



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**AMASYA VE TOKAT İLLERİNDE MARUL EKİM ALANLARINDA
GÖRÜLEN BAZI VİRÜS HASTALIKLARININ MOLEKÜLER
OLARAK BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elif Ayça ŞAHİN

Danışman: Doç. Dr. Şerife TOPKAYA

TOKAT- 2025



Bu tez çalışması;

Bilimsel Araştırmalar Proje Merkezi tarafından 2023/03 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Şerife TOPKAYA danıŐmanlıđında hazırlamıŐ olduğum “Amasya ve tokat illerinde marul ekim alanlarında görölen bazı virüs hastalıklarının moleküler olarak belirlenmesi” adlı Yüksek Lisans tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

28/11/2024

Elif Ayça ŞAHİN

JÜRİ KABUL VE ONAY



TEŞEKKÜR

Öncelikle, çalıőmalarımın her aşamasında yardımını ve desteğini benden esirgemeyen ve yardımcı olan danışman hocam sayın Doç. Dr. Şerife TOPKAYA'ya (Gaziosmanpaşa Üniversitesi-Bitki Koruma Anabilim Dalı) teőekkürlerimi sunarım.

Sevgili dostum ve çalışma arkadaőım Nurselin YILMAZ'a, yüksek lisans eğitimi sürecinde gerekli olan izinleri sağlayan Prof.Dr. Yusuf YANAR hocama teşekkür ederim.

Ayrıca tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisans öğrenimim süresince de beni hep destekleyen, her türlü fedakârlıkta bulunan, maddi ve manevi her zaman yanımda olan babam Eftal ALTUNYAY ve annem Selime ALTUNYAY'a her konuda nazımı çeken ablam Esin ağla SİRKECİOğLU'na ve eőim Ozan ŞAHİN 'e sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

ELİF AYÇA ŞAHİN
2025

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ETİK SÖZLEŞME	i
JÜRİ KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETİ	8
2.1.Dünya’da yapılan çalışmalar	8
2.2. Türkiye’de yapılan çalışmalar	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM	12
3.1. Bitki materyalinin temini ve örnekleme yöntemi	12
3.2. DAS-ELISA yöntemi.....	13
3.3. RNA izolasyonu	14
3.4. Tamamlayıcı DNA.....	14
3.5. PCR çalışmaları	15
3.6. Agaroz jel elektroforez çalışması	17
3.7. Filogenetik analiz çalışmaları	17
3.8. Virüs vektörü Olpidium spp. bitki köklerinin belirlenmesi.....	17
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI	18
4.1. Örnekleme sonuçları	18
4.2. DAS-ELISA sonuçları	20
4.2.1. Tokat ili Niksar ilçesinden alınan örneklerin DAS-ELISA sonuçları	21
4.2.2. Tokat ili Erbaa ilçesinden alınan örneklerin DAS-ELISA sonuçları.....	22
4.2.3. Tokat ili Merkezinden alınan örneklerin DAS-ELISA sonuçları	23
4.2.4. Amasya ilinden alınan örneklerin DAS-ELISA sonuçları.....	24
4.3.RT-PCR sonuçları.....	28
4.4. Filogenetik analiz sonuçları	27
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	30
6. KAYNAKÇA.....	32
7. ÖZGEÇMİŞ	37

ÖZET

AMASYA ve TOKAT İLLERİNDEKİ MARUL EKİM ALANLARINDA GÖRÜLEN BAZI VİRÜS HASTALIKLARININ MOLEKÜLER OLARAK BELİRLENMESİ

Şahin, Elif Ayça

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Şerife TOPKAYA

Ocak 2025, ix + 48 sayfa

2022-2024 yılları arasında Tokat ve Amasya illerinde yapılan bu çalışmada, marul yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Amasya Merkez, Tokat Merkez ve Tokat'ın Erbaa ve Niksar ilçelerindeki bazı marul alanlarında virüs belirtisi gösteren bitkilerin genç yapraklarından bitki örnekleri toplanmıştır. Toplanan 191 adet marul örneği Cucumber mosaic virus (CMV), Lettuce mosaic virus (LMV), Mirafiori lettuce big vein virus (MiLBVV) virüslerinin varlığını tespit etmek amacıyla, virüslere spesifik serolojik testler ile DAS-ELISA testine tabi tutulmuştur. DAS-ELISA sonucu pozitif çıkan örneklerden virüslere spesifik primerler kullanılarak moleküler bir yöntem olan RT-PCR ile virüslerin varlığı ortaya konulmuştur. DAS ELISA sonucu testlenen örneklerden %13.6 CMV ve %14.6 MiLBVV etmenleri tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: CMV, LMV, MiLBVV, DAS-ELISA, RT-PCR

ABSTRACT
**MOLECULAR DETERMINATION OF SOME VIRAL DISEASES OBSERVED IN
LETTUCE FIELDS IN AMASYA AND TOKAT PROVINCES**

Şahin, Elif Ayça
Master's Thesis, Division of Curriculum and Instruction
Advisor: Assoc.Prof.Dr. Şerife Topkaya
January 2025, ix + 48 pages

In this study, conducted in Tokat and Amasya provinces between 2022 and 2024, plant samples were collected from the young leaves of plants showing virus symptoms in some lettuce areas in Amasya Center, Tokat Center and Erbaa and Niksar districts of Tokat, where lettuce is grown intensively. 191 lettuce samples collected were subjected to DAS-ELISA and RT-PCR tests, which are molecular methods using virus-specific primers, in order to detect the presence of Cucumber mosaic virus (CMV), Lettuce mosaic virus (LMV), Mirafiori lettuce big vein virus (MiLBVV) viruses. As a result of DAS ELISA, 13.6% CMV and 14.6% MiLBVV factors were detected from the samples tested.

KEYWORDS: LMV, CMV, MiLBVV, DAS-ELISA, RT-PCR

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

%: Yüzde

°C: Santigrat derece

µl: Mikrolitre

da: Dekar

dk: Dakika

g: Gram

ml: Mililitre

mg: Miligram

nm: Nanometre

V: Volt

Rpm: Dakikadaki devir

M: Molar

KISALTMALAR

bp: Baz çifti

cDNA: Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit

dNTP: Deoksiribonükleotid trifosfat

DNA: Deoksiribonükleik asit

RNA: Ribonükleik asit

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

MiLBVV: Mirafiori lettuçe big vein virus

CMV: Cucumber mosaic virus

LMV: Lettuçe mosaic virus

TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu

UV: Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. MiLBVV ile enfekteli bitkilerin mikroskopta incelenmeden önceki hali	17
Şekil 2. Marul kılcal köklerinde asit-fuksin lakto fenol çözeltisi ile boyanmış Olpidium pp.sporları.....	19
Şekil 3. Marul kılcal köklerinde Olpidium spp.'nin spor yapıları	19
Şekil 4. Örnek alınan alanların genel görüntüsü	20
Şekil 5. Enfekteli bitki örneği	20
Şekil 6. MiLBVV etmeninin platede pozitif belirti veren örneklerin renk görünümü	27
Şekil 7. CMV etmeninin platede pozitif belirti veren örneklerin renk görünümü.....	27
Şekil 8. MiLBVV etmeninin jel üzerindeki 469 bp büyüklüğündeki bant görüntüsü	28
Şekil 9. CMV etmeninin jel üzerindeki 650 bp büyüklüğündeki bant görüntüsü	28
Şekil 10. MiLBVV'e protein gen bölgesine ait filogenetik ağaç	29

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. 2017 ve 2022 yılları arasında Türkiyedeki marul üretim alanları(da) ve üretim miktarları	2
Çizelge 2. 2021 yılı Marul üretiminin yoğun olduğu iller ve üretim miktarları	3
Çizelge 3. 2022 yılı Marul üretiminin yoğun olduğu iller ve üretim miktarları	3
Çizelge 4. Tokat ve Amasya ilindeki marul üretim miktarları ve alanları	4
Çizelge 5. Çalışılmakta olan bitkilerin alındıkları yerler ve bitki sayıları	12
Çizelge 6. Çalışmalarda kullanılacak primerler, polariteleri ve fragment uzunlukları	15
Çizelge 7. Çalışılmakta olan bitki örneklerinin alınmış olduğu yerler ve kodları.....	18
Çizelge 8. Miraflori lettuçe big vein virus (MiLBVV) etmeninin DAS-ELISA testinde pozitif kabul edilen örneklerin absorbans değerleri.....	21

1.GİRİŞ

Marul (*Lactuca sativa L.*), papatyagiller (Asteraceae) familyasına ait tek yıllık serin iklim bitkisidir. Dünyada ve ülkemizde en çok üretimi ve tüketimi yapılan yapraklı sebze türlerinden birisi olan marul, en popüler salata bitkisidir. Farklı ürün segment gruplarına ait marul çeşitleri sadece salata olarak değil, sarma, dürüm, turşu, yemek ve işlenmiş şekilde de tüketilmektedir. Anavatanının Anadolu, Kafkasya, İran ve Türkistan olduğu kabul edilmektedir (Eşiyok, 2012).

Yunanistan ve Türkiye üzerinden Avrupa'ya oradan da Amerika kıtasına dağılım göstermektedir (De Vries, 1997; Karaağaç ve Balkaya, 2019). Bunun yanı sıra bazı araştırmacılar marul bitkisinin yabancı türlerinin olduğunu Orta ve Güney Avrupa ülkeleri ile Kanarya Adaları, Cezayir, Etiyopya gibi Afrika ülkelerinde, Mezopotamya, Keşmir ve Nepal ve hatta Sibiry'a da varlığını bildirmektedir. (Şalk ve ark., 2008).

Marul, farklı morfolojik özelliklere sahip geniş bir ürün grubunu içermektedir (Balkaya ve Özgen, 2019). Şalk ve ark. (2008) yaprak yapılarına göre marulu gruplandırmışlardır. Bunlar; Kıvırcık formu *L. sativa L. var. crispa*, Baş (*L. sativa L. var. capitata*) Cos (Romaine) Marul (*L. sativa L. var. longifolia*) olarak ifade etmiştir. Vural ve ark. (2000) salata ve/veya marulları kıvırcık yapraklı salatalar (*Crisp*), yağlı salatalar (*butter*) ve marullar (*Romaine = Cos*) olmak üzere üç ana gruba ayırmışlardır. Kurtar (2021), yaprak/baş şekli ve özellikleri yönünden marul-salata tiplerini yağlı salata (*butterhead lettuce*), baş salata (*Crispy lettuce-iceberg*), kıvırcık salata (*bunching lettuce*), marul (Coslettuce-Romaine-Yedikule) ve kuşkonmaz salatası (*stem lettuce*) şeklinde beş grupta sınıflandırmıştır.

Türkiye'de baş salata olarak Aysberg, yeşil ve Akdeniz kıvırcık yapraklı ve marulun Göbekli pazar ürünü olan birçok çeşidi mevcuttur. Özellikle Akdeniz Bölgesi ve Ege Bölgesi'nin iklim koşullarına bağlı olarak yıl içerisinde hemen hemen her ay hem sera hem de açıkta tarlada olmak üzere yoğun üretimi yapılmaktadır. Bununla birlikte Orta Anadolu'da Amasya-Tokat illerinde marul üretimine uygun toprak ve iklim özelliklerine sahip olmasıyla, yılın önemli ölçüğünde, hava koşullarına bağlı olarak marul üretimi yapılmaktadır. Marulun uzun süre muhafaza edilememesi sebebiyle dış ticareti yapılamamaktadır. Üretilen ürünler iç pazara sunulmaktadır. Ülkemizde değişik

mevsimlere uygun olarak ıslah edilmiş yaklaşık 2-3 ay gibi kısa vejetasyon periyodu olan marul çeşitleriyle açıkta ve örtü altında yılın on iki ayı üretim yapmak mümkündür. Getirisi iyi bir sebze olan marulun ülkemiz ekonomisi bakımından da önemi büyüktür. Ülkemizin son altı yıllık marul üretim miktarlarına ait değerler verilmiştir (TUİK, 2022). Yıllar itibariyle ülkemizde kıvırcık ve aysberg marulu üretim miktarı belirgin düzeylerde artışlar göstermiştir. Göbekli marul üretim miktarında ise yıllara göre dalgalanmalar olmuştur. 2022 yılında Türkiye’de 2022 yılında 252.583 ton kıvırcık, 204.422 ton göbekli ve 104.985 ton aysberg olmak üzere toplam 561.990 ton marul üretilmiştir. Ülkemiz marul üretim miktarlarına ait son altı yıllık değerler Çizelge 1’de verilmiştir. (TUİK, 2022).

