

Determination and Molecular Characterization of Cucumber Mosaic Virus (CMV) Infection on Spinach Production Fields of Çanakkale Province, Turkey*

Ali KURTOĞLU **Savaş KORKMAZ****

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, ÇANAKKALE

** Sorumlu Yazar (Corresponding author): S. Korkmaz, E-mail address: skorkmaz@comu.edu.tr

Received: 18 May 2018 Accepted for publication: 28 December 2018

ABSTRACT

For the determination and characterization of Cucumber mosaic virus (CMV) infection in spinach production fields of Çanakkale province and its districts, surveys were carried out in the production season of 2016–2017. Sixty-six spinach samples showing virus and virus-like symptoms were collected. The collected spinach samples were tested by DAS-ELISA tests for the presence of CMV. Four samples out of collected sample were found to be infected by CMV in the result of DAS-ELISA tests. One isolate (CNK21) among samples infected by CMV was chosen, randomly and molecular characterization of CNK21 was performed. As a result of molecular characterization works, CNK21 isolate showed identities 87–98% and 91–99% with the World CMV isolates at nucleotide and amino acid level, respectively. In addition, CNK21 was found in subgroup IA in result of phylogenetic analyzes carried out.

Keywords: DAS-ELISA, RT-PCR, identity, phylogenetic

ÖZ

Çanakkale İli Ispanak Üretim Alanlarındaki Hıyar Mozaik Virüsü (Cucumber Mosaic Virus; CMV) Enfeksiyonunun Belirlenmesi ve Moleküler Karakterizasyonu

Çanakkale ilinde ıspanak üretimi yapılan alanlarda Hıyar mozaik virüsü (Cucumber mosaic virüsü; CMV) enfeksiyonunun belirlenmesi ve karakterizasyonu amacı ile 2016–2017 yılları üretim sezonunda arazi çıkışları gerçekleştirilmiştir. Yapılan arazi çıkışlarında virüs ve virüs benzeri semptom gösteren 66 ıspanak örneği toplanmıştır. Toplanan örnekler CMV varlığının belirlenmesi amacıyla DAS-ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Testlemeler sonucunda örneklerden dört tanesi CMV ile enfekteli olarak bulunmuştur. Enfekteli bulunan izolatlar arasından bir tanesi rastgele seçilerek moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda Çanakkale CMV ıspanak izolatu dünya CMV izolatları ile nükleotid düzeyinde %87–98 ve aminoasit düzeyinde ise %91–99 oranında benzerlik göstermiştir. Ayrıca gerçekleştirilen filogenetik analizler sonucunda bu izolatın altgrup IA'da yer aldığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: DAS-ELISA, RT-PCR, benzerlik, filogenetik

* Yüksek lisans tezinden üretilmiştir. Trakya Üniversiteler Birliği İkinci Lisansüstü Öğrenci Kongresinde (2017) sunulmuş ve bildiri kitabında özeti basılmıştır.

GİRİŞ

İspanak (*Spinacia oleracea* L.) genelde soğuk bölgelerimizde ilkbahar ve kış, sıcak bölgelerimizde ise yaz sonlarında ve kış aylarında üretimi yapılan bir sebzedir. Hemen hemen tüm bölgelerimizde yetişebilen ıspanak sadece yoğun yağış aldığı için Doğu Karadeniz bölgesinde sınırlı bir şekilde üretimi yapılmaktadır. İspanak ülkemizde batı ve güney bölgelerinde daha fazla yetiştirilmektedir. Bu bölgelerde yetiştirilen ıspanaklar ulaşımın ve taşımacılığın iyi bir şekilde yapılmasından dolayı kolaylıkla diğer bölgelere pazarlanabilmektedir (Vural ve ark., 2000). Bu nedenle diğer kışlık sebzelere göre yetiştiriciliği daha fazla yapılmaktadır. Dünyada birçok ülkede ıspanak tarımı yapılmaktadır. Dünya ıspanak üretiminde ilk sırayı Çin almaktadır. Çin'den sonra sıralamayı Endonezya, Japonya, ABD ve ülkemiz takip etmektedir (FAO, 2016). Ülkemizde 2016 yılında ıspanak üretimi 161,510 dekar olup, 210,999 ton verim alınmıştır. İller bazında üretim bakımından ilk sırada 32,607 ton ile İzmir bulunmaktadır, İzmir'i 25,876 ton ile Ankara, 24,056 ton ile Samsun takip etmektedir (TÜİK, 2016).

Besin değeri yüksek olan bu sebzede birçok viral hastalık verim kayıplarına yol açabilmektedir. Virüs hastalıkları, ıspanak üretiminde önemli bir sorun olup, bitkiye ciddi zararlar vermekte ve bu sebzenin pazar değerini düşürerek önemli derecede ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Wilson, 1983).

