



**T.C.  
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HATAY İLİNDE CUCURBİTACEAE FAMILİYASINA AİT BİTKİLERDE  
YENİ TANIMLANAN BAZI VİRÜSLERİN DAS-ELISA ve RT-PCR  
YÖNTEMLERİYLE SAPTANMASI VE MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU**

**HÜLYA ÜSTÜNKAYA**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATAY  
NİSAN-2019**



T.C.  
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HATAY İLİNDE CUCURBİTACEAE FAMILİYASINA AİT BİTKİLERDE  
YENİ TANIMLANAN BAZI VİRÜSLERİN DAS-ELISA ve RT-PCR  
YÖNTEMLERİYLE SAPTANMASI VE MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU

HÜLYA ÜSTÜNKAYA

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY  
NİSAN-2019

**T.C.**  
**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HATAY İLİNDE CUCURBİTACEA FAMILİYASINA AİT BİTKİLERDE YENİ  
GİRİŞ YAPAN VİRÜSLERİN ELISA VE PCR YÖNTEMİYLE SAPTANMASI VE  
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

**HÜLYA ÜSTÜNKAYA**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Prof. Dr. Mona GAZEL** danışmanlığında hazırlanan bu tez **22/04/2019** tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mona GAZEL  
Başkan

Prof. Dr Kadriye ÇAGLAYAN  
Üye

Dr.Ögr. Üyesi Eminur ELÇİ  
Üye

**Kod No:**

**Prof. Dr. Erdal SERTKAYA**  
**Enstitü Müdürü**

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: Metin girmek için burayı tıkklatın.

**Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.**

22.04.2019

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

**HÜLYA ÜSTÜKAYA**

## ÖZET

### HATAY İLİNDE CUCURBITACEAE FAMILYASINA AİT BİTKİLERDE YENİ TANIMLANAN BAZI VİRÜSLERİN DAS-ELISA ve RT-PCR YÖNTEMLERİYLE SAPTANMASI VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Bu çalışma ile Hatay ilinde *Cucurbitaceae* familyasına ait bitkilerde yeni tanımlanan bazı virüslerin (cucurbit sarı bodurlaşma bozukluğu virüsü CYSDV, cucurbit klorotik sarılık virüsü CCYV, şekerpancarı yalancı sarılık virüsü BPYV) DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleriyle saptanması ve moleküler karakterizasyonlarının yapılması amaçlanmıştır.

Hatay ilinde yetiştirilen kabak, hıyar ve kavun bitkilerinde virüs benzeri belirtiler gösteren toplam 90 adet örnek toplanmıştır. Gözlenen en yaygın belirtiler yapraklarda küçülme, deformasyon, yaprak kırışıklıkları, kıvrılmalar ve damar açılmalarıdır. DAS-ELISA testi sonuçlarına göre testlenen tüm örneklerde CCYV bulunamamıştır. RT-PCR analizleri sonucunda testlenen örneklerde BPYV ve CCYV bulunamamış ancak CYSDV'nin heat shock protein 70h (HSP70h) genini çoğaltan 364 bp büyüklüğünde PCR amplikasyonları 11 örnekte (9 kabak, 2 kavun) elde edilmiştir. Bu ürünlerden 10 tanesinin doğrudan iki yönlü sekans analizi sonucunda, elde edilen nükleotid dizilerinin gen bankasında kayıtlı CYSDV izolatları ile yüksek oranda (%99) benzerlik gösterdiği saptanmıştır. CYSDV izolatlarından CYSDV-48 kabak izolatının GenBankasında kayıtlı AY580974.1 İspanya hıyar izolatıyla %99 oranında benzer olduğu belirlenmiştir.

2019, 48 sayfa.

**Anahtar Kelimeler:** *Cucurbitaceae*, virus, RT-PCR, DAS-ELISA, sekanslama

## ABSTRACT

### MOLECULAR CHARACTERIZATION AND DETECTION BY DAS-ELISA AND RT-PCR ANALYSIS OF SOME NEW EMERGING VIRUSES IN *CUCURBITACEAE* FAMILY PLANTS GROWING IN HATAY PROVINCE

The aim of the present study was to investigate the occurrence and characterization of some new emerging viruses (cucurbit yellow stunting disorder virus CYSDV, cucurbit chlorotic yellows virus CCYV, beet pseudo-yellows virus BPYV) in *Cucurbitaceae* family plants growing in Hatay province by DAS-ELISA and RT-PCR analysis.

Totally 90 samplas showing virus-like symptoms were collected from cucumber, melon and squash plants growing in Hatay province. The most common symptoms were and observed as vein clearing, leaf rolling, crinkling, deformation and small leaves. According to DAS-ELISA results, all tested samples were found negative for CCYV. RT-PCR analysis showed that CCYV and BPYV was not detected in all tested samples but, heat shock protein 70h (HSP70h) gene of CYSDV was succesfully amplified in 11 samples (9 squash, 2 melon) and 364 bp amplicon was obtained. Ten PCR product were directly sequenced on both strands and nucleotide sequences of isolates shared the highest sequence identity (99%) between each other. CYSDV-48 squash isolate is very similar with AY580974.1 Spain-cucumber isolate deposited in GenBank.

2019, 48 pages.

**Key words:** *Cucurbitaceae*, virus, RT-PCT, DAS-ELISA, sequencing

## TEŐEKKÖR

Yüksek lisans tez konusunun belirlenmesinde, araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmayı yönlendiren ve her türlü yardımı esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Mona GAZEL' e ve Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN' a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez konusunun belirlenmesi ve çalışmaların takip edilmesinde her türlü yardımı esirgemeyen çalışmamda konusunda yardımcı olan Ziraat Yüksek Mühendisi Mehtap ACIOGLU ve Bahar TUNÇ'a isimlerini burada zikredemediğim ama yardımlarını esirgememiş tüm arkadaşlarıma ve çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen, her zaman arkamda olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	I
ABSTRACT .....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	VIII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
2.1. <i>Cucurbitaceae</i> familyasına ait bitkilerde saptanan virüsler konusunda yapılmış çalışmalar.....	5
2.2. <i>Cucurbitaceae</i> familyasına ait bitkilerde yeni giriş yapan virüsler konusunda yapılmış çalışmalar.....	11
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	16
3.1. Materyal .....	16
3.2. Yöntem.....	16
3.2.1 Bitki Örneklerin Toplanması.....	16
3.2.2 Serolojik çalışmalar (DAS-ELISA) .....	16
3.2.2.1 Mekanik İnokulasyon ile Taşıma Denemeleri .....	17
3.2.3 Moleküler Çalışmalar.....	18
3.2.3.1 Toplam Ribo Nükleik Asit (RNA) İzolasyonu .....	18
3.2.3.2 Qiagen RNA Ekstraksiyon Kiti ile modifiye MacKenzie yöntemiyle RNA İzolasyonu .....	18
3.2.3.3 Silica Yöntemiyle RNA Ekstraksiyonu (Rott ve Jelkmann, 2001) .....	19
3.2.3.4 Reverse Transkripsiyon (RT; Reverse Transcription) .....	20
3.2.3.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	21
3.2.3.6 PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Jel Elektrofrez .....	22
3.2.3.7 DNA Dizileme ve BLAST Analizleri .....	23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA .....	24
4.1 Arazi Çalışmaları .....	24
4.2. DAS-ELISA Analizleri .....	26
4.3 Mekanik İzolasyon sonuçları .....	26
4.4 Moleküler Çalışmalar.....	27
4.4.1 Kabak, kavun ve hıyar örneklerinden NA İzolasyonu .....	27
4.4.2 RT-PCR ve PCR analizleri .....	29
4.4.3 Filogenetik Analizi.....	35
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	37
KAYNAKÇA .....	39
ÖZGEÇMİŞ .....	46





## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	Hıyar bitkisine yapılan mekanik inokulasyon çalışmasından bir görüntü .....	18
Şekil 3.2.	PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jele yüklenmesi.....	23
Şekil 4.1.	Hatay ilinden toplanan kavun, kabak ve hıyar bitkilerinden alınan örnek sayıları.....	24
Şekil 4.2.	Hıyar bitkilerinde gözlenen yapraklarda küçülme, deformasyonlar, yaprakta renk değişikliği ve koyu renk lekelenme simptomları .....	25
Şekil 4.3.	Kavun bitkilerinde gözlenen yapraklarda sararma ve mozaik leke simptomları) .....	25
Şekil 4.4.	Mekanik inokulasyon yapıldıktan sonra 2 hafta sonra tütün bitkilerinin görünümü .....	26
Şekil 4.5.	Mekanik inokulasyon yapıldıktan sonra 2 hafta sonra hıyar bitkilerinin görünümü .....	26
Şekil 4.6.	Qiagen RNA yöntemi ile ekstrakte edilen kavun (31 no'lu örnek) RNA'sının Nanodrop aleti ile spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD) ölçüm grafiği .....	27
Şekil 4.7.	Qiagen RNA yöntemi ile ekstrakte edilen kavun (27 no'lu örnek) RNA'sının Nanodrop aleti ile spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD) ölçüm grafiği .....	27
Şekil 4.8.	Qiagen RNA yöntemi ile ekstrakte edilen kabak (16 no'lu örnek) RNA'sının Nanodrop aleti ile spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD) ölçüm grafiği .....	28
Şekil 4.9.	Silica yöntemi kullanılarak ekstrakte edilen kabak (51 no'lu örnek) RNA'sının spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD) ölçüm grafiği.....	28
Şekil 4.10.	Silica yöntemi kullanılarak ekstrakte edilen hıyar (79 no'lu örnek) RNA'sının spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD) ölçüm grafiği .....	28
Şekil 4.11.	Farklı virüslere spesifik primerlerle yapılan PCR analizinde sistem kurma çalışması M: Marker (SMO#321, MBI, Fermentas), 1: BPYV pozitif kontrol (I/II primer çifti) =251 bp, 2: CYSDV pozitif kontrol (F/R primer çifti) =364 bp, 3:CCYV pozitif kontrol (RdRpF/RdRpR primer çifti) =709 bp,W: Su Kontrol.....	30
Şekil 4.12.	CCYV'e spesifik RdRpF/RdRpR primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü M: Marker (SMO#321, MBI, Fermentas) 28-29: Kavun örnekleri,43-47 Kabak Örnekleri +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol .....	30
Şekil 4.13.	CCYV'ye spesifik RdRpF/RdRpR primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizi sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü M: Marker (SMO#321, MBI, Fermentas), 49- 55: Kabak Örnekleri +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol.....	31

Şekil 4.14. BPYV'ye spesifik I/II primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizi sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü M: Marker (SMO#321, MBI, Fermentas), 48- 53: Kabak Örnekleri +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol.....	31
Şekil 4.15. CYSDV'ye spesifik F/R primer çifti kullanılarak PCR yapılan örneklerin agaroz jel elektroforez görüntüsü M: Marker (SMO#321, MBI, Fermentas), 1- 3: Hıyar, 4-9: Kavun,10-17: Kabak örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol .....	32
Şekil 4. 16. CYSDV'nin örtü proteinine (CP) spesifik CPF/CPR primer çifti kullanılarak PCR yapılan jel elektroforez görüntüsü M: Marker (SMO#321, MBI, Fermentas), 1- 12= Kabak, Hıyar ve Kavun örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol .....	32
Şekil 4. 17. CYSDV'e spesifik örtü protein bölgesini çoğaltan CYSCPF/CYSCPR primeri çifti kullanılarak yapılan PCR jel elektroforez görüntüsü M: Marker (SMO#321, MBI, Fermentas), 28, 29 =Kavun örnekleri, 43, 47 Kabak örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol .....	33
Şekil 4. 18. Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV)'ünün farklı izolatlarının sekans analizleri sonucunda elde edilen filogenetik ağaç.....	36

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Ülkemizde hıyar, kavun ve karpuzun son 5 yıllık üretim miktarları.....	2
Çizelge 3.1. Hıyar, kavun ve kabak örneklerinde bulunan virüslerin saptanması amacıyla yapılan RT-PCR analizlerinde kullanılan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri, çoğaltıldığı bölge ve baz büyüklükleri.....	21
Çizelge 4.1. Hatay ilinden toplanan kavun, kabak ve hıyar bitkilerinden alınan örnek sayıları .....	24
Çizelge 4.2. Kabak, hıyar ve kavun örneklerinden ekstrakte edilen bazı RNA ların nanodrop ölçüm değerleri.....	29
Çizelge 4.3. Hatay ilinden toplanan kabak, hıyar ve kavun bitkilerinden yapılan PCR analizleri sonucunda yeni giriş yapan virüslerin bulunma durumu .....	34



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER

°C	Sıcaklık
Da	Dekar
mg	Miligram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
gr	Gram
M	Molar
mM	Mili molar
pmol	Piko mol
g	gram

### KISALTMALAR

A.B.D	Amerika Birleşik Devletleri
bp	baz çifti
d <sub>2</sub> O	Çift distile su
DNA	Deoksiribonükleik Asid
RNA	Ribonükleik Asid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	Ethidium Bromid
ETOH	Ethanol
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TAE	Tris asetat EDTA
TE	Tris EDTA
UV	Ultraviyole
V	Volt

CCYV	Cucurbit chlorotic yellows virüs
CYSDV	Cucurbit yellow stunting disorder virus
BPYV	Beet pseudo-yellows virus
ToMV	Domates mozaik virüsü),
PMMV	Biber hafif benek virüsü
CMV	Cucumber mosaic virus,
ZYMV	Zucchini yellow mosaic virus
WMV	Karpuz mozaik virüsü
CGMMV	Cucumber green mottle mosaic virus
SqMV	Squash mosaic comovirus
PRSV	Papaya ringspot virus
NaCl	Sodium Chloride
LiCl	Lithium Chloride

## 1.GİRİŞ

Açıkda ve serada yetiştirilen sebzelerden *Cucurbitaceae* familyasına ait hıyar, kabak, karpuz, ve kavun gerek besin gerekse vitamin içerikleri bakımından oldukça zengindir. Özellikle kavun ve karpuz yüksek su içerikleri, iştah açıcılık, tat ve serinletici özellikleri bakımında yaz mevsiminin meyveleridir. Hıyar zengin su içeriği ve vitamin içeriği bakımından, turşu yada taze olarak sofralarımızda sürekli tüketilen sebzedir. Ayrıca bu sebzeler, turşu, konserve, reçel olarak tüketilmeleri ile hayatımızda önemli bir yer tutmaktadır (Karamanlı, 2007).

Kabak yetiştiriciliği ülkemizin bütün bölgelerinde yapılmaktadır. Özellikle Akdeniz ve Ege bölgelerinde kabak yetiştiriciliği oldukça önemlidir. Akdeniz Bölgesi'nde sebze üretiminde kabakgil yetiştiriciliği açık alanda ve örtü altı üretiminde yaygın olarak yapılmaktadır. Dünyada ve ülkemizde değişik amaçlarla üretilen ve çeşitli türleri olan kabak, 2017 yılı verilerine göre, dünyadaki ekim alanı yaklaşık 1,5 milyon ha, üretim miktarı ise yaklaşık 20 milyon tondur. Dünyadaki kabak üretiminin %29'unu Çin, %18'ini Hindistan, %5'ini Ukrayna karşılamaktadır. Üretim sıralamasında Türkiye, Arjantin ve Japonya ile birlikte ve yaklaşık %4' lük bir üretim payı ile dördüncülük konumunda bulunmaktadır (TUİK, 2017). İstatistiki verilere göre Türkiye'nin toplam sebze üretimi 25 milyon ton civarında olup, bunun 6 milyon ton kadarını kabakgiller oluşturmaktadır (TÜİK, 2017). Kabakgiller bu üretim miktarı ile Türkiye sebze üretiminin % 23'ünü oluşturmaktadır. Kabak sıcak iklimden hoşlanan fakat değişik iklim koşullarında yetiştirilebilme şansına sahip olan tek yıllık bir bitkidir. Olgunlaşmış ve olgunlaşmamış meyvelerinin insan beslemesinde kullanılmasının yanında besleyici değeri yüksek olan tohumları da özellikle ülkemiz, Akdeniz ülkeleri ve Ortadoğu ülkelerinde çerezlik olarak kullanılmakta (Anonim, 2007), ayrıca gıda, ilaç ve kozmetik sanayinde değerlendirilebilmektedir (Robinson ve Decker-Walters, 1997). Derin, geçirgen, su tutma kabiliyeti çok iyi organik ve mineral maddelerce zengin tınlı topraklarda en iyi mahsul ve tohum alınır. Kumlu topraklarda çiftlik gübresi ve ticaret gübresi kullanılarak kabak yetiştiriciliği yapılabilir. Toprak pH'sı 6-7 civarında olmalıdır.