Çizelge 1. Türkiye’deki marul üretim alanları(da) ve üretim miktarları(ton) (TUİK,2022)

TÜRKİYE								
Yıl	Kıvırcık		Göbekli		Iceberg		Toplam	Toplam
	Alan(da)	Miktar(ton)	Alan(da)	Miktar(ton)	Alan(da)	Miktar(ton)	Toplam alan (da)	Toplam miktar(ton)
2017	95.385	185.070	97.446	223.449	27.727	81.904	220.558	490.423
2018	92.437	187.658	93.784	215.725	28.398	84.160	214.619	487.543
2019	95.303	198.491	91.439	215.728	29.119	85.547	215.861	499.766
2020	94.401	207.234	93.874	225.639	29.933	87.278	218.208	520.151
2021	96.046	234.048	83.576	212.091	31.730	94.430	211.352	540.569
2022	100.710	252.583	80.148	204.422	35.783	104.985	216.641	561.990

Aşağıda verilen Çizelge 2 ve Çizelge 3’te verilmiş olan tabloda tür bazında marul bitkisinin yoğun olarak ekiminin yapılmış olduğu illere göre dağılımı verilmiştir. Üretimde iki yılın üretim değerleri gözlemlendiğinde ilk sırayı Ankara alırken Tokat ilinde yapılan üretim 2021 yılında 5.sırada iken 2022 yılında 6.sıraya gerilemektedir. Buna Sakarya ilindeki üretim miktarındaki artış sebep olmuştur. Bölgesel olarak tür bazında üretim miktarları farklılık göstermektedir. Örneğin, Adana ilinde göbekli marul üretimi yoğunken, Ankara’da iceberg üretimi yoğundur. Antalya’da ise kıvırcık marul üretimi fazlalık göstermektedir. Tokatta ve Amasya’da kıvırcık marul üretimi diğer türlere oranla her iki yılda fazlalığını korumuştur. (Çizelge 2,3).

Çizelge 2. 2021 yılı marul üretiminin yoğun olduğu iller ve üretim miktarları (ton) (TUİK, 2022)

İller	Göbekli	Kıvırcık	Aysberg	Toplam
Ankara	14.679	10.192	52.726	77.597
Adana	58.232	4.050	8.600	70.882
Antalya	22.829	29.216	3.769	55.814
Mersin	20.453	10.519	16.320	47.292
Tokat	5.155	28.016	120	33.291
Sakarya	749	31.819	120	32.688
Eskişehir	3.413	23.172	2.772	29.357
İzmir	12.687	10.119	3.127	25.933
Bilecik	0	14.574	0	14.574
Amasya	282	11.016	0	11.298
Karaman	5.348	3.407	1.870	10.625
Bursa	1.549	8.747	174	10.470
Muğla	6.085	1.326	893	8.304
Samsun	310	7.786	160	8.256

Çizelge 3. 2022 yılı marul üretiminin yoğun olduğu iller ve üretim miktarları (ton) (TUİK, 2022)

İller	Göbekli	Kıvırcık	Aysberg	Toplam
Ankara	16.157	10.301	52.360	78.818
Adana	53.335	4.650	8.600	66.585
Antalya	24.917	33.651	3.779	62.347
Mersin	12.616	5.735	25.445	43.796
Tokat	4.906	32.492	480	37.878
Sakarya	659	43.296	120	44.075
Eskişehir	2.564	22.811	4.146	29.521
İzmir	16.779	11.074	3.488	31.341
Bilecik	0	16.682	0	16.682
Amasya	249	7.181	0	7.430
Karaman	5.346	3.403	1.870	10.619
Bursa	1.612	8.160	218	9.990
Muğla	4.511	1.447	1.718	7.676
Samsun	369	6.625	180	7.174

Aşağıda Çizelge 4'te Tokat ve Amasya ilinde üretimi yapılan marul türlerinin yıl bazında dağılımları verilmiştir. Kıvırcık marulunda Amasya ve Tokat 2017 yılından 2020 yılına kadar artış varken 2021 yılında az miktarda düşüş gerçekleşmiştir. Fakat Tokat ilinde 2022 yılında artış gözlenmiştir. Göbekli marul türünün 2017 yılından 2020

yılına kadar düşüş varken 2020 sonrası tekrardan bir artış gözlenmiş sonrasında tekrar düşüş olmuştur. Baş marul Tokat ilinde üretim miktarları yıllar geçtikçe artmıştır.

Çizelge 4. Tokat ve Amasya ilindeki marul üretim miktarları ve alanları (TÜİK,2022)

TOKAT								
Yıl	Kıvırcık		Göbekli		Iceberg		Toplam alan (da)	Toplam miktar(ton)
	Alan (da)	Miktar (ton)	Alan (da)	Miktar (ton)	Alan (da)	Miktar (ton)		
2017	3915	18944	1142	4879	25	100	5082	23923
2018	4421	21134	1117	4757	25	100	5563	25991
2019	5067	24454	1056	4589	27	105	6150	29148
2020	5733	28033	1116	5001	30	120	6879	33154
2021	5724	28016	1187	5155	30	120	6941	33291
2022	6151	32492	1133	4906	120	480	7404	37878
AMASYA								
2017	4373	9505	152	233	0	0	4525	9738
2018	4418	9741	147	236	0	0	4565	9977
2019	4639	11064	144	248	0	0	4783	11312
2020	4785	11025	140	244	0	0	4925	11269
2021	4907	11016	148	282	0	0	5055	11298
2022	4678	7181	133	249	0	0	4811	7430

Marul bitkisinde enfeksiyon oluşturan bazı viral etmenler şunlardır; Marul iri damar virüsü (Lettuce big vein associated virus) (LBVaV), Marul iri damar virüsü (Mirafiori lettuce big vein virus) (MiLBVV), Marul mozaik virüsü (Lettuce mosaic virus) (LMV), Marul bulaşıcı sarılık virüsü Lettuce infectious yellows virus (LIYV), Marul nekrotik bodurluk virüsü(Lettuce necrotic stunt virus) (LNSV), Marul nekrotik sarılık virüsü (Lettuce necrotic yellows virüs) (LNYV), Marul nokta beneklenme virüsü (Lettuce speckles mottle virüs) (LSMV), Tütün halkalı leke virüsü (Tobacco ringspot virüs) (ToRV), Hıyar mozaik virüsü (Cucumber mosaic virüs) (CMV), Domates benekli solgunluk virüsü (Tomato spotted wilt virüs) (TSWV) (Alan, 2012).

Bu çalışmada konu olan virüs etmenlerine bakacak olursak;

CMV, bütün dünyada yetiştirilen ürünlerde enfeksiyon gelişimine ve zararlara sebep olmaktadır (Zitter ve Murphy 2009). Süs bitkileri, sebzeler, yarı-odunsu ve odunsu tek

çenekli ve çift çenekli 85'ten fazla ailesi olan 1000'den fazla tür bitkide hastalığa sebep olmaktadır (Francki ve ark. 1979, Palukaitis ve ark. 1992, Hull 2002, Palukaitis ve Garcia-Arenal 2003).

CMV, Bromoviridae familyasının Cucumovirus cinsinin bir üyesidir. Tek iplikçikli RNA'ya ve doğrusal bir yapıya sahip olan virüs zarfsız yapıdadır (Francki and Habili, 1987).

CMV, yaprak bitleri tarafından non persistent olarak taşınmaktadır (Francki ve ark. 1979, Raccach ve ark. 1985, Nault 1997). Yaprak bitleri arasında önemli olan bazı vektörler *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* ve *Acyrtosiphon pisum*dur. (Palukaitis ve ark. 1992, Perry ve ark. 1998). CMV yaprak bitlerinin yanı sıra tohumla ve mekanik olarak taşınmaktadır (Neergaard 1977, Tomlinson ve Carter 1970).

CMV, birçok konukçu bitkide sistemik enfeksiyonlara neden olmakta, fakat bazı bitkilerde belirtisiz olabilmekte, belirtiler enfekte olan bitkiye ve enfeksiyon döneminde bitkilerin yaş durumuna bağlı olarak yüksek ihtimalle değişkenlik göstermektedir (Gallitelli 2000).

CMV, hastalıklı bitkilerde meyvede yapraklarda şekil bozukluğuna bazen ise bitkilerin geriye doğru ölümüne sebep olmaktadır (Kosaka ve Fukunishi 1997). Bunun yanı sıra enfekteli bitki yapraklarında kahverengileşme, damar bantlaşması ve damarlar arası klorotik belirtiler görülmektedir (Ndunguru and Kapooria, 1997).

Marul mozaik virüsü, zarfsız bir formda olup, ipliksi yapıda virionlara sahiptir, tek iplikçikli bir RNA virüsü genom büyüklüğü 9-12 kb dir. LMV, Potyviridae familyasına bağlı Potyvirus cinsindedir (Anonim, 2015b).

Marul üretimi yapılan bölgelerde marul mozaik virüsüne rastlanmıştır. Asteraceae familyası üyelerini enfekte etmiş olduğu bilinmektedir. 21 çeşit bitkide yapay inokulasyon mekanik taşınarak 121 çeşit bitki türünü enfekte ettiği söylenmiştir (Horvath, 1980).

LMV ile ilgili yapılan bir çalışmada virüsün afitlerle non persistent olarak taşındığına yer verilmiştir (Moreno, 2007).

LMV'nin ilk tespit edilen vektörü yaprak biti türlerinden şeftaliye özgü olan *Myzus persicae*'dir. 15 farklı afid türüyle taşınmasına rağmen pamukta görülen daha çok sıcak bölgelerde yoğunluğu saptanan *Aphis gossypii* türü olduğu belirtilmiştir. Bunun yanı sıra patatesten görülen yaprak biti türü olan *Macrosiphum euphorbiae* türü marulda oldukça fazla sorun teşkil etmektedir (Messiaen and Lafon, 1965).

Marul mozaik virüsü çok şiddetli ve çok yaygın olarak görülen bir virüstür. LMV tohumla mekanik olarak ve polenle taşınabilmektedir (Dinant and Lot, 1992).

Türkiye'de son dönemlerde yoğun olarak gözlemlenen ve ekonomik önem arz eden bir virüs etmeni haline gelen MİLBVV enfeksiyonuna geçmiş yıllarda varikosavirüsün sebep olduğu düşünülürken 2000 yılı sonrası Ophiovirüs'ün buna sebep olduğu tespit edilmiştir. MİLBVV ipliksi yapıda ve tek iplikçik negatif polariteli (-) ssRNA içermektedir. Aspiviridae familyasına aittir (Roggero ve ark., 2000; Alan, 2012).

MİLBVV etmenine nemli topraklarda daha çok rastlanmıştır (Hayes ve ark, 2006). MİLBVV etmeni adını damarlar boyunca görülen iri damar yapısından, oluşan renk açılmaları ve yapraklarda görülen deformasyonlar sonucu almıştır (Falk, 1997; Vetten ve ark., 1987).