Bazı ülkelerde yapılan araştırmalar sonucunda Hıyar mozaik virüsü (Cucumber mosaic virus; CMV), Domates lekeli solgunluk virüsü (Tomato spotted wilt virus; TSWV), Şeker pancarı tepe kıvrıkcılığı virüsü (Beet curly top virus; BCTV), Şeker pancarı batı sarılık virüsü (Beet western yellow virus; BWYV), Şalgam mozaik virüsü (Turnip mosaic virus; TuMV), Marul mozaik virüsü (Lettuce mosaic virus; LMV), Tütün mozaik virüsü (Tobacco mosaic virus; TMV), Pancar mozaik virüsü (Beet mosaic virus; BtMV) ve Pancar nekrotik sarı damar virüsünün (Beet necrotic yellow vein virus; BNYSV) ıspanaklarda zarar oluşturan önemli virüsler olduğu saptanmıştır (Tamada ve Baba, 1973; Wilson, 1983; Whitney ve Duffus, 1986; Dinant ve Lot, 1992; Correll ve ark., 1994; Parella ve ark., 2003).

CMV birçok tarımsal ürünü enfekte edebilen önemli virüsler arasındadır. CMV ıspanak yanıklığı olarak bilinen hastalığa neden olmaktadır. Enfekteli bitkilerin genç yapraklarında kloroza neden olur, bitki ölümleri ve büyüme noktalarında şiddetli yanmalar görünür. Enfekteli bitkilerde genellikle şekil bozuklukları, yapraklarda daralma, genç yapraklarında çoğunlukla klorotik lekeler ve şiddetli kıvrılma görülmektedir. Etmen bitkilerin büyüme noktasına zarar verebilir. Yapraklarda kenarlardan içe doğru kıvrılmalar oluşmaktadır. Ayrıca hastalığın ilerleyen döneminde bitki genelde bodur kalır ve taç yaprakları tamamen yanabilir. Belirtiler sıcaklığa, gelişim dönemine, virüs streynine ve türlere göre değişiklik göstermektedir (Fulton, 1950; Kaper ve Waterworth, 1981; Yang ve ark., 1993).

CMV, yaklaşık 80 yaprak biti türü ile non-persistent olarak taşınabilmektedir (Palukaitis ve Garcia-Arenal, 2003). Japonya'da yapılan araştırmalarda bazı CMV streynleri ve konukçu bitki kombinasyonlarında yaprak biti ile semi-persistent taşınma rapor edilmiştir (Kameya-Iwaki ve ark., 2000). CMV'yi taşıyan türler arasında en yaygın *Myzus persica* ve *Aphis gossypii*'dir (Palukaitis ve Garcia-Arenal, 2003). CMV tohumla, aşı yoluyla ve mekanik olarak sağlıklı bitkilere taşınabilmektedir. Etmen ayrıca küskütün birçok türü ile de taşınmaktadır. Bununla birlikte CMV, hastalıklı bitki artıklarında uzun süre kalabilmekte ve bu yolla sağlıklı bitkilere taşınabilmektedir. Birçok yabancı ot CMV'ye konukçuluk yapmakta ve hastalığın yayılmasında etkili olmaktadır. Moleküler karakterizasyonu sonucunda CMV izolatlarının IB, IA ve II olmak üzere 3 alt gruba ayrılmaktadır (Roossinck, 2002).

Ülkemizde gerçekleştirilen birçok çalışmada etmenin varlığı farklı bölgelerde, farklı konukçular üzerinde belirlenmiştir (Gümüş ve ark., 2004; Erkan ve ark., 2013; Sertkaya, 2015; Karanfil ve ark., 2016a, Karanfil ve Korkmaz, 2017). Bu konukçulardan bir tanesi de ıspanaktır. Ülkemizde CMV enfeksiyonu ıspanakta bildirilmiş, fakat moleküler olarak karakterizasyonu gerçekleştirilmemiştir (Erbay, 2010; Gümüş ve ark., 2014; Gökdağ ve ark., 2016; Güngör ve ark., 2017).