Hıyar bitkisi gelişmesini 15°C' nin üzerindeki sıcaklıklarda sürdürmektedir. Yetiştirme sıcaklığı gece optimum 15-18 °C olmakla beraber gündüz ise 20- 25 °C' dir

Nemli topraklarda iyi yetişir. Toprak yapısının tınlı-kumlu, kumlu-tınlı bünyeye sahip olması, tuz içeriğinin çok yüksek olmaması, pH nında hafif asidik (5,5-7,5) olması istenir. 2017 verilerine göre hıyar 357.595 ha alanda yetiştirilmekte olup 1.827.782 ton üretim elde edilmiştir, bu 2016 yılına oranla % 5,9 pay almıştır (TUİK, 2017).

Karpuz bitkisi, derin, iyi havalanabilen, su tutma kapasitesi yüksek olan, kumlu, kumlu-tınlı bünyeye sahip, drenaj sorunu olmayan ve pH'sı 6-7 arasında olan topraklarda iyi gelişir. 2017 verilerine göre karpuz da 4.011.313 ton üretim miktarı 904.884 dekar yetiştirilme alanı 2016 yılına oranla % 13 pay almıştır (TUİK, 2017).

Kavunun gen merkezini Anadolu, İran, Afganistan, Afrika'nın tropik ve subtropik bölgeleri oluşturur. Genellikle dondurma yapımında, meyve suyu, meyveli yoğurt yapımında ve parfümeride kullanılmaktadır. 2017 verilerine göre kavun da 1.813.422 ton üretim miktarı, toplam 786.632 dekar alandan elde edilmekte ve 2016 yılına oranla % 5.9 pay almıştır (TUİK, 2017). Ülkemizde hıyar, kavun ve karpuzun son 5 yıllık üretim miktarı Çizelge 1.1'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Ülkemizde hıyar, kavun ve karpuzun son 5 yıllık üretim miktarları

	<b>Hıyar</b>	<b>Kavun</b>	<b>Karpuz</b>
<b>2013</b>	1 754 613	1 699 550	3 887 324
<b>2014</b>	1 780 472	1 707 302	3 885 617
<b>2015</b>	1 822 636	1 719 620	3 918 558
<b>2016</b>	1 811 681	1 854 356	3 928 892
<b>2017</b>	1 827 782	1 813 422	4 011 313

Kabakgillerde 40' dan fazla virüs ve virüs benzeri hastalık belirlenmiştir. Bu virüs hastalıkları bitkilerde gelişme geriliğine sebep olmakta şiddetli enfeksiyonlar sonucunda ise anormal meyve oluşumu meydana gelmektedir. Kabakgillerde saptanan ve çok fazla çalışma yapılmış olan virüs hastalıkları şunlardır: kabak sarı mozaik virüsü (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV), hıyar mozaik virüsü (cucumber mosaic virus, CMV), kabak mozaik virüsü (squash mosaic virus, SqMV), karpuz mozaik virüsü II (watermelon mosaic virus- II, WMV- II), papaya halkalı leke virüs (papaya ring spot virus, PRSV= WMV-1) kabakgillere zarar veren en önemli virüslerden bazılarıdır. ZYMV, diğer potyviruslerde olduğu gibi yaprak bitleri ile non- persistent olarak



taşınmaktadır (Lisa ve ark., 1981; Lecoq ve ark., 1991). *Myzus persicae* ve *Aphis gossypii* ZYMV'nin en önemli vektörleri olarak bildirilmiştir (Lisa ve Lecoq, 1984; Purcifull ve ark., 1984; Provvidenti, 1992).

CMV' nin partikül ağırlığının %18'ini tek kollu RNA oluşturmakta ve viral genom, RNA 1, RNA 2 ve RNA 3 olarak isimlendirilen pozitif duyarlı tek kollu 3 RNA'ya bölünmektedir (Lot ve ark., 1974; Paden ve Symons, 1973). Virüsün protein mantosunun rol oynayan RNA, RNA 4 olarak bilinmektedir (Gould ve Symons, 1983; Schwinghamer ve Symons, 1975). CMV ile ilgili olan bir diğer RNA türü ise, satellit RNA olarak isimlendirilen RNA 5'tir (Martelli ve Quacquarelli, 1988; Kaper ve Waterworth, 1981). CMV, yaklaşık 30 nm çapında 3 tip icosahedral partikülden meydana gelmektedir. Genom yapıları tek iplikçikli doğrusal RNA'dan meydana gelmektedir (Francki ve ark., 1979). CMV dışında çeşitli kültür bitkilerinde sorun olan önemli Cucumovirüsler de bulunmaktadır (Kaper ve Waterworth, 1981; Palukaitis ve ark., 1992; White ve ark., 1995). Genel olarak bu virüslerin kabakgillerde özellikle kavunda bodurluk, kloroz, deformasyon, mozaik, genç sürgünlerde iplikleşmeye ve çiçek azalmasına neden olduğu ve buna bağlı olarak da ürün kayıplarına yol açtığı bildirilmiştir (Blua ve Perring, 1989).

Dünyada *Cucurbitaceae* familyasına giren bitkilerde bulunan ve uzun yıllar boyunca çalışılan virüs hastalıkları yanında son yıllarda yeni giriş yapan virüsler şekerpancarı yalancı sarılık virüsü BPYV, cucurbit klorotik sarılık virüsü CCYV, cucurbit sarı bodurlaşma bozukluğu virüsü CYSDV belirlenmiş ve birçok ülkede saptanmışlardır. Son yıllarda *Cucurbitaceae* familyasına ait bitkilerde saptanan ve yeni giriş yapan virüslerden CSYDV'nin şiddetli sararmaya neden olduğu, meyve ağırlığını önemli ölçüde etkilediği ve %30-50 arasında verim kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Abou Jawdah ve ark., 2000). CCYV hıyar, kavun ve karpuz bitkilerinin yapraklarında klorotik lekelere ve tüm yaprağın sararmasına neden olmakta ve hıyarlarda önemli verim kaybına neden olduğu, kavunların market değerini düşürmekle birlikte şeker içeriğini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Gyoutoku ve ark., 2009). Ülkemizde *Cucurbitaceae* familyasına ait bitkilerde yeni giriş yapan virüslerden sadece CSYDV Antalya ilinde saptanmış olup detaylı bir çalışma ve diğer virüslerin varlığı hakkında bir bilgi bulunmamaktadır.

Bu alışma kapsamında Hatay ilinde yetiştirilen kabakgil familyasına giren kabak, kavun ve hıyar bitkilerinde yeni giriş yapan virüslerden, cucurbit klorotik sarılık virüsü (cucurbit chlorotic yellows virüsü: CCYV), cucurbit sarı bodurlaşma bozukluğu virüsü (cucurbit yellow stunting disorder virus: CYSDV), şekerpancarı yalancı sarılık virüsü (beet pseudo-yellows virus: BPYV)'nün varlığının biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemlerle saptanması ve elde edilen virus izolatlarının sekans analizlerinin yapılması amaçlanmıştır.



## 2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. *Cucurbitaceae* familyasına ait bitkilerde saptanan virüsler konusunda yapılmış çalışmalar

Hıyar mozaik virüsü (cucumber mosaic virus, CMV) Bromoviridae familyasının Cucumovirüs cinsine ait bir virüs olup ilk kez Amerika Birleşik Devletleri'nde 1916 yılında Doolittle tarafından hıyar bitkisinde bulunmuş ve 1934 yılında Price tarafından izole edilmiştir (Brunt ve ark., 1990). Cucumovirüsler pozitif anlamlı (positive sense) üç parçalı genoma sahiptirler (Kaper ve Waterworth, 1981; Palukaitis ve ark., 1992; White ve ark., 1995).

CMV, 85 familyadan yaklaşık 775'in üzerinde 1000'e yakın değişik bitki türünü hastalandıran ve çok çeşitli belirtiler oluşturabilen, *Cucurbitaceae* familyası dahil olmak üzere oldukça geniş konukçu dizisine sahip bir virüstür (Tien ve ark., 1987; Francki ve ark., 1979; Kaper ve Waterworth, 1981). Benzer şekilde CMV'nin yabani ve kültür bitkileri içerisinde 85 bitki familyası içerisinde 800 den fazla monokotiledon ve dikotiledon bitki türünde zararlı olduğu değişik araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Palukaitis ve ark., 1992).

Cucumovirüsler yabani ve kültür bitkileri olmak üzere birçok türde gelişme geriliği, yapraklarda mozaikleşme ve iplikleşme ve şekil bozukluğu şeklinde belirtilere neden olmakta, vektör böcekler, mekanik inokulasyon, aşı ve tohum ile taşınabilmektedir (Anonim, 2002). CMV, 60'dan fazla yaprak biti türü ile non-persistent biçimde taşınmaktadır (Francki ve ark., 1979). *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* ve *Acyrtosiphon pisum*'un CMV'nin en önemli vektörleri arasında yer aldığı bildirilmiştir (Grube ve ark., 2000). CMV yaprak bitleri dışında mekanik inokulasyon ve tohumla da taşınabilmektedir. Yapılan bir çalışmada CMV'nin %4-18 oranında börülce tohumları ile taşınabildiği ancak hıyar tohumları ile kolaylıkla taşınmadığı bildirilmiştir (Gibbs ve Harrison, 1970; Richardson, 1990). Ülkemizde yapılan bir çalışmada CMV'nin %36.8 oranında hıyar tohumlarında bulunduğu bildirilmiştir (Gümüş ve ark., 2004).

KKTC'de yapılan CMV ve kabak sarı mozaik virüsü (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV) ilgili yapılan araştırmada %40.5 oranında ZYMV enfeksiyonu

belirlenirken CMV'ü belirlenememiştir (Karamanlı, 2007). Oregon eyaletinde (ABD) ZYMV ve WMV-II gibi virüslerin kabakgillerde en yaygın virüs olduğu bildirilmiştir (Anonim, 2014c). Kabakgil virüslerine karşı dayanıklılık ile ilgili yapılan karşıt korunma gibi çalışmalarda olumlu sonuçlar alınmıştır. ZYMV' nin zayıf ırkı ZYMV-WK ile başarılı sonuçlar alındığı meyve kalitesinde önemli artışlar olduğu belirlenmiştir (Wang ve ark., 1991; Lecoq ve ark., 1991; Prieto ve ark., 2001). Adana, Mersin, Hatay ve Şanlıurfa illerinde bulunan kavun, domates ve biber bitkilerinden elde edilen CMV izolatlarının biyolojik, serolojik ve moleküler tanılanması, sınıflandırılması ve ürettikleri satellit-RNA'lar ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada, kavundan alınan CMV izolatı (CMV-K)'nin zayıf ırk olduğunu ve bu ırkta simptomun satellit-RNA'den kaynaklanabileceğini, CMV-K'nın çapraz koruma olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Çağlar, 2006). Kavunlarda etkili bir vektör olan *A. gossypii* ile CMV taşınmasını engellediği bildirilmiştir (Martin, 2003). Ülkemizin farklı yerlerinden toplanan kavun örneklerinin, ZYMV, WMV ve CMV'ye dayanıklılığının araştırıldığı bir çalışmada CMV'ye dayanıklı genotip bulunamadığı bildirilmiştir (Ekbiç ve ark., 2010).

ZYMV, kabakgillerde dünya genelinde oldukça yaygın ve en önemli virüslerden biridir. ZYMV, 750 nm uzunlukta ve 11 nm genişlikte ipliksi yapıda bir virüstür. Genom parçaları tek iplikli doğrusal RNA'dan meydana gelmektedir (Brunt ve ark., 1996). ZYMV bir potyvirus olup, mekanik inokulasyon ve yaprak bitleri ile non-persistent olarak taşınmaktadır. Bitkilerde gelişme geriliğine, sarı mozaiklere, yapraklarda bükülmeye, yaprak ve meyvede şekil bozukluğuna neden olmaktadır (Lisa ve ark., 1981; Yılmaz ve ark., 1994; Zitter ve ark., 1996). Etmen ilk kez İtalya'da kabak (*Cucurbita pepo*) bitkilerinde Lisa ve ark., (1981) tarafından rapor edilmiştir. ZYMV, Türkiye'de ilk olarak 1984 yılında saptanmıştır (Yılmaz ve Davis, 1984). Daha sonra yapılan kapsamlı survey çalışmalarında alınan örnekler ELISA ile testlenmiş ve ZYMV enfeksiyonu saptanmıştır (Yılmaz ve ark., 1992). Fransa'da bu virüsün zayıf bir izolatı bulunmuş (Lecoq ve ark., 1991) ve ülkemizde de ZYMV ile mücadele amacıyla çapraz koruma (cross-protection) çalışmalarında kullanılmıştır (Yılmaz ve ark., 1994). Ontario (Kanada)' da hıyar bitkilerinin %80'inde ZYMV enfeksiyonu olduğu belirlenmiştir (Stobbs ve Van Schagen, 1990). ZYMV, kabakgillerde bodurluk, kloroz, yaprak ve meyvelerde deformasyon ve çiçek sayısında azalmalara neden olmakta ve buna bağlı olarak verim kaybı meydana gelmektedir. Kantolop (Cantoloupe) kavun çeşidinde

bitkiler çiçeklenme başlangıcında ZYMV ile inokule olduğu zaman %76-94 oranında meyve kaybına neden olmuştur (Blua ve Perring, 1989). Meyve ve yapraklarda şiddetli deformasyon meydana getiren ZYMV'nin bazı ülkelerde %80'nin üzerinde ürün kayıpları meydana getirdiği ve kabakgil üretimini önemli ölçüde sınırladığı bildirilmiştir (Al-Shahwan, 1990; Stobbs ve Van Schagen, 1990). ZYMV'nin kabak, kavun, hıyar ve kabak bitkileri üzerinde lokal lezyon, latent enfeksiyonlara, mozaikleşme ve deformasyon belirtilerine neden olduğu rapor edilmiştir (Brunt ve ark., 1996).

ZYMV mekanik olarak aktarıldığı kabak, kantolop kavunu ve karpuzda şiddetli belirtilere neden olduğu bildirilmiştir (Lisa ve ark.,1981). ZYMV, diğer potyvirusler gibi yaprak bitleri ile non-persistent olarak taşınmaktadır (Lisa ve ark., 1981; Lecoq ve ark., 1991). Şeftali yaprak biti (*Myzus persicae*) ve pamuk yaprak biti (*Aphis gossypii*) ZYMV'nin en önemli vektörleri olarak bildirilmiştir (Lisa ve Lecoq, 1984; Purcifull ve ark.,1984; Castle ve ark., 1992). ZYMV ayrıca patates yaprak biti (*Macrosiphum euphorbiae*), turunçgil yeşil yaprak biti (*Aphis citricola*) ile de taşındığı bildirilmiştir (Adlerz ve ark., 1987). Lübnan'da ZYMV ve cucurbit yaprak biti kökenli sarı virüs (cucurbit aphid-borne yellow virus CABYV)'lerinin hıyar yetiştirilen bölgelerde en yaygın virüsler olduğu saptanmıştır (Abou-Jawdah ve ark., 2000).

Castle ve ark, (1992), ZYMV'nin çeşitli yaprakbiti türleri ile taşıma oranını belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada *Myzus persicae*'nin %41, bezelye yaprak biti (*Acyrtosiphon pisum*)'un %40, *Aphis gossypii*'nin %35 oranlarında virüsü taşıdığını rapor etmişlerdir. ZYMV'nin vektör etkinliğini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada *A. craccivora*'nın %52.77 taşıma oranıyla *A. gossypii*'ye kıyasla daha etkili bir vektör olduğu belirlenmiştir (Yuan ve Ullman, 1996). Bostan ve ark. (2002), Erzurum, Erzincan ve Artvin illerinde kabakgillerdeki viral etmenleri belirlemek amacıyla yapmış oldukları çalışmada semptom gösteren kabakgil bitkilerinden 90 adet yaprak örneğinin tamamının ZYMV ile infekteli olduğunu, CMV enfeksiyonunun saptanmadığını, yıl içerisinde hastalıklı bitki sayısının arttığını bildirmiştir. Samsun ilinde kabakgil virüslerini araştırmak üzere yapılan bir çalışmada Temmuz-Ekim ayları arasında toplanan 165 adet örneğin ELISA sonucunda %53.9 oranında WMV -2, %38.8 oranında ZYMV ve %20.6 oranında CMV enfeksiyonu tespit edilmiştir. ZYMV ve WMV-II testlenen tüm kabakgil türlerinde saptanırken, karpuz ve balkabağında CMV saptanamamıştır (Şevik ve Sökmen, 2003).