Hastalık etmeni belirtileri yapraklarda şekil bozukluğu ve damar bantlaşması olarak görülmektedir. Bunun yanı sıra küçük baş oluşumuna sebep olmaktadır. Tüm bu belirtiler sonucunda ekonomik kayıplara sebep olmuştur (Ryder, 1980; Walsh, 1992).

1961 senesinde MİLBVV etmeninin aşısı ile taşındığı tespit edilmiştir. *O. brassicae*'nin virüs vektörü olarak hastalığa sebep olduğu belirtilmiştir. (Campbell ve Grogan, 1963).

Yapılan çalışmalarda *O. virulentus*'un iri damar etmeninin vektörü olarak belirtilmiştir (Herrera Vasquez vd., 2009).

Bu çalışma Amasya ve Tokat illeri açık alan ve örtü altı marul yetiştiriciliği yapılan sahalarda ekonomik kayıplara sebebiyet veren etmenlerin viral kaynaklı olup olmadığının ortaya konulması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Bu bölgede marul alanlarında viral etmenlerin varlığının araştırılması ve virüs kaynaklı problemlerin daha etkin bir şekilde ortaya konması planlanmıştır. Ayrıca son yıllarda

tüm dünyada marul virüs hastalıklarının ana hastalığı olarak bilinen Marul iri damar hastalığının etmenleri olan MİLBVV ve aynı sıra diğer etmenlerin bölgedeki son durumunun belirlenmesi amaçlanmış marul bitkisinde görülen ve yoğun şekilde zarar veren virüsler ve belirtileri göz önünde bulundurulmuştur.



2.KAYNAK ÖZETİ

2.1. Dünya’da yapılan çalışmalar

Yeni Zelanda’nın Auckland bölgesinde marul yetiştiriciliği yapılan alanlarda yapılmış bir çalışmada yapraklarda damar aralarında irileşmenin meydana geldiği bitkilerde *O. Brassicae* varlığı tespit edilmiştir. *O.brassicae*’nin tespitinin yapılmadığı bitkilerde herhangi bir belirti gözlemlenmemiştir. Belirti gözlemlenen marul bitki köklerinden elde edilen *Olpidium* sporlarını düşük santrifüjle sedimente edip bunu sağlıklı olan bitkilere inoküle etmişler ve iri damar belirtisini gözlememişlerdir. Fakat tekrardan inoküle edilmiş bitkilerden aldığı süspansiyonu sağlıklı bitkiye inoküle etmesi sonucunda symptom gözlemlenmemiştir. *O.brassicae* mücadelesinde Thiram, Captan, Copper Oxychloride fungusitleriyle mücadelesi edilerek marullardaki belirtilerin azaldığını gözlemlemişlerdir (Fry 1958).

Thomson ve Procter (1965) Yeni Zelanda’da yapılan bir çalışmada, farklı bölgelerde CMV ile enfekteli olduğu düşünülen marul ekim alanlarından örnekleme yapmışlardır. Örneklerde nekrotik, klorotik, bodurluk ve sararma gibi belirtilerini ön planda tutmuşlardır. CMV ile enfekteli olup olmadığını anlamak için virüse özgü antiserumları Amerika’da hazırlatıp, jel difüzyonu testiyle tespit etmişlerdir. Bu teknikle pozitif sonuç elde edilen örnekleri hastalıkla bulaşık olan bitkilerden izole ederek indikatör bitkilere inoküle etmişlerdir.

Bruckart ve Lorbeer, (1975) tarafından New York’un Oswego bölgesinde ve Orange bölgesinde marul ekim alanlarında ve kereviz ekim alanlarında yabancı otlar üzerine yapılan bir çalışmada CMV’nin tespiti üzerine immunodifüzyon testler, mekanik inokülasyon ve elektron mikroskobu kullanılarak analizi gerçekleştirilmiştir. CMV’nin Orange bölgesinde kereviz ekim alanlarında kayıplara sebep olduğu belirtilmiştir. 1972-1973 yılları arasında 66 bitki örneğinden 12 tanesinde CMV enfeksiyonu tespit edilmiş ve Amerika’da CMV’nin doğal konukçuları olarak ilk kez 8 yabancı ot türü rapor edilmiştir.

Choi ve ark., (1999) tarafından Güney Kore’de yapılan çalışmada marul mozaik virüsü rapor edilmiştir. Lim ve ark. (2014) Güney Kore’de açık alanlarda ekim yapılan marul

tarlalarında %90'ın üzerinde sararma ve klorotik leke belirtilerinin görüldüğü alandan alınan 5 bitkinin yaprak örneklerinin incelenmesi sonucunda Mirafiori marul iri damar virüsü olduğu tespit edilmiştir.

İri damar hastalığı, *Olpidium virulentus* vektörlü mirafiori marul iri damar virüsünün (MiLBVV) neden olduğu, ekonomik açıdan zarar veren bir marul hastalığıdır. ABD'de iri damar hastalığı önemli bir sorun olmasına rağmen, MiLBVV ve LBVV enfeksiyonunun ne ölçüde sorun teşkil ettiği bilinmemektedir. İri damar hastalığına karşı kısmen dayanıklı çeşitler kayıpları azaltmaktadır ancak hastalığı ortadan kaldırmakta etkili değildir. Kaliforniya'da yapılan çalışmada marul örnekleri toplanmış gözlenen semptomlar değerlendirilmiştir. MiLBVV ve LBVV enfeksiyonu virüs dizilimi açısından değerlendirmek için ters transkripsiyon- polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve nükleotit dizilimi kullanılmıştır. Margarita ve Payane çeşitlerine karşı direnç tespit edilmiştir. Ancak asemptomatik bitkilerde MiLBVV enfeksiyonu bulunmuştur. *L. virosa* VT280'in semptomsuz ve virüsten arı olması için MiLBVV ve LBVV'ye karşı bağışık olduğunu düşünmüşlerdir (Hayes ve ark., 2006).

Krause- Sakate, (2001) Brezilya'nın Sao Paulo vilayetinde LMV etmeni çalışmada virüsün 2 farklı patotipinin dizilim analizi yapılmış ve klonlamışlardır. Brezilya, Avrupa ve Amerika ırklarıyla kıyaslanması sonucunda ırklar arasında farklılık olmadığı görülmüştür. Çalışma sonucunda direnç genlerinde farklı LMV ırklarının oluşumunda mutasyon olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Lot ve ark., (2002) yaptıkları bir çalışmada LBVV ve MiLBVV' nin morfolojik ve serolojik olarak farklılıklarına bakmışlardır, LBVV'nin tek başına bitkide herhangi bir belirti oluşturmazken yalnızca MiLBVV ile enfekteli olan bitkilerde yoğun belirtiler gözlemlemişlerdir. MiLBVV serin iklim koşullarında şiddetli enfeksiyon oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

Maekawa ve ark., (2004) tarafından, MiLBVV ve LBVV enfeksiyonları ile ilgili yapılmış olan bir sıcaklık çalışmasında, LBVV etmeni 27°C' de tespit edilirken, MiLBVV etmeni 18 °C'ye düştüğünde enfeksiyona neden olduğunu belirtmişlerdir.

Moreno ve ark., (2004) İspanya’da yaptıkları çalışmada marul tarlalarında yaygın olarak görülen Potyvirus cinsi LMV etmeni olduğunu bildirmişlerdir. Marul iri damar virüsü gibi dünya çapında mevcut (LBVaV) araştırmada gözlemlenmemiştir, ancak virüslerin varlığı ELISA tarafından rutin olarak arananlar göz ardı edilmemiştir. Marul fidelerinin yaprak bitlerine karşı dayanıklı koşullarda yetiştirildiğinde enfeksiyon azaltılabilir.

Ndunguru ve Kapooria (1997) tarafından Güney Afrika ülkelerinden Zambiya’ da yapılan bir çalışmada marul yetiştiriciliği yapılan alanlarda ve yabancı ot üzerinde CMV etmeni üzerine yaptıkları çalışmada DAS-ELISA testlemesi ve elektron mikroskop incelemeleri yapılmıştır. CMV ile enfekteli marul bitkilerinde kahverengileşme, mozaikleşme, klorotikleşme ve damar bantlaşması gözlemlenmiştir.

Salem ve ark., 2015- 2016 yılları arasında Ürdün’de yaptıkları bir çalışmada MiLBVV ve LBVaV etmenlerinin marul bitkisinde bulunmasına *Ospidium* spp.'nin dinlenme sporları ve zoosporlarının varlığının sebep olduğunu düşünmüşlerdir. Salem ve ark., (2020) yılında yapmış oldukları bir diğer çalışmada RT- PCR tekniği ile MiLBVV etmenin varlığının belirlenmesinde virüsün taşınmasına vektörlük eden fungusun *O.virulentus* olduğunu belirtmişlerdir.

Marul iri damar virüsü etmenin ana konukçusu marul bitkisidir ancak Solanaceae, Compositae, Chenopodiaceae, Tetragoniaceae familyasına ait bitkileride enfekte ettiği belirtilmiştir (Salem ve ark., 2020).

Opatovsky ve ark. (2019), *Ospidium* spp. üzerine yapılan bir çalışmada fungusun sporlarının popülasyonunun azaltılmasında etkili olan carbendazim ve fluazinam fungusiti olduğunu belirtmişlerdir.

Umar ve ark., (2017) tarafından, Suudi Arabistan’ın Riyad bölgesinde 2014-2015 yılları arasında iri damar hastalığına benzer belirtiler gösterdiği düşünülen 97 marul bitkisi ve 7 yabancı ot bitkisi toplanmıştır. DAS-ELISA yöntemi sonucunda marul bitkisinde %25 LBVV ve %9’nun MİLBVV yalnızca bu etmenlerle enfekte olurken %63’nün ise her iki virüs etmeniyle karışık enfekteli olduğunu bildirmişlerdir. LBVV ve MİLBVV izolatlarının nükleotid sekansı %94.3-100 aralığında olduğu tespit edilmiştir.

2.2.Türkiye’de yapılan çalışmalar

Alan (2012) Doğu Akdeniz bölgesinde yetiştiriciliği yapılan kışlık sebzeler (marul, ıspanak, lahanası, karnabahar, turp) mevcut virüs hatalıklarının saptanması ve yaygınlık oranının belirlemek amacıyla çalışma yürütmüşlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda 808 marul örneğinden 380 bitki örneğinde MiLBVV, 82 bitki örneğinde LMV, 3 bitki örneğinde ise CMV etmeni ile enfekteli olduğunu DAS-ELISA yöntemiyle tespit etmişlerdir.

Akbaş ve ark., (2021) 2017 ve 2018 yılları arasında Ankara, Eskişehir ve Konya illerinde marul üretimi yapılan alanlardan alınan 164 adet marul örnekleme yapılmıştır. Toplanan örnekler 14 farklı virüs etmeninin serolojik olarak testlenmesinde kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda %31.7 LBVV, %19.5 MiLBVV, %7.3 LMV, %3.7 TNV oranında tespit edilmiştir. En yaygın virüs etmeninin LBVV ve MiLBVV olduğu görülmüştür.

Sağlam ve Kameroğlu (2019) 2015 ve 2017 yılları arasında Adana ve Mersin illerinde yürüttükleri çalışmada 160 marul örneği toplanmıştır. ELISA testlemesi sonucunda 52 örnekte MiLBVV enfeksiyonu olduğu bildirilmiştir. Bunun yanı sıra yapmış oldukları dizi analizlerinde MiLBVV’nin Adana ve Mersin izolatlarının filogenetik ağaçta ayrı gruplar halinde oluştuğunu göstermişlerdir.

