAS-ELISA çalışmaları, Clark ve Adams (1977) tarafından bildirilen yöntem baz alınarak antiserum, konjugat ve örneklerin sulandırılma oranları ELISA kitinin alındığı firmanın (BIOREBA AG) belirttiği protokolle göre yapılmıştır.

1. Testlenen virüse spesifik poliklonal  $\gamma$ -globulin (MiLBVV'ye spesifik antiserumlar; BIOREBA), firmanın bildirdiği yöntemle göre belirli oranlarda sulandırılarak kaplama tampon çözeltisinde karıştırılmış ve ELISA pleytlerinin her bir çukuruna 100  $\mu$ l olacak şekilde iki tekrarlı koyulmuştur.

2. Pleytlerin üzeri kapatılarak 30-35 °C'de 3-4 saat inkübasyona alınmıştır.

3. İnkübasyon aşamasından sonra pleyt yıkama tamponu ile tüm çukurlara gelecek şekilde 3'kez her yıkama 3'er dakika olacak şekilde yıkanmıştır ve ters çevrilerek boşaltılmıştır.

4. Örneklerden aldığımız bitki öz suları ile 1/10 oranında hazırladığımız ELISA ekstraksiyon tamponu karışımını her bir kuyuya 100 µl karışım koyarak +4 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra yıkama tamponu ile 3' kez her yıkama 3'dk olacak şekilde tekrar yıkanmıştır.

5. Konjugat tamponu ile sulandırılmış konjugattan pleytdeki her kuyuya, 100'er µl gelecek şekilde konulmuş ve 30–35°C'de 4 saat inkübasyondan sonra pleytler yukarıda belirtilen 3 kez 3 dakika yıkama yöntemiyle yıkanmış ve ters çevrilerek kurutulmuştur.

6. Substrat tamponu içerisinde taze olarak 1mg/ml olacak şekilde hazırlanmış substrattan her bir çukura 100 µl konulmuş ve üstü kapatılarak karanlık bir ortamda oda sıcaklığında ortalama 45–60 dk veya gerekli görülen durumlarda daha uzun süre bekletilmiştir.

7. Pleytler de görülen sararmalar Medispec ESR 200 ELISA okuyucusu ile 405 nm dalga boyunda okunmuştur.

ELISA testlerinde her bir örnek için ikişer kuyu kullanılmış ve her pleyt içerisinde bir adet pozitif (infekteli), bir adet negatif (sağlıklı) ve bir adet buffer kontrol bulundurulmuştur.

Yapılan ELISA testlerinin sonucunda, ELISA okuyucusunda negatif kontrolün absorbans değerinin en az iki katı ve daha fazla absorbans değerine ( $OD_{405}$ ) sahip olan örnekler MiLBVV ile bulaşık olarak kabul edilmiştir (Barbara ve Riccioni, 1993).

**3.2.5. Moleküler Çalışmalar****3.2.5.1. Total Nükleik Asit (tNA) Ekstraksiyonu**

Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu çalışmaları, araziden alınan marul bitkileri ile mekanik inokulasyon ve taşıma denemelerinde kullanılan marul bitkilerinin yaprakları ve kökleri kullanılarak, Fulton ve ark. (2007)'nin önerdiği yönteme göre modifiye edilerek yürütülmüştür.

**3.2.5.1.1. Total Nükleik Asit (tNA) Ekstraksiyonu Aşamaları**

1. Bitki örnekleri ekstraksiyon tamponu (100 mM tris, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, pH 8.0, %2 CTAB, %0.3 beta-mercaptoethanol) içerisinde 1/3 (w/v) oranında ekstraksiyon torbalarının içinde sulandırılarak homojenize edilmiştir
2. Ekstraksiyondan sonra 4.000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmından 600 µl çekilerek yeni hazırlanan eppendorflara aktarılmıştır.
3. Bitki öz suyundan 1ml alınarak eppendorf tüpleri içerisine yerleştirilmiş ve örnekler 65 °C'de su banyosunda 30 dakika inkübe edilmiştir.
4. Eppendorf tüplerine 600 µl chloroform-isoamyl (24:1) eklenmiş ve 1 dakikalık vorteksin ardından 10 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüj sonucu oluşan süpernatant kısımdan 500 µl çekilerek tekrar 1:1 oranında kloroform-izoamil alkol eklenmiş, 1 dakikalık vorteksin ardından 10 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
6. Oluşan süpernatant kısımdan 300 µl alınarak 1/1 oranında isopropanol eklenmiş ve -20°C derecede 1 saat bekletilmiştir.
7. Daha sonra 15 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve tüplerin içindeki sıvı kısım boşaltılmıştır.

8. Eppendorf tüplerine 1ml %70'lik alkol eklenerek 5 dakika 15.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Alkol döküldükten sonra kurutma kağıtları yardımıyla tüplerdeki alkol temizlenmiştir.
9. Son aşamada 50 µl ddH<sub>2</sub>O eklenmiş ve oda sıcaklığında 3-4 saat ekstrakte edilen nükleik asitin çözülmesi beklenmiştir. Daha sonra bunlar - 20°C'de eppendorf tüplerde muhafaza edilmiştir.

### 3.2.5.2. DNA Ekstraksiyonu

DNA Ekstraksiyon Çalışmaları;

Araziden alınan marul bitkileri ile taşıma denemeleri ve mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan marul bitkilerinin kökleri kullanılarak Nejat ve ark. (2009)'nın önerdiği yöntemle göre modifiye edilerek yürütülmüştür.

#### 3.2.5.2.1. DNA Ekstraksiyonu Aşamaları

1. İçerisinde zoospor bulunan GS solüsyonlu homojenattan 900 µl alınarak 1,5 ml'lik eppendorf tüplere eklenmiş ve üzerine 600 µl 2xCTAB Buffer ekstraksiyon tamponu eklenerek homojenize edilmiştir.
2. Üzerine 2 µl 2-Mercaptoethanol eklenmiş ve 1 dakikalık vorteksin ardından 65 °C' de su banyosunda 30-40 dakika inkübe edilmiştir.
3. Eppendorf tüplerine 600 µl chloroform-isoamylalkol (24:1) eklenmiş ve 30-40 saniyelik vorteksin ardından 10 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
4. Oluşan süpernatant kısımdan 400 µl alınmış ve üzerine 375 µl chloroform-isoamyl (24:1) eklenmiş ve 30-40 saniyelik vorteksin ardından 10 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

5. Oluşan süpernatant kısımdan 350 µl alınmış ve üzerine 250 µl soğuk isopropanol (2-propanol) eklenmiş ve tüpler nazikçe el ile 4-5 kez çalkalanmıştır ve sonra -20°C derecede 20 dakika bekletilmiştir.
6. Daha sonra 15 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve tüplerin içindeki sıvı kısım boşaltılmıştır.
7. Eppendorf tüplerine 1ml %70'lik alkol eklenerek çalkalama yapmadan yavaşça dököldükten sonra kurutma kağıtları yardımıyla tüplerdeki alkol temizlenmiştir.
8. Son aşamada 50 µl TE buffer eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika ufak vuruşlar yaparak ekstrakte edilen nükleik asitin çözülmesi beklenmiştir. Daha sonra DNA izolatları- 20°C derecede eppendorf tüplerde muhafaza edilmiştir.

#### 3.2.5.3. RT-PCR Çalışmaları

Çalışmada MiLBVV'yi ve ticari olarak ELISA kiti bulunmayan LBVaV'yi saptamak ve moleküler karakterizasyonunu yapmak amacı ile kullanılacak DNA'ların elde edilmesini sağlamak için, total nükleik asit izolasyon çalışmalarında elde edilen preparasyonlar, RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) çalışmalarında kullanılmıştır ve yöntem Sidek ve ark. (1999) ve Prieto ve ark. (2001)'e göre modifiye edilerek yürütülmüş.

RT-PCR işlemi iki aşamalı yapılmıştır:

RT-PCR yönteminde I. aşamada; RT (Reverse transcription) işlemi ile cDNA'lar elde edilmiş, II. aşamada ise, bu cDNA'lar kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

1. RT işleminde, PCR tüplerinin her birine total NA'dan 1 µl konulup, üzerine 1 µl primer (10 pmol/ µl) ilave edilerek thermocycler'a yerleştirilmiş ve 70 °C'de 5 dk denatürasyon işlemi uygulanmıştır. Daha sonra tüpler buz üzerine alınarak 5 dk bekletilmiştir. PCR tüplerine 16.6 µl saf su, 1 µl dNTPs, 0.1 µl M-

MLV enzimi, 5 µl RT-buffer (5X), 0.3 µl RNaz inhibitörü ilave edilerek son hacim 25 µl olarak ayarlanmış ve örnekler thermocycler'a yerleştirilerek 42 °C'de 60 dk inkübe edilmiştir.