Hatay ilinin farklı yörelerinden, 2003 yılında yazlık kabak (*Cucurbita pepo*), kışlık kabaklar (*Cucurbita maxima* ve *C. moschata*), kavun ve hıyar bitkilerinde şiddetli mozaik lekeler, sararma, uç sürgünlerdeki yapraklarda ayakkabı bağı görünümü, bodurlaşma ve meyvelerde şekil bozukluğu gibi belirtiler gözlenmiş olup, semptomlu bitkiler ELISA ile testlenmiş, şiddetli semptom sergileyen hıyar örneklerinin hiç birinde ZYMV saptanamamıştır. Aynı çalışmada şiddetli semptom gösteren meyvelerden çıkarılan tohumlar çimlendirilerek %86-94 oranında bitki elde edilmiştir. Özellikle kabak fidelerinde %2-3 oranında genel kloroz, bodurlaşma ve yaprak deformasyonu gözlenmiş, ELISA sonucunda tohumdan elde edilen fidelerin hiç birinde ZYMV belirlenmemiştir. Şiddetli semptom gösteren kabaklardan elde edilen özsu ile yapılan biyolojik testlemelerde mekanik inokulasyondan 2 hafta sonra test bitkilerinde ZYMV'ye özgü semptomlar gözlenmiştir. ELISA sonucunda ZYMV ile enfekteli olduğu belirlenen kabak bitkileri üzerinde 7 gün süre ile beslenen *Myzus persicae* bireyleri 10'arlı gruplar halinde sağlıklı kabak fideleri üzerine aktararak 3 gün süre ile tutulmuş, afitle taşıma çalışmalarında kullanılan test bitkilerinde 3 hafta içerisinde yapraklarda klorotik ve mozaik lekelenmeler, şekil bozukluğu, bodurlaşma ve fide ölümleri gibi belirtiler ortaya çıkmıştır (Sertkaya ve ark., 2004).

Sera şartlarında ZYMV'nin şiddetli irkinin hıyar bitkisindeki zararının virüsün zayıf ırkı olan ZYMV-WK ile kontrol edilmesinin araştırıldığı bir çalışma sonucunda, ZYMV-WK uygulaması ile 7 kat daha fazla pazarlanabilir ürün alınabildiği, şiddetli ZYMV enfeksiyonu olan yerlerde ekonomik ürün alınabilmesi için karşılıklı koruma: cross-protection uygulanması önerilmiştir (Değirmenci ve Güldür, 2006).

WMV-II, genellikle WMV olarak adlandırılır ve ilk kez karpuzda (*Citrullus lanatus*) rapor edilmiştir (Webb ve ark., 1965). WMV-II'nin mekanik olarak ve *Myzus persicae* ve *Aphis craccivora* dahil en az 29 yaprakbiti türü ile taşınabildiği, tohumla taşınmadığı belirlenmiştir (Edwardson ve Christie, 1986; Wakman ve ark., 2002).

Ülkemizde Ege Bölgesi'nde 2004 ve 2005 yıllarında sera koşullarında yapılan bir çalışmada bazı sakız kabağı ve kavun çeşitlerinin WMV-II'ye karşı gösterdikleri reaksiyonlar belirlenmeye çalışılmış, sakız kabaklarının yapraklarında şiddetli mozaik ve deformasyona ve kavun bitkilerinde ise şiddetli kabarcıklı mozaik ve şekil bozukluklarının görüldüğü olan bitkilerden izole edilen virüs izolatları ile inokule edilen kabakgil türlerinde hastalık belirtilerinin bitki çeşidine, enfeksiyon zamanına ve bitki

yaşına bağlı olarak değiştiği, kavun ve karpuz bitkilerinde orta ve şiddetli derecede bodurlaşma, yaprak deformasyonu su kabarcığı gibi simptomlar, sarı ya da açık beneklenme ve kenar klorozları şeklinde simptom olduğu gözlenmiştir. Geç enfeksiyonlarda ise kavun bitkilerinde şiddetli şekilde bodurlaşma, pazarlanabilir değeri olmayan meyve oluşumuna neden olduğu, karpuz meyvelerinde ise şekil bozukluğu, cücelik ve beneklenme görüldüğü belirlenmiştir (Kaya ve Erkan, 2009).

WMV-1 duyarlı kabakgil türlerinde belirgin yaprak belirtilerine ve bitkilerde şiddetli bodurlaşmaya neden olmaktadır. Kabakgil bitkilerinin yapraklarında, mozaik, kabarcıklı, damar bantlaşması, kıvrılma, burulma ve yaprak ayasında daralma şeklinde belirtiler meydana gelmektedir. Tepe yapraklar daralmakta ve ana damar kaybolmaktadır. Bazı çeşitlerde yapraklarda beneklenme görülmektedir. Meyvelerde ise genellikle şekil bozukluğu meydana gelmekte, bazı çeşitlerde meyve rengi değişmektedir. Hastalık etmeni tropik ve subtropik bölgelerde yaygın olup bazen sıcak bölgelerde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Anonim, 2010).

Kabak mozaik virüs (squash mosaic comovirus: SqMV), kabak, kavun ve kazayağı (*Chenopodium* sp.) tohumları ile (Grogan ve ark., 1959; Nelson ve Knuhtsen, 1973; Lockhart ve ark., 1985) ve mısır kök kurdu (*Diabrotica* spp.) ve gelin böceği (*Coccinelidae*) gibi böcek vektörlerle (Freitag, 1956; Cohen ve Nitzany, 1963; Lastra, 1968) ve mekanik olarak taşınabilmektedir (Freitag, 1956). Bitkilerde klorotik sarı lekeler, koyu yeşil damar bantlaşması ve deformasyon, ileriki dönemlerde açık yeşilden koyu yeşile değişen mozaik, yaprak yüzeyinde kabarıklıklar ve yaprakta sertlik şeklinde ve meyvelerde renksizleşme, yüzeyde kabarıklık ve şekil bozukluğu meydana getirmiştir (Davis ve Muzuki, 1987).

Papaya halkalı leke virüs (papaya ringspot virus: PRSV), *Potyvirus* cinsinde yer alan *Potyviriidae* familyasına aittir. PRSV'nin karpuz ırkı (PRSV-W) önceden WMV-1 olarak bilinmekteydi ve Amerika Birleşik Devletleri'nde kabakgilerde saptanan en yaygın virüsler arasındadır (Provvidenti, 1993; Gonsalves ve ark., 2010). PRSV ifadesi ilk kez Jensen (1949) tarafından bir papaya hastalığını tanımlamak için kullanılmıştır. PRSV, papaya ve cucurbit türlerini enfekte edebilen PRSV-P ve cucurbit türlerini enfekte edebilen fakat papaya bitkilerini enfekte etmeyen PRSV-W olarak gruplandırılmıştır (Gonsalves ve ark., 2010). Ülkemizde, Ankara, İçel, Aydın, Manisa

ve İzmir’de kabakgil alanlarında saptanmıştır. Ege Bölgesi’nden toplanan karpuz örneklerinin % 24’ünde WMV-1 ilk kez belirlenmiştir (Kaya ve Erkan, 2011).

Kabakgil virüs hastalıklarında gerekli önlemlerin alınabilmesi için hastalığın ve vektörlerinin güvenilir yöntemler ile teşhis edilmesi gerekmektedir. Bitki virüslerinin araştırılmasında değişik yöntemler bulunmakla birlikte, ELISA (Enzme-Linked Immunosorbent Assay) uygulaması oldukça kolay, çok sayıda örneği çalışabilme olanağı veren ve güvenilir yöntemlerden biri olduğundan (Lecoq ve ark., 1998), ülkemizde de sebze virüslerinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Çıtır, 1982.; Yılmaz ve ark., 1990; Çalı ve Yalçın, 1991). Serolojik tanı yöntemleri virüslerin tespit ve tanısında yaygın olarak kullanılmakla birlikte, hastalıkların fizyolojik özelliklerinin izlenmesinde de önemli bir role sahiptir. Bitki virüslerinin epidemiyolojik çalışmaları için uygulanan serolojik teknikler daha hızlı, basit, duyarlı ve ekonomik yöntemlerin gelişmesini sağlamıştır.

Son yıllarda ABD’de ZYMV ve WMV-II için ilk kez ticari olarak transgenik bitki üretimi başlamıştır (Medley, 1994; Tricoli ve ark., 1995). Ülkemizde ZYMV’ye dayanıklı transgenik kavunda meyve kalite özelliklerinin belirlenmesi ile ilgili yapılan bir çalışmada bir çok meyve kalite özelliklerinin kontrol genotipleri ile %100 gen kaçı olduğu belirlenmiştir (Yalçın Mendi ve ark., 2010).

Gaziantep’te 2004 yılında toplanan 56 kabakgil örneğinde CMV, CABYV, ZYMV, ToMV (domates mozaik virusu), PMMV (biber hafif benek virusu), PXV (patates X virusu), PYV (patates Y virüsü)’nin enfeksiyon oranlarını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, örneklerin 10 tanesinin bir ve ya birden fazla virüsle enfekteli olduğu 20 örneğin CMV, 22 örneğin ZYMV, 3 örneğin ise PVY ile enfekte olduğu saptanmıştır (Özaslan ve ark., 2006).

Sinop ve Bolu illerinden toplanan bal kabağı tohum örnekleri CMV, ZYMV, SqMV, Tobacco ring spot virus (TRSV) ve Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) için DAS-ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, tohum örneklerinin sadece ZYMV ve CMV ile enfekteli olduğu belirlenmiş ve bal kabağı tohum örneklerinde ZYMV ve CMV adlı etmenlerin bulunma oranlarının sırasıyla %12.5 ve %4.1 olduğu saptanmıştır. SqMV, TRSV ve CGMMV ile enfekteli olan hiçbir bal kabağı tohum örneğine rastlanmamıştır. (Şevik ve Balkaya., 2015).



## 2.2. Cucurbitaceae familyasına ait bitkilerde yeni giriş yapan virüsler konusunda yapılmış çalışmalar

Dünyada Cucurbitaceae familyasına giren bitkilerde bulunan ve uzun yıllar boyunca çalışılan virüs hastalıkları yanında son yıllarda yeni giriş yapan virüsler de belirlenmiş ve birçok ülkede saptanmışlardır.

Cucurbit sarı bodurlaşma bozukluğu virüsü (cucurbit yellow stunting disorder virus CYSDV), ilk kez Birleşik Arap Emirliklerinde 1982 yılında tanımlanmış olup (Hassan ve Duffur, 1991) daha sonra İspanya'da (Celix ve ark., 1996 ) ve diğer Orta Doğu ve Akdeniz Ülkelerinden Mısır, İsrail, Ürdün, Türkiye, Lübnan, Portekiz ve Fas'ta rapor edilmiştir (Wisler ve ark., 1998; Rubio ve ark., 1999; Abou Jawdah ve ark., 2000). CSYDV'nin doğal konukçularının hıyar, kavun, karpuz ve kabak gibi *Cucurbitaceae* familyası üyeleri olduğu, virüsün şiddetli sararmaya neden olduğu, meyve ağırlığını önemli ölçüde etkilediği ve %30-50 arasında verim kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Abou Jawdah ve ark., 2000). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda CYSDV *Closteroviridae* familyasında Crinivirüs cinsi içine dahil edilmiş (Wisler ve ark., 1998; Fauquet ve Mayo, 1999) olup *Bemisia tabaci* Gen ile taşındığı rapor edilmiştir (Berdiales ve ark., 1999; Celix ve ark., 1996). Etmenin konukçu dizisi oldukça geniş olup *Amaranthus retroflexus* (tilki kuyruğu), *Bassia hyssopifolia* (diken otu), *Sisymbrium irio* (bülbul otu), *Chenopodium albüm* (kazayagı), *Lactuca sativa* (marul), *Sonchus* sp (eşek marulu), *Medicago sativa* (yonca) bitkilerinde rapor edilmiştir.

Cucurbit klorotik sarılık virüsü (Cucurbit chlorotic yellows virüs, CCYV) ilk kez Japonya'da 2004 yılında kavun bitkilerinde tanımlanmış olup (Gyoutoku ve ark., 2008) daha sonraları diğer ülkelere hızla yayılmıştır. CCYV hıyar, kavun ve karpuz bitkilerinin yapraklarında klorotik yaprak lekelere ve tüm yaprağın sararmasına neden olur. Bu enfeksiyonun hıyarlarda önemli verim kaybına neden olduğu, kavunların market değerini düşürmekle birlikte şeker içeriğini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Gyoutoku ve ark., 2009). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda CCYV *Closteroviridae* familyasında Crinivirüs cinsi içine dahil edilmiştir.

Şekerpancarı yalancı sarılık virüsü (beet pseudo-yellows virus, BPYV) ilk kez beyaz sinekle taşınan *Closterovirus* olarak 1965 yılında Kalifornia'da seralarda

tanımlanmış bir virüstür (Duffus, 1965). Etmenin süs bitkileri ve yabancı otları içeren geniş bir konukçu dizisi olduğu rapor edilmiş olup BPYV enfekteli hıyar ve kavun bitkilerindeki simptomların CCYV ve CYSDV tarafından neden olunanlara oldukça benzer olduğu gözlemlenmiştir (Wisler ve ark., 1998).

*Cucurbitacea* yetiştirilen birçok Akdeniz ülkesi, Orta Doğu ve California'dan toplanan 498 cucurbit örneği marul enfeksiyöz sarılık virüsü (lettuce infectious yellows virus, LIYV), CYSDV ve BPYV açısından testlenmiş, testlenen örneklerin hiçbirinde LIYV bulunmadığı 69 örneğin CYSDV, 12 örneğin BPYV ile enfekteli olduğu saptanmıştır. HSP70h homolog bölgesinin bir kısmı RT-PCR ile çoğaltılmış, takibinde tek sarmal nükleotit sekans analizleri yapılmış ve izolatlar arasındaki moleküler değişkenlik belirlenmeye çalışılmıştır. Bu analizler sonucunda BPYV ve CYSDV izolatlarının her birinde nükleotit benzerliğinin %98'den büyük olduğu saptanmıştır. CYSDV izolatlarının 2 değişken gruba ayrıldığı, Grup 1'in sadece Türkiye, Ürdün ve İspanya izolatlarından, Grup 2'nin ise sadece Suudi Arabistan izolatlarından oluştuğu belirlenmiştir. Aynı gruptaki izolatlar arasındaki nükleotit benzerliğinin %99'dan büyük olduğu, her iki grup arasındaki benzerliğin ise %92'den küçük olduğu ortaya konulmuştur. Tüm BPYV izolatlarının ise %98'den daha büyük nükleotit benzerliği gösterdiği saptanmıştır (Rubio ve ark., 1999).

İspanya'da CYSDV izolatının 5 kodlama (coding) ve 1 tane kodlama yapmayan bölgesinin (non-coding) nükleotid dizileri analiz edilmiştir. Her izolatın nükleotitlik kısmı sekans edilmiş ve bu sekans edilen bölge toplam virus genomunun yaklaşık %13'lük kısmına tekabül etmektedir. Viral genomun farklı bölgeleri arasında gözlenen değişkenliğin çok iyi bir şekilde dağılmadığı, örtü protein geninin analiz edilen diğer 4 tane kodlama bölgesine göre daha değişken olduğu belirlenmiştir (Marco ve Aranda, 2005).