Sertkaya (2015) yılında Hatay ilinde yaptıkları bir çalışmada 53 marul örneğinde en yaygın olarak %47.1 oranında LMV enfeksiyonu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra %11.3 MiLBVV ve %3.7 oranında ise CMV enfeksiyonu gözlemlenmiştir. Toplanan 18 ıspanak bitkisi örneğinde ise %16.6 oranında CMV ve %11.1 oranında LMV olduğu tespit edilmiştir.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmanın materyalleri 2022-2024 tarihleri arasında 2023/03 no'lu BAP projesi kapsamında gerçekleştirilen örnekleme çalışmalarında Amasya-Tokat Merkez ve ilçelerindeki marul alanlarında virüs belirtisi gösteren bitkilerden toplanan 191 marul yaprak örneği oluşturmaktadır. Yapılan örneklemelemlerde toplanan yaprak ve kök örnekleri kullanılmıştır. Köklerde *Olpidium spp.* varlığı mikroskopi yöntemiyle araştırılmıştır. Alınan örneklerin konum ve bitki sayımları Çizelge 5 'te verilmiştir.

Çizelge 5. Bitkilerin alındıkları yerler ve bitki sayıları

YER	BİTKİ SAYISI
Tokat/Merkez	58
Tokat/ Erbaa	12
Tokat/Niksar	31
Amasya	90
Toplam	191

3.1 Bitki materyalinin temini ve örnekleme yöntemi

Çalışmanın materyalini Amasya-Tokat ilçeleri marul ekim alanlarından temin edilen marul bitkisi oluşturmaktadır. Amasya iline bağlı Büyük kızılca tarımın ticari boyutlarda yoğun olarak yapıldığı bu bölgeden ve farklı çeşitlerde marul bitkisi örnekleri alınmıştır. Tokatta ise Merkezden ve bazı ilçelerinden örnekler büyük oranda açık alanda yetiştiricilik yapılan yerlerden, viral belirti gösteren marul bitkilerinin köklerinden ve yapraklarından alınmıştır.

Bununla beraber ekili arazilerin büyük kısmı imkanlar doğrultusunda incelenmeye çalışılmıştır. Bu sebeplerden ötürü tarlalara çapraz yönlerden girilerek simptomolojik yöntemlere dayalı gözlemler yapılarak sıralar seçilmiş ve bu sıralardaki bitkiler incelenmiştir. Bu belirtiler MiLBVV, CMV, LMV gibi virüs etmenlerinin marul bitkisinde oluşturduğu yaygın belirtilere göre tespit edilmeye çalışılmıştır. Toplanan örnekler plastik poşetlere konulup, etiketlenip, buz torbaların da laboratuvara getirilip – 20°C'deki derin dondurucuya yerleştirilmiştir.

3.2 DAS-ELISA yöntemi

Enzyme- Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemi Clark ve Adams(1977) tarafından belirtilen yönergeye göre yapılmıştır. Çalışmada kullanılan ELISA kitlerinin sulandırılma oranları temin edilen ticari firmanın belirttiği şekilde dikkate alınarak yapılmıştır. CMV, LMV, MiLBVV etmenlerine karşı LOEWE (Almanya) firmasından temin edilen antiserum kitleri kullanılarak aşağıdaki metod sırayla uygulanmıştır.

- 1- İlk olarak üretilmiş IgG'ler 1/200 oranında kaplama tampon çözeltisinde sulandırılarak ELISA tabağında her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde yüklenmiştir.
- 2- ELISA tabakları, 37°C'de 4 saat etüve yerleştirilerek inkübe edilmiştir, yıkama tampon çözeltisi ile her yıkama 3'er dakika olacak şekilde 3 kez olarak yıkama yapılmıştır.
- 3- Ekstraksiyon tampon çözeltisinde ezilen bitkiler her kuyuya 100'er µl olacak şekilde yüklenmiştir ve ELISA tabağı bir gece +4°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra yıkama tamponu çözeltisi ile 3'er dakika olacak şekilde 3 kez yıkama yapılmıştır.
- 4- Alkalın fosfataz ile işaretli IgG (Konjugate) konjugat tamponu çözeltisi içerisinde 1/200 sulandırılarak her kuyucuğa 100'er µl konulduktan sonra 37°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra ELISA tabağı yıkama tamponu çözeltisi ile tekrar yıkanmıştır.
- 5- ELISA tabağının her bir kuyusuna diethalonamin substrate tampon çözeltisinde 1mg/ml olacak şekilde hazırlanan 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate substrattan 100'er µl ilave edilmiş ve ELISA tabağı 60-90 dakika oda sıcaklığında ışısız ortamda bekletildikten sonra ELISA okuyucuda 405 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır.
- 6- Okuma sonucunda elde edilen negatif kontrolün absorbans değerinin iki katına eşit ya da iki katından daha büyük absorbans değerleri pozitif olarak kabul edilmiştir.

3.3 RNA izolasyonu

Çalışmada Tokat ve Amasya illerinden alınan marul alanlarından toplanan yaprak örneklerinden RNA izolasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu çalışmaları Astruc ve ark. (1996)'nın önerdiği yöntem modifiye edilerek aşağıdaki gibi uygulanmıştır.

- a. Örnekler ekstraksiyon tampon çözeltisi (100 mM Tris-HCl pH.8.0, 50 mM EDTA, pH. 7.0, 5 mM NaCl, 10 mM 2-mercapto-ethanol (1/1000) ile 1:2(w/v) oranında sulandırılarak ezme işlemi yapılmıştır.
- b. Bitki öz suyundan 1 ml eppendorf tüpüne alınmıştır ve üzerine 50 µl Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) (% 20) ilave edilmiştir ve elle altüst edilmiştir.
- c. Daha sonra tüpler 65 °C'de 30 dakika su banyosunda inkube edilmiştir.
- d. Tüplere 250 µl potasyum asetat (5M) ilave edilerek 20 dakika buz içerisinde bekletilmiştir ve daha sonra 15 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- e. 600 µl üst sıvı kısım yeni tüpe alındıktan sonra üzerine eşit miktarda chloroform eklenip ve 10 dk oda sıcaklığında bekletip ve daha sonra 15 dakika 13.000 rpm 'de santrifüj edilmiştir.
- f. 600 µl süpernant yeni hazırlanan eppendorf tüplerine konularak üzerine eşit miktar isopropanol eklenmiştir ve elle alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- g. Sonra -20 °C'de en az 30 dakika bekletilmiştir.
- h. Örnekler 15 dakika 14.000 rpm 'de santrifüj edildikten sonra sıvı kısım ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- ı. Eppendorf tüpleri ters çevrilerek filtre kağıdı üzerinde 5 dakika süre ile kurutulmuştur ve pellet üzerine 1 ml ethanol (% 70) ilave edilerek yıkama işlemi yapılmıştır.
- i. Eppendorf tüplerde RNA'leri çöktürmek için 5 dakika 15.000 rpm'de santrifüj edilmiştir ve tüp içerisindeki ethanol atılarak eppendorf tüpleri 1 saat kurutulmaya bırakılmıştır.
- j. Elde edilen total RNA'lar 100 µl distile su ile sulandırılmış ve -20 °C'ye kaldırılmıştır.

3.4 Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi

Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi, toplam RNA izolasyon prosedüründen elde edilen RNA'lar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi sırasında, 2,5 µl toplam RNA,

1 µl heksamer primer (5'-d (NNNNNN)-3'N = G, A, T veya C) (10µmol) ve 7 µl saf su ile mikrosantrifüj tüplerinde karıştırılmıştır. Karışım 65°C'de 5 dakika inkübasyon ardından buz üzerine yerleştirilmiş ve 1 dakika buzlukta muhafaza edilmiştir. 4 µl 5X MMLV tampon (5X), 0,5 µl dNTP (25 mM), 0,5 µl hekzamer primer (10 µmol), 0,5 µl RNase inhibitörü (10 U/µl), 0,5 µl Ters transkriptaz (200 U/ µl) (Thermo Scientific) ve 2 µl distile su 10 µl, hacme ulaşacak şekilde her tüpe ilave edilmiştir. Daha sonra tüpler 42°C'de 60 dakika, 80°C'de 5 dakika 10°C'de 4 dakika bekletilerek cDNA sentezi yapılmıştır.

ELISA işlemi sonrasında pozitifliğinden emin olduğumuz örneklerde PCR sonucunda negatif sonuç elde edildiğinde cDNA yönteminde değişikliğine gidilmiştir.

3' primer ile hazırlanan cDNA eldesi için, toplam 3 µl RNA, 1 µl 3'primer, 2 µl distile su ilave edilerek 6 µl olarak PCR tüplerine dağıtılmıştır. 65°C'de 5 dakika inkübasyona tabii tutulmuştur. Daha sonra 2 µl Reaction buffer, 0,5 µl RNase inhibitörü (10 U/µl) , 1 µl dNTP (25 mM) ve 0,5 µl 5X MMLV tampon (5X) şeklinde son hacim 10 µl olacak şekilde hazırlanmış ve tüpler 42°C'de 60 dakika bekletilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.5 PCR çalışmaları

İlk aşamada elde edilen cDNA kalıp olarak kullanılarak virüslere spesifik primerlerle PCR işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada 2,5 µl cDNA, 5 µl GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 0,6 µl dNTP ,0,5 µl forward primer (100 pmol), 0,5 µl reverse primer (100 pmol), 1 µl MgCl₂ (25 mM), 0,25 µl Taq polimeraz enzimi (Promega) ve 1 µl Dimetilsülfoxid (DMSO) karıştırılmıştır ve saf su ile 25 µl ye tamamlanıp PCR cihazına yerleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan primer çiftleri dizilimleri Çizelge 7'de verilmiştir.

Çizelge 6. Çalışmalarda kullanılan primerler, polariteleri ve fragment uzunlukları

Primer Çiftleri	Dizi	Çoğaltılan cBüyüklüğü ve Bölgesi	Referans
CMV	RW8-GGTTTCGAAAGAGATATAACCGGG RV11-GTTTATTTACAAG AGCGTACGG	650 bp-RNA-2	Finetti- Sialer vd. (1999)
LMV	1196 F-AAGGCAGTAAACTGATG 1087 R-TTATACTACAGTCTTTA	800bp-CP	Krause- Sakate vd. (2001)

PCR aşamasında her örnek için 25 µl hacimde; 2,5 µl cDNA, 2,5 µl 10X PCR buffer (Thermo Scientific Green Buffer), 0,6 µl dNTP (10 mM, Thermo Scientific), 0,5 µl (10 pmol/ µl, MİLBVV, CMV) forward ve reverse primerler, 0,25 µl Taq polymerase (10.000 u, Thermo Scientific), 1 µl DMSO ve 17,15 dH₂O PCR tüplerinin içinde hazırlanmıştır. Hazırlanan tüpler kapakları kapatılıp Thermocycler'a PCR işlemi gerçekleştirilmek üzere hazırlanmıştır.

LMV etmeni için PCR döngüleri:

94°C'de 3 dk
95°C'de 1 dk
42 °C'de 1 dk
72 °C'de 2 dk
72 °C'de 10 dk

35 döngü

CMV etmeni için PCR döngüleri:

94 °C'de 5 dk
92 °C'de 1 dk
58 °C'de 45 sn
72 °C'de 1 dk
72 °C'de 5 dk

35 döngü

MiLBVV etmeni için PCR döngüleri:

95°C'de 2 dk
95 °C'de 30 sn
61 °C'de 30 sn
72 °C'de 2 dk
72 °C'de 10 dk

35 döngü

3.6 Agaroz jel elektroforez çalışması

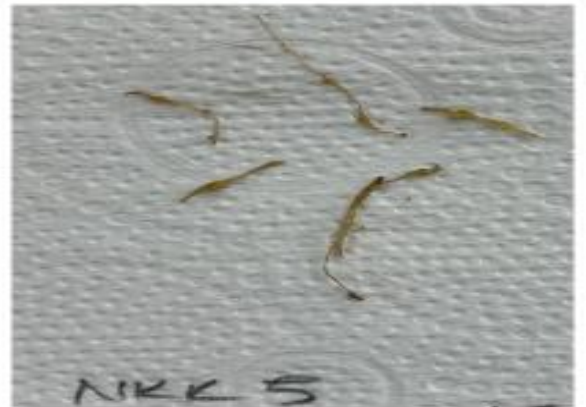
PCR ürünleri % 1lik olarak hazırlanan içerisine 7 mg/ml ethidium bromid ilave edilen agaroz jel 90 V'da 30 dk elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez işlemi sonunda görüntüleme cihazında görüntüleme işlemi yapılmıştır.