Bu amaçla bu çalışma kapsamında 2016–2017 üretim yılında Çanakkale ili ve ilçelerinde ticari üretim yapılan ıspanak alanlarında virüs ve virüs benzeri hastalık semptomu gösteren bitkilerden örnekler alınmıştır. Alınan bu örneklerde CMV'nin varlığı tespit edilerek, bir izolatın moleküler olarak karakterizasyonu yapılmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışma temel olarak 3 aşamada yürütülmüştür. İlk olarak Çanakkale ili ve ilçelerinde ıspanak bitkisinin yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlara arazi çıkışları yapılarak, virüs ve virüs benzeri hastalık ile enfekteli olduğu düşünülen bitkilerden örnekler toplanmıştır. İkinci aşamada toplanan örneklerde CMV'nin varlığını belirlemek amacıyla DAS-ELISA ile testlenmesi gerçekleştirilmiştir. DAS-ELISA testleri sonucunda CMV ile enfekteli olduğu belirlenen örnekler, moleküler analizlerin yapılması için silika jel içinde 4°C'de saklanmıştır. Üçüncü aşama olan moleküler karakterizasyon çalışmalarına DAS-ELISA testi sonuçları pozitif olan örneklerin RT-PCR ile testlenmesi ile başlanmıştır. Elde edilen RT-PCR ürünleri kullanılarak seçilen bir izolatın (CNK21) nükleotid dizileri hizmet alımı ile belirlenmiştir. Elde edilen CMV CP genlerine ait nükleotid (nt) dizilimleri kullanılarak, amino asit (a.a.) dizilimleri çıkarılmıştır. Elde edilen nt ve a.a. dizilimleri, gen bankasında bulunan CMV izolatlarının nt ve a.a. dizilimleri kullanılarak çoklu dizi karşılaştırmaları yapılmış ve filogenetik ilişkileri ortaya konulmuştur.

Arazi Çalışması

Arazi çalışması 2016–2017 yılı üretim sezonunda ıspanak bitkisinin yetiştiriciliğinin yapıldığı Çanakkale ili ve ilçelerinde yürütülmüştür. Üretim sezonu süresince Çanakkale ili ve ilçelerinde yetiştirilen ıspanak bitkileri görsel olarak incelenmiş ve CMV belirtilerine benzer belirti gösteren bitkilerden örnekler alınmıştır. Örneklemeye yapılan alanların seçimi tamamen tesadüfi olarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler en az 2 dekar ve üzeri büyüklüğe sahip olan arazilerden toplanmış ve her ilçede en az 3 arazide görsel olarak virüs benzeri belirti gösteren bitkilerden örnekler alınarak incelemeler yapılmıştır. Alınan örnekler soğuk zincirde korunarak laboratuvara getirilmiş ve testler uygulanana kadar buzdolabında 4°C'de silika jel içinde saklanmıştır.

DAS-ELISA Testleri

Gerçekleştirilen arazi çalışmaları sonucunda virüs ve virüs benzeri hastalık ile enfekteli olduğundan şüphelenilerek toplanan örneklerdeki CMV'nin varlığı DAS-ELISA testi ile Clark ve Adams (1977)'in belirttiği yöntem temel alınarak kitlerin sağlandığı firmanın (Bioreba, İsviçre) önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar MEDISPEC ESR 200 ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda okuma işlemine tabi tutularak elde edilen absorbans değerlerine göre belirlenmiştir. Absorbans değerlerine göre negatif kontrolün iki katı ve üzerindeki değerlere sahip olan örnekler CMV ile enfekteli olarak kabul edilmiştir.

Moleküler Karakterizasyon Çalışmaları

Ters Transkriptaz - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

DAS-ELISA testleri sonucunda CMV ile enfekteli bulunan örneklerin RT-PCR analizleri yapılmıştır. RT-PCR analizlerine total RNA izolasyonu ile başlanmıştır. Total RNA izolasyonunda hazır total RNA ekstraksiyon kiti (Qiagen, Kanada) kullanılmış ve izolasyon üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. RT-PCR kitlerin sağlandığı Fermentas (Litvanya) firmasının belirttiği şekilde CMV gen spesifik primer ile (SK5CMV CP-F 5' ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC 3' ve SK6CMV CP-R 5' GAT GTG GGA ATG CGT TGG TGC 3') gerçekleştirilmiştir. Son aşamada agaroz jel elektroforezi ile elde edilen RT-PCR ürünleri 100–1000 bp DNA büyüklük markörleriyle birlikte %1'lik agaroz jelinde 100 voltta ayrıştırılıp EtBr ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında MAJOR SCIENCE UVDI jel görüntüleme cihazında CMV'nin kılıf proteinine ait 638 bp'ne karşılık gelen bantlar fotoğraflanmıştır.

RT-PCR Ürünlerinin Saflaştırılması ve Sekans Analizi

RT-PCR ürünleri arasından rastgele seçilen bir izolatın (CNK21) çoğaltılmış CMV CP genleri EZ Column PCR pürifikasyon kiti (BioBasic, Kanada) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan RT-PCR ürünleri sekanslamaya gönderilinceye kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Seçilen CNK21 CMV izolatının DNA baz dizileri hizmet alımı ile SK5CMV ve SK6CMV primerleri kullanılarak çift yönlü olarak belirlenmiştir.

DETERMINATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CUCUMBER MOSAIC VIRUS (CMV)
INFECTION ON SPINACH PRODUCTION FIELDS OF ÇANAKKALE PROVINCE, TURKEY

Dizi Analizleri ve Filogenetik Soy Ağaçlarının Oluşturulması

Elde edilen CMV CP geninin DNA dizileri, daha önceden dizilimi belirlenerek gen bankalarına konulmuş dünyanın farklı bölgelerine ait CMV izolatlarının kılıf protein genlerinin DNA dizileriyle bir araya getirildikten sonra DNA dizi analiz programları kullanılarak karşılaştırılmıştır (Çizelge 1). Bu amaçla CNK21 CMV izolatının CP genlerine ait nükleotid dizileri CLC Main Workbench programında ClustalW ile çoklu dizi karşılaştırması yapılarak dünya izolatlarıyla olan nt ve a.a. düzeyindeki benzerlik oranları tespit edilmiştir. Ayrıca dünya ve Çanakkale CMV izolatı arasındaki filogenetik ilişkileri Mega 7 programında neighbor joining metodu ile ortaya konulmuştur (Kumar ve ark., 2016). Filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde oluşturulan soyağacının doğruluğunu arttırmak için CMV ile aynı familya ve cins içinde bulunan Peanut stunt virus (PSV, genbankası erişim numarası: U15730) dış grup olarak kullanılmıştır.

Çizelge 1. Moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılan çalışma izolatı ve dünya izolatlarına ait bazı bilgiler

Genbankası Erişim Numarası	Orjin	Alt grup*	Genbankası Erişim Numarası	Orjin	Alt grup*
CNK21	Türkiye	IA	HQ829827	Çin	IB
LC066422	Japonya	IA	LC003524	Güney Kore	IB
LC066458	Japonya	IA	JX993914	Çin	IB
HM065509	Sırbistan	IA	FN552543	Tayland	II
AJ829771	İspanya	IA	AJ829779	İspanya	II
AF316362	Güney Kore	IA	EF153734	Hindistan	II
KM527391	Çin	IB	JX101617	Kolombiya	II

*Referans ve oluşturulan filogenetik ağaca göre

BULGULAR ve TARTIŞMA

Arazi Çalışması ve DAS-ELISA Sonuçları

Çanakkale ilinin merkez köylerinde ve 4 ilçesinde yürütülen arazi çalışmaları sonucunda virüs ve virüs hastalığı simptomsu gösteren 66 örnek toplanmıştır (Çizelge 2). Bu örnekler; Ayvacık (25), Ezine (17), Merkez köyler (10), Lapseki (8) ve Biga (6) şeklinde dağılım göstermiştir. Toplanan örneklerde genellikle ıspanak yapraklarında yoğun kıvrılmalar ve sararmalar gözlenmiştir. Ayrıca bazı örneklerin yapraklarında mozaik belirtiler görülürken, bazı bitkilerde bodurluklar gözlenmiştir (Şekil 1). Belirtilen bu belirtiler daha önce ıspanak alanlarındaki virüs hastalıkları ile ilgili yapılan diğer çalışmalara da benzerlik göstermektedir (Erbay, 2010; Gökdağ ve ark., 2016; Karanfil ve ark., 2016b).

Çizelge 2. Çanakkale ili ve ilçelerinden toplanan örnek sayıları ve Hıyar mozaik virüsü ile enfekteli bitki sayıları

Örnekleme Yapılan Çanakkale İlçeleri	Alınan Örnek Sayısı	Enfekteli Örnek Sayısı
Merkez	10	—
Ayvacık	25	1
Ezine	17	—
Biga	6	1
Lapseki	8	2
Toplam	66	4



Şekil 1. Toplanan ıspanak bitkilerindeki virüs ve virüs benzeri semptomlar (A: ıspanak bitkilerinin yapraklarındaki yoğun kıvrılmalar; B: ıspanak bitkilerinin yapraklarında sarımtırak ve beyazımtırak mozaik belirtiler)

Toplanan örneklerin DAS-ELISA ile testlenmesi sonucu 4 örneğin CMV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçla toplanan örneklerdeki CMV enfeksiyon oranı yaklaşık %6 olarak belirlenmiştir (Çizelge 2). Enfekteli örneklerin dağılımı ise; Lapseki (2), Ayvacık (1), Biga (1) şeklinde olmuştur. Ezine ve Merkez köylerde ise enfekteli örnek bulunamamıştır. Toplanan örneklerin hepsinin virüs ve virüs benzeri semptom göstermesine rağmen enfeksiyon oranının %6 civarında bulunması, toplanan örneklerin ülkemiz ıspanak üretim alanlarında tespit edilen diğer virüs hastalıkları ile enfekteli olmasından da kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Gümüş ve ark., 2014; Gökdağ ve ark., 2016; Karanfil ve ark., 2016b). İngiltere’de ıspanak üretimi yapılan alanlardaki virüs hastalıklarının belirlenmesi ile ilgili bir çalışmada araştırmacılar 193 örnek toplamışlardır. Tanılama çalışmaları sonucunda topladıkları örneklerin 114 tanesinde CMV enfeksiyonunu tespit etmişlerdir (Okonkwo ve Bailiss, 1979). Fotopoulos ve ark. (2011) ise Yunanistan ıspanak üretim alanlarındaki virüs hastalıklarının belirlenmesi amacı ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında topladıkları örneklerin %7’sinin CMV ile enfekteli olduğunu belirtmişlerdir. Bölgemizde gerçekleştirilen benzer bir çalışmada ise araştırmacılar toplanan 45 örneğin 14’ünde CMV enfeksiyonu olduğunu bildirmiştir (Gökdağ ve ark., 2016).