CYSDV, CCYV ve diğer Crinivirusler tarafından neden olunan simptomların çok benzediği ve bu etmenlerin ayırımının laboratuvara dayalı teşhis yöntemlerinin uygulanmasıyla yapıldığı rapor edilmiştir (Wintermantel ve Wisler, 2006). Son zamanlarda, CYSDC ve CCYV'nin ticari olarak yetiştirilen kabakgillerde beraber enfeksiyon yaptığı ortaya koyulmuştur (Abrahamian ve ark., 2012).

Cucurbit bitkilerinde CYSDV, CYSDV ile CVYV (hıyar damar sarılılık virüsü) beraber enfeksiyonun sinerjik etki oluşturduğu (Fidan ve ark., 2012, Gil- Salas ve ark., 2012 ve Abrahamion ve ark., 2015) bildirilmiştir.

CYSDV'nin stropik ve tropik bölgelerde serada ve açıkta yetiştirilen cucurbit bitkilerini etkileyen en önemli patojenlerden biri olduğu bildirilmiştir (Tzonelohis ve ark.,2013; Orfanidou ve ark., 2014; EPPO, 2014; Amer., 2015 ve Wintermantel ve ark.,2016).

CYSDV'nin İran'daki *Cucurbitacea* familyasını tahrip edici bir virüs olduğu, 2008–2012 yıllarında yapılan bir çalışmada toplanan tipik CYSDV simptomlu 366 cucurbit örneği (kavun, hıyar ve kabak) ilk önce ELISA ile testlenen ve ELISA-pozitif örneklerde virüsün varlığı RT-PCR ile doğrulanmıştır. Testlenen 366 örnekten 309 tanesinin CYSDV ile enfekteli olduğu ortaya konulmuştur. CYSDV kaplama proteininin (CP) nükleotit ve amino asit sekanslarının analizleri, CYSDV'nin doğu alt grubuyla beraber kümelendiği belirlenmiştir. Doğu CYSDV alt grubu, İran izolatları ve Suudi Arabistan olmak üzere iki farklı alt gruba ayrılmıştır. İran izolatları arasındaki benzerlik %99'dan daha yüksek bulunmuştur. Yapılan filogenetik analizler sonucunda İran CYSDV izolatlarının düşük genetik çeşitliliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Keshavarz ve ark., 2013).

*Bemisia* ve *Trialeurodes* cinslerine ait olan beyaz sinekler (Hemiptera: *Aleyrodidae*) etkili virüs vektörleri olup, beyaz sineklerin en az dört cinse ait virüsleri taşıdığı bilinmektedir, bunlar DNA virüslerinden olan Begomovirus cinsi ve üç RNA virus cinsi olan Crinivirus, Ipomovirus ve Torradovirus cinsleridir (Navas-Castillo ve ark., 2014).

Yunanistan'da 2 farklı serada yetiştirilen hıyar ve kavun bitkilerinde sararmaya neden olan kloroz ve damarlar arası beneklenme simptomlarına benzer simptomlar Rodos adasında 2012 yılında açıkta yetiştirilen karpuzlarda ve Tympaki'de seralardaki hıyarlarda 2013 kasım ayında da gözlenmiştir. Simptomların bitkilerde %10-40 arasında yaygın olduğu belirlenmiştir. Simptomlu örneklerin tümünde cucurbit klorotik sarılık virüsü (cucurbit chlorotic yellows virüs CCYV) saptanırken CYSDV ise 18 hıyar, 1 kavun ve 3 karpuz bitkisinde saptanmış ve rapor edilmiştir. Testlenen örneklerde BPYV bulunmamıştır (Orfanidou ve ark., 2014).

İtalya'dan Sardinia adasında Haziran 2016'da kabak ve kavun bitkilerindeki viral hastalıkları belirlemek amacıyla yapılan bir survey çalışmasında yaprak sararması, kalınlaşma kırılabilirlik ve alt yapraklarda erken kahverengileşme belirtileri gösteren açık alanlarda yetiştirilen kavun ve kabak bitkilerinden alınan 70 örnek testlenmiştir. Testlenen örneklerde BPYV ve cucurbit yaprak biti kökenli sarı vürüs (cucurbit aphid-borne yellow virus CABYV) saptanmış olup CYSDV saptanamamıştır (Mangli ve ark., 2016).

CYSDV enfeksiyonunun konukçu bitkiye bağlı olarak bitkide fotosentezde azalma, yapraklarda damar aralarının sararmaya, klorotik beneklenme, yapraklarda kırılabilirliğe, bitkide güç kaybına ve yaklaşık %30-100 oranında verim kaybına neden olduğu ve tüm kıtalarda cucurbit alanlarında rapor edildiği bildirilmiştir (Ghanem ve ark., 2016).

Antalya'da Kasım 2015 ve Şubat 2016'da üç farklı serada yetiştirilen hıyar bitkisinde sararma belirtileri gözlenmiş CYSDV ve CCYV'nin oluşturduğu belirtilere benzer belirtiler gözlenmiştir. Belirtili bitkilerden 30 örnek alınmış ve toplam RNA ekstraksiyonuna tabi tutularak ve BPYV, CYSDV varlığı için RT-PCR yöntemiyle analiz edilmiştir. Toplanan örneklerden 15 tanesinin CYSDV, 21 örneğin CCYV ile enfekteli olduğu bu örneklerin 6 tanesinin hem CYSDV hemde CCYV ile karışık enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Türkiye'de zaten bilindiğinden, CCYV'nin 2 izolatının kısmi RdRp bölgesi sekans edilmiştir. Elde edilen dizilerinin BLAST analizi Japonya'dan bir CCYV izolatı ile %99 benzerlik göstermiş olduğu sağlanmıştır. CCYV'nin *Bemisia tabaci* ile yapılan taşıma deneyimleri gerçekleştirilmiştir. 30 yetişkin beyaz sinekten beş gruba, sadece CCYV ile doğal olarak enfekte edilen hıyar yapraklarında 24 saatlik bir edinim süresi verilmiştir. Daha sonra, her bir grup, 72 saat inokülasyon erişim süresi için sağlıklı bir hıyar bitkisine aktarılmıştır ve aşılama 3 hafta sonra, RT-PCR ile 5 inoküle edilmiş bitkiden 4'ünde CCYV tespit edildi. Bildiğimiz kadarıyla, bu, CCYV'nin Türkiye'deki hıyar hastalığına yakalanan ilk rapordur. CCYV ayrıca, Lübnan, Mısır ve Yunanistan'da da bildirilmiştir ve bu da Akdeniz bölgesinde ortaya çıkan bir cucurbit patojeni olduğunu göstermektedir (Orfanidou ve ark., 2017).

Suudi Arabistan'da 2014-2015 yıllarında Riyad'dan toplanan klorotik beneklenme ve damarlar arasında kloroz belirtileri gösteren 134 hıyar ve 103 yabancı ot örneği toplanmıştır. Toplanan örnekler CCYV, CYSDV'nin varlığı için RT-PCR

yöntemi ile testlenmiştir. Testlenen hıyar örneklerinde CCYV %61.1, CYSDV ise %19.4 oranında saptanmış olup bitkilerin %9'u karışık enfekteli olarak bulunmuştur. Ayrıca 4 yabancı ot türü CCYV'nin alternative konukçusu olarak ilk kez belirlenmiş olup CYSDV sadece yabancı ebegümece (*Malva parviflora*) bitkisinde rapor edilmiştir. Bu çalışmada hıyar ve yabancı otlardan elde edilen 3 CCYV ve 5 CYSDV izolatlarının kısmı nükleotit sekans analizleri yapılmış, her iki virusün düşük genetik çeşitliliğe sahip olduğu, CYSDV izolatlarının "Doğu alt popülasyonu" adıyla ayrı bir grup olarak adlandırıldığı, CCYV izolatlarının ise IIa ve IIb alt grupları içinde bulunduğu belirlenmiştir (Shakeel ve ark., 2018).

Bugüne kadar ülkemizde bu üç virüsten sadece CYSDV rapor edilmiş olup, ülkemizde farklı lokasyonlarda yetiştirilen *Curcubitaceae* familyasına ait bitkilerde bu üç virusun bulunuşu, dağılışı ve genetik çeşitliliği hakkında bir bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı ülkemizde Hatay ilinde *Cucurbitaceae* familyasına ait bitkilerde CYSDV, BPYV ve CCYV'lerinin varlığını DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleriyle belirlemek ve elde edilecek virüs izolatlarının sekans analizlerini yapmaktır.

### **3.MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

Yapılan bu çalışmada Hatay ilinde (Kırıkhan ve Reyhanlı) açıkta yetiştirilen alanlardan hıyar, kavun ve kabak örnekleri çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Hatay ilinde survey yapılan kabakgil üretim alanlarından hıyardan 13, kabaktan 37 ve kavundan 40 örnek toplanarak toplam 90 örnek çalışmada materyal olarak kullanılmıştır. Çalışmada ayrıca mekanik inokulasyonda kullanmak üzere tohumdan yetiştirilmiş hıyar ve tütün (*Nicotiana glutinosa*) bitkilerinde kullanılmıştır.

#### **3.2.Yöntem**

##### **3.2.1. Bitki Örneklerinin Toplanması**

Hatay illinde kabakgil üretim alanlarında 2017 yılında virüs enfekteli olduğundan şüphelenilen açıkta yetiştirilen ilkbahar ve yaz döneminde dikimden sonra her tarladan 5-10 şüpheli bitki örneği alınmıştır. Simptomatolojik olarak incelenen bitkilerden yaprak, sürgün ve var ise meyve örnekleri alınıp etiketlenerek naylon torbalara konulmuştur. Buzluk içerisinde laboratuara getirilerek laboratuvar ve iklim odası çalışmalarında kullanılıncaya kadar +4 °C' de buzdolabında de saklanmıştır.

##### **3.2.2. Serolojik çalışmalar (DAS-ELISA)**

Yapılan arazi çalışmalarında, virüs benzeri simptom gösteren bitkilerin genç yapraklarından enfekteli olduğundan şüphelenilen kabak, hıyar, ve kavun türlerinden alınan bitki dokuları materyal olarak kullanılmıştır. Sadece CCYV için üretilmiş ticari antiserum olduğundan dolayı, örnekler sadece CCYV'üne karşı DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) yöntemiyle testlenmiştir. DAS-ELISA çalışmalarında kullanılan tampon çözeltiler EK-1'de verilmiş ve testler aşağıdaki şekilde uygulanmıştır (Clark ve Adams, 1977):

1. Kaplama tamponu ile sulandırılmış IgG ELISA plakasının her bir çukuruna 100 µl koyulmuş ve 37 °C’de 4 saat inkübe edilmiştir.
2. Plaka yıkama tamponu ile üçer kez yıkanmış ve kâğıt havlu üzerine vurularak kurutma işlemi yapılmıştır.
3. Her örnek için ikişer çukura 100 µl örnek plakalarda plana göre yerleştirilmiş ve plakalar gece boyunca +4 °C’ de inkübe edilmiştir.
4. Plakalar yıkama tamponu ile dörder kez yıkanmış ve kağıt havlu üzerine vurularak kurutma işlemi yapılmıştır.
5. Konjugat tamponu ile sulandırılmış konjugateler her bir çukura 100 µl konmuş ve plaklar 37 °C’ de 4 saat bekletilmiştir.
6. Plakalar yıkama tamponu ile üçer kez yıkanmış ve kâğıt havlu üzerine vurularak kurutma işlemi yapılmıştır.
7. Yeni hazırlanmış substrattan (1mg/ml p-Nitrophenyl Phosphate) plakaların her bir çukuruna 100 µl konulmuş ve plakalar karanlık bir ortamda ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
8. ELISA okuyucusunda 405nm dalga boyunda 30 ve 60 dk sonra okumalar yapılarak değerlendirilmiştir. Substrat eklendikten sonra 30, 60 ve 120 dk sonra plakalar ELISA okuyucusunda (Seac Siriz S) 405 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunarak değerlendirilmiştir. Testlenen örneklerin absorbans değerlerine bakılarak sağlıklı örneklerin (negatif kontrollerin) en az iki katı ya da daha fazla değerlere sahip olanlar enfekteli olarak kabul edilmiştir (Clark, 1981).

### **3.2.2.1. Mekanik İnokulasyon ile Taşıma Denemeleri**

Mekanik inokulasyon çalışmaları iklim odası (24±2°C ve 16:8 saat gündüz: gece) koşullarında yürütülmüştür. Arazide virüs benzeri simptom gösteren kabak, hıyar ve kavun’dan alınan bitki örnekleri fosfor tampon çözeltisinde (PBS) 1:10 oranında ezilerek, tohumdan yetiştirilen 4-5 yapraklı tütünlere (*Nicotiana glutinosa*) ve kotiledon yaprak dönemindeki hıyarlara aşılanmıştır. Aşılama yapmadan önce bitkilerin yapraklarına celite serpilmiştir ve bitki ekstraktı yapraklara parmak ucu ile sürülmüştür (Şekil 3.1). Mekanik inokulasyon çalışmaları yapılan iklim odasında tutularak simptom gözlemleri günlük olarak yapılmıştır.



Şekil 3.1. Hıyar bitkisine yapılan mekanik inokulasyon çalışmasından bir görüntü

### **3.2.3. Moleküler Çalışmalar**

#### **3.2.3.1 Toplam Ribo Nükleik Asit (RNA) İzolasyonu**

Araziden toplanan hıyar, kavun ve kabak örneklerden RNA izolasyonu yapmak için Qiagen RNA ekstraksiyon kiti, MacKenzie ve ark (1997)'nin önerdiği modifiye yönteme göre, Silica RNA protokolü Rott ve Jelkmann (2001)'e göre yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak, Aristoteles Üniversitesi, Selanik-Yunanistan'dan getirilen cDNA'lar (complementer DNA) kullanılmıştır.

#### **3.2.3.2 Qiagen RNA Ekstraksiyon Kiti ile modifiye MacKenzie yöntemiyle RNA İzolasyonu**

- Her bir bitki örneğinden yaklaşık 0.5 g alınarak sıvı azot içinde toz haline getirilerek Mackenzie ekstraksiyon tampon çözeltisinde ekstrakte edilmiş ve örnekler 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmıştır.
- Bu örneklerin üzerine 150 µl %20'lik sarkozyl eklenmiş ve hafifçe karıştırılmıştır.
- Tüpler 70°C'de 10 dk ara ara karıştırılarak inkübe edilmiştir.



- Tüpler 14.000 rpm' de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Tüpler sıvı kısım pellet hareket ettirilmeden 2 µl'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş Q/Ashredder spin kolona alınmıştır.
- 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılmıştır.
- Sıvı kısım ependorf tüplere alınarak ve üzerine 0,5 hacim %96'lık alkol eklenmiş ve pipetle karıştırılmıştır.
- Karışımdan 650 µl alınarak RNeasy mini spin kolona alınmıştır.
- Tüpler 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiş ve sıvı kısım atılarak, arta kalan karışımla işlem tekrarlanmıştır.
- RNeasy mini spin kolonlar yeni ependorf tüplere yerleştirilerek üzerine 700 µl RW1 tampon çözeltisi eklenmiştir.
- Tüpler 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılarak sıvı kısım atılmıştır.
- RNeasy mini spin kolonlar yeni tüplere yerleştirilerek üzerine 500 µl RPE tampon çözeltisi eklenmiş ve tüpler 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılmıştır. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır.
- Kolona 40 µl RNase ari su eklenerek 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen RNA'lar PCR işlemleri yapıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

### 3.2.3.3. Silica Yöntemiyle RNA Ekstraksiyonu (Rott ve Jelkmann, 2001)

- Sıvı azotla ezilmiş 0.02 gr. bitki dokusu üzerine 1 ml silica ekstraksiyon buffer ve 10 µl B- Mercaptoethanol eklenerek iyice karıştırılmış ve ependorf tüplere alınmıştır.
- Santrifüj yapılmadan 600 µl sıvı fazdan çekilerek yeni ependorf tüpe konulmuştur. Tüpün içerisine 600 µl 5.8 M potasyum asetat eklenmiştir. Tüpler ters-düz edildikten sonra 13.000 rpm' de 15 dk santrifüj edilmiştir.
- Sıvı fazdan 750 µl alınarak yeni bir tüpe konulmuş ve üzerine 750 µl % 100 isopropanol eklenmiştir. Tüpler 20°C' de en az yarım saat bekletilmiş ve daha sonra 13.000 rpm' de 30 dk santrifüj yapılmıştır.
- Tüplerdeki sıvı faz atılmış ve pellet üzerine 500 µl yıkama tampon çözeltisi eklenerek vortexlenmiş ve pelletin çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra üzerine 20 µl silica eklenmiş ve 10.000 rpm' de 1 dk santrifüj yapılmıştır.