3.7 Filogenetik analiz çalışmaları

Filogenetik çalışmalar RT-PCR sonunda CMV ve MiLBVV ile pozitif sonuç veren izolatlardan her bir virüs etmenine ait izolatın RT-PCR ürünleri sekansa gönderilmiştir. Sekanslama sonunda elde edilen veriler MEGAX bilgisayar programı ile analiz edilmiştir (Kumar, 2018). Veriler daha sonra National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gen Bankasında kayıtlı referans izolatlarla kıyaslanarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

3.8 Virüs vektörü *Olpidium spp.*'nin bitki köklerinde belirlenmesi

191 bitki örneğinden DAS-ELISA sonuçlarına göre MiLBVV enfekteli 2 bitki kökü; marul ekim alanlarında MiLBVV ve LBVV virüslerini taşıyan *Olpidium spp.* obligat kök parazitinin bitki köklerinde ışık mikroskobu altında görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir. Öncelikle örnek kökleri akan musluk suyu altında yıkanmış, kılcal kökler toprak artıklarından temizlenmiştir. Daha sonra 4 kez steril saf sudan geçirilerek kökte yapışık kalmış toprak zerreleri uzaklaştırılmıştır (Şekil 1). Temizlenmiş kökler %0.1'lik oranında asit fuksin içeren asit-fuksin lakto fenol solüsyonu ile muamele edilmiş veya çözeltiye gerek duyulmadan da ışık mikroskobu altında incelenmiştir.



Şekil 1. MiLBVV ile enfekteli bitkilerin mikroskofta incelenmeden önceki hali

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Örnekleme sonuçları

Örnekleme Ekim 2022- Ocak 2024 tarihleri arasında yapılmıştır. Arazi çalışmaları sonucunda toplam 23 tarla ve 11 seradan 191 örnek toplanmıştır. Amasya Merkez'den 90, Tokat Merkez'den 58, Erbaa'dan 12, Niksar'dan 31 örnek alınmıştır. Alınan örneklerin konumları ve kodları Çizelge 6'da verilmiştir.

Çizelge 7. Bitki örneklerinin alınmış olduğu yerler ve kodları

İLÇE	KODLAMA
Amasya/Merkez	MAS (Marul Amasya Sera) MAT, MAT-A, MAT-Y (Marul Amasya Tarla)
Tokat/Merkez	ME (Marul Emice) MK (Marul Kargı)
Erbaa	EM (Erbaa Marul)
Niksar	NFM (Niksar Fatih Mahallesi) NKK (Niksar Kumçiflik Köyü) NTK (Niksar Tamlar Köyü) N50YM (Niksar 50. yıl Mahallesi)

Tokat bölgesindeki örnekleme yapılan marul ekim alanları Şekil 2'te görülmektedir.



Şekil 2. Örnek alınan alanların genel görüntüsü

Alınan örneklerdeki belirtiler; mozaik, damarlarda renk açılması, büyüme geriliği ve gelişememe, dokularda kalınlaşma şeklinde gözlemlenmiştir (Şekil 3 a,b).

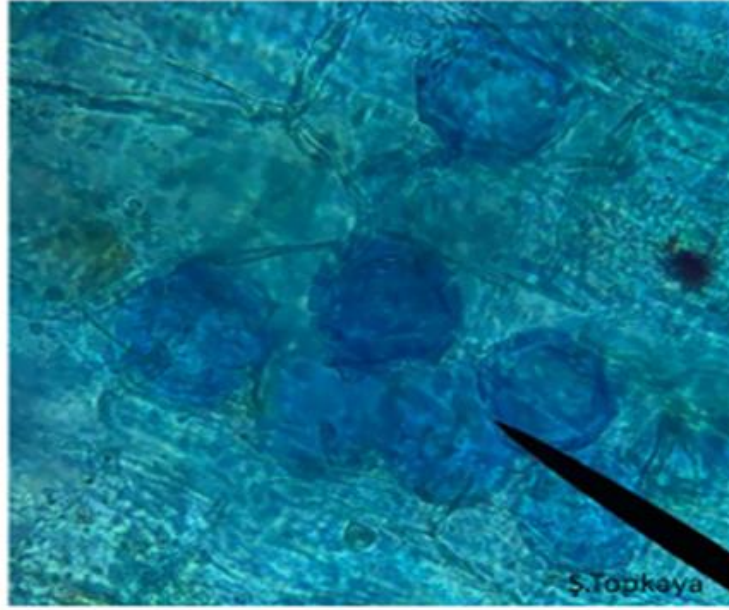


a

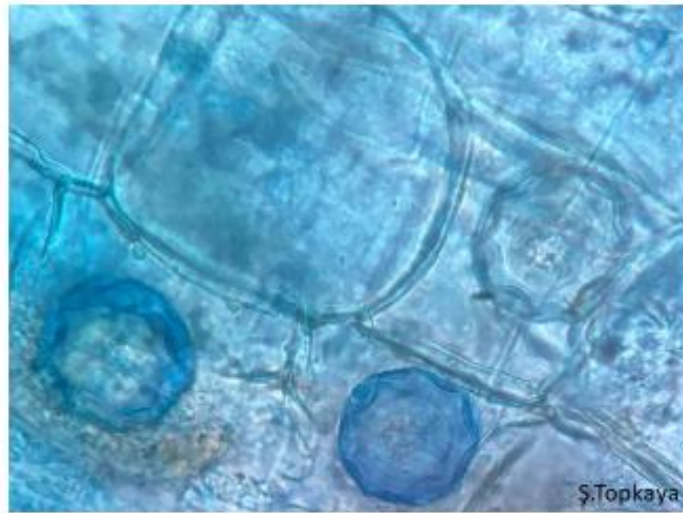


b

Şekil 3.a) Mozaik, şekil bozukluğu ve gelişme geriliği. **b)** Doku kalınlaşması



Şekil 4.Marul kılcac köklerinde asit-fuksin lakto fenol çözeltisi ile boyanmış *Olpidium spp.*'nin sporları



Şekil 5.Marul kılcac köklerinde *Olpidium spp.*'nin spor yapıları

4.2 DAS ELISA sonuçları

Yapılan DAS-ELISA testi sonucunda 3 virüs etmeni LMV, CMV, MİLBVV, varlığına ait bulgular; 11 tarladan ve 9 seradan alınan 191 örnek için; 28 örnekte MİLBVV, 26 örnekte CMV pozitif sonuç elde edilmiştir. MİLBVV'ye ait pozitif değerler Çizelge 8

de vermiştir. LMV enfeksiyonu ise ELISA testinde saptanamamıştır. Çizelge 8'de ilgili virüslerin absorbands değerleri verilmiştir.

Çizelge 8. Miraflori lettuce big vein virus (MiLBVV) etmeninin DAS-ELISA testinde pozitif kabul edilen örneklerin absorbands değerleri

Örnek	Negatif kontrol değerleri	Pozitif örneklerin absorbands
ME 1-1	0.160	2.619-2.829
ME 1-2	0.160	2.750-2.624
ME 1-3	0.160	2.687-2.904
ME 1-4	0.160	2.873-2.912
ME 3-3	0.160	3.271-3.500
EM 1-1	0.314	1.520-0.632
EM 1-2	0.314	0.555-1468
EM 1-3	0.314	0.696-0.766
EM 1-4	0.314	0.679-1.867
MK 7-6	0.160	0.888-0.669
MK 7-9	0.160	0.629-0.884
NFM 4	0.310	2.723-3.088
NFM 5	0.310	2.704-2.983
NKK 1	0.310	2.861-2.928
NKK 4	0.310	3.143-2.770
NKK 5	0.310	2.055-1.989
NKK 6	0.310	2.617-3.363

4.2.1 Tokat ili Niksar ilçesinden alınan örneklerin DAS-ELISA sonuçları

ÖRNEK	BELİRTİ	CMV	LMV	MİLBVV
NFM 1	Mozaik görünümü	+	Test edilmedi	-
NFM 2	Şekil bozukluğu büyüme geriliği	-	Test edilmedi	-
NFM 3	Damar bantlaşmasında anormallik	+	Test edilmedi	-
NFM 4	Şekil bozukluğu ve kalınlaşma	+	-	-
NFM 5	Büyüme geriliği ve gelişememe	-	Test edilmedi	-
NKK 1	Mozaik görünümü	-	Test edilmedi	-
NKK 2	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	+	Test edilmedi	+
NKK 3	Mozaik görünümü	-	-	-
NKK 4	Şekil bozukluğu ve kalınlaşma	-	Test edilmedi	-
NKK 5	Şekil bozukluğu ve kalınlaşma, mozaik görünümü	-	-	+
NKK 6	Şekil bozukluğu ve kalınlaşma	-	Test edilmedi	+
NTK 1	Mozaik görünümü ve kabarcıklaşma	+	-	+
NTK 2	Şekil bozukluğu ve kalınlaşma	-	Test edilmedi	-
NTK 3	Şekil bozukluğu ve kalınlaşma	-	Test edilmedi	-

NTK 4	Mozaik görünümü	+	Test edilmedi	-
NTK 5	Şekil bozukluğu ve kalınlaşma	+	Test edilmedi	-
NTK 6	Damar bantlaşmasında anormallik	+	Test edilmedi	-
NTK 7	Mozaik görünümü	-	-	-
NTK 8	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	-	Test edilmedi	-
NTK 9	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	+	Test edilmedi	-
NTK 10	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	-	Test edilmedi	-
NTK 11	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	-	Test edilmedi	-
N50YM 1	Damarlar arası renk açılması	-	Test edilmedi	-
N50YM 2	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	-	Test edilmedi	-
N50YM 3	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	-	Test edilmedi	-
N50YM 4	Şekil bozukluğu ve kabarcıklaşma	-	Test edilmedi	-
N50YM 5	İri damar görünümü	-	Test edilmedi	-
N50YM 6	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	-	Test edilmedi	-
N50YM 7	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	-	Test edilmedi	-
N50YM 8	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	-	Test edilmedi	-
N50YM 9	Şekil bozukluğu ve kalınlaşma	-	Test edilmedi	-

4.2.2 Tokat ili Erbaa ilçesinden alınan örneklerin DAS-ELISA sonuçları

ÖRNEK	BELİRTİ	CMV	LMV	MİLBVV
EM 1-1	İri damar görünümü	-	Test edilmedi	+
EM 1-2	İri damar görünümü	-	Test edilmedi	+
EM 1-3	İri damar görünümü	-	Test edilmedi	+
EM 1-4	İri damar görünümü	-	Test edilmedi	+
EM 1-5	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma ve kalın doku	-	Test edilmedi	-
EM 1-6	Büyüme geriliği ve gelişememe	-	Test edilmedi	-
EM 2-1	İri damar görünümü	-	Test edilmedi	+

EM 2-2	Büyüme geriliği ve gelişememe	-	Test edilmedi	-
EM 2-3	Büyüme geriliği ve gelişememe	-	Test edilmedi	-
EM 2-4	İri damar görünümü	-	Test edilmedi	+
EM 2-5	İri damar görünümü ve kalınlaşma	-	Test edilmedi	-
EM 2-6	İri damar görünümü ve kalınlaşma	-	Test edilmedi	-