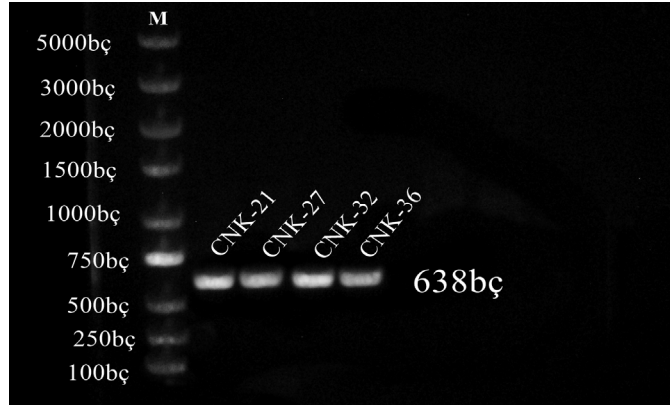
Moleküler Karakterizasyon Çalışmaları

DAS-ELISA testleri sonucunda enfekteli bulunan izolatların moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere RT-PCR ile CP genlerinin çoğaltılması gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen RT-PCR çalışmaları sonucunda enfekteli bulunan 4 örnekten de CMV CP genine karşılık gelen 638 bp’lik bantlar elde edilmiştir (Şekil 2). CMV enfeksiyonunun RT-PCR ile tanınması amacı ile gerçekleştirilen diğer çalışmalarda da enfekteli örneklerden istenilen bant büyüklüğüne karşılık gelen bantlar sorunsuzca elde edilmiştir (Gökdağ ve ark., 2016; Karanfil ve ark., 2016a). Bu bağlamda RT-PCR analizi bu çalışmada moleküler karakterizasyon çalışmalarının başlangıcı olarak kullanılmasına rağmen, CMV enfeksiyonunun tespitinde de direkt olarak ELISA testinden daha duyarlı olması ile de kullanılabilir (Zhao ve ark., 2013; Erilmez ve Erkan, 2016).

Gerçekleştirilen çoklu nt ve a.a. dizi analizleri sonucunda CNK21 kodlu Çanakkale CMV izolatı dünya CMV izolatları ile nükleotid düzeyinde %87–98 ve aminoasit düzeyinde ise %91–99 arasında benzerlik göstermiştir (Çizelge 3 ve 4). CNK21 Çanakkale CMV izolatı nt düzeyinde en fazla benzerliği %98 ile LC066422 erişim numaralı Güney Kore izolatı ile gösterirken en az benzerliği ise %87 ile JX101617 erişim numaralı Kolombiya izolatı ile göstermiştir. Amino asit dizilimlerine göre ise birden fazla izolat ile %99 oranında benzerlik gösterdiği görülürken, en az benzerliği ise nt dizilimlerinde olduğu gibi JX101617 erişim numaralı Kolombiya izolatı ile göstermiştir. CNK21 izolatının nt dizilimlerine göre belirlenen en fazla benzerlik gösterdiği izolat olan LC066422 erişim numaralı Japonya izolatı ile göstermiştir. Hindistan’da glayöllerde enfeksiyon oluşturan CMV’nin moleküler karakterizasyonu amacı ile gerçekleştirilen bir çalışmada ise, araştırmacılar CMV-G olarak kodladıkları izolatın

DETERMINATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CUCUMBER MOSAIC VIRUS (CMV)
INFECTION ON SPINACH PRODUCTION FIELDS OF ÇANAKKALE PROVINCE, TURKEY

dünya izolatları ile nt düzeyinde %70–98, a.a. düzeyinde ise %80–99 oranında benzerlik gösterdiğini belirterek, bu çalışmaya paralel sonuçlar elde etmişlerdir (Dubey ve ark., 2010).



Şekil 2. Çanakkale ili ve ilçelerinden toplanan örneklerle Hıyar mozaik virüsü için uygulanmış olan RT-PCR test sonuçları (M: Marker, 100–5000 bp; CNK-21, CNK-27, CNK-32, CNK-36: CMV ile enfekteli izolat numaraları)