- Tüplerdeki sıvı faz atılmış ve pellet üzerine 500 µl yıkama tampon çözeltisi eklenerek vortexlenir çözündürülmüştür.
- Tüpler 13.000 rpm' de 1 dk santrifüj yapılmış, sıvı faz atılmış ve pellet oda sıcaklığında alkol kokusu kalmayacak şekilde iyice kurutulmuştur.
- Pelletin üzerine 150 µl TE tampon çözeltisi eklenerek pellet çözündürülmüştür. Tüpler oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir.
- Tüpler 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılmış ve sıvı fazdan 100 µl alınarak üzerine 8 µl sodium asetat ve 200 µl % 100 ethanol eklenmiştir.
- Tüpler 20°C' de 30 dk inkübe edildikten sonra 10 dk süreyle +4 °C'de 12.000 rpm' de santrifüj edilmiştir. Tüplerdeki sıvı faz atılmıştır.
- Tüplerdeki pellet üzerine 200 µl % 70' lik ethanol eklenmiş ve 20 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir.
- Tüpler vortexlendikten sonra + 4 °C' de 3 dk 12.000 rpm' de santrifüjlenmiş ve sıvı faz atılmıştır (bu aşama 2 defa tekrarlanır).
- Tüplerdeki pellete dokunmadan sıvı faz atılmış ve alkol kokusu kalmayacana kadar pellet 20 dk oda sıcaklığında kurutulmuştur.
- Tüplerdeki pellet 80 µl TE tampon çözeltisi ile çözündürülmüş ve elde edilen RNA' ların konsantrasyonları Nanodrop cihazı ölçülerek moleküler analizlerde kullanıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

#### **3.2.3.4. Reverse Transkripsiyon (RT; Reverse Transcription)**

Hatay ilinden toplanan hıyar, kavun ve kabak örneklerinden ekstrakte edilen RNA'lar kullanılarak yapılan RT analizlerinde ilk önce RNA'lardan cDNA elde edilmiştir Her bir örnek için 1 µl Random hexamer primer, 6,5 µl d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O ve 5 µl RNA karışımı hazırlanarak PCR tüplerine konulmuştur. PCR cihazında 94 °C'de 5 dakika ve buz'da 5 dakika bekletildikten sonra her bir tüp içine 5xRT tamponundan (Fermentas) 4 µl, d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 2 µl, dNTP (10 mM) 0,5 µl ve RT (MMLV) enziminden 1 µl eklenmiştir. Tüpler PCR cihazında 42 °C'de 1 saat 72 °C'de 10 dakika tutulmuş ve cDNA aşaması tamamlanmış ve bu cDNA'lar PZR'unda kullanılmıştır.

### 3.2.3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Bu çalışma kapsamında RT ile elde edilen cDNA'lar kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Hıyar, kavun ve kabak bitkilerinde yeni giriş yapan virüslerden cucurbit chlorotic yellows virüs (CCYV), cucurbit yellow stunting disorder virüs (CSYDV), beet pseudo-yellows virus (BPYV)'nin testlenmesinde kullanılan primerler, baz büyüklükleri ve çoğaltıldığı bölge Çizelge 3.1'de verilmiştir.

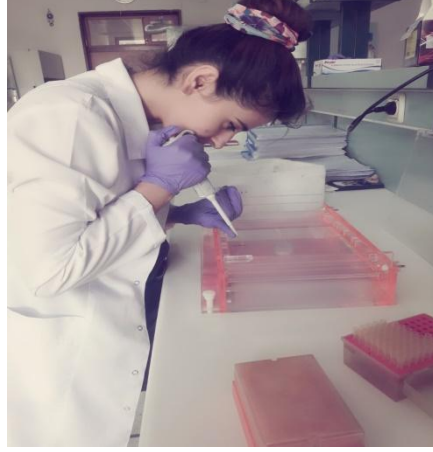
Çizelge 3.1. Hıyar, kavun ve kabak örneklerinde bulunan virüslerin saptanması amacıyla yapılan RT-PCR analizlerinde kullanılan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri, çoğaltıldığı bölge ve baz büyüklükleri

Virüs	Primer Adı	Primer Dizilimi	Uzunluk (bp)	Çoğaltıldığı Bölge	Referans
BPYV	I	TCGAAAGTCCAACAAGACGT	251	I/II	Boubourak as ve ark. 2006
	II	CTGATGGTGC GCGAGTG			
CCYV	RdRpF	CCTAATATTGGAGCTTATGAGTA	709	RdRp	Orfanidou ve ark.,2014
	CA	CATACTTTAAACACAACCCC			
CYSDV	F	ATGGACATGCCTAACTGTTACTT	364	HSP70	Boubourak as ve ark. 2006
	R	ATAGCTGCTGCAGATGGTTC			
CYSDV	F	ATGGCGAGTTCGAGTGAGAATA	756	CP	Rubio ve ark. 2001
	A	ATTACCACAGCCACCTGGTGCTA			
MA155F	R	GATTGTC ACTGAATCACC	683	CP	Sambroak ve Russel, 2000
	R	TCACATCATCAATCCAAAAG			

Kabakgil bitkilerinde yeni giriş yapan virüslerden BPYV, CCYV, CYSDV'nin PCR analizlerinde PCR karışımı 16,8 µl d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O, 2,5 µl 10XB, 2µl dNTP (2,5 mM), 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), virüse özgü 1 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl), 0,2 µl Taq-DNA polymerase ve 2 µl cDNA kullanılmıştır. PCR döngüleri, primerlerin hedef DNA' ya bağlanma (annealing) ve sentez (extension) süre ve sıcaklıkları programlanmıştır: Bu döngü 95 °C'de 3 dakika; 35 döngü 95 °C'de 1 dakika, 60°C'de 1 dakika, 72 °C'de 1 dakika ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika olacak şekilde programlanmıştır. CYSDV'nin MA155F/129R primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizlerinde kullanılan PCR döngü ise, 95 °C'de 3 dakika; 35 döngü 95 °C'de 1 dakika, 51°C'de 1.5 dakika, 72 °C'de 2 dakika ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika şeklinde programlanmıştır.

### **3.2.3.6. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Jel Elektroforez**

PCR ürünlerinin görüntülenmesi için %1'lik Agaroz jel elektroforez işlemi yapılmıştır. 1 gr Agaroz, 100 ml 1x TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu içerisinde mikrodalga fırında çözündürülüp tarak yerleştirilmiş ve jel tepsisine düz bir zemin üzerinde dökülerek agarozun polimerizasyonu için 20 dk süre ile bekletilmiştir. Jelin polimerizasyonundan sonra tarak dikkatli bir şekilde alınıp jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir. 1xTAE tamponu tankın içersine jeli kapatacak şekilde döküldükten sonra jel çukurlarına DNA marker ile beraber PCR ürünleri jel çukurlarına yüklenmiştir (Şekil 3.2) Yükleme tamamlandıktan sonra elektroforez güç kaynağı ile elektroforez tankına 150 V'luk elektrik akımı 50 dakika süreyle uygulanmıştır. Ethidium Bromid (EtBr) 0,5 µg/ml konsantrasyon da 100 ml suya karıştırılmış ve jel bu karışım içerisinde 5-6 dakika tutularak boyanmıştır. Jel UV ışıkta görüntülenip oluşan bantların büyüklüğüne göre sonuçlar değerlendirilmiştir. Testlenen virüslere karşı örnekler kullanılan pozitif kontrollerle karşılaştırılmış ve beklenen düzeyde bant oluşturanlar pozitif, oluşturmayanlar negatif kabul edilerek jel görüntüleme cihazında fotoğraflanmıştır.



Şekil 3.2. PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jele yüklenmesi

### **3.2.3.7 DNA Dizileme ve BLAST Analizleri**

PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezi sonucunda beklenen büyüklükte elde edilen PCR ürünleri DNA dizileme yapan firmaya (Medsantek, İstanbul) gönderilmiş, PCR'da kullanılan primerler ile çift yönlü olarak doğrudan dizilenmiş ve sonuçlar on-line olarak alınmıştır. Elde edilen nükleotid dizilerinin kromatogram kontrolleri yapılmış, NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) kullanılarak Basic alignment search (BLAST) aracılığı ile benzerlikler kontrol edilmiştir. Filogenetik analizler Neighbour-Joining metodu ile (Saitou ve Nei, 1987) MEGA X kullanılarak (Kumar ve ark., 2016) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### 4.1. Arazi Çalışmaları

Bu çalışma kapsamında Hatay ilinde yetiştirilen ve virüs benzeri symptom gösteren kavun, kabak ve hıyar bitkilerinden toplam 90 adet örnek alınmıştır. (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Hatay ilinden toplanan kavun, kabak ve hıyar bitkilerinden alınan örnek sayıları

Tür	Latince ismi	Testlenen örnek sayısı (Adet)
Hıyar	<i>Cucumis sativus</i>	13
Kavun	<i>Cucurbita melo</i>	40
Kabak	<i>Cucurbita pepo</i>	37
<b>TOPLAM</b>		90

Hatay ilinde yetiştirilen hıyar, kavun ve kabak bitkilerinde gözlenen en yaygın symptomlar yapraklarda küçülme, deformasyonlar, yaprak kırışıklıkları, kıvrılma ve damar açılmaları olmuştur (Şekil 4. 1, 4.2, 4.3.)



Şekil 4. 1. Kabak bitkilerinde gözlenen yapraklarda küçülme, deformasyonlar, yaprak kırışıklıkları, kıvrılma ve damar açılma symptomları



Şekil 4. 2. Hıyar bitkilerinde gözlenen yapraklarda küçülme, deformasyonlar, yaprakta renk değişikliği ve koyu renk lekelenme belirtileri



Şekil 4.3. Kavun bitkilerinde gözlenen yapraklarda sararma ve mozaik leke belirtileri

Yunanistan’da kloroz ve damarlar arası beneklenme belirtilerinin gözlemlendiği serada yetiştirilen hıyar ve kavunlar, açıkta yetiştirilen karpuzlar ve seralardaki hıyarların RT-PCR yöntemiyle testlenmesi sonucu bu bitkilerde CCYV ve CYSDV saptanmış olup, testlenen örneklerde BPYV bulunmamış olup belirtilerin bitkilerde %10-40 arasında yaygın olduğu belirlenmiştir (Orfanidou ve ark., 2014). CSYDV’nin doğal konukçularının hıyar, kavun, karpuz ve kabak gibi *Curcubitaceae* familyası üyeleri olduğu, virüsün neden olduğu şiddetli sararma, meyve ağırlığını önemli ölçüde etkilediği ve %30-50 arasında verim kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Abou Jawdah ve ark., 2000). CYSDV’nin yaşlı yapraklarda damarlar arası alanda klorotik benekler oluşturduğu, zaman geçtikçe damarlar hariç tüm yaprağın sararmasına neden olduğu belirlenmiştir (Celix ve ark., 1996; Wisler ve ark., 1998). CYSDV’nin hıyar, kavun ve karpuz bitkilerinin yapraklarında sararma, damarlar arası alanda kloroz belirtileri olduğu belirlenmiştir (Ghanem ve ark., 2016).

#### 4.2.DAS-ELISA Analizleri

Hatay’ın Kırıkhan ve Reyhanlı ilçelerinden toplanan toplam 90 adet kavun, kabak ve hıyar bitkileri DAS-ELISA yöntemiyle CCYV açısından testlenmiş olup testlenen örneklerde CCYV saptanamamıştır.

#### 4.3. Mekanik İnokulasyon Sonuçları

Araziden toplanan simptomlu kavun, kabak ve hıyar örnekleri iklim odasında hıyar ve tütün bitkilerine mekanik inokulasyon yapılarak aktarılmaya çalışılmış olup yapılan gözlemler sonucunda tütün ve hıyar bitkilerinde herhangi bir simptom gözlenememiştir (Şekil 4.4, 4.5).



Şekil 4.4. Mekanik inokulasyon yapıldıktan 2 hafta sonra tütün bitkilerinin görünümü



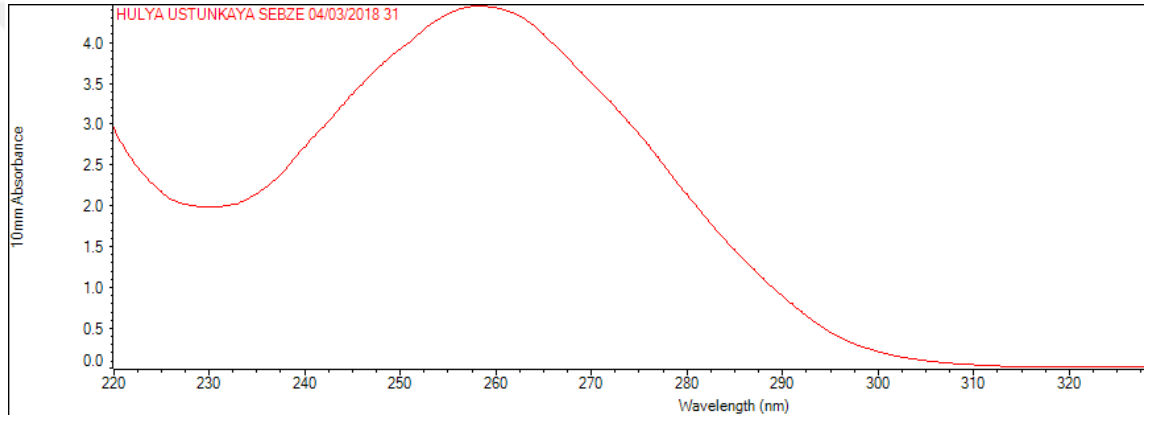
Şekil 4. 5. Mekanik inokulasyon yapıldıktan 2 hafta sonra hıyar bitkilerinin görünüm



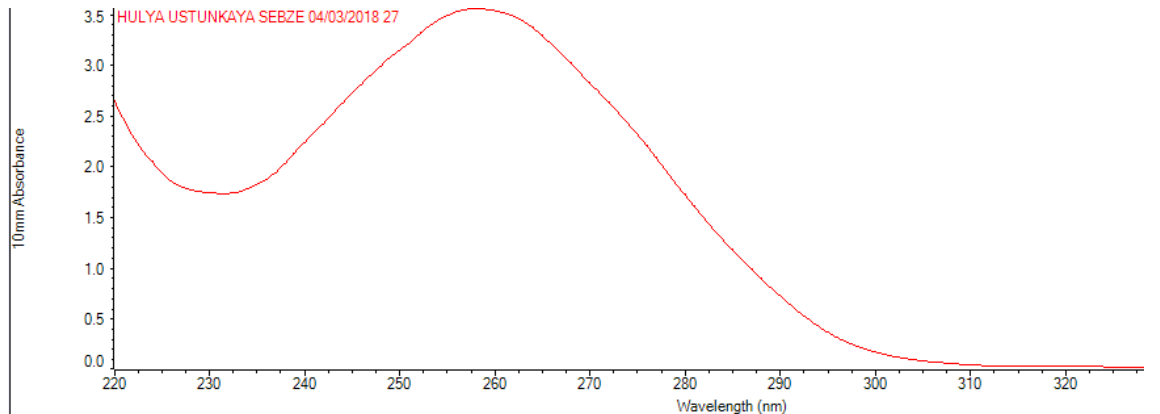
## 4.4. Moleküler Çalışmalar

### 4.4.1. Kabak, kavun ve hıyar örneklerinden RNA İzolasyonu

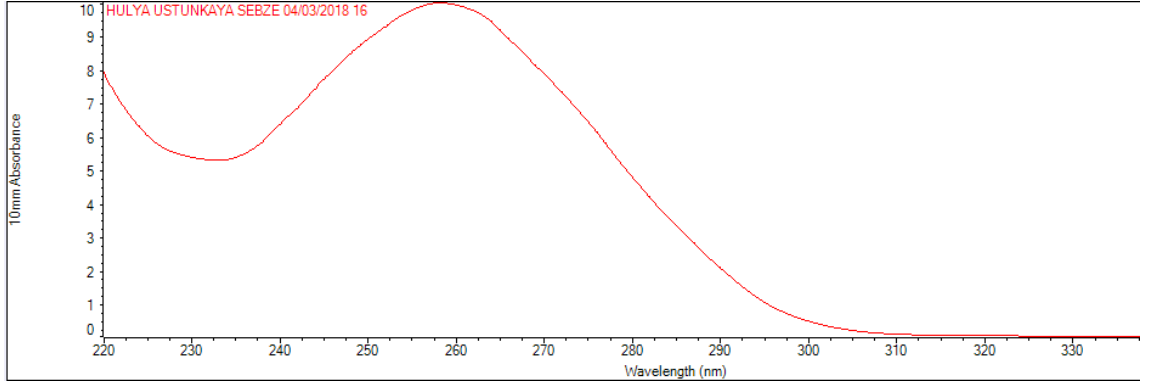
Kabak, hıyar ve kavun örneklerinden RNA izole etmek için Qiagen RNA kiti ve Silica yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemlerle yapılan izolasyonlarda RNA kalitesini belirlemek amacıyla yapılan nanodrop spektrofotometre ölçümlerinde RNA kalitelerinin PCR yapabilecek kalite ve miktarda olduğu saptanmıştır (Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10).