4.2.3 Tokat il Merkezinden alınan örneklerin DAS-ELISA sonuçları

ÖRNEK	BELİRTİ	CMV	LMV	MİLBVV
ME 1-1	İri damar görünümü	-	Test edilmedi	+
ME 1-2	Yaprak yüzeyinde kalınlaşma	-	Test edilmedi	+
ME 1-3	Şekil bozukluğu ve kalınlaşma	-	Test edilmedi	+
ME 1-4	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma ve kalın doku	-	Test edilmedi	+
ME 1-5	Şekil bozukluğu ve kalınlaşma	-	Test edilmedi	-
ME 1-6	İri damar görünümü ve kalınlaşma	-	Test edilmedi	-
ME 2-1	Büyüme geriliği ve gelişememe	-	Test edilmedi	-
ME 2-2	Büyüme geriliği ve gelişememe	-	Test edilmedi	-
ME 2-3	Büyüme geriliği ve gelişememe	-	Test edilmedi	-
ME 2-4	Büyüme geriliği ve gelişememe	-	Test edilmedi	-
ME 2-5	Büyüme geriliği ve gelişememe	-	Test edilmedi	-
ME 3-1	İri damar görünümü ve kalınlaşma	-	Test edilmedi	-
ME 3-2	İri damar görünümü ve kalınlaşma	-	Test edilmedi	-
ME 3-3	Şekil bozukluğu ve iri damar	-	Test edilmedi	+
ME 3-4	Büyüme geriliği ve gelişememe	-	Test edilmedi	-
ME 4-1	Büyüme geriliği ve gelişememe	-	Test edilmedi	-
ME 4-2	Mozaik görünümü ve kabarcıklaşma	-	Test edilmedi	-
ME 4-3	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	-	Test edilmedi	-
ME 4-4	Mozaik görünümü	-	Test edilmedi	-
ME 4-5	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	-	Test edilmedi	-
ME 4-6	Mozaik görünümü	-	Test edilmedi	-
ME 4-7	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	-	Test edilmedi	-
ME 4-8	Şekil bozukluğu ve kabarcıklaşma	-	Test edilmedi	-
ME 5-1	Damarlar arası renk açılması	-	Test edilmedi	-
ME 5-2	Damarlar arası renk açılması	-	Test edilmedi	-
ME 5-3	Damarlar arası renk açılması	-	Test edilmedi	-
ME 5-4	Şekil bozukluğu ve kahverengi lezyonlar	-	Test edilmedi	-
ME 6-1	Damarlar arası renk açılması	-	Test edilmedi	-
ME 6-2	Damarlar arası renk açılması	-	Test edilmedi	-
ME 6-3	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	-	Test edilmedi	-
ME 6-4	Damarlar arası renk açılması	-	Test edilmedi	-

ME 6-5	Damarlar arası renk açılması	–	Test edilmedi	–
ME 6-6	Damarlar arası renk açılması	–	Test edilmedi	–
ME 6-7	Damarlar arası renk açılması	–	Test edilmedi	–
ME 6-8	Damarlar arası renk açılması	–	Test edilmedi	–
ME 6-9	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma ve kalınlaşma	–	Test edilmedi	–
ME 6-10	Damarlar arası renk açılmadı	–	Test edilmedi	+
MK 7-1	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MK7-2	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MK 7-3	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MK 7-4	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MK 7-5	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MK 7-6	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	–	Test edilmedi	+?
MK 7-7	Şekil bozukluğu	–	Test edilmedi	+?
MK 7-8	İri damar görünümü	–	Test edilmedi	+?
MK 7-9	Halka halka kahverengileşmeler	–	Test edilmedi	+?
MK 7-10	Mozaik görünümü	–	Test edilmedi	–
MK 7-11	Yaprak yüzeyinde kahverengi renk dağılımı	–	Test edilmedi	–
MK 8-1	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	–	Test edilmedi	–
MK 9-1	Damarlar arası renk açılması	–	Test edilmedi	–
MK 9-2	Şekil bozukluğu	–	Test edilmedi	–
MK 9-3	Damarlar arası renk açılması	–	Test edilmedi	–
MK 9-4	Damarlar arası renk açılması	–	Test edilmedi	–
MK 9-5	Damarlar arası renk açılması	–	Test edilmedi	–
MK 9-6	Şekil bozukluğu ve damarlar arası renk açılması	–	Test edilmedi	–
MK 9-7	Büyüme geriliği ve şekil bozukluğu	–	Test edilmedi	–
MK 9-8	Damarlar arası renk açılması ve kabarcıklaşma	–	Test edilmedi	–
MK 9-9	Damarlar arası renk açılması ve kabarcıklaşma	–	Test edilmedi	–

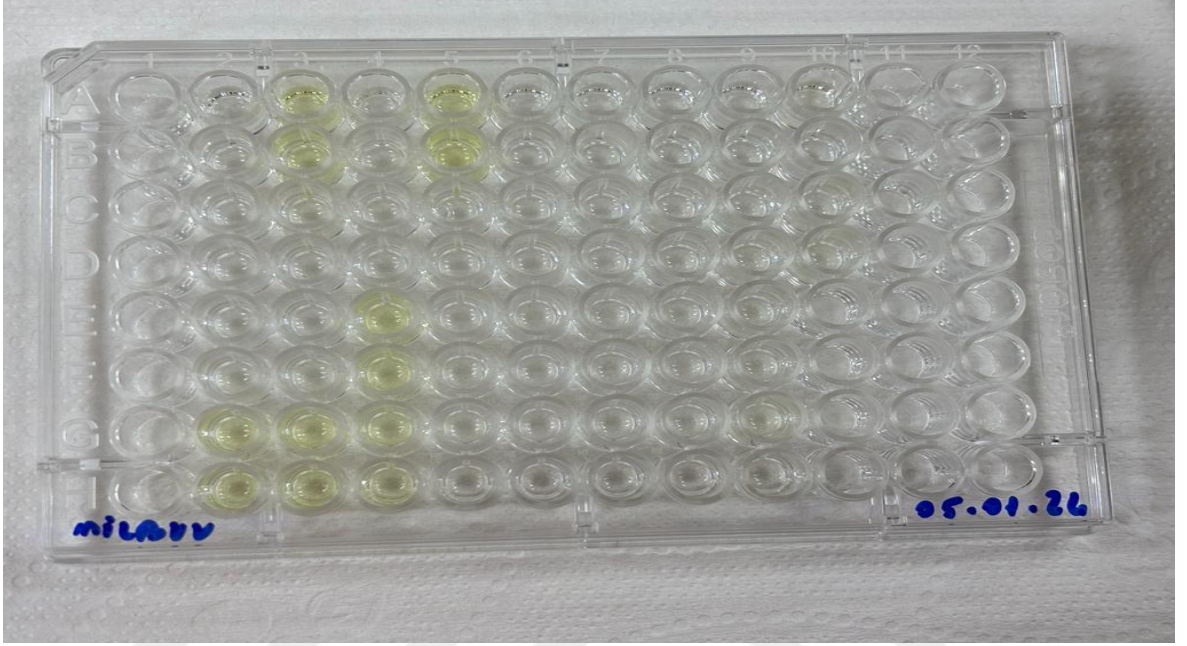
4.2.4 Amasya ilinden alınan örneklerin DAS-ELISA sonuçları

ÖRNEK	BELİRTİ	CMV	LMV	MİLBVV
MAS 1-1	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	–	Test edilmedi	–
MAS 1-2	Mozaik görünümü	–	Test edilmedi	–
MAS 1-3	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	–	Test edilmedi	–
MAS 1-4	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	+	Test edilmedi	+
MAS 1-5	İri damar görünümü	–	Test edilmedi	–
MAS 1-6	İri damar görünümü	–	Test edilmedi	–
MAS 1-7	Damarlar arası renk açılması	–	Test edilmedi	–

MAS 1-8	Şekil bozukluğu ve kalınlaşma	–	Test edilmedi	–
MAS 2-1	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	–	Test edilmedi	+
MAS 2-2	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	+	Test edilmedi	–
MAS 2-3	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	–	Test edilmedi	–
MAS 2-4	İri damar görünümü	–	Test edilmedi	–
MAS 2-5	Mozaik görünümü	–	Test edilmedi	–
MAS 2-6	Mozaik ve iri damar görünümü	–	Test edilmedi	–
MAS 3-1	İri damar görünümü	–	–	–
MAS 3-2	İri damar görünümü	–	Test edilmedi	–
MAS 3-3	Damarlar arası renk açılması	–	Test edilmedi	–
MAS 3-4	Damarlar arası renk açılması	–	Test edilmedi	–
MAS 3-5	Damarlar arası renk açılması	–	Test edilmedi	–
MAS 4-1	Damarlar arası renk açılması	–	Test edilmedi	–
MAS 4-2	Damarlar arası renk açılması	+	–	+
MAS 4-3	Damarlar arası renk açılması	–	Test edilmedi	–
MAS 4-4	Damarlar arası renk açılması	–	Test edilmedi	–
MAS 4-5	Damarlar arası renk açılması	–	Test edilmedi	–
MAS 5-1	Mozaik görünümü	–	Test edilmedi	–
MAS 5-2	Mozaik görünümü ve iri damar	–	Test edilmedi	–
MAS 5-3	Mozaik görünümü	+	Test edilmedi	–
MAS 5-4	Mozaik görünümü	–	–	+
MAS 5-5	Mozaik görünümü	–	Test edilmedi	–
MAS 6-1	Kalın doku ve damar yapısı	–	Test edilmedi	–
MAS 6-2	Şekil bozukluğu ve kalınlaşma	+	Test edilmedi	+
MAS 6-3	Şekil bozukluğu ve kalınlaşma	–	Test edilmedi	–
MAS 6-4	Şekil bozukluğu ve kalınlaşma	–	Test edilmedi	–
MAS -6-5	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAS 7-1	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAS 7-2	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAS 7-3	Yaprak damarlarının irileşmesi	–	–	+
MAS 7-4	Yaprak damarlarında kalınlaşma	–	Test edilmedi	–
MAS 7-5	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAS 7-6	Mozaik görünümü ve iri damar	+	–	+
MAS 7-7	Mozaik görünümü	–	Test edilmedi	–
MAT 1-1	Mozaik görünümü ve iri damar	–	–	+
MAT 1-2	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAT 1-3	Mozaik görünüm	+	Test edilmedi	–
MAT 2-1	Yapraklarda iri damar görünümü	–	Test edilmedi	–
MAT 2-2	Mozaik görünümü	+	Test edilmedi	–
MAT 2-3	Mozaik görünümü ve iri damar	–	–	+
MAT 2-4	Yaprak damarlarında kalınlaşma	–	Test edilmedi	–