2. PCR işleminde ise ayrı bir PCR tüpüne, 1. aşamada yapılan işlemlerden elde edilen cDNA'lardan 1 µl konularak üzerine 17.8 µl saf su, 2,5 µl 10X PCR tampon çözeltisi (250 mM Tris -HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 50 mM DTI), 1.5 µl MgCl<sub>2</sub> (20 mM), 1 µl dNTP, 0.2 µl Taq DNA polymerase, 1 µl forward primer ve 1 µl reverse primer ilave edilmiştir.

Daha sonra tüpler çizelge 3.3 de gösterilen şekilde ayarlanmış thermocycler'a yerleştirilerek PCR aşaması tamamlanmıştır.

Çizelge 3.4. MiLBVV ve LBVaV İçin Uygun Sıcaklıklar

| MiLBVV                                 | LBVaV                                  |
|----------------------------------------|----------------------------------------|
| 95 °C 2 dk                             | 95 °C 2 dk                             |
| 95°C 30 sn<br>62°C 30 sn<br>72 °C 2 dk | 95°C 30 sn<br>62°C 30 sn<br>72 °C 2 dk |
| 30 döngü                               | 30 döngü                               |
| 72°C 10 dk                             | 72°C 10 dk                             |

#### 3.2.5.4. PCR Çalışmaları

DNA izolasyonu çalışmalarında elde edilen preparasyonlar, PCR (Polymerase Chain Reaction) çalışmalarında kullanılmıştır ve yöntem Sidek ve ark. (1999) ve Prieto ve ark. (2001)'e göre modifiye edilerek yürütülmüştür.

PCR işleminde, ayrı bir PCR tüpüne, yukarıdaki işlemlerden elde edilen DNA'lardan 1 µl konularak üzerine 17.8 µl saf su, 2,5 µl 10X PCR tampon çözeltisi (250 mM Tris -HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 50 mM DTI), 1.5 µl MgCl<sub>2</sub> (20 mM), 1 µl dNTP, 0.2 µl Taq DNA polymerase, 1 µl forward primer ve 1 µl reverse primer ilave edilmiştir.

Daha sonra tüpler Çizelge 3.5.'te gösterilen şekilde ayarlanmış thermocycler'a yerleştirilerek PCR aşaması tamamlanmıştır.

Çizelge 3.5. *Olpidium virulentus*, *Olpidium bornovanus* ve *Olpidium brassicae* İçin Uygun Sıcaklıklar

|                         |            |
|-------------------------|------------|
| <i>Olpidium</i> türleri |            |
| 94 °C’de 5 dk           |            |
| 94 °C’de 45 sn          | } 35 döngü |
| 55 °C’de 1dk            |            |
| 72 °C’de 1 dk           |            |
| 72 °C’de 10 dk          |            |

#### 3.2.5.5. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları

Agaroz jel elektroforez çalışması % 1.5'lik olacak şekilde Galitelli ve Minafra (1994)'ya ve Dezbiez ve ark. (2009)'na göre uygulanmıştır.

- Cam erlen içerisine 100 mg agaroz, 20 ml 1X TAE (4.84 g Tris, 2ml 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA, 1.142 ml Glacial acetic acid) ya da 1X TBE tampon çözeltisi konulmuş ve agaroz tamamen eriyinceye kadar ısıtıcıda bekletilmiştir.
- Karışım kaynadıktan sonra ısıtıcıdan alınıp soğuyunca, tank içerisine karışım dökülerek tarak takılmıştır.
- Tank içerisindeki jel donduktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkartılarak, jel elektroforez tankına yerleştirilmiş ve jeli 1-2 mm geçecek kadar kullanılan buffera göre 1X TAE ya da 1X TBE tampon çözeltisi eklenmiştir.
- Örnekler ve marker 10 µl karışım olacak şekilde jeldeki kuyulara dikkatli bir şekilde yerleştirilmiştir. Marker ilk kuyuya konulmuştur.

- e) Loading buffer'daki turuncu renk (Orange G) jel'in sonuna gelene kadar elektroforez tankına 30 veya 35 V elektrik akımı verilmiştir.
- f) Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel, oda sıcaklığında 10 dk, 30 µl ethidium bromid /100 ml saf su (10 mg/ml saf su) karışımında boyanmış ve daha sonra jeli fazla ethidium bromidden arındırmak için 10 dk saf su içerisinde tutulmuştur. Daha sonra yıkanan Jel UV transilluminatörü üzerine konulmuş ve UV ışık altında ortaya çıkan bantlar gözlemlenerek fotoğrafı çekilmiştir.





#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

##### 4.1. Survey Çalışmaları ve Gözlenen Simptomlar

LBVD ve taşıyıcısı olan *Olpidium* türlerine ait izolatlarının toplanması, tanımlanması ve karakterizasyonu amacıyla 2018-2021 sonbahar ve kış sezonlarında Adana ve Mersin İlleri'nde marul yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı alanlarda yürütülen tez çalışmasında simptomatolojik olarak yaprakların damarları çevresinde klorotik alanlar, damar genişlemesi, şiddetli yaprak deformasyonları, gelişmede azalma ve baş gelişiminde bozulma belirtileri gösteren 85 adet marul bitkisinden bitki dokuları alınmış ve laboratuvar çalışmalarında kullanılmıştır.

Yapılan arazi çıkışlarında Adana'da Seyhan'dan 26, Yüreğir'den 7, Yumurtalık'tan 25 ve Sarıçam'dan 4 bitkiden; Mersin'de ise Tarsus'tan 23 bitkiden örnekleme yapılmıştır.

Simptomatolojik gözlemler ile MiLBVV ve LBVaV ile enfekteli olduğu tespit edilen bitkilerin bulunduğu marul tarlalarında hastalığın yaygınlık oranının %28 olduğu tespit edilmiştir. MiLBVV ve LBVaV'nin bitkide en fazla damarlarda genişleme, damar renginde açılma, baş oluşturmama ve deformasyon belirtilerine sebep olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1; Şekil 4.2; Şekil 4.3; Şekil 4.4).

Avustralya, İran ve Riyadh Bölgesi'nde marul alanlarında yapılan survey çalışmaları, bitkide; cüceleşme, bodurluk ve sararma, yapraklarda; damar açılması, beneklenme, buruşukluk ve deformasyon belirtileri olan örnekleri toplamış ve bu alanlarda LBVD'nin tespit edildiğini göstermiştir (Fletcher ve ark., 2005; Alemzadeh ve Izadpanah, 2012; Al-Saleh ve ark., 2015).

Bu tez çalışmasında Adana ve Mersin illerine bağlı marul yetiştiriciliğinin yaygın olduğu ilçelerden/mahallelerden MiLBVV, LBVaV, *Olpidium virulentus*, *Olpidium bornovanus* ve *Olpidium brassicae* etmenlerini testlemek amacıyla toplam 85 adet örnek alınmıştır.



Şekil 4.1. Bitkide Bodurluk (Yumurtalık/MiLBVV İnfeksiyonu)



Şekil 4.2. Yaprakta Kabarcıklaşma ve Nekroz (Yumurtalık/LBVaV İnfeksiyonu)



şekil 4.3. Bitkide Bodurluk/Cücelik, Baş Oluşturamama, Yapraklarda Nekroz ve Damar Bantlaşması (Tarsus/MiLBVV+LBVaV İnfeksiyonu)



Şekil 4.4. Yaprakta Damar Açılması, Buruşukluk, Deformasyon (Seyhan/MiLBVV+LBVaV İnfeksiyonu)

#### 4.2. Serolojik Çalışmaları

##### 4.2.1. DAS- ELISA Testi Çalışmaları

Marul tarlalarında simptomatolojik olarak MiLBVV ve LBVaV'nin en az biri ile bulaşık olduğundan şüphelenilen ve symptom göstermeyen 85 adet marul bitkisinden yapılan ELISA testleri sonucunda Adana ve Mersin illerinde yaygın bir şekilde marul yetiştiriciliği yapılan ilçelerde/mahallelerde mevcut arazilerden toplanan 85 adet marul bitkisinden 18 tanesinin MiLBVV ile infekteli olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. DAS- ELISA Testi Sonucu MiLBVV ile İnfekteli Olduğu Saptanan Bitkiler

| İlçe/Mahalle  | KOD<br>NUMARASI | MiLBVV    |          |
|---------------|-----------------|-----------|----------|
|               |                 | Yaprak    | Kök      |
| Haylazlı      | 1               | +         | -        |
| Haylazlı      | 2               | +         | -        |
| Haylazlı      | 3               | +         | -        |
| Haylazlı      | 5               | +         | -        |
| Haylazlı      | 6               | +         | -        |
| Haylazlı      | 7               | +         | -        |
| Haylazlı      | 8               | +         | -        |
| Haylazlı      | 9               | +         | -        |
| Haylazlı      | 10              | +         | -        |
| Haylazlı      | 12              | +         | -        |
| Haylazlı      | 13              | +         | -        |
| Haylazlı      | 14              | +         | -        |
| Günyurdu      | 33              | +         | -        |
| Günyurdu      | 35              | +         | -        |
| Büyükdikili   | 76              | +         | -        |
| Büyükdikili   | 77              | +         | -        |
| Büyükdikili   | 78              | +         | -        |
| Büyükdikili   | 79              | +         | -        |
| <b>TOPLAM</b> | <b>18</b>       | <b>18</b> | <b>0</b> |

DAS-ELISA testinin marul yapraklarından alınan sonuçlarına göre 85 örnekten MiLBVV ile infekteli 21 adet örneğin pozitif olduğu saptanmıştır.