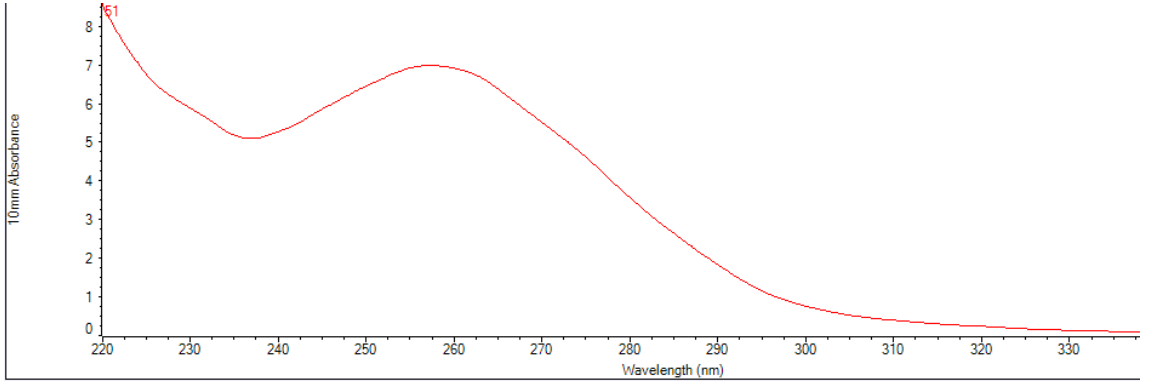
Şekil 4.6. Qiagen RNA yöntemi ile ekstrakte edilen kavun (31 no'lu örnek) RNA'sının Nanodrop aleti ile spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD) ölçüm grafiği



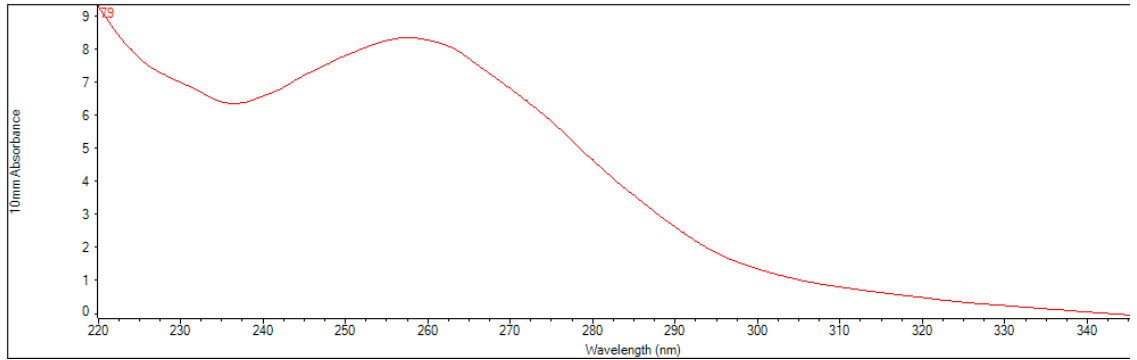
Şekil 4.7. Qiagen RNA yöntemi ile ekstrakte edilen kavun (27 no'lu örnek) RNA'sının Nanodrop aleti ile spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD) ölçüm grafiği



Şekil 4.8 Qiagen RNA yöntemi ile ekstrakte edilen kabak (16 no'lu örnek) RNA'sının Nanodrop aleti ile spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD) ölçüm grafiği



Şekil 4.9. Silica yöntemi kullanılarak ekstrakte edilen kabak (51 no'lu örnek) RNA'sının spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD) ölçüm grafiği



Şekil 4.10. Silica yöntemi kullanılarak ekstrakte edilen hıyar (79 no'lu örnek) RNA'sının spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD) ölçüm grafiği

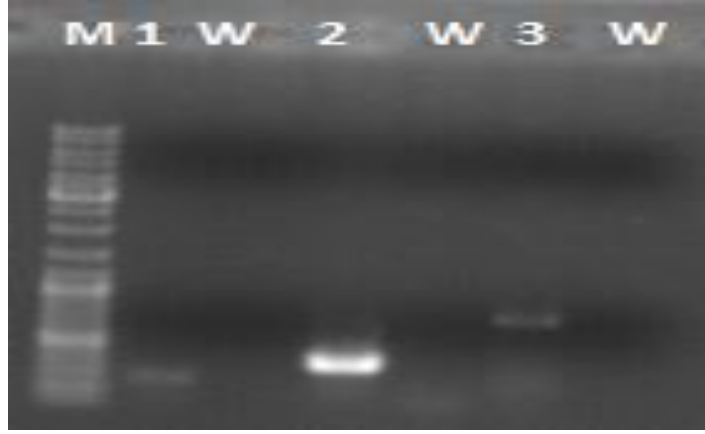
Gerek Qiagen RNA ekstraksiyon kiti gerekse Silica yöntemi ile ekstrakte edilen kavun, kabak ve hıyar RNA'larının nanodrop ölçüm değerlerine göre oldukça iyi kalitede RNA elde edildiği saptanmıştır (Çizelge 4. 2). Yapılan bu çalışma sonucunda kullanılan RNA ekstraksiyon yöntemlerinden silica ile ekstraksiyon yönteminin daha ucuz olması nedeniyle *Cucurbitaceae* familyasına ait bitkilerden RNA ekstraksiyonunda iyi kalitede RNA elde edilmesinde kullanılabilir olduğu ortaya koyulmuştur.

Çizelge 4. 2. Kabak, hıyar ve kavun örneklerinden ekstrakte edilen bazı RNA'ların nanodrop ölçüm değerleri

<b>Örnek No ve bitki adı</b>	<b>Ekstraksiyon Yöntemi</b>	<b>Konsantrasyon ng/µl</b>	<b>OD 260/ 280</b>	<b>OD 260/ 230</b>
31 (Kavun)	Qiagen	176.8	2.08	2.24
27 (Kavun)	Qiagen	141.3	2.06	2.04
16 (Kabak)	Qiagen	398.3	2.07	1.85
51 (Kabak)	Silica	162.4	2.07	1.99
79 (Hıyar)	Silica	109.7	2.08	2.19

#### 4.4.2. RT-PCR ve PCR analizleri

Bu çalışma kapsamında toplanan kabak, kavun ve hıyar örneklerinden izole edilen RNA'lar RT-PCR yöntemi ile testlenmiştir. Örnekler testlenmeden önce her bir virüse spesifik primerlerle sadece pozitif kontroller kullanılarak PCR analizlerinde sistem kurma çalışmaları yapılmıştır. Optimizasyon çalışmaları esnasında Yunanistan'dan temin edilen cDNA'lar doğrudan kullanılarak testlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Farklı virüslere spesifik primerlerle yapılan PCR analizinde optimizasyon çalışması M: Marker (SMO#321, MBI, Fermentas), 1: BPYV pozitif kontrol (I/II primer çifti) =251 bp, 2: CYSDV pozitif kontrol (F/R primer çifti) =364 bp, 3:CCYV pozitif kontrol (RdRpF/RdRpR primer çifti) =709 bp,W: Su Kontrol

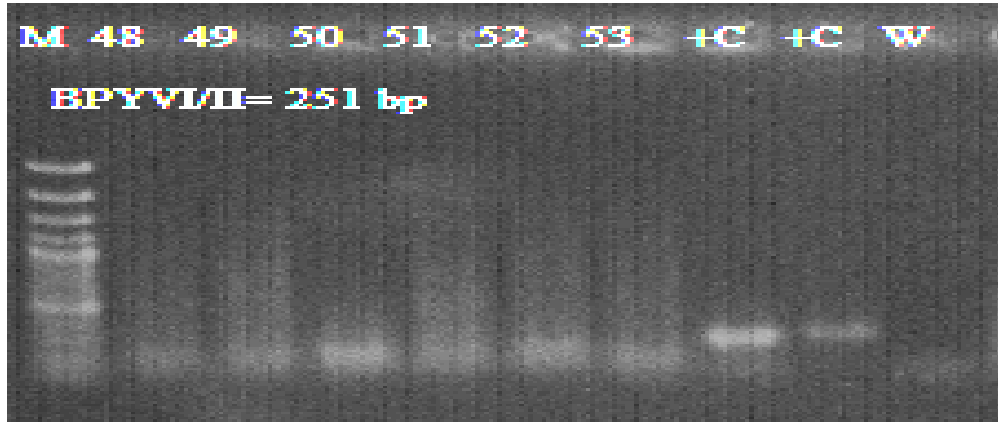
BPYV ve CCYV nin saptanması amacıyla yapılan RT-PCR analizlerinde Hatay'dan toplanan 37 kabak, 13 hıyar ve 40 kavun örneklerinde herhangi bir amplifikasyon gözlenmezken pozitif kontrollerde beklenen düzeyde bant elde edilmiştir. (Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14).



Şekil 4.12. CCYV'e spesifik RdRpF/RdRpR primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü M: Marker (SMO#321, MBI, Fermentas) 28-29: Kavun örnekleri,43-47 Kabak Örnekleri +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol

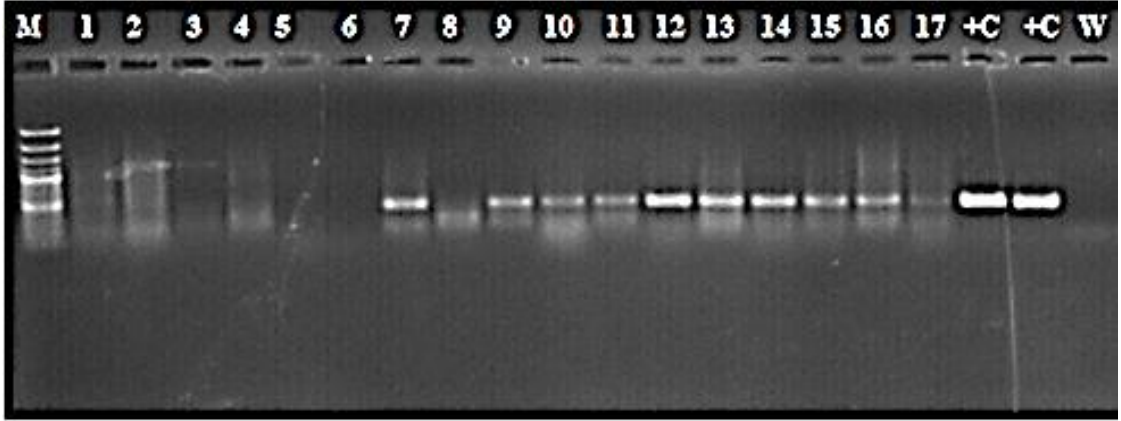


Şekil 4.13. CCYV'ye spesifik RdRpF/RdRpR primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizi sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü M: Marker (SMO#321, MBI, Fermentas), 49- 55: Kabak Örnekleri +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol



Şekil 4.14. BPYV'ye spesifik I/II primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizi sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü M: Marker (SMO#321, MBI, Fermentas), 48- 53: Kabak Örnekleri +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol

CYSDV'nin primerleriyle HSP70h bölgesini çoğaltan F/R primerine karşı yapılan RT-PCR analizlerinde Hatay'dan toplanan 37 kabak, 13 hıyar ve 40 kavun bitkisinden 11 örnekte pozitif kontrolde oluşan 364 bp düzeyinde bant elde edilmiştir ( Çizelge 4.3; Şekil 4.15). Amplifikasyon görülen örnekler RT-PCR analizleri ile yeniden çoğaltılmış ve elde edilen PCR ürünleri sekans analizleri için firmaya gönderilmiştir.



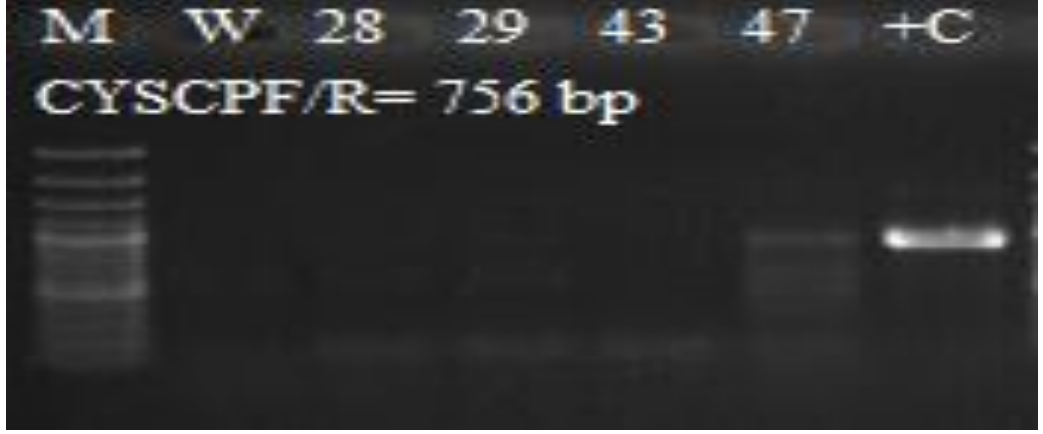
Şekil 4.15. CYSDV'ye spesifik F/R primer çifti kullanılarak PCR yapılan örneklerin agaroz jel elektroforez görüntüsü M: Marker (SMO#321, MBI, Fermentas), 1- 3: Hıyar, 4-9: Kavun,10-17: Kabak örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol

Bu çalışma aşamasında CYSDV'nin kılıf protein (CP) bölgesini çoğaltan MA155F/MA129R primer çiftiyle yapılan PCR analizlerinde testlenen toplam 90 örnekte hiçbir amplifikasyon elde edilmemiş, ancak pozitif kontrolde beklenen 683 bp büyüklüğünde bant elde edilmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. CYSDV'nin örtü proteinine (CP) spesifik CPF/CPR primer çifti kullanılarak PCR yapılan jel elektroforez görüntüsü M: Marker (SMO#383, MBI, Fermentas), 1- 12= Kabak, Hıyar ve Kavun örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol

CYSDV'nin örtü protein bölgesini çoğaltan CYSCPF/CPR primerleriyle yapılan PCR analizlerinde ise testlenen örneklerden sadece 1 kabak bitkisinde (47 no'lu örnek) beklenen 756 bp seviyesinde bant edilmiştir (Şekil 4.17). Amplifiye edilen örnek yeniden PCR'da yeniden çoğaltılmış ve PCR ürünü sekans analizi yapan firmaya gönderilmiştir.



Şekil 4.17 CYSDV'e spesifik örtü protein bölgesini çoğaltan CYSCPF/CYSCPR primeri çifti kullanılarak yapılan PCR jel elektroforez görüntüsü M: Marker (SMO#321, MBI, Fermentas), 28, 29 =Kavun örnekleri, 43, 47 Kabak örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol

Hatay ilinde yetiştirilen kabak, hıyar ve kavun bitkilerinden toplanan toplam 90 örnekte CYSDV bulunma oranı % 12.22 olarak bulunmuştur. Testlenen 40 adet kavun bitkisinin 2 tanesi CYSDV ile enfekteli bulunurken (%5 enfeksiyon oranı), BPYV ve CCYV saptanamamıştır. Testlenen hıyar bitkilerinin CYSDV, BPYV ve CCYV ile enfekteli olmadığı belirlenmiştir. Toplam 37 kabak örneği BPYV ve CCYV ile enfekteli bulunmamıştır. Kabak örnekleri CYSDV'ü açısından F/R primeriyle testlendiğinde bitkilerin % 24.324 oranında CYSDV ile enfekteli olduğu, CYSDV'nin CPF/CPR primeriyle testlendiğinde ise bu oranın %2.702 olduğu belirlenmiştir.