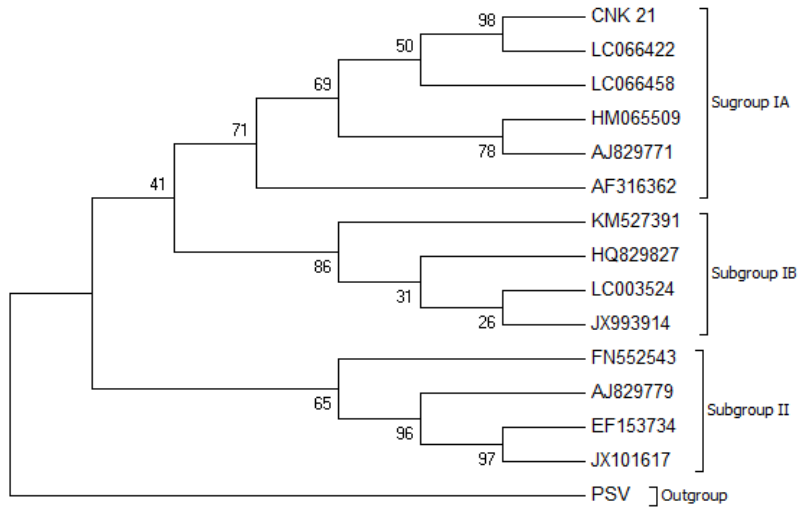
Çizelge 3. Çanakkale Hıyar mozaik virüsü izolatı (CMV) ile dünya CMV izolatlarının nükleotid düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HM065509	1	*	99	99	97	96	97	96	96	89	95	95	94	94	94
AJ829771	2	99	*	98	96	96	96	95	95	88	94	94	94	94	94
LC066458	3	99	98	*	97	96	96	95	95	88	94	94	93	94	94
CNK21	4	97	96	97	*	98	95	93	93	87	94	94	93	93	92
LC066422	5	96	96	96	98	*	95	93	93	86	94	94	93	93	92
AF316362	6	97	96	96	95	95	*	96	95	89	94	94	94	94	93
EF153734	7	96	95	95	93	93	96	*	99	93	94	96	94	96	96
AJ829779	8	96	95	95	93	93	95	99	*	92	94	95	94	96	96
JX101617	9	89	88	88	87	86	89	93	92	*	88	89	87	89	89
HQ829827	10	95	94	94	94	94	94	94	94	88	*	97	97	97	93
KM527391	11	95	94	94	94	94	94	96	95	89	97	*	97	97	94
LC003524	12	94	94	93	93	93	94	94	94	87	97	97	*	97	94
JX993914	13	94	94	94	93	93	95	96	96	89	97	97	97	*	94
FN552543	14	94	94	94	92	92	93	96	96	89	93	94	94	94	*

Çizelge 4. Çanakkale Hıyar mozaik virüsü izolatı (CMV) ile dünya CMV izolatlarının aminoasit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HM065509	1	*	100	100	99	98	98	98	98	99	98	98	97	98	91
AJ829771	2	100	*	100	99	98	98	98	98	99	98	98	97	98	91
LC066458	3	100	100	*	99	98	98	98	98	99	98	98	97	98	91
CNK21	4	99	99	99	*	98	99	99	99	98	98	98	98	98	91
LC066422	5	98	98	98	98	*	98	98	98	98	97	98	97	98	91
AF316362	6	98	98	98	99	98	*	99	99	98	98	98	98	98	91
HQ829827	7	98	98	98	99	98	99	*	100	99	99	99	99	99	92
KM527391	8	98	98	98	99	98	99	100	*	99	99	99	99	99	92
EF153734	9	99	99	99	98	98	98	99	99	*	99	99	98	99	92
AJ829779	10	98	98	98	98	97	98	99	99	99	*	98	98	98	91
JX993914	11	98	98	98	98	98	98	99	99	99	98	*	99	99	92
LC003524	12	97	97	97	98	97	98	99	99	98	98	99	*	99	91
FN552543	13	98	98	98	98	98	98	99	99	99	98	99	99	*	91
JX101617	14	91	91	91	91	91	91	92	92	92	91	91	91	91	*

CNK21 izolatu oluşturulan filogenetik ağaçta subgroup IA'de yer almıştır (Şekil 3). Oluşturulan filogenetik ağaçta LC066458 erişim numaralı Japonya, HM066509 erişim numaralı Sırbistan, AJ829771 erişim numaralı İspanya ve AF316362 erişim numaralı Güney Kore izolatları da CNK21 izolatu ile birlikte IA alt grubunda yer almışlardır. IB alt grubunda KM527391 erişim numaralı Çin izolatu, HQ829827 erişim numaralı Çin izolatu, LC003524 erişim numaralı Güney Kore izolatu ve JX993914 erişim numaralı Çin izolatu yer alırken, altgrup II'de ise FN552543 erişim numaralı Tayland, AJ829779 erişim numaralı İspanya, EF153734 erişim numaralı Hindistan izolatu ve JX101617 erişim numaralı Kolombiya izolatu yer almıştır. Roossinck (2002), CMV izolatlarının IA ve II alt gruplarının tüm dünya izolatlarından oluşabileceği, IB alt grubunun ise genellikle Asya izolatları ile sınırlı olduğunu belirtmiştir. Ülkemizde biber, kavun ve domateste CMV enfeksiyonunun karakterizasyonu için yapılan bir çalışmada CMV izolatlarının subgroup IA'ya ait olduğu bulunmuştur (Çağlar, 2006). Ülkemizde gerçekleştirilen başka bir çalışma ise; Samsun ilinde yetiştirilen yazlık sebzelerde enfeksiyon oluşturan CMV izolatlarının karakterizasyonları ve konukçu-simptom-satellit RNA ilişkilerinin araştırılması amacı ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda araştırmacı elde ettiği CMV izolatları arasından subgroup I ve II izolatlarının varlığını tespit etmiştir (Sarı, 2015). Bu bağlamda elde edilen araştırma sonuçları, ülkemizde gerçekleştirilen diğer çalışmalar ile paralellik göstermektedir.