DAS-ELISA testinin marul köklerinden alınan sonuçlarına göre 85 örneğin tamamı MiLBVV için negatif bulunmuştur.

### 4.3. Moleküler Çalışmaları

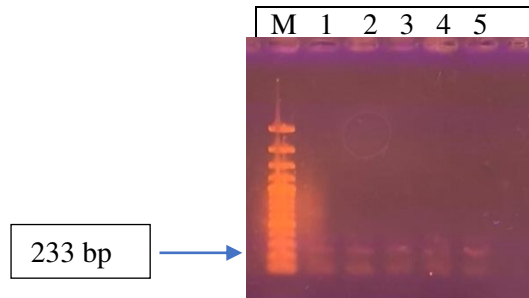
#### 4.3.1. Total Nükleik Asit (tNA) Ekstraksiyon Çalışmaları

DAS-ELISA testleri sonucunda MiLBVV ile enfekteli olduğu belirlenen marul örneklerinin taze yapraklarından ve köklerinden ayrıca LBVaV'nin oluşturduğu semptomlara benzer belirti gösteren taze marul yaprakları ve köklerinde de dahil olmak üzere 85 adet marula ait dokular kullanılmıştır ve Astruc ve ark. (1996)'nın önerdiği yöntem dikkate alınarak, örneklerde nükleik asitler elde edilmiştir ve PCR işlemi sonrası PCR ürünleri ile % 1,5'lik ya da % 2'lik agaroz jel kullanılarak TAE tampon çözeltisinde elektroforez yöntemi ile bandlar elde edilmiştir.

#### 4.3.2. RT-PCR Çalışmaları

Bu tez çalışmasında, RT-PCR yöntemi ticari antiserumu bulunmayan LBVaV'nin moleküler karakterizasyonu ve ELISA testleri sonucu saptanan MiLBVV'nin moleküler karakterizasyonu amacıyla kullanılmıştır.

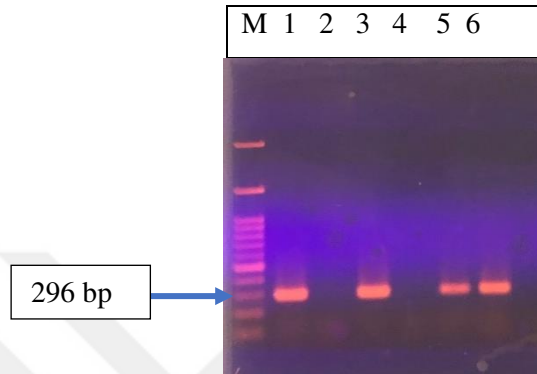
MiLBVV için MiLBVV(F) ve MiLBVV(R) primer çifti kullanılarak Seyhan, Yumurtalık, Sarıçam ve Tarsus ilçelerinden toplanan marul izolatlarına ait 233 bp büyüklüğünde bandlar elde edilmiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. MiLBVV'nin F ve R Nolu Primer Çifti ile Yapılan RT-PCR Bandları

LBVaV'ye özgü VP-248 ve VP-249 primer çifti kullanılmış ve Adana ilinde Seyhan, Yüreğir, Yumurtalık ve Tarsus'dan alınan marul izolatlarına ait 296

bp'lık bandlar gözlenmiştir (Şekil 4.6.). Ticari antiserumu bulunmayan LBVaV çalışmada ELISA ile saptanamamış, RT-PCR yöntemi ile saptanmıştır.



Şekil 4.6. LBVaV'nin 248 ve 249 Nolu Primer Çifti ile Yapılan RT-PCR Bandları

Çizelge 4.2. RT-PCR Testi Sonucu MiLBVV ve LBVaV ile İnfekteli Olduğu Saptanan Marul Bitkileri

| İlçe<br>Mahalle | Kod<br>Numarası | RT-PCR |       |        |       |
|-----------------|-----------------|--------|-------|--------|-------|
|                 |                 | Yaprak |       | Kök    |       |
|                 |                 | MiLBVV | LBVaV | MiLBVV | LBVaV |
| Haylazlı        | 1               | +      | -     | -      | -     |
| Haylazlı        | 3               | -      | +     | -      | -     |
| Haylazlı        | 5               | +      | +     | -      | -     |
| Haylazlı        | 6               | +      | +     | -      | -     |
| Haylazlı        | 7               | +      | -     | -      | -     |
| Haylazlı        | 8               | +      | -     | -      | -     |
| Haylazlı        | 9               | +      | +     | -      | -     |
| Haylazlı        | 10              | +      | -     | -      | -     |
| Haylazlı        | 11              | -      | +     | -      | -     |
| Haylazlı        | 12              | +      | +     | -      | -     |
| Haylazlı        | 14              | +      | -     | -      | -     |
| Haylazlı        | 15              | -      | +     | -      | -     |
| Zeytinbeli      | 23              | +      | -     | -      | -     |
| Abdioğlu        | 27              | -      | +     | -      | -     |
| Günyurdu        | 33              | +      | +     | -      | -     |
| Günyurdu        | 35              | +      | +     | -      | -     |
| Günyurdu        | 47              | -      | -     | +      | -     |

Çizelge 4.2'nin devamı

|               |           |           |           |           |          |
|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Günyurdu      | 48        | -         | -         | +         | -        |
| Günyurdu      | 54        | -         | -         | +         | +        |
| Büyükdikili   | 56        | -         | -         | +         | -        |
| Büyükdikili   | 60        | -         | -         | +         | +        |
| Büyükdikili   | 63        | -         | -         | +         | +        |
| Büyükdikili   | 69        | -         | -         | +         | -        |
| Büyükdikili   | 71        | -         | -         | +         | +        |
| Büyükdikili   | 72        | -         | -         | +         | -        |
| Büyükdikili   | 73        | -         | -         | +         | -        |
| Büyükdikili   | 76        | +         | -         | -         | -        |
| Büyükdikili   | 77        | +         | +         | -         | -        |
| Büyükdikili   | 78        | +         | +         | -         | -        |
| Büyükdikili   | 79        | +         | +         | -         | -        |
| Haylazlı      | 80        | +         | -         | -         | -        |
| Günyurdu      | 81        | +         | -         | -         | -        |
| Zeytinbeli    | 82        | +         | -         | -         | -        |
| Büyükdikili   | 83        | +         | -         | -         | -        |
| Abdioğlu      | 84        | +         | -         | -         | -        |
| <b>TOPLAM</b> | <b>35</b> | <b>21</b> | <b>13</b> | <b>10</b> | <b>4</b> |

RT-PCR testinin marul yapraklarından alınan sonuçlarına göre 85 örnekten 25 tanesinin LBVD etmenlerinden en az birisi ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir. MiLBVV ile infekteli 21, LBVaV ile infekteli 14 adet örneğin pozitif olduğu saptanmıştır. Ayrıca 9 örnekte, MiLBVV ve LBVaV'nin birlikte bulunarak, karışık enfeksiyona neden olduğu belirlenmiştir.

RT-PCR testinin marul köklerinden alınan sonuçlarına göre 85 örnekten MiLBVV ile infekteli 10, LBVaV ile infekteli 4 adet örneğin pozitif olduğu saptanmıştır ve LBVaV ile infekteli örnekler MiLBVV ile birlikte karışık enfeksiyon olarak belirlenmiştir.