Yapılan RT-PCR çalışmalarında CYSDV'ye spesifik F/R primeriyle 11 bitki, CPF/CPR primeriyle 1 bitki pozitif olarak belirlenmiş ancak MA155/MA129 primeri ile pozitif bitki sağlanamamıştır.

CYSDV'nin RT-PCR yöntemiyle sağlanmasında 3 farklı primer kullanılmış olup bu primerlerden F/R primeri en çok pozitif bitki belirleyebilmiş olduğundan F/R primerinin detection (saptama) primeri olarak kullanılması uygun bulunmuştur.

Çizelge 4. 3. Hatay ilinden toplanan kabak, hıyar ve kavun bitkilerinden yapılan PCR analizleri sonucunda yeni giriş yapan virüslerin bulunma durumu

<b>Testlenen virüsler ve kullanılan primerler</b>					
	<b>BPYV I/II*</b>	<b>CCYV RdRpF/ RdRpR*</b>	<b>CYSDV F/R*</b>	<b>CYSDV CPF/ CPR*</b>	<b>CYSDV MA155/ MA129*</b>
<b>KAVUN</b>	0/40	0/40	2/ 40	0/40	0/40
<b>% Enfeksiyon</b>	0	0	5	0	0
<b>KABAK</b>	0/37	0/37	9/37	1/37	0/37
<b>% Enfeksiyon</b>	0	0	24.324	2.702	0
<b>HIYAR</b>	0/13	0/13	0/13	0/13	0/13
<b>% Enfeksiyon</b>	0	0	0	0	0
<b>Enfekteli/ testlenen toplam örnek sayısı</b>	0/90	0/90	11/90	1/90	0/90
<b>Toplam % Enfeksiyon</b>	0	0	12.22	1.11	0

(\* Enfekteli /testlenen toplam örnek sayısı)

CYSDV Lübnan (Abou-Jawdah, 2000), İspanya (Celix ve ark., 1996), Birleşik Arap Emirlikleri (Desbiez ve ark., 2000), Fas'ta (Kao ve ark., 2000), Portekiz (Louro ve ark., 2000) gibi birçok ülkede Cucurbitlerde rapor edilmiştir. Suudi Arabistan'da Riyad'da hıyar sararma hastalığının etiyojijisinde rol oynayan Crinivirüslerin moleküler karakterizasyonunun yapıldığı bir çalışmada hıyarlarda CCYV %61.1, CYSDV'nin ise %19.4 oranında bulunduğu testlenen bitkilerin %9'unun her iki virüsle enfekteli olduğu belirlenmiştir (Shakeel ve ark., 2018).

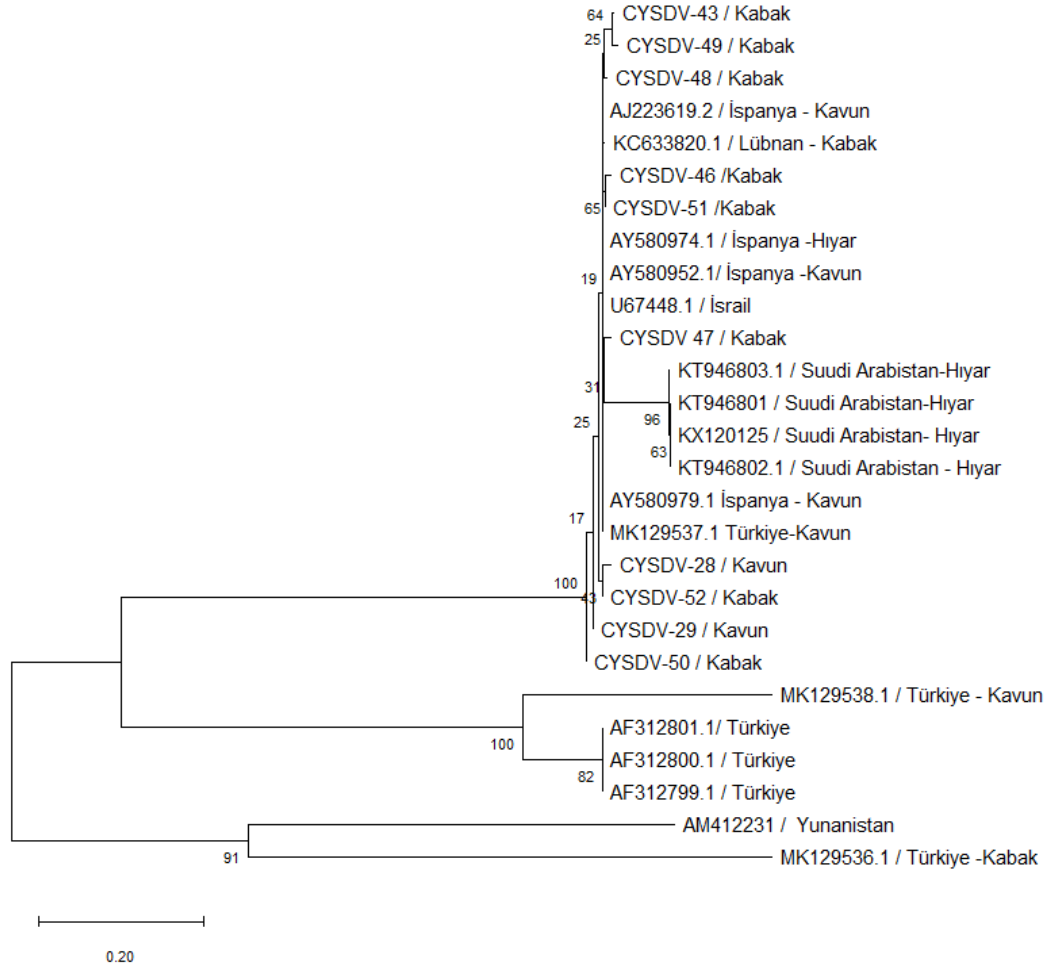
CCYV ve CYSDV'nin Bemicia tabaci ile taşındığı (Celix ve ark., 1996; Berdiales ve ark., 1999; Okuda ve ark., 2010), tohumla taşınmadıkları, yabancı otların



her iki etmenin epidemiyolojisinde rol oynadıkları ortaya koyulmuştur (Boubourakas ve ark., 2006). Hıyar yapraklarında klorotik beneklenme ve damarlar arası alanda kloroza neden olan BPYV'nin birçok ülkede saptandığı ve etmenin vektörünün *Trialeurodes vaporariorum* (sera beyaz sineği) olduğu bildirilmiştir (Clover ve ark., 2001). Yapılan bu çalışmada araziden bitki örneği toplanırken etmenlerin vektörü olabilecek beyaz sinekler de gözlenmeye çalışılmış ancak hiçbir beyaz sinek bitkilerde gözlenmemiştir.

#### **4.4.3 Filogenetik Analizi**

Bu çalışma kapsamında CYSDV'nün HSP70h bölgesinin bir kısmını çoğaltan primerler kullanılarak yapılan PCR analizlerinde pozitif kontrolle aynı seviyede bant veren (364 bp) 11 örneğin 10 tanesinin sekans analizi yapılmıştır. Örnek sekansları NCBI veri tabanındaki diğer CYSDV izolatlarının dizileri ile Clustal W yöntemi kullanılarak hizalanmıştır. Hizalanan tüm nükleotid dizileri NJ (Neighbor Joining) yöntemi kullanılarak Mega X yazılımı ile analiz edilmiştir. CYSDV Türkiye izolatlarının aynı grup içerisinde yer aldığı ve birbirleriyle %91-99 oranında benzer oldukları ortaya koyulmuştur. CYSDV izolatlarından CYSDV-48 kabak izolatının GenBankasında kayıtlı AY580974.1 İspanya hıyar izolatıyla %99 oranında benzer (Şekli 4.18). olduğu belirlenmiştir



Şekil 4.18. Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV)'ünün farklı izolatlarının sekans analizleri sonucunda elde edilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, MEGA X yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendrogramda bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiş ve % 50'nin altındaki değerler ağaçta yer almamıştır.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Ülkemizde kabakgil yetiştiriciliği hemen hemen bütün bölgelerde yaygındır. Özellikle Akdeniz ve Ege bölgelerinde bu sebze türlerinin büyük çoğunluğu örtü altında yapılmaktadır. Hatay ilinde kabakgil yetiştiriciliği hem açık alanda hemde örtü altı üretimi yaygındır. Meyvesi yenen sebzeler içinde domatesten sonra önemli üretim değerlerine sahip olan ve önemli gelir kaynağı oluşturan kabakgillerde, hastalık ve zararlıların neden olduğu ekonomik kayıplar yetiştiriciler için oldukça önem arz etmektedir. Virüs hastalıklarının ticari kabakgil üretiminde en önemli sorunlardan biri olduğu bilinmektedir (Lovisol, 1980; Provvidenti, 1996).

Kabakgiller birçok virüs hastalığına konukçuluk etmektedir ve önemli oranda ürün kayıpları meydana gelmektedir. Dünya’da kabakgiller familyası içindeki bitki türlerinde zarar yapan ve ekonomik kayıplara neden olan çok sayıda virüs hastalığı gözlenmektedir (Zitter ve ark., 1996). Kabakgillerde zarar yapan 40’ dan fazla virüs ve virüs benzeri hastalık etmeni bulunmuştur. Bu hastalıklar içerisinde; kabak sarı mozaik virüsü (ZYMV), hıyar mozaik virüsü (CMV), kabak mozaik virüsü (SqMV), karpuz mozaik virüsü (WMV), papaya halkalı leke virüsü (PRSV) kabakgillerde zarar veren en önemli virüslerdendir (Lisa ve Lecoq, 1984; Purcifull ve ark., 1984; Provvidenti, 1996).

Son yıllarda *Cucurbitaceae* familyasına ait bitkilerde saptanan ve yeni giriş yapan virüslerden CSYDV (cucurbit sarı bodurlaşma bozukluğu virüsü)’nün şiddetli sararmaya neden olduğu, meyve ağırlığını önemli ölçüde etkilediği ve %30-50 arasında verim kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Abou Jawdah ve ark., 2000). CCYV (cucurbit chlorotic yellows virus)’nin hıyar, kavun ve karpuz bitkilerinin yapraklarında klorotik lekelere ve tüm yaprağın sararmasına neden olmakta ve hıyarlarda önemli verim kaybına neden olduğu, kavunların market değerini düşürmekle birlikte şeker içeriğini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Gyoutoku ve ark., 2009). Ülkemizde *Cucurbitaceae* familyasına ait bitkilerde yeni giriş yapan virüslerden sadece CSYDV Antalya ilinde saptanmış olup detaylı bir çalışma ve diğer virüslerin varlığı hakkında bir bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışma kapsamında; kabakgil yetiştiriciliğinde önemli bir yere sahip olan Hatay ilinde üretilen kabakgil türlerinde yeni giriş yapan virüslerin varlığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Hatay ilinde kabakgil yetiştiriciliği yapılan alanlarda önemli virüs enfeksiyonları ile biyolojik (mekanik inokulasyon: özsu

bulaştırma), serolojik (DAS-ELISA: Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ve moleküler yöntemler ile teşhis edilmeye çalışılmıştır. Sadece CCYV için ticari antiserum bulunduğundan DAS-ELISA yöntemiyle CCYV belirlenmeye çalışılmıştır.

Hatay ilinden alınan kabak, hıyar, kavun bitkilerinin yapraklarında küçülme, deformasyon, kıvrılma, kırışıklık ve damarlarda renk açılması gözlenen en yaygın belirtiler olmuştur. Yapılan mekanik inokulasyon çalışmalarında CYSDV ile enfekteli bulunan ve belirtiler gözlenen bitkiler indikatör bitkilerden hıyar ve tütüne aşılanmış ve inokulasyon takibinde 1 ay boyunca gözlenmiş ve belirtiler gözlenmemiştir. Mekanik aşılama yapılan bitkiler gerek CCYV açısından DAS-ELISA yöntemiyle gerekse 3 virüs açısından RT-PCR yöntemiyle testlenmiş ve bu bitkiler negatif bulunmuştur.

Yapılan RT-PCR analizlerinde testlenen 90 örneğin hiçbirinde BPYV, CCYV bulunamamıştır. CYSDV'nin testlenmesinde 3 farklı primer kullanılmıştır. CYSDV'nin F/R primeri kullanılarak yapılan PCR analizlerinde bu virüsün enfeksiyon oranı %12.22 olarak belirlenirken, Kavunlarda CYSDV % 5 oranında bulunurken bu oran kabaalarda %24.32, olarak saptanmış ve bu virüs hıyarlarda saptanamamıştır.

CYSDV'nin 10 izolatının sekans analizi sonucunda izolatların aynı grup içerisinde yer aldığı ve birbirleriyle %91-99 oranında benzer oldukları ortaya konulmuştur. CYSDV izolatlarından CYSDV-48 kabak izolatının GenBankasında kayıtlı AY580974.1 İspanya hıyar izolatıyla %99 oranında benzer olduğu belirlenmiştir.

Yapılan bu çalışmada Hatay ilinde kabak, kavun ve hıyarlarda yeni giriş yapan virüslerin varlığı araştırılmış olup, etmenin diğer otsu konukçularının ve olası vektörlerinin belirlenmesi konusunda ilave çalışmalar gerek duyulmaktadır. Ülkemizde kabakgillerde sağlıklı olmayan üretim materyallerinin kullanılması, sertifikasyon programlarına yeterli önemin verilmemesi ve kontrolsüz tohum ithal edilmesi virüslerin hızla yayılmasına neden olmaktadır. Bu yüzden ülkemizde sanitasyon ve sertifikasyon programlarının üzerinde önemle durulması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abou-Jawdah Y. Sobh H., El-Zammar S., Fayyad A., and Lecoq H., 2000. Incidence and Management of Virus Diseases of Cucurbits in Lebanon. **Crop Protection**, 19 (4) : 217-224
- Abrahamian, P.E., H. Sobh and Y. Abou-Jawdah, 2012. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* on cucumber in Lebanon. **Plant Disease.**, 96: 1704-1704.
- Abrahamian, P. E., Sobh, H., Seblani, R. and Abou-Jawdah, Y. (2015). Co-infection of two criniviruses and a begomovirus enhances the disease severity in cucumber. **European Journal of Plant Pathology**, 142(3):521-530.
- Adlertz, W.C.Purcifull, D.E., Simone, G.W., And Hiebert, E. 1987. Zucchini Yellow Mosaic Virus: A Pathogen of Squash and other Cucurbits in Florida. **Proc. Fla. State Hort. Soc.** 96:72-74.
- Al-Shahwan, I.M., 1990. First Report of Zucchini Yellow Mosaic Virus in Cucurbits in the Central Region of Saudi Arabia. **J. King Saud Univ., Agric. Sci.**, 2:251-260.
- Amer, M. A. (2015). Serological and Molecular Characterization of Cucurbit chlorotic yellows virus Affecting Cucumber Plants in Egypt. **International Journal of Virology**, 11(1): 1-11.
- Anonim, 2010. <http://www.tarimziraat.com/hastalikvezararlilar/sebzehastaliklari/karpuzmozaikvirusu/>
- Anonim, 2007 <http://www.palancikuruyemisblogspot.com/2007/02/erezlik-kabak-ve-besin-deeri.html>
- Anonim, 2002. International Committee on Taxonomy of Viruses, Cucumovirus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb>
- Anonim, 2014c. Squash ( Cucurita spp) Virus Diseases. A Pacific Northwest Extension Publicatin.[http://pnwhandbooks.org/plantdisease/squash\\_cucurbitaspp\\_virus\\_diseases](http://pnwhandbooks.org/plantdisease/squash_cucurbitaspp_virus_diseases)
- Berdiales, B., Bernal, J. J., Saez, E., Woudt, B., Beitia, F., Rodriguez-Cerezo, E. (1999). Occurrence of Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) and Beet pseudo-yellows virus in cucurbit crops in Spain and transmission of CYSDV by two biotypes of *Bemisia tabaci*. **European Journal of Plant Pathology**, 105, 211–215.
- Blua, M. J., and Perring, T. M., 1989. Effect of zucchini yellow mosaic virus on Development and Yield of Cantaloupe (*Cucumis melo*). **Plant Disease**, 73:317-320.
- Bostan H., Kaymak H.Ç., and Haliloğlu, K., 2002. Detection of cucumber mosaic virus (CMV) and zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) in squash in Erzurum, Erzincan and Artvin provinces by serological and biological methods. **J. Turkish Phytopathology**, 31(1), 9-14.
- Boubourakas, I. N., Avgelis, A. D., Kyriakopoulou, P. E., & Katis, N. I. (2006). Occurrence of yellowing viruses (Beet pseudo-yellows virus, Cucurbit yellow stunting disorder virus and Cucurbit aphid-borne yellows virus) affecting cucurbits in Greece. **Plant Pathology**, 55, 276–283.
- Brunt, A, Crabtree, K. and Gibbs, A., 1990. Viruses of Tropical Plants. **C.A.B. International**, UK. 707pp.