Şekil 3. Çanakkale ilinden elde edilen CNK21 Hıyar mozaik virüsü (CMV) izolatu ile Dünya CMV izolatlarının göstermiş oldukları filogenetik ilişkiler (CNK21: Çanakkale'de ispanak bitkisinden elde edilen CMV izolatu; PSV: Peanut stunt virus, dış grup olarak; diğer numaralar gen bankasında bulunan dünya CMV izolatlarının erişim numaralarına aittir)

Gerçekleştirilen bu çalışma kapsamında ülkemiz ispanak alanlarında enfeksiyon oluşturan CMV'nin ilk kez CP gen bölgesine özgü moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda daha geniş ispanak alanlarında sörveyler yapılarak, etmenin tüm RNA segmentlerinin tüm genom analizine ve satellit RNA'larının varlığının araştırılmasına yönelik olması düşünülmektedir. Ayrıca yapılması muhtemel olan diğer çalışmaların ispanak alanlarında enfeksiyon oluşturan diğer virüslerin karakterizasyonuna yönelik olması da önem taşımaktadır.

LİTERATÜR LİSTESİ

Clark, M.F. and Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Genet. Virol.*, 34: 475-483.

DETERMINATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CUCUMBER MOSAIC VIRUS (CMV)
INFECTION ON SPINACH PRODUCTION FIELDS OF ÇANAKKALE PROVINCE, TURKEY