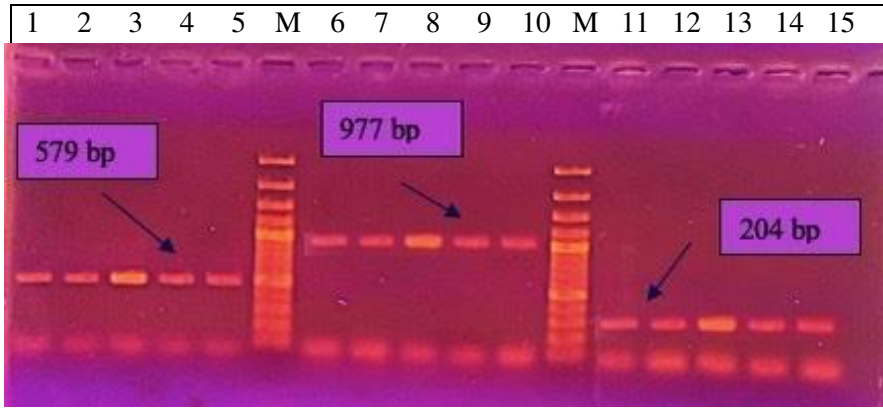
RT-PCR testi sonucunda köklerde varlığı saptanan MiLBVV ve LBVaV kesinlikle yapraklarda bulunmamaktadır. Bu durum etmenlerin henüz çoğalıp yapraklara kadar ulaşmadığını düşündürmektedir.

#### 4.3.3. DNA Ekstraksiyon Çalışmaları

DNA ekstraksiyon çalışmaları araziden alınan marul bitkileri ile taşıma denemeleri ve mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan 85 adet marul bitkisinin yaprak ve kökleri kullanılmıştır ve Nejat ve ark. (2009)'nın önerdiği yöntem modifiye edilerek, nükleik asitler elde edilmiş ve PCR işlemi sonrası PCR ürünleri % 1,5'luk ya da % 2'lik agaroz jel kullanılarak TAE tampon çözeltisinde elektroforez yöntemi ile bandlar elde edilmiştir.

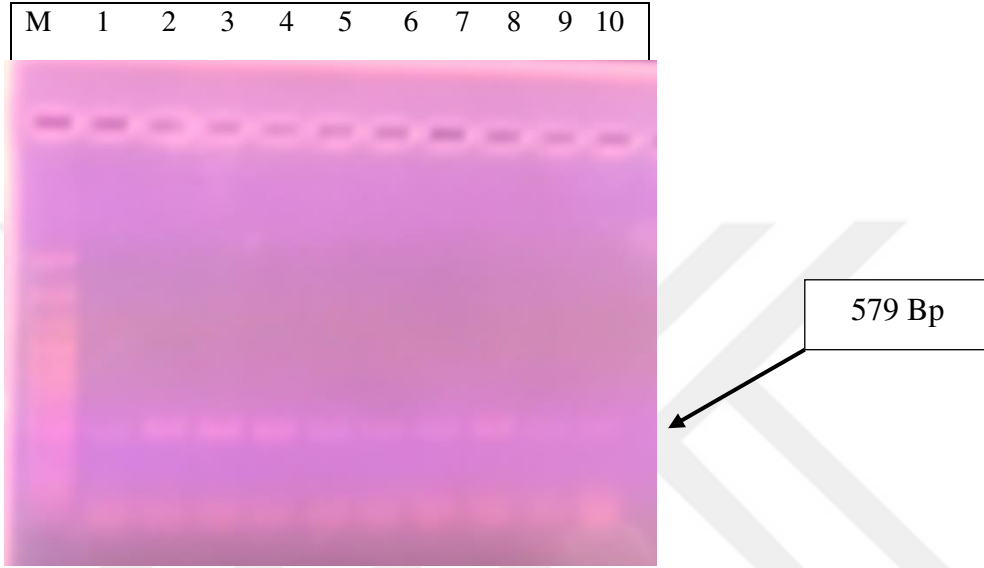
#### 4.3.4. PCR Çalışmaları

Bu tez çalışmasında, PCR yöntemi *Olpidium brassicae*, *Olpidium bornovanus* ve *Olpidium virulentus*'un moleküler karakterizasyonu amacıyla kullanılmıştır. 2019 yılında *O. brassicae*'ya özgü OLPbraF ve OLPR primer çifti ile Tarsus izolatlarından 204 bp; *O. bornovanus*'a özgü OLPborF ve OLPR primer çifti ile Seyhan ve Tarsus izolatlarından 977 bp; *O. virulentus*'a özgü OLPvirF ve OLPR primer çifti ile Seyhan, Tarsus, Yumurtalık ve Yüreğir'den toplanan marul izolatlarına ait 579 bp büyüklüğünde bandlar elde edilmiştir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. OLPvirF ve OLPR, OLPborF ve OLPR ve OLPbraF ve OLPR Primer Çiftleri ile Yapılan PCR Bandları

2021 yılında *O. virulentus*'a özgü OLPvirF ve OLPR primer çifti ile Tarsus'dan toplanan marul izolatlarına ait 579 bp büyüklüğünde bandlar elde edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. OLPvirF ve OLPR Primer Çiftleri ile Yapılan PCR Bandları

Çizelge 4.3. PCR Testi Sonucu *Olpidium bornovanus*, *Olpidium brassicae* ve *Olpidium virulentus* ile İnfekteli Olduğu Saptanan Marul Bitkileri

| İlçe<br>Mahalle | Kod<br>Numarası | PCR                            |                               |                                |
|-----------------|-----------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
|                 |                 | Kök                            |                               |                                |
|                 |                 | <i>Olpidium<br/>bornovanus</i> | <i>Olpidium<br/>brassicae</i> | <i>Olpidium<br/>virulentus</i> |
| Haylazlı        | 1               | -                              | -                             | +                              |
| Haylazlı        | 2               | -                              | -                             | +                              |
| Haylazlı        | 3               | -                              | -                             | +                              |
| Haylazlı        | 4               | -                              | -                             | +                              |
| Haylazlı        | 5               | -                              | -                             | +                              |
| Haylazlı        | 6               | -                              | -                             | +                              |
| Haylazlı        | 7               | -                              | -                             | +                              |
| Haylazlı        | 8               | -                              | -                             | +                              |
| Haylazlı        | 9               | -                              | -                             | +                              |
| Haylazlı        | 10              | -                              | -                             | +                              |
| Haylazlı        | 11              | -                              | -                             | +                              |
| Haylazlı        | 12              | -                              | -                             | +                              |
| Haylazlı        | 13              | -                              | -                             | +                              |
| Haylazlı        | 14              | -                              | -                             | +                              |
| Haylazlı        | 15              | -                              | -                             | +                              |
| Haylazlı        | 16              | -                              | -                             | +                              |
| Zeytinbeli      | 17              | -                              | -                             | +                              |
| Zeytinbeli      | 18              | -                              | -                             | +                              |
| Zeytinbeli      | 19              | -                              | -                             | +                              |
| Zeytinbeli      | 20              | -                              | -                             | +                              |
| Zeytinbeli      | 21              | -                              | -                             | +                              |
| Zeytinbeli      | 22              | -                              | -                             | +                              |
| Zeytinbeli      | 23              | -                              | -                             | +                              |
| Zeytinbeli      | 24              | -                              | -                             | +                              |
| Abdioğlu        | 27              | -                              | -                             | +                              |
| Abdioğlu        | 28              | -                              | -                             | +                              |
| Abdioğlu        | 29              | -                              | -                             | +                              |
| Abdioğlu        | 30              | -                              | -                             | +                              |
| Abdioğlu        | 31              | -                              | -                             | +                              |
| Abdioğlu        | 32              | -                              | -                             | +                              |
| Günyurdu        | 33              | -                              | -                             | +                              |
| Günyurdu        | 34              | -                              | -                             | +                              |
| Günyurdu        | 35              | -                              | -                             | +                              |
| Günyurdu        | 36              | -                              | -                             | +                              |