MAT 2-5	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAT 2-6	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAT 2-7	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAT 3-1	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAT 3-2	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAT 4-1	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAT 4-2	Yaprak damarlarında kalınlaşma	–	Test edilmedi	–
MAT 4-3	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	–	Test edilmedi	–
MAT 5-1	Damarlar arası renk açılması ve iri damar görünümü	+	–	+
MAT 5-2	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAT 5-3	Damarlar arası renk açılması ve iri damar görünümü, sert doku	–	–	+
MAT 5-4	Mozaik görünümü	+	Test edilmedi	–
MAT 5-5	Mozaik görünümü	+	Test edilmedi	–
MAT 5-6	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAT 6-1	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAT 6-2	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAT 6-3	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAT 6-4	Mozaik görünümü	+	Test edilmedi	–
MAT 6-5	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAT 6-6	Yaprak damarlarında kalınlaşma	–	Test edilmedi	–
MAT-A 1-1	Damarlar arası renk açılması	–	Test edilmedi	–
MAT-A 1-2	Damarlar arası renk açılması	–	Test edilmedi	–
MAT-A 1-3	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAT-A 1-4	Büyüme geriliği ve gelişememe	+	Test edilmedi	–
MAT-A 2-1	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAT-A 2-2	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAT-A 2-3	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAT-A 3-1	Damarlar arası renk açılması	–	Test edilmedi	–
MAT-A 3-2	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAT-A 3-3	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	–	Test edilmedi	–
MAT-A 3-4	Yaprak damarlarında kalınlaşma	–	Test edilmedi	–
MAT-A 3-5	Yaprak damarlarında kalınlaşma	+	Test edilmedi	–
MAT-A 3-6	Damarlar arası renk açılması	–	Test edilmedi	–
MAT-A 4-1	Yaprak damarlarında kalınlaşma	–	Test edilmedi	–
MAT-A 5-1	Yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma	–	Test edilmedi	–
MAT-A 5-2	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAT-A 5-3	Büyüme geriliği ve gelişememe	–	Test edilmedi	–
MAT-Y 1-1	Damarlar arası renk açılması	+	Test edilmedi	–
MAT-Y 1-2	Damarlar arası renk açılması	+	Test edilmedi	–

MAT-Y 1-3	Damarlar arası renk açılması	+	-	-
MAT-Y 1-4	Damarlar arası renk açılması	-	Test edilmedi	-
MAT-Y 1-5	Damarlar arası renk açılması	-	Test edilmedi	+



Şekil 6. MILBVV etmeninin platede pozitif belirti veren örneklerin renk görünümü

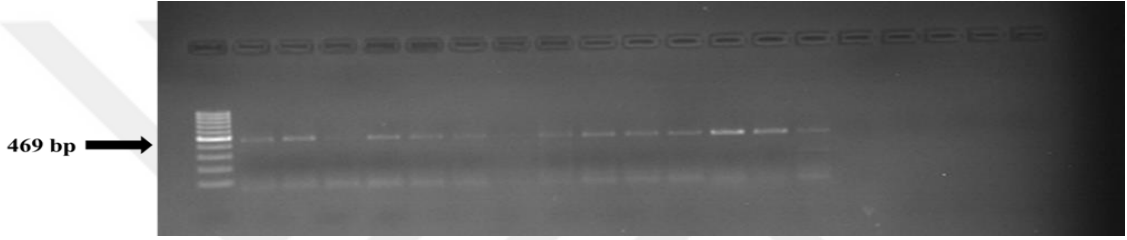


Şekil 7. CMV etmeninin platede pozitif belirti veren örneklerin renk görünümü

4.3 RT -PCR sonuçları

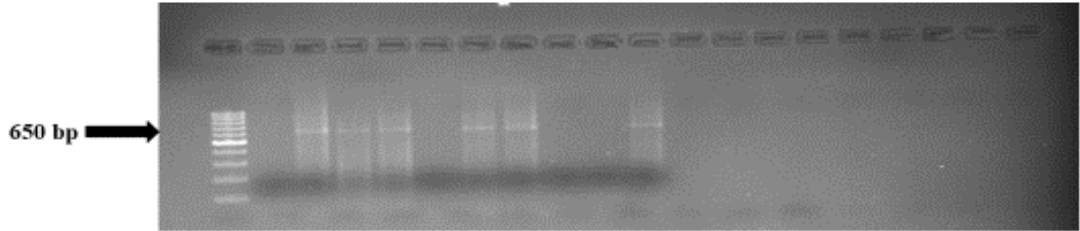
Toplanan 191 marul bitkisi örneğinden DAS-ELISA yönteminde pozitif sonuç veren virüslerin varlığını tespit etmek için RNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra RNA izolasyonu yapılan örneklerden hexamer primerle cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Marul örnekleri araştırma konusu olan virüslerin (CMV, LMV, MiLBVV) belirlenmesi için virüslere spesifik primerlerle RT-PCR işlemine tabi tutulmuştur.

MiLBVV'ye spesifik VP 286 F ve VP 287 R primerleri ile yapılan RT-PCR testi sonucunda DAS-ELISA yönteminde pozitif sonuç elde edilen örnekler test edilmiştir. 28 örnekte (%14.6) beklenen büyüklükte (469 bp) bant elde edilmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. MiLBVV etmeninin jel üzerindeki 469 bp büyüklüğündeki bant görüntüsü

CMV'ye spesifik CMV F ve CMV R primerleri ile yapılan RT-PCR testi sonucunda DAS-ELISA yönteminde pozitif sonuç veren örnekler test edilmiştir. 26 örnekte (%13.6) beklenen büyüklükte (650 bp) bant elde edilmiştir (Şekil 9).

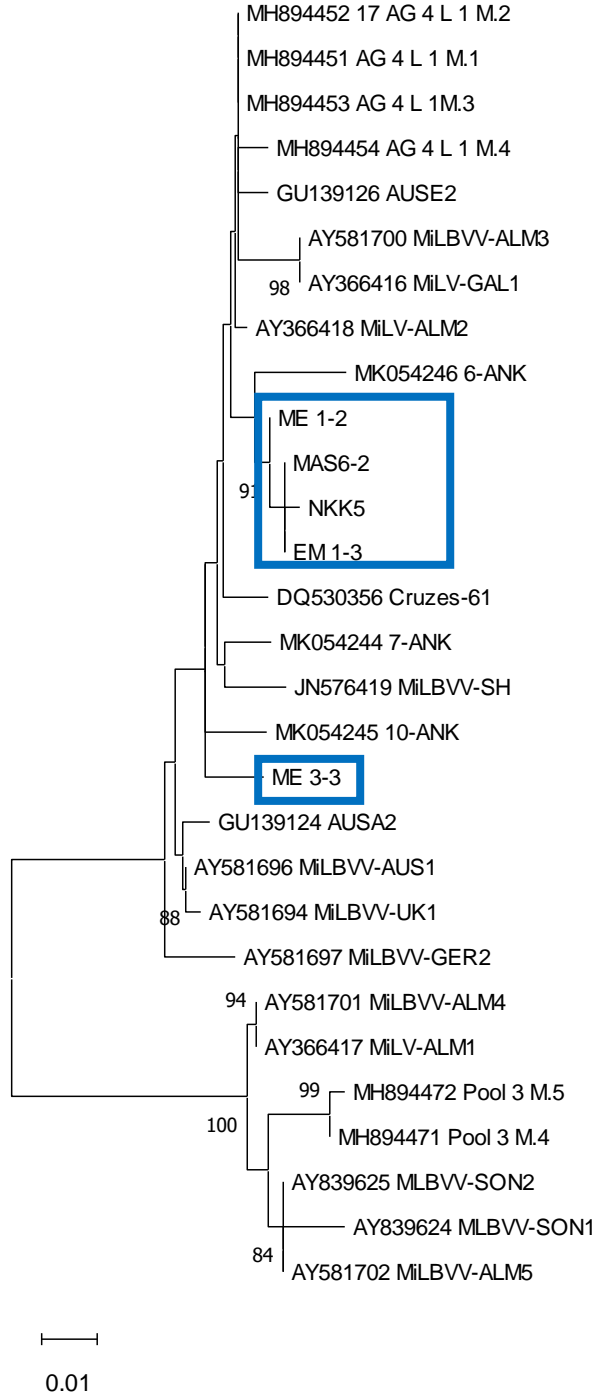


Şekil 9. CMV etmeninin jel üzerindeki 650 bp büyüklüğündeki bant görüntüsü

4.4 Filogenetik analiz sonuçları

MiLBVV ile pozitif sonuç veren beş izolatın RT-PCR ürünleri sekansa gönderilmiştir. Sekans sonunda elde edilen veriler MEGAX bilgisayar programı ile analiz edilmiştir (Kumar, 2018). Oluşturulan filogenetik analiz sonunda, dört MiLBVV izolatu referans izolat MK054246 6-ANK izolatu ile benzer dallanma gösterirken, bir izolat (ME 3-3)

dört izolattan farklı bir dallanma oluşturmuş ve MK054245 10-ANK izolatı ile benzer dallanma oluşturmuştur (Şekil 10).



Şekil 10. MiLBVV'e protein gen bölgesine ait filogenetik ağaç. Çalışmada kullanılan izoaltlar mavi kutu içinde gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmanın yapıldığı Amasya ve Tokat illerindeki marul yetiştiriciliği yapılan alanlarda hastalık varlığına bakılmıştır. Marul bitkisine duyulan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Amasya ilinde belli bir bölgede yoğun yetiştiriciliği yapılmakta iken Tokat ilinin belli kesimlerinde daha yoğun olarak marul yetiştirildiğini gözlemlenmiştir. Çiftçiye olumlu ekonomik katkıda bulunmasının yanı sıra olumsuz etkenlerde marulda ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Bunlar hastalık ve zararlıların yanı sıra kimyasal bir mücadelesi olmayan viral etmenlerin oluşturduğu hastalıklar son yıllarda marul yetiştirilen alanlarda ön plana çıkmaktadır.

Yapılan örneklemeler sonucunda marul yapraklarında doku kalınlaşmaları, mozaik ve kloroz, iri damar oluşumu, bitkide gelişim geriliği gibi belirtiler gözlemlenmiştir. Özellikle iri damar oluşumu belirtisi MiLBVV etmeni için karakteristik olup birçok araştırmacı tarafından bu hastalık belirtileri ifade edilmiştir (Lot ve ark., 2002; Roggero ve ark., 2003; Sağlam ve Kamberoğlu, 2019; Zelyüt ve Ertunç, 2021).

DAS-ELISA yöntemi ile testleme yapılan bir çalışmada 240 adet marul bitkisi örneğinin 44 tanesinin MiLBVV ile enfekteli olduğu belirtilmiştir. Testlenen marul örneklerinin %18.33 oranında MiLBVV saptanmıştır. DAS-ELISA yöntemi birden fazla örneğin bir arada testlenmesinden dolayı büyük avantaj sağlamakta olup rutin testlemelerde kullanılabilirliği ifade edilmektedir (Clark ve Adams, 1977). Birçok araştırmacıda MiLBVV etmeninin tanılamasında DAS-ELISA yönteminden yararlanmaktadır (Alan, 2012; Sertkaya, 2015; Ertunç ve Zelyüt, 2019; Sağlam ve Kamberoğlu, 2019).

Yapılan bu çalışmada; DAS-ELISA testi sonuçlarına göre; Tokat ilinin Niksar ilçesi üretim alanlarından toplanmış olan 31 marul yaprak örneğinin 11'i (%35.4) ve Erbaa ilçesi üretim alanlarından toplanmış olan 12 örneğin 6'sı (%50) pozitif sonuç vermiştir.

Bu çalışmada, Tokat ilinden ve Amasya'nın Merkez-Büyükkızılca mevkiinden alınan marul örneklerinde LMV'ye rastlanılmamıştır. Farklı zamanlarda yapılacak daha detaylı çalışmaların yapılması planlanmaktadır.

Roggero ve ark., (2003), Heidari ve ark. (2010), Ertunç ve Zelyüt (2019) ile Akbaş ve ark. (2021), yapmış oldukları bir çalışmalarda genel olarak virüslerin karışık biçimde ve tek biçimde bulduklarında da arazide benzer belirtilere neden olduklarını ortaya koymuşlardır.

Farklı bir çalışmada MiLBVV etmeninin LBVaV etmeninin varlığına bağlı olmadığını tek başına veya LBVV ile birlikte simptomlara sebep olduğu ve ağ görünümüne neden olmaktadır, LBVaV'nin ise tek olarak marul bitkisinde görüldüğünde herhangi bir belirti görülmediğini ifade etmiştir (Hayes ve ark., 2006; Sasaya ve ark., 2008; Araya ve ark., 2011; Sağlam ve Kamberoğlu, 2019).