- Correll, J.C., Morelock, T.E., Black, M.C., Koike, S.T., Brandenberger, L.P. and Dainello, F.J. 1994. Economically important disease of spinach, Plant Disease, The American Phytopathological Society, United States of America, 653-659.
- Çağlar, B.K. 2006. Hıyar mozaik virüsü (CMV)'nün kavun (CMV-K), domates (CMV-D), biber (CMV-B) izolatlarının biyolojik, serolojik, moleküler yöntemlerle karakterizasyonu ve satellit RNA'lerin virüs üzerindeki etkisi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Doktora Tezi, 89s.
- Dinant, S. and Lot, H. 1992. Lettuce Mosaic Virus, PlantPathology, France, 41:528-542.
- Dubey, K.V., Aminuddin and Singh, V.P. 2010. Molecular characterization of Cucumber mosaic virus infecting Gladiolus, revealing its phylogeny distinct from the Indian isolate and alike the Fny strain of CMV. Virus Genes, 41:126-134.
- Erbay, E. 2010. Gediz Havzası Ispanak Üretim Alanlarında Görülen Virüs Hastalıklarının Belirlenmesi Üzerinde Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Türkiye.
- Erilmez, S. and Erkan, S. 2016. Zeytin Ağaçlarındaki Virüs Hastalıklarının Tanılanmasında Kullanılan Değişik Yöntemlerin Duyarlılıklarının Karşılaştırılması. J. Turk. Phytopath., 45 (1): 1-12.
- Erkan, S., Gümüş, M., Paylan, İ., Duman, İ. and Ergün, M. 2013. İzmir ili ve çevresindeki bazı kışlık sebzelerde görülen viral etmenlerin saptanması. Ege Univ. Ziraat Fak. Derg., 50 (3): 311-322.
- FAO, 2016. Agriculture Statistics (<http://www.fao.org/faostat/en/#home>).
- Fotopoulos, V., Dovas, C.I. and Katis, N.I. 2011. Incidence of viruses infecting spinach in Greece, highlighting the importance of weeds as reservoir hosts. Journal of Plant Pathology, 93, 389-395.
- Fulton, J.P. 1950. Studies on strains of cucumber virus I from spinach. Phytopathology, 40:729-36.
- Gökdağ, Ş., Karanfil, A. and Korkmaz, S. 2016. Çanakkale İli Ispanak Alanlarındaki Şalgam Mozaik Virüsü Ve Hıyar Mozaik Virüsü Varlığının Belirlenmesi. Bahçe Özel Sayı: VII. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Bildirileri- Cilt II: Sebzeçilik – Bağcılık – Süs Bitkileri.
- Gümüş, M., Erbay, E., Erkan S. and Paylan, İ. 2014. Occurrence of viruses infecting spinach in Western Anatolia of Turkey: The first field survey report. Journal Of Food, Agriculture & Environment, 12 (1): 272-275.
- Gümüş, M., Erkan, S. and Tok, S. 2004. Bazı kabakgil türlerinin tohumlarındaki viral etmenlerin saptanması üzerinde araştırmalar. Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg., 2004, 41 (1): 49-56.
- Güngör, M., Uzunbacak, H., Kutluk Yılmaz, N.D. and Şevik, M.A. 2017. Samsun ili ıspanak üretim alanlarında enfeksiyon oluşturan virüslerin belirlenmesi. Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi, 32, 164-168.
- Kameya-Iwaki, M., Murakami, K., Ito, S., Hanada, K. and Tanaka, S. 2000. Semipersistency of Myzus persicae transmission of cucumoviruses systemically infecting leguminous plants. Journal of General Plant Pathology, Tokyo, V. 66, n.1, P.64-67.
- Kaper, J.M and Waterworth, H.M. 1981. Cucumoviruses, HandBook of Plant Virus Infections, Holland, 257-263.
- Karanfil, A., Soylu, B. and Korkmaz, S., 2016a. Çanakkale İli Ve İlçelerindeki Soğanlı Süs Bitkilerinde Hıyar Mozaik Virüsü Enfeksiyonunun Serolojik Ve Moleküler Yöntemler İle Araştırılması. Trakya University Journal of Natural Sciences, 17(2): 105-110.
- Karanfil, A., Gökdağ, S. and Korkmaz, S. 2016b. Çanakkale ili ve ilçeleri ıspanak üretim alanlarındaki Pancar nekrotik sarı damar virüsü (Beet necrotic yellow vein virus; BNYYV) enfeksiyonunun araştırılması. Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi, 592, 5-8 Eylül, Konya.
- Karanfil, A., Korkmaz, S., 2017. Çanakkale ili börülce üretim alanlarında Hıyar mozaik virüsü (Cucumber mosaic virus; CMV)'nün tespiti ve kılıf protein genine göre moleküler karakterizasyonu. Bitki Koruma Bülteni, 57 (3), 293-304.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution, 33: 1870-1874.
- Okonkwo, V.N and Bailiss, K.W. 1979. Virus infection of spinach (*Spinacea oleracea L.*) in Britain. Journal of Horticultural Science, University Of london 54(4): 289-297.
- Palukaitis, P. and Garcia-Arenal, F. 2003. Cucumber mosaic virus. AAB. Descriptions of Plant Viruses, No. 400.
- Parella, G., Gognalons, P., Gebre-Selassi, K., Volvas, C. and Marchoux, G. 2003, An update of the host range of Tomato spotted wilt virus, Journal of Plan Pathology, İtaly, 85:227-264.

- Roossinck, M.J. 2002. Evolutionary history of Cucumber mosaic virus deduced by phylogenetic analyses. *Journal of Virology*, 76(7), 3382–3387.
- Sarı S. 2015. Samsun ilinde yetiştirilen yazlık sebzelerde enfeksiyon oluşturan Cucumber mosaic virus (CMV) izolatlarının karakterizasyonu ve konukçu-simptom-satellit RNA ilişkilerinin araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 89s.
- Sertkaya, G. 2015. Hatay ili marul ve ıspanak alanlarında bazı virüslerin araştırılması. *Journal of Agricultural Faculty of Mustafa Kemal University Research Article*. 20(1): 7-12.
- Tamada, T. and Baba, T., 1973. Beet necrotic yellow vein virus from “Rhizomania” affected sugar beet in Japan. *Annls. Phytopath. Soc. Japan*, 39:325-352.
- TÜİK, 2016. Bitkisel Üretim İstatistikleri Veri Tabanı, www.tuik.com.tr. Erişim Tarihi: 10.03.2017
- Vural, H., Eşiyok, D. and Duman, İ. 2000. Kültür sebzeleri (Sebze yetiştirme), Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, İzmir, 95s.
- Whitney, A.D. and Duffus, J.E. 1986. *Compendium of beet diseases and insects*, American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Wilson, A.D. 1983. Studies of two cucumber mosaic virus isolates from spinach in the winter garden area of Texas. M.S thesis, Texas A&M University, College Station, 1p.
- Yang, Y., Correll, J.C., Morelock, T.E., and Anderson, E.J. 1993, Characterization of a seed-transmitted of cucumber mosaic virus (CMV) isolate from spinach (*Spinacia oleracea*), *Phytopathology*, 83:1403.
- Zhao, L., Feng, C., Hao, X., Wang, R., Hu, L., Wang, Q. and Wu, Y. 2013. Detection and molecular variability of Turnip mosaic virus (TuMV) in Shaanxi, China. *Journal of Phytopathology*, 162(7-8), 519-522.