Çizelge 4.3'ün devamı

|             |    |   |   |   |
|-------------|----|---|---|---|
| Günyurdu    | 37 | - | - | + |
| Günyurdu    | 38 | - | - | + |
| Günyurdu    | 39 | - | - | + |
| Günyurdu    | 40 | - | - | + |
| Günyurdu    | 41 | - | - | + |
| Günyurdu    | 42 | - | - | + |
| Günyurdu    | 43 | - | - | + |
| Günyurdu    | 44 | - | - | + |
| Günyurdu    | 45 | - | - | + |
| Günyurdu    | 46 | - | - | + |
| Günyurdu    | 47 | + | + | + |
| Günyurdu    | 48 | + | + | + |
| Günyurdu    | 49 | - | - | + |
| Günyurdu    | 50 | + | + | + |
| Günyurdu    | 51 | - | - | + |
| Günyurdu    | 52 | - | + | + |
| Günyurdu    | 53 | - | - | + |
| Günyurdu    | 54 | - | + | + |
| Büyükdikili | 55 | - | - | + |
| Büyükdikili | 56 | - | - | + |
| Büyükdikili | 57 | - | - | + |
| Büyükdikili | 58 | - | - | + |
| Büyükdikili | 59 | - | - | + |
| Büyükdikili | 60 | + | - | + |
| Büyükdikili | 61 | - | - | + |
| Büyükdikili | 62 | - | - | + |
| Büyükdikili | 63 | + | - | + |
| Büyükdikili | 64 | - | - | + |
| Büyükdikili | 65 | - | - | + |
| Büyükdikili | 66 | - | - | + |
| Büyükdikili | 67 | - | - | + |
| Büyükdikili | 68 | - | - | + |
| Büyükdikili | 69 | + | - | + |
| Büyükdikili | 70 | - | - | + |
| Büyükdikili | 71 | + | - | + |
| Büyükdikili | 72 | + | - | + |
| Büyükdikili | 73 | + | - | + |
| Büyükdikili | 74 | + | - | + |

Çizelge 4.3'ün devamı

|               |           |           |          |           |
|---------------|-----------|-----------|----------|-----------|
| Büyükdikili   | 75        | -         | -        | +         |
| Büyükdikili   | 77        | -         | -        | +         |
| Haylazlı      | 80        | -         | -        | +         |
| Günyurdu      | 81        | -         | -        | +         |
| Zeytinbeli    | 82        | -         | -        | +         |
| Büyükdikili   | 83        | -         | -        | +         |
| Abdioğlu      | 84        | -         | -        | +         |
| <b>TOPLAM</b> | <b>79</b> | <b>10</b> | <b>5</b> | <b>79</b> |

PCR testinin marul köklerinden alınan sonuçlarına göre 85 örnekten 79 tanesinin *Olpidium* türlerinden en az birisi ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir. *Olpidium bornovanus* ile infekteli 10, *Olpidium brassicae* ile infekteli 5 ve *Olpidium virulentus* ile infekteli 79 adet örneğin pozitif olduğu saptanmıştır.

PCR testi sonuçlarına göre *O. virulentus* ve *O. brassicae*'nin 2, *O. virulentus* ve *O. brassicae*'nin 7 örnekte birlikte bulunarak, karışık enfeksiyona neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *O. virulentus*, *O. brassicae* ve *O. bornovanus*'un 3 adet örnekte bulunarak, karışık enfeksiyona neden olduğu tespit edilmiştir.

Yukarıda verilen bilgiler ışığında, Herrera-Vasquez ve ark. (2009)'nın gerçekleştirdiği çalışmanın aksine, *O. brassicae*'nin bitkilerde, diğer *Olpidium* türleri ile birlikte ortak enfeksiyon gerçekleştirdiği ortaya konmuştur.

ELISA, RT-PCR ve PCR testleri sonucunda Adana İli'nin Yüreğir, Seyhan ve Yumurtalık ilçelerinde ve Mersin İli'nin Tarsus ilçesinde LBVD ve *Olpidium* türlerine ait etmenlerden en az birinin bulunduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.4. DAS-ELISA, RT-PCR ve PCR Testleri Sonucunda Marul Örneklerinin Alındığı Bölgeler ve Saptanan Etmenler

| İL     | İLÇE       | MAHALLE     | VİRÜSLER |       | VEKTÖRLER           |                     |                    |
|--------|------------|-------------|----------|-------|---------------------|---------------------|--------------------|
| Adana  | Yüreğir    | Abdioğlu    | -        | LBVaV | <i>O.virulentus</i> |                     |                    |
|        | Seyhan     | Büyükdikili | MiLBVV   | LBVaV | <i>O.virulentus</i> | <i>O.bornovanus</i> |                    |
|        | Yumurtalık | Haylazlı    | MiLBVV   | LBVaV | <i>O.virulentus</i> |                     |                    |
|        |            | Zeytinbeli  | MiLBVV   | -     | <i>O.virulentus</i> |                     |                    |
| Mersin | Tarsus     | Günyurdu    | MiLBVV   | LBVaV | <i>O.virulentus</i> | <i>O.bornovanus</i> | <i>O.brassicae</i> |

ELISA, RT-PCR ve PCR testleri sonucunda örneklerin toplandığı bölgelerin tamamında *O.virulentus* saptanmıştır ve LBVD etmenlerinden en az birinin varlığı tespit edilmiştir.

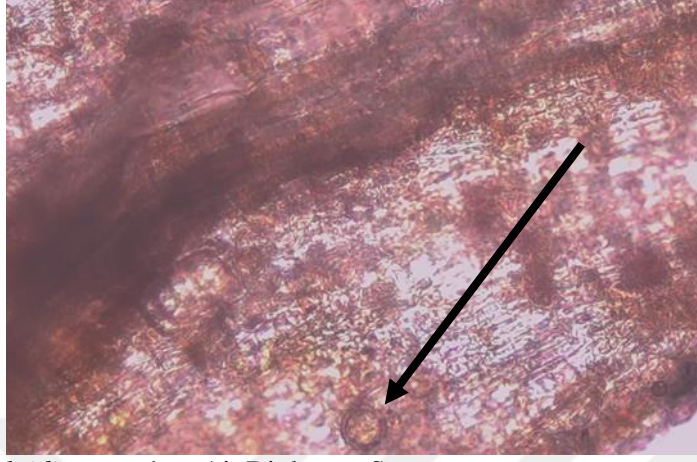
Bu çalışma; Fry (1958)'ın Yeni Zellanda'da yapmış olduğu, iri damar infekteli marul bitkilerinin köklerinde *Olpidium spp.*'nin var olduğunu ancak iri damar simptomsu göstermeyen marul köklerinde ise *Olpidium spp.*'nin bulunmadığını bildirdiği araştırmanın aksine, marul bitkilerinin köklerinde LBVD etmenlerinin varlığından bağımsız olarak *Olpidium spp.*'den en az birinin varlığına rastlanıldığını ortaya çıkarmıştır.

Yürütülen bu çalışma, Herrera-Vasquez (2009)'in Multiplex PCR yöntemleri ve morfolojik teşhisi yöntemleri, Maccarone (2010)'un PCR tekniklerini kullanarak iri damarları taşıyan vektörün *O. virulentus* olduğunu ve Nomiya ve ark. (2012)'nin *Olpidium virulentus*'a karşı spesifik antiserumları kullanarak tespit ettiği çalışmalarla paralel olarak gerçekleşmiştir.

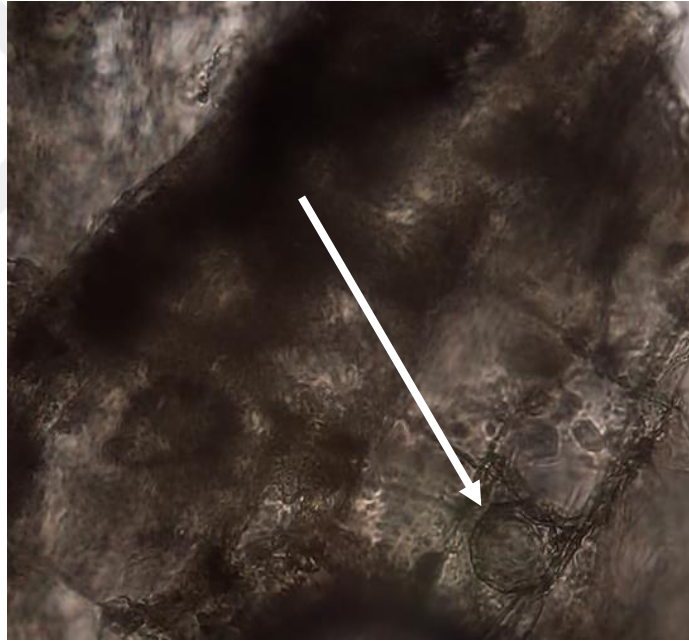
#### 4.3.5. Işık Mikroskobu ile *Olpidium spp.*'nin Belirlenmesi Çalışmaları

Yapılan uygulamalar sonucunda elde edilen marul kök örnekleri % 0.1 asit fuksin içeren laktogliserin çözeltisi ile muamele edilmiştir.

Her köke ait 10 parça alınarak (yaklaşık 1 cm uzunluğunda), alev ile fiske edilmiş lam üzerine yerleştirilmiş ve ışık mikroskobu altında vektör *O. brassicae*'nin, *O. bornovanus*'un ve *O. virulentus*'un dinlenme spor kümeleri araştırılmıştır (Şekil 4.9; Şekil 4.10).