Çalışmada; DAS- ELISA testlemesi sonucunda pozitif reaksiyon veren ve absorbans değeri yüksek olan 54 izolatın total RNA izolasyonları yapılmıştır. Buradan elde edilen RNA'lar RT-PCR'a kaynak oluşturmuştur.

Akbaş ve ark., (2021) Ankara, Eskişehir ve Konya'da marul üretimi yapılan yerlerde yapılan serolojik ve moleküler çalışmalarda en çok marul iri damar virüsü etmeninin sebep olduğu MiLBVV ve LBVaV olduğunu belirtmişlerdir.

MiLBVV etmeninin vektörü olan *Olpidium spp.* marul bitkisinin köklerinde spor varlığının saptanması amacıyla marul bitkisi iklim odalarında enfekteli topraklarda yetiştirilmiştir. Marul bitkisinin kökleri Phillips ve Hayman (1970)'ın ifade ettiği şekilde kök boyama yöntemine göre ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Fungusun spor yapıları görüntülenmiştir. Farklı araştırmacılar tarafında bu boyama yöntemi kullanılmıştır. (Woltjen, 2010; Varanda ve ark., 2011).

Bu tez çalışması Amasya ve Tokat ilindeki marul yetiştirilen alanlarda MiLBVV etmeninin varlığını ortaya koymaktadır. Bunun yanı sıra çalışmada MiLBVV'nin vektörü olan *Olpidium spp.*'nin marul bitkisi köklerinde oluşturduğu spor yapılarında tespit edilmiştir. Örneklem çalışmaları 2022-2024 yılları arasında yapılmıştır. Marul bitkisi geniş bir pazar ürünü olup iç pazarda büyük ekonomik öneme sahiptir. Yaprak ve köklü formda toplanan marullar MiLBVV, CMV ve LMV etmenlerine özgü antiserumlar kullanılarak testlenmiştir. MiLBVV ile enfekteli olan bitki köklerinde *Olpidium spp.* varlığı görülmüştür. Bu testlemeler sonucunda LMV etmenine rastlanmadığı için PCR'a tabi tutulmamıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda Tokat'ın Niksar ilçesinde yoğun virüs etmeni görülmüştür.

Bu çalışmanın sonuçlarına bağlı olarak; MiLBVV hastalığına karşı alınması gereken önlemlerden biri dayanıklı çeşit tercih edilmesi gerekmektedir. Bunun yanı sıra kültürel önlemler büyük öneme sahiptir. Tarla temizliği ve gerekli önlemler alınmalıdır. Bu konuda üretici bilinçlendirilmeli ve virüsle mücadele edilmelidir.

6.KAYNAKÇA

- Akbaş, B., Morca, A.F. & Coşkan, S., 2021. Ankara, Eskişehir ve Konya İlleri Marul Üretim Alanlarında Görölen Viral Hastalık Etmenlerinin Tespiti. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 31(2), 387-395.
- Alan, B. 2012. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yetiştirilen bazı kışlık sebzelerde hastalık yapan virüslerin tanılanması ve karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 134s.
- Anonim, 2023b. "Plant Viruses Online Descriptions and Lists from the VIDE Database".<http://pvo.bio-mirror.cn/sppindex.htm> 23.11. 2023.
- Balkaya A, Özgen R, 2019. Marul Tarımı. Tarım Gündem Dergisi, 9-11.
- Bruckart, W. L. and J. W. Lorbeer., 1975. "Cucumber Mosaic Virus in Weed Hosts Near Commercial Fields of Lettuce and Celery" *Phytopathology* 66: 253-259.
- Campbell, R.N., Grogan, R.G., 1963. Big-Vein virus of lettuce and its transmission by *Olpidium brassicae*. *Phytopathology* 53, 252-259.
- Choi, S. K., Choi, J. K., Park, W. M. and Ryu, K. H., 1999, RT-PCR detection and identification of three species of cucumoviruses with a genus-specific single pair of primers, *Journal of Virological Methods*, 83(1-2), 67-73.
- Clark, M. F., 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(3), 475-483.
- De Vries IM., 1997. Origin and Domestication of *Lactuca sativa* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44(2): 165-174.
- Dinant, S. ve Lot, H., 1992. Lettuce mosaic virus. *Plant Pathology*, 41(5), 528-542.
- Eşiyok D., 2012. Kışlık ve Yazlık Sebze Yetiştiriciliği. Meta Basım, 410s, Bornova/İzmir.
- Falk BW., 1997. Lettuce big-vein. In *Compendium of Lettuce Disease*, ed. Davis, R. M., Subbarao, K. V., Raid R. N., Kurtz, E. A., pp. 41-42. St. Paul, MN: APS Press.
- Finetti-sialer, m. M., Cillio, F. and Barbarossa, L., 1999. Differentiation of cucumber mosaic virus subgroups by RT-PCR RFLP, *Journal of Plant Pathology*, 81(2), 145-148.

- Francki, R.I.B., 1979. Cucumber mosaic virus CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No: 213, <https://books.google.com.tr/> (15.03.2024).
- 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-Vásquez, J.Á., del Carmen Cebrián, M., Alfaro-Fernández, A., del Carmen Córdoba-Sellés, M. & Jordá, C., 2009. Multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Olpidium bornovanus*, *O. brassicae*, and *O. virulentus*. *Mycological research*, 113(5), 602-610.
- Horvath, J., 1980. Viruses of lettuce; II. Host range of lettuce mosaic virus and cucumber mosaic virus. *Acta Agronomica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 29, 333-352.
- Karaağaç, O., ve Balkaya A., 2019. Marul Tarımı. *Tarım Gündem Dergisi*, s. 17-24.
- Kosaka, Y., & Fukunishi, T., 1997. Multiple inoculation with three attenuated viruses for the control of cucumber virus disease. *Plant Disease*, 81(7),733-738.
- Krause-Sakate, R., R. N. Mello, M. A. Pavan, E. M. Zambolim, M. G. Carvalho, O. Gall and F. M. Zerbini (2001). "Molecular characterization of two Brazilian isolates of Lettuce mosaic virus with distinct biological properties." *Fitopatologia Brasileira* 26: 153-157.
- Kurtar, ES., ve Seymen, M., 2021. *Cucurbita* Türlerinde Anter Kültürü. İçinde: Segui-Simarro, JM (eds) Haploid Teknolojisini İkiye Katladı. *Moleküler Biyolojide Yöntemler*, cilt 2289. Humana, New York.
- Lim, S., Zhao, F., Yoo, R. H., Igori, D., Lee, S. H., Lim, H. S., ve Moon, J. S., 2014. Characteristics of a Lettuce mosaic virus isolate infecting lettuce in Korea. *Plant Pathology Journal*, 30(2), 183–187.
- Lot, H., Campbell, R. N., Souche, S., Milne, R. G., Roggero, P., 2002. Transmission by *Olpidium brassicae* of Mirafiori lettuce virus and Lettuce Big-Vein Virus, and Their Roles in Lettuce BigVein Etiology. *Phytopathology*, 92(3), 288-293.
- Maekawa, K., Sasaya, T., Fujii, H., Ishikawa, K., Kanto, T., Iwamoto, Y. & Aino, M., 2004. The effect of growth temperature, on big-vein symptom and serological detection of Mirafiori lettuce virus and Lettuce big-vein virus in lettuce. *Japanese Journal of Phytopathology*, 70(4), 320-322.

- Messiaen, M. C., and Lafon, R., 1965. "Les Maladies Des Plantesmaraicheres, Vol; II, IRA," 272-276.
- Moreno, A., Bertolini, E., Olmos, A., Cambra, M. ve Fereres, A., 2007. Estimation of vector propensity for Lettuce mosaic virus based on viral detection in single aphids. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 5(3), 376-384.
- 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.
- Ndunguru, J., and Kapooria R. G., 1997. " Detection of Cucumber mosaic virus in vegetables and herbs in Zambia." *AfricanPlant Protection* 3(2): 57-56.
- Neergaard, P., 1977. *Tohum Kaynaklı Virüsler. İçinde: Tohum Patolojisi*. Palgrave, Londra.
- Opatovsky, I., Elbaz, M., Dori, I., Avraham, L., Mordechai-Lebiush, S., Dombrovsky, A. & Tsrer, L., 2019. Control of lettuce big-vein disease by application of fungicides and crop covers. *Plant Pathology*, 68(4), 790-795.
- Palukaitis, P., Roossinck, M., Dietzgen, R.G., Franchi, R.I.B., 1992. Cucumber mosaic virus, *Adv. Virus Res.*, 41, 281-348.
- Palukaitis, P., Zaitlin, M., 1997. Replicase-mediated resistance to plant virus disease, *Adv. Virus Res.*, 48, 349-377.
- Racah, B., Galon, A. and Eastop, V.F., 1985. The role of flying aphid vectors in the transmission of cucumber mosaic virus and potato virus to peppers in Israel. *Ann. Appl. Biol.*, 106: 451-460.
- Revers, F., Lot, H., Souche, S., Le Gall, O., Candresse T., and Dunez, J., 1997. "Biological and molecular variability of lettuce mosaic virus isolates." *Phytopathology* 87(4): 397-403.
- 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.
- Ryder E.J., 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.
- Salem, N., Odeh, S., Muslem, M.A. & Tahzima, R., 2020. Occurrence and partial genetic characterisation of Lettuce big-vein associated virus and Mirafiori lettuce big-vein virus infecting lettuce in Jordan. *Annals of Applied Biology*, 177(1), 90-100.
- Sertkaya, G., 2015. Hatay İli Marul ve Ispanak Alanlarında Bazı Virüslerin Araştırılması. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20(1), 7-12.
- Şalk, A., Arın, L., Deveci, M., Polat, S., 2008. Özel Sebzeçilik. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, 488s, Tekirdağ.
- TÜİK, 2023. Bitkisel üretim istatistikleri. <http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>.
- Tomlinson, J.A., Garrett, R.G., 1962. Role of *Olpidium* in the transmission of big vein disease of lettuce. *Nature* 194, 249-250.
- Thomson, A. D., and Procter, C. H., 1965. Cucumber mosaic virus in lettuce, *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 9(1) : 142-144.
- Umar, M., Amer, M.A., Al-Saleh, M.A., Al-Shahwan, I.M., Shakeel, M.T., Zakri, A.M. & Katis, N.I., 2017. Characterization of lettuce big-vein associated virus and Mirafiori lettuce big-vein virus infecting lettuce in Saudi Arabia. *Archives of Virology*, 162(7), 2067-2072.
- Varanda, C. M., Silva, M. S., Maria do Rosário, F. F., Clara, M. I. E., 2011. Evidence of Olive Mild Mosaic Virus Transmission by *Olpidium Brassicae*. *European Journal of Plant Pathology*, 130(2), 165-172.
- Vetten, H.J., Lesemann, D.E., Dalchow, J., 1987. Electron microscopical and serological detection of virus-like particles associated with Lettuce bigvein disease. *J. Phytopathol.* 120: 53–59.
- Vural, H., Esiyok, D., Duman, I., 2000. *Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme)*, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- Woltjen, C. D., 2010. Responding to industry needs from the field to the greenhouse: Dieback and cankers of *Gleditsia triacanthos* var. *inermis* and characterization of an Ohio isolate of Melon necrotic spot virus and its vector, *Olpidium*

bornovanus, collected from Cucumis sativ. Doctoral dissertation, The Ohio State University.

Walsh, J.A., 1992. Catching up with big vein. Grower December 3, 11-15.

Zelyüt, F.R., 2016. Ankara İli Marul Ekim Alanlarında Görülen Virüs Hastalıklarının Belirlenmesi.(Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü ,Ankara.

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



ÖZGEÇMİŞ