Şekil 4.9. *Olpidium spp.*' ye Ait Dinlenme Sporu



Şekil 4.10. *Olpidium spp.*' ye Ait Dinlenme Sporu

**4.3.6. Taşınma Çalışmaları****4.3.6.1 Virüslerin Mekanik İnokülasyon ile Taşınma Çalışmaları**

Mekanik inoküsyon çalışmalarında marul bitkilerinin yaprak ve kökleri DAS-ELISA ve RT-PCR ile testlenmiştir ve örneklerin tamamı MiBVV ve LBVaV için negatif sonuç vermiştir.

**4.3.6.2. Virüslerin *Olpidium spp.* ile Taşınma Çalışmaları**

Taşınma denemelerinin yapıldığı marul bitkilerinin yaprak ve kökleri DAS-ELISA ve RT-PCR ile testlenmiştir ve örneklerin tamamı *Olpidium bornovanus*, *Olpidium brassicae* ve *Olpidium virulentus* için negatif sonuç vermiştir.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Marul bitkisi ülkemizde; sağlıklı beslenme açısından ve üreticiye ekonomik getirisinden dolayı oldukça önemli bir konuma gelmiştir. Marul yetiştiriciliği; Adana ve Mersin İlleri'nde uzun zamandır geniş alanlarda yapılmakta olup üreticilere ticari olarak önemli kazançlar sağlarken ne yazık ki önemli hastalık ve zararlıları da ev sahipliği yapmıştır ve bu durum çok ciddi ekonomik kayıplara neden olmuştur. Mevcut olan marul hastalıklarının içerisinde en önemli sıraya kimyasal mücadelesi olmayan viral hastalıklar yerleşmiştir. Bu viral hastalıklar içerisinde LBVD çok önemli bir yere sahiptir ve toprakta uzun yıllar varlığını koruyabilen *Olpidium spp.* ile taşınabilmesi hastalığın kısa sürede geniş alanlara yayılmasını ve mücadelenin neredeyse imkansız hale gelmesini sağlamaktadır.

Surveyler bu tez çalışması için 2018 yılı sonbahar ve kış aylarında ön araştırma şeklinde yapılmış olup, çalışmalar 2021 sonbahar kış aylarına kadar ana materyalleri toplamak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Yaprak, kök ve kök bölgesindeki topraklar ile bütün olarak toplanan marullar MiLBVV, LBVaV, *O. brassicae*'nin, *O. bornovanus*'un ve *O. virulentus* etmenlerine karşı serolojik (DAS-ELISA) ve moleküler (RT-PCR) yöntemler ile testlenmiş ve elde edilen izolatların moleküler karakterizasyonu yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında saptanan sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Toplanan örneklerde gerek MiLBVV gerek LBVaV ve gerekse MiLBVV + LBVaV'nin birlikte bulunduğu (karışık) enfeksiyon saptanmıştır ve arazide gözlenen semptomlara bu etmenlerin neden olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda *Olpidium spp.*'nin en az birine rastlanması viral etmenlerin *Olpidium spp.* ile taşındığını ispatlamaktadır.

2. Yapılan çalışmalarda, her iki virüsün varlığında, yalnızca birinin varlığında ya da virüslerin bulunmadığı bitkilerde *Olpidium spp.*'dan en az birine rastlanmıştır.
3. Bugüne kadar literatürde bildirilen çalışmaların aksine her üç *Olpidium spp.* de birlikte vektör olarak görev aldığı ortaya çıkarken, *O. brassicae* da in vivo edinimde diğer iki *Olpidium* türüyle birlikte virüsleri taşımıştır.

*Olpidium* tarafından iletilen virüslerin yapısını ve işlevini anlamadaki yeni bulgular, bunların vektörleri ve etkinlikleri konusunda yapılacak yeni çalışmalar şüphesiz bu virüslerin neden olduğu hastalıkları kontrol etme stratejilerinin ortaya konmasına yardımcı olacaktır. Virüs ve vektör arasındaki etkileşimin özellikleri, özellikle vektörlerin virüsü nasıl edindiği ve ilettiği hakkında ne yazık ki hala bilgi eksikliği vardır. Bu süreci daha iyi anlamak için vektörler üzerinde daha fazla araştırmanın yapılmasına ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

- Adams MJ. 1991. Transmission of plant viruses by fungi. *Ann. Appl. Biol.* 118: 479–92
- Adams MJ. 2002. Fungi. *Adv. Bot. Res.* 36:47–64
- Alan, B. 2012. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Yetiştirilen Bazı Kışlık Sebzelerde Hastalık Yapan Virüslerin Tanılanması ve Karakterizasyonu. Çukurova Üniv. Fen Bil. Enst. Bitki Koruma Anabilim Dalı Doktora Tezi, Adana.
- Alemzadeh, E., Izadpanah, K., 2012. Occurrence and Partial Characterization of Lettuce big vein associated virus and Mirafiori lettuce big vein virus in Lettuce in Iran. *Springer*, 23(3):354-358.
- Allen, M. W. 1948. Relation of soil fumigation, nematodes, and inoculation technique to big vein disease of lettuce. *Phytopathology* 38:612- 628.
- AL-Saleh, M.A., AL-Shahwan, I.M., Amer, M.A., Shakeel, M.T., Umar, M., Abdala, D.A., Efthimiou, C.E., Katis, N.I. 2015. First reports of Lettuce big- vein associated Virus and Mirafiori lettuce big-vein virus infecting lettuce in Saudi Arabia. *New Disease Reports*, 31,2.
- Anonim. 2020a. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). Web sitesi: <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=Tarim-111> Son erişim tarihi: Haziran 2021.
- Anonim. 2020b. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). Web sitesi: <https://web.tuik.gov.tr/tr/classification-categories/sub-categories-sub-components/> Son erişim tarihi: Haziran 2021.
- Anonymous. 2020. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Web sitesi: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> Son erişim tarihi: Haziran 2021.

- Araya, C., Pena, E., Salazar, E., Roman, L., Medina, C., Mora, R., Aljaro, A., Rosales, I.M., 2011. Symptom Severity and Viral Protein or RNA Accumulation in Lettuce Affected by Big-Vein Disease. Chilean Journal of Agricultural Research, 71(1):63-72.
- Astruc, N., Marcos, J.F., Macquarie, G., Candresse, G.T., and Vicent, P., 1996. Studies on the Diagnosis of Hop stunt viroid in Fruit Trees: Identification of New Host and Application of a Nucleic Acid Extraction Procedure Based on Non-Organic Solvents. European Journal of Plant Pathology, 102:837-846.
- Aybak, H. Ç., 2002. Salata/marul yetiştiriciliği, Hasad Yayıncılık Ltd. Şti. İstanbul.
- Barr DJS. 1968. A new species of *Olpidium* parasitic on cucumber roots. Can. J. Bot. 46:1087–91 33
- Barr DJS. 1980. An outline for the reclassification of the Chytridiales, and for a new order, the Spizellomycetales. Can. J. Bot. 58:2380–94
- Baytop, T. Türkiye’de bitkiler ile tedavi geçmişte ve bugün İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul. (1999), 289.
- Braselton JP. 1988. Karyology and systematics of Plasmodiophoromycetes. See Ref. 27a, pp. 139–52
- Braselton JP. 1995. Current status of the plasmodiophorids. Crit. Rev. Microbiol. 21:263–75
- Bulman SR, Kuhn SF, Marshall JW, Schnepf E. 2001. A phylogenetic analysis of the SSU rRNA from members of the Plasmodiophora and Phagomyxida. Protist 152:43–51.
- Campbell, R. N. 1962. Relationship between the lettuce big-vein virus and its vector, *Olpidium brassicae*. Nature (Lond.) 195:675-677.
- Campbell, R.N., Grogan, R.G., 1963. Big-Vein virus of lettuce and its transmission by *Olpidium brassicae*. Phytopathology 53, 252e259.

- Campbell RN, Fry PR. 1966. The nature of the associations between *Olpidium brassicae* and Lettuce big-vein and Tobacco necrosis viruses. *Virology* 29:222–33
- Campbell, R. N. 1985. Longevity of *Olpidium brassicae* in air-dry soil and the persistence of the lettuce big-vein agent. *Can. J. Bot.* 63:2288-2289.
- Campbell RN, Sim ST, 1994. Host specificity and nomenclature of *Olpidium bornovanus* (1/4*Olpidium radicale*) and comparisons to *Olpidium brassicae*. *Canadian Journal of Botany* 72: 1136–1143.
- Campbell RN, Sim ST, Lecoq H. 1995. Virus transmission by host specific strains of *Olpidium bornovanus* and *Olpidium brassicae*. *Eur. J. Plant Pathol.* 101:273– 82
- Campbell, R. N. 1996. Fungal transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:87-108.
- Candresse T, Lot H, German-Retana S, Krause- Sakate R, Thomas J, Souche S, Delaunay T, Lanneau M, LeGall O., 2007. Analysis of the serological variability of Lettuce mosaic virus using monoclonal antibodies and surface plasmon resonance technology. *Journal of General Virology*, 88: 2605- - 2610.
- Chaudry MA, Bibi N, Khan M, Khan M, Badshah A, Qureshi MJ. Irradiation treatment of minimally processed carrots for ensuring microbiological safety. *Radiation Physics and Chemistry* 2004; 71: 169–173.
- Chen JP, Swaby AG, Adams MJ, Yili R. 1991. Barley mild mosaic virus inside its fungal vector, *Polymyxa graminis*. *Ann. Appl. Biol.* 118:615–21
- Clark, M.F. And Adams, A.N., 1977. Characteristics Of The Microplate Method Of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay For The Detection Of Plant Viruses. *Journal Of General Virology* 34: 475 483.
- Çelikel G., Tunar M., Gap Sonbahar ve İlkbahar yetiştiriciliğine uygun baş salata ve marul çeşitlerinin belirlenmesi. 1. Sebze Tarımı sempozyumu kitabı, 1996, 74-78.

- Dick MW. 2001. Straminopilous Fungi: Systematics of the Peronosporomycetes Including Accounts of the Marine Straminopilous Protists, the Plasmodiophorids and Similar Organisms. Dordrecht: Kluwer. 670 pp.
- Dillingen, B.J., 1956. Handbuch des Gesamten Gemüsebaues Paul Parey in Berlin und Hamburg.
- Dorais M, Papadopoulos A P & Gosselin A (2001). Influence of electric conductivity management on greenhouse tomato yield and fruit quality. Agronomic 21:367-383
- Driskel B, Verchot-Lubicz J. 2003. Interactions between *Soilborne wheat mosaic virus* and its vector *Polymyxa graminis* may involve the viral movement protein. *Am. Soc. Virol. Annu. Meet., Univ. Calif. Davis, 22nd.* (Abstr.)
- Dubois F, Sangwan RS, Sangwan Norreel BS. 1994. Immunogold labelling and electron microscopic screening of Beet necrotic yellow vein virus in the fungus *Polymyxa betae* infecting *Beta vulgaris* root cortical parenchyma cell. *Int. J. Plant Sci.* 155:545–52
- Erkan, S., Gümüř, M., Paylan, İ.C., Duman, İ., and Ergün, M., 2013. Ege Üniv. Ziraat Fakültesi Derg., 50(3):311-322.
- Eşiyok, D., Özen ř. ve Özzambak E., 1996. Salata Marul Çeřitlerinde Dikim Mesafesinin Verim ve Kaliteye Etkisi Üzerinde Bir Araştırma. Gap 1. Sebze Tarımı Sempozyumu, S: 79-83
- Eşiyok, D., 2012. Kışlık ve Yazlık Sebze Yetiştiriciliği. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, 404s, İzmir.
- Falk BW. 1997. Lettuce big-vein. In *Compendium of Lettuce Disease*, ed. RM Davis, KV Subbarao, RN Raid, EA Kurtz, pp. 41–42. St. Paul, MN: APS Press
- Fletcher, J.D., France, C.M., and Butler, R.C., 2005. Virus Surveys of Lettuce Crops and Management of Lettuce Big-Vein Disease in New Zealand. *NewZealand Plant Protection*, 58:239-244.

- Fry, P. R. 1958. The Relationship of *Olpidium Brassicae* (Wor.) Dang. To The Big- Vein Disease of Lettuce. Plant Diseases. New Zealand Journal of Agricultural Research, 1:3, 301-304.
- Fry, P. R., and Campbell, R. N. 1966. Transmission of *Tobacco necrosis virus* by *Olpidium brassicae*. Virology 30:517-527.
- Fulton, T., Chunwongse, J., Tanksley, S.D., (2007). Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. Plant Molecular Biology Reporter, 13, 207-209.
- Gallitelli, D., and Minafra, A., 1994. Electroforesis. Course on Plant Virus Diagnosis, 15 30 October 1994. Adana-Turkey. Page:89-99.
- Grogan, R. G., Zink, F. W., Hewitt, W. B., and Kimble, K. A. 1958. The association of *Olpidium* with the big-vein disease of lettuce. Phytopathology 48:292-296.
- Günay, A., 1992. Özel Sebze Yetiştiriciliği, Cilt:II. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, S:92, Ankara.
- Günay, A., 2005. Sebze Yetiştiriciliği. Cilt 2., İzmir.
- Haeske, E., 1950. Untersuchungen über das Blattnervenmosaik des Salats, Thesis Justus Liebig Universitat. Gießen, p. 86.
- Hayes, R. J., Wintermantel, W. M., Nicely, P.A., Ryder, E. J. 2006. Host Resistance to Mirafiori lettuce big-vein virus and Lettuce big-vein associated virus and Virus Sequence Diversity and Frequency in California, Plant Disease, 90:233-239.
- Herrera-Vasquez, J. A., Cebrian, M. C., Alfaro-Fernandez, A., Cordoba- Selles, M. C., and Jorda, C. 2009. Multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Olpidium bornovanus*, *Olpidium brassicae* and *Olpidium virulentus*. Mycol. Res. 113:602-610.
- Hiruki, C., 1964. Mechanical transmission of tobacco stunt virus. Virology 23, 288e290.

- Hiruki, C., 1965. Transmission of tobacco stunt virus by *Olpidium brassicae*. *Virology* 25, 541e549.
- Huijberts, N., Blystad, D. R., and Bos, L. 1990. *Lettuce big-vein virus*: Mechanical transmission and relationships to *tobacco stunt virus*. *Ann. Appl. Biol.* 116:463-475.
- Jagger, I. C., and Chandler, N. 1934. Big vein, a disease of lettuce. *Phytopathology* 24:1253-1256.
- Kakani K, Reade R, Rochon D. 2004. Evidence that vector transmission of a plant virus requires conformational change in virus particles. *J. Mol. Biol.* In press
- Kamberoğlu, M. and Alan B., 2011. Occurrence of Tomato Spotted Wilt Virus in Lettuce in Çukurova Region of Turkey. *Int. J. Agric. Biol.*, 13(3): 431–434.
- Kanyuka K, Ward E, Adams MJ. 2003. *Polymyxa graminis* and the cereal viruses it transmits: a research challenge. *Mol. Plant Pathol.* 4:393–406
- Koganezawa H, Takayama T, Sasaya T (2004) Difference in resting- spore formation between crucifer and noncrucifer strains of *Olpidium brassicae* sensu lato (in Japanese). *Jpn J Phytopathol* 70:307–313
- Koganezawa H, Inoue H, Sasaya T (2005) Host specificity and multiplication of eight isolates of *Olpidium brassicae* sensu lato and its related *Olpidium* sp. *Bull Natl Agric Res Cent West Reg* 4:39–59
- Kuwata S, Kubo S, Yamashita S, Doi Y, 1983. Rod-shaped particles, a probable entity of lettuce big vein virus. *Annals of Phytopathological Society of Japan* 49: 246-251.
- Lot H, Campbell, RN, Souche S, Milne, RG, Roggero P. 2002. Transmission by *Olpidium brassicae* of *Mirafiori lettuce virus* and *Lettuce big-vein virus*, and their roles in Lettuce Big-Vein etiology. *Phytopathology* 92:288–293.

- Maccarone, L. D., Barbetti, M. J., Sivasithamparam, K., and Jones, R. A. C. 2010. Molecular genetic characterization of *Olpidium virulentus* isolates associated with big-vein diseased lettuce plants. *Plant Diseases*. 94:563-569.
- Moreno, A., De Blas C., Biurrun R., Nebreda M., Palacios I., Duque M. and Fereres A., 2004. The incidence and distribution of viruses infecting lettuce, cultivated Brassica and associated natural vegetation in Spain. *Annl. Appl. Biol*, 144: 339–346.
- Nomiyama, K., Osaki, H., Sasaya, T. and Ishikawa, K., 2012. Preparation and characterization of polyclonal antibody against resting spores of *Olpidium virulentus*, fungal vector of lettuce big-vein disease. *Genereal Plant Pathology* 79:64–68.
- Pavan, M.A., Krause-Sakate, R., Silva, N., Zerbini, F.M., Gall, O.L. 2008. Virus Diseases of Lettuce in Brazil. *Plant Viruses*. M. Pavan (corresponding author), Plant Viruses, Global Science Books, Viçosa, pp.35-40.
- Peirce, L.C., 1987. *Vegetables (Characteristics, Production, Marketing)*. John Wiley and Sons Inc. USA. 433 p.
- Polat, E., Sönmez, S., Demir, H. ve Kaplan, M., 2001. Farklı Organik Gübre Uygulamalarının Marulda Verim, Kalite ve Bitki Besin Maddeleri Alımına Etkileri. *Türkiye 2. Ekolojik Tarım Sempozyumu*, 14-16 Kasım 2001, Antalya, s. 69-77.
- Robbins MA. 2000. Molecular interactions between cucumber necrosis virus and zoospores of its fungal vector, *Olpidium bornovianus*. PhD thesis, Dep. Plant Sci., Univ. B.C., Vancouver
- Roggero, P., Ciufffo, M., Vaira, A. M., Accotto, G. P., Masenga, V., and Milne, R. G. 2000. An ophiovirus isolated from lettuce with bigvein symptoms. *Arch. Virol*. 145:2629-2642.

- Rosello, S., Diez M.J., Nuez F., 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. I. The Tomato spotted wilt virus-a review. *Scientia Horticulturae*, 67: 117-150.
- Ryder EJ, 1980. Studies on sources and nature of big vein resistance in lettuce and progress in breeding resistant cultivars. In *Proceedings of Eucarpia Meeting on Leafy Vegetables* (Maxon Smith JW, Langton FA, eds), 78-85. Glasshouse Crop Research Institute, Littlehampton, UK.
- Rysanek P, Stocky G, Haeberle AM, Putz C. 1992. Immunogold labelling of Beet necrotic yellow vein virus particles inside its fungal vector, *Polymyxa betae*. *Agronomy* 12:651-59.
- Sahtiyanci, S., (1962) Studien über einige wurzelparasitäre Olpidiaceen. *Arch Mikrobiol* 41:187-228.
- Santamaria, P., (2006). Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86:1071.
- Sasaya, T., and Koganezawa, H. 2006. Molecular analysis and virus transmission tests place *Olpidium virulentus*, a vector of Mirafiori lettuce big-vein virus and Tobacco stunt virus, as a distinct species rather than a strain of *Olpidium brassicae*. *J. Gen. Plant Pathol.* 72:20-25.
- Sasaya, T., Fujii, H., Ishikawa, K., and Koganezawa, H. 2008. Further evidence of *Mirafiori lettuce big-vein virus* but not of *Lettuce big-vein associated virus* with big-vein disease in lettuce. *Phytopathology* 98:464-468.
- Sertkaya, G., 2012. Hatay İli Marul Alanlarında Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV)'nin Araştırılması. 9. Ulusal Sebze Tarımı Sempozyumu-Konya: 484-487.
- Sertkaya, G., 2015. Hatay İli Marul ve Ispanak Alanlarında Bazı Virüslerin Araştırılması. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20(1):7-12.

- Soundy, P., Botha, C. C., Crispheat Lettuce ( *Lactuca sativa* L.) Cultivar Evaluation and Response of Transplants to Nitrogen Nutrition, Master Thesis, University of Pretoria etd-Madzivhandila, L L-R (2005).
- Splittstoesser, W.E., 1990. Vegetable Growing Handbook. Printed in United States of America, New York. 362 p.
- Stobbs LW, Cross GW, Manocha MS. 1982. Transmission of Cucumber necrosis virus by *Ospidium radicale* zoospores. Can. J. Plant Pathol. 4:134–42.
- Şalk, A., Arın, L., Deveci M., Polat S. 2008. “Özel Sebzecilik”. Tekirdağ, 485s.
- Şalk A, Arın L, Deveci M, Polat S (2008). Özel Sebzecilik. Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 488 s Tekirdağ.
- Teakle, D.S., 1962. Transmission of tobacco necrosis virus by a fungus, *Ospidium brassicae*. Virology 18, 224e231.
- Temminck, J.H.M., Campbell, R.N., Smith, P.R., (1970) Specificity and site of in vitro acquisition of tobacco necrosis virus by zoospores of *Ospidium brassicae*. J Gen Virol 9:210–213.
- Temminck, J.H.M., 1971. An ultrastructural study of *Ospidium brassicae* and its transmission of *Tobacco necrosis virus*. Meded. Landbouwhogeschool Wageningen 71:1–135.
- Tomlinson, J.A., Garrett, R.G., 1962. Role of *Ospidium* in the transmission of big vein disease of lettuce. Nature 194, 249e250.
- Tomlinson, J. A., and Garrett, R. G. 1964. Studies on the lettuce big-vein virus and its vector *Ospidium brassicae* (Wor.) Dang. Ann. Appl. Biol. 54:45-61.
- Vetten, H.J., Lesemann, D.E., Dalchow, J., 1987. Electron microscopical and serological detection of virus-like particles associated with Lettuce big-vein disease. J. Phytopathol. 120:53–59.
- Vural, H., Eşiyok, D., Duman, İ., 2000. Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme). Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Bornova, İzmir, 440 s.

- Walsh, J.A., 1992. Catching up with big vein. *Grower* December 3, 11-15.
- Ward, E., Adams, M.J., 1998. Analysis of ribosomal DNA sequences of Polymyxa species and related fungi and the development of genus- and species-specific primers. *Mycol. Res.* 102:965–74.
- Ware, G.W., McCollum, J.P., 1975. Producing vegetable Crops. The Interstate Printer and Publihers, Inc, USA, 599 p.
- Yardımcı, N., 2013. Bitki Virolojisi. Hasad Yayıncılık Ltd. Şti., İstanbul, 120 s
- Yılmaz, M. A., Baloğlu, S., Özaslan, M. ve Güldür, M. E., 1995. GAP Bölgesinde Kültür Bitkilerinde Belirlenen Virüsler. GAP Bitki Koruma Sorunları ve Çözüm Önerileri Sempozyumu, 27-29 Nisan-Şanlıurfa:241- 250.
- Yücel PK, Halkman HBD. Minimal İşlem Görmüş Meyve ve Sebzelerin İşılama ile Kalitesinin Arttırılması, X. Ulusal Nükleer Bilimler ve Teknolojileri Kongresi 2009; 291-301.

## ÖZGEÇMİŞ

İlk ve orta öğrenimini Adana’da tamamladı. Lise eğitimini Adana Erkek Lisesi (YDA)’nde 2006 yılında tamamladı. 2007 yılında Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma bölümünü kazandı. 2012 yılında ziraat mühendisi olarak mezun oldu. 2017 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Bitki virolojisi alanında yapmış olduğu yüksek lisans eğitimini, 2017-2021 yılları arasında yapmış olduğu tez çalışması ile tamamladı.





# **EKLER**



## Ek 1. ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

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

|       |                                                            |
|-------|------------------------------------------------------------|
| 8.0 g | NaCl                                                       |
| 0.2 g | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                            |
| 2.9 g | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O veya  |
|       | 2.3 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O  |
|       | 1.44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O |
|       | 1.15 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                    |
| 0.2 g | KCl                                                        |
| 0.2 g | NaN <sub>3</sub>                                           |

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

### 2. Coating Buffer Ph 9.6 (Kaplama Tampon Çözeltisi)

|        |                                 |
|--------|---------------------------------|
| 2.93 g | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> |
| 2.94 g | NaHCO <sub>3</sub>              |
| 0.2 g  | NaN <sub>3</sub>                |

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

### 3. Washing Buffer (Yıkama Tampon Çözeltisi)

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

### 4. Sample Extraction Buffer (Örnek tampon çözeltisi)

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

### 5. Enzyme Conjugate Buffer (Konjugat Tampon Çözeltisi)

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

### 6. Substrat Buffer Ph 9.8 (Substrat Tampon Çözeltisi)

97 ml Diethanolamine 800 ml saf su içerisine ilave edilmiş ve 0.2 g NaN<sub>3</sub> konarak Ph 9.8'e ayarlanmış ve 1 litreye tamamlanmıştır.

## **Ek 2. Total RNA Analizlerinde Kullanılan Solüsyonlar**

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

Tris-HCl 2.4228 g

EDTA 3.7224

NaCl 5.844 g

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

### **% 20 Sodium Dodecyl Sülfate (SDS)**

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

### **Potassium asetat ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) (5M)**

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

### **Sodium asetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) (3M)**

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

### **% 70 lik Ethanol**

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

### **Ek 3. Agaroz Jel Elektroforezde Kullanılan Tampon Çözeltiler**

#### **1. TBE Buffer (89 mM Tris, 89 mM borik asit, 2 mM EDTA) (pH:8,3)**

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

#### **2. TAE Buffer (10 mM Tris, 5 mM Sodium acetate, 0,5 mM EDTA) (pH:8,3)**

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

#### **3. Etidyum Bromid**

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