- Brunt, A. Crabtree, K., Dallwitz, M, Gibbs, A., and Watson, L., 1996. Virus of Plants. **C.A.B. International Wallingford, Oxon, UK.** 1484 pp.
- Castle, S.J. Perring, T.M., Farrar, C.A., And Kishaba, A.N., 1992. Field and Laboratory Transmission of Watermelon Mosaic Virus 2 and Zucchini Mosaic Virus by Various Aphids Species. **Phytopathology**, 82:235-240.
- Celix A, Lopez-Sese A, Almarza N, Gomez-Guillamon ML & Rodriguez Cerezo (1996) Characterization of cucurbit yellow stunting disorder virus, a Bemisia tabaci-transmitted closterovirus. **Phytopathology** 86,1370–1376.
- Clark, M. F., 1981. Immunosorbent assay plant pathology. Ann. Rev. **Phytopathology**, 19: 83-106.
- Clark, M. F and Adams, A.N., 1977. Charactritics of the microplate method of enzymelinked immunosorbent assay for the detection on of plant viruses. **Journal of General Virology** 34.475-483.
- Clover, G.R.G., Elliott, D.R., Tang Z., and Alexander, B.J.R.2001. Occurrence of Beet pseudo-yellows virus in cucumber in New Zealand. **New Disease Reports** (2001) 4, 8.
- Cohen S, Nitzany FE. 1963. Identify of viruses affecting cucurbits in Israel. **Ibid**; 53: 193-196.
- Çalı, S. Yalçın, N. 1991. İthal edilmiş tohumluk patateslerde önemli virüs hastalıklarının DAS-ELISA ve diğer yöntemlerle araştırılması. **VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, İzmir.** 333 – 336
- 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.
- Çıtır, A. 1982. Erzurum ve çevresinde tohumluk patateslerdeki virüs hastalıkları ve bunların tanılanması üzerine bazı araştırmalar. **Doğu Bilim Dergisi.Vet. Hay. Tar. Orm.** 6 (3), 99 – 109.
- Davis, R.F, and Muzuki, M.K. 1987. Detection of cucurbit viruses in New Jersey. **Plant Disease**,71, 40-44.
- Değirmenci, K. ve Güldür, M. E. 2006. Hıyarlarda Zucchini Sarı Mozayik Virüsü (Zucchini Yellow Mosaic Virus, ZYMV)"nün Karşılıklı Korunma Yöntemi ile Kontrolü. **BİTKİ KORUMA BÜLTENİ 2006, 46** (1-4):13-23
- Desbiez, C., Lecoq, H., Aboulama, S., and Peterschmitt, M. 2000. First report of Cucurbit yellow stunting disorder virus in Morocco. **Plant Dis.** 84:596.
- Duffus J.E., 1965. Beet pseudo-yellows virus, transmitted by the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). **Phytopathology** 55: 450-453.
- Edwardson, J.R. and Christie, R.G.,1986. Viruses infecting Forage Legumes. Florida Agricultural Experiment Stations. Institute of Food and Agricultural Sciences. **Monograph**, 14 (1): 454.
- Ekbiç, E. Fidan H., Yıldız M., Abak K., 2010. Screening of Turkish Melon Accessions for Resistance to ZYMV, WMV and CMV. **Not Sci Biol** 2 (1) 2010, 55-57.
- EPPO. (2014). Cucurbit yellow stunting disorder virus. European and Mediterranean Plant Protection Organization PQR database, <http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>.
- Fauquet M.C., Mayo, M.A., 1999. Abbreviations for plant virus names. 1999. **Archives of Virology** 144: 1249-1273.

- Fidan, H., Unlu, M., Unlu, A. and Yilmaz, M.A. (2012). Cucurbit Yellow Stunting Disorders (CYSDV) and Cucumber vein yellowing virus (CVYV) Diseases on Melon and Cucumber in Turkey. **EUCARPIA International Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae**, 755-762.
- Francki, R.I.B, Mossop, D.W., and Hatta, T., 1979. **CMI/AAB Description Viruses** No. 213: 6p.
- Freitag (1956). Beetle transmission host range and properties of squash mosaic virus. 1. 31-8.
- Gil-Salas, F.M., Peters, J., Boonham, N., Cuadrado, I.M., Janssen, D., 2012. Co-infection with Cucumber vein yellowing virus and Cucurbit yellow stunting disorder virus leading to synergism in cucumber **Plant Pathology** (2012) 61, 468-478
- Ghanem G, Noura-Hassan M, Kheder A, Mazyad H.M and Abdel-Alim A.(2016). International Journal of Advanced Research (2016), Volume 4, Issue 4, 1116-1128
- Gould, A.R. and Symons, R.H., 1983. Satellite RNA of Cucumber Mosaic Virus forms a Secondary Structure with Partial 3'-Terminal Homology to Genomal RNAs. **Nucleic Acids Res.**, 11: 947-960.
- Gonsalves, D., S. Tripathi, J. B. Carr, and J. Y. Suzuki. 2010. Papaya Ringspot virus. **The Plant Health Instructor**. DOI: 10.1094/PHI-I-2010-1004-01
- Grogan, R.G. Hall D.H., Kimble K.A., 1959. Cucurbit mosaic viruses in California. **Ibid**, 49: 366-375.
- Grube, R. C. Zhang, Y. Murphy, J. F., Loaiza-Figueroa, F., Lackney, V. K., Provvidenti, R., And JAHN, M. K., 2000. New Source of Resistance to Cucumber Mosaic Virus in *Capsicum Frutescens*. **Plant Disease**, 84:885-891.
- Gibbs, A.J., and Harrison, B.D., 1970. Cucumber Mosaic Virus. Commonwealth Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol. **Descriptions of Plant Viruses**. No:1. CMI, Kew, Surrey..
- Gümüş M, Erkan S, Tok S., 2004. Bazı kabakgil türlerinin tohumlarındaki viral etmenlerin saptanması üzerinde araştırmalar. **Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.**, 41(1): 49-56.
- Gyoutoku Y, Hayashida S, Okazaki and Okuda M (2008). The occurrence of melon yellowing disease caused by cucurbit chlorotic yellows virus in Kumamoto prefecture Ann. **Phytopathol. Soc. Jpn.**, 74:219-219.
- Gyoutoku Y, Okazaki S, Furuta A, Etoh T, Mizobe M, Kuno K et al.(2009). Chlorotic yellows disease of melon caused by cucurbit chlorotic yellows virus, a new crinivirus. **Jpn.J. Phytopathol.** 75,109-111.(In Japanese with English abstract)
- Hassan A.A., Duffus J.E., 1991. A review of a yellowing and stunting disorder of cucurbits in the United Arab Emirates. **Emirates Journal of Agricultural Sciences** 2: 1-16.
- Jensen, D, D. 1949a. Papaya ringspot virus and its insect vector relationship. **Phytopathology** 39:212-220.
- Kaper, J.M., and Waterworth, H.E., 1981. Cucumoviruses. In: Handbook of Plant Virus Infectious and Comparative Diagnosis. **Biomedical, North Holland**, p.258-332.
- Kao, J., Jia, L., Tian, T., Rubio, L., and Falk, B. W. 2000. First report of Cucurbit yellow stunting disorder virus (Genus Crinivirus) in North America. **Plant Disease**. 84:101.

- Karamanlı, A.2007. Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti,(KKTC)“nde kabakgil yetiştirilen alanlarda hıyar mozaik virüsü (cucumber mosaic virus, CMV) ve kabak sarı mozaik virüsü (Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)“nün surveyi. **Ç.Ü. Fen Bil.Enst.Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi**, 86 s.
- Kaya, A. ve Erkan, S. 2009. Bazı Kabakgil Çeşitlerinin Karpuz Mozaik Virüsü 2 (WMV-2) ye Karşı Reaksiyonlarının Belirlenmesi. **Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri**, 15-18 Temmuz 2009, Van , s. 169.
- Kaya, A., Erkan S., 2011. İzmir, Aydın, Manisa ve Balıkesir illerinde üretilen kabakgillerdeki viral etmenlerin tanılanması ve yaygınlıklarının belirlenmesi. **Bitki Koruma Bülteni**, 51(4):387-405.
- Keshavarz T, M. Shams-Bakhsh, K. Izadpanah, S. M. Nassaj Hossini. 2013. Geographic distribution and phylogenetic analysis of cucurbit yellow stunting disorder virus in Iran **Acta virologica** 57: 415 – 420
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, 33 (7): 1870–1874.
- Lastra, R.1968. Occurrence of cucurbit viruses in Venezuela. **Plant Disease Reporter** 52:171-174.
- Lecoq H., Wisler G., Pitrat M., 1998. Cucurbit viruses: the classics and the emerging. In: McCreight J.D. (ed.). **Cucurbitaceae ‘98**, evaluation and enhancement of cucurbit germplasm, pp. 126-142. Alexandria VA, USA. ASHS Press.
- Lecoq H. Lemaire, J.M., and Wipf-Scheibel, C., 1991. Control Of Zucchini Yellow Mosaic Virus in Squash by Cross Protection. **Plant Disease**, 75:208-211.
- Lisa, V. Boccardo, G., D’Agostino, G., Delavalle, G., and D’aquilio, M., 1981. Characterization of a Potyvirus that Causes Zucchini Yellow Mosaic Virus. **Phytopathology**, 71:667-672.
- Lisa, V. ve Lecoq, H. 1984. Zucchini yellow mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of **Plant Viruses**, No.282. 28
- Lockhart, B. E. L., Jebbour F., Lennon A.M., 1985. Seed Transmission of Squash Mosaic Virus in Chenopodium spp. **Plant Disease** 69:946-947.
- Lot, H., Marchoux, G., and Marrou, J., 1974.Evidence for three Functional RNA Species in Several Strains of Cucumber Mosaic Virus. **J. Gen. Virology**, 22: 81-93.
- Louro, D, Vicente, M., Vaira, A. M., Accotto, G. P., and Nolasco, G. 2000. Cucurbit yellow stunting disorder virus(genus Crinivirus) associated with the yellowing disease of cucurbit crops in Portugal. **Plant Disease**. 84:1156.
- Lovisolo, O. 1980. Virus and viroid diseases of cucurbits. **Acta Hort**. 88:3382.
- Mackenzie, D.J, Mclean, M.A., Mukerji, S., Green, M. 1997. Improved RNA extraction for woody plants for the detection of viral pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. **Plant Disease**, 81: 222-226.
- Mangli, A., Murenu, M., Sitzia, M., and Tomassoli, L., 2016. First report of Cucurbit yellow stunting disorder virus infecting cucurbits in Italy. **New Disease Reports**, 34, 23.
- Marco CF Aranda MA. 2005. Genetic Diversity Of A Natural Population Of Cucurbit Yellow Stunting Journal of **General Virology** 86 (3):815-22
- Martelli, G.P. and Quaquarelli, A., 1988. The Present Status of Tomato and Pepper Viruses. **Acta Horticulture**, 127:39-64.



- Martin, B., 2003. Blokage of Stylet Tips as Mechanizm of Resistance to Virus Transmission by *Aphis gossypii* in Melon Bearing the Vatgene, **Annals of Applied Biology**, 142 (2): 245 – 250.
- Medley 1994. Availability of determination of nonregulated status for virus resistant squash. **Fed. Reg.** 59:6418764188.
- Navas- Castillo J, Lopez- Moya J, Aranda M.A. (2014) Whitefly- transmitted RNA viruses that affect intensive vegetable production
- Nelson, M.R., and Knuhtsen H.K., 1973. Squash mosaic virus variability: epidemiological consequences of differences in seed transmission frequency between strains. **Phytopathology**, 63, 918-920.
- Okuda, M., Okazaki, S., Yamasaki, S., Okuda, S., Sugiyama, M. (2010). Host range and complete genome sequence of Cucurbit chlorotic yellows virus, a new member of the genus Crinivirus. **Phytopathology**, 100, 560–566.
- Orfanidou C.G. Maliogka V.I., Katis N.I., 2014. First report of Cucurbit chlorotic yellows virus in cucumber, melon, and watermelon in Greece. **Plant Disease** 98: 1446.
- Orfanidou, C.G., Maliogka, V.I., Katis, N.I., Kontosfyris, G., Smith, T., Caglayan, K., 2017. First Report of Cucurbit Chlorotic Yellows Virus In Cucumber In Turkey Journal of **Plant Pathology** (2017), 99 (2), 533-543
- Özaslan M, Aytekn T, Bas B, Kilic H, Afacan ID, Dag DS (2006). Virus diseades of cucurbits in Gaziantep, Turkey. **The Plant Pathology Journal** 5,24-27.
- Paden, K.W.C, and Symons, R.H., 1973.Cucumber Mosaic Virus Contains aFunctionally Divided Genom. **Virology**, 53:487-492.
- Palukaitis, P, Rossinck, M. J. Dietzgen, R. G, and Francki, R. I. B. 1992. Cucumber Mosaic Cucumovirus. In: **Advance in Virus Research Academic, San Diego**, p.281-348.
- Prieto, H., Bruna, A., Hnrichsen, P. and Munoz, C., 2001. Isolation and Molecular Characterization of a Chilean Isolate of Zucchini Yellow Mosaic Virus. **Plant Disease**, 85:644-648.
- Provvidenti, R. 1996. Diseases caused by viruses, p. 3745. In: T.A. Zitter, D.L. Hopkins, and C.E. Thomas (eds.). **Compendium of Cucurbit Diseases**. APS Press, St. Paul, Minn.
- Provvidenti, R. and Zinner, T. A., 1992. Comparative Biological and Serological Properties of Four Strains of Zuccinia Yellow Mosaic Virus. **Plant Disease**, 76:530-535
- Provvidenti, R. 1993. Resistance to viral diseases of vegetables. In Kyle, M.M. (ed).Timber Press, Inc.
- Purcifull, D.E. Adlerz, W.C., Simone, G.W., Hiebert, F., and Christie S.R., 1984. Serological Relationships and Partial Charecterization on Zucchini Yellow Mosaic Isolated from Squash in Florida. **Plant Disease**, 98:230-233.
- Richardson, M.J, 1990. An Annotated List of Seed Borne Diseases. **The International Seed Testing Assosiation Zurich**, Switzerland, Edition 4, 387p.
- Robinson, R.W., Decker-Walters D.S., 1997. Cucurbits. In: Bahçivanlık Bilimi Bitkisel Üretim Bölümü. Cornell Univ. Ve D.S. Decker-Walters, **The Cucurbit Network U.S.A**
- Rott M.E. and W. Jelkmann. 2001. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adoption of an alternative cloning method

- (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. **European J. Phytopath.** 7: 411-420.
- Rubio L., Soong J., Kao J., Falk B.W., 1999. Geographic distribution and molecular variation of isolates of three whitefly-borne closteroviruses of cucurbits: Lettuce infectious yellows virus, Cucurbit yellow stunting disorder virus, and Beet pseudo-yellows virus. **Phytopathology** 89: 707-711.
- Rubio, L., Abou-Jawdah, Y., Lin, H.-X., and Falk, B. W. 2001. Geographically distant isolates of the crinivirus Cucurbit yellow stunting disorder virus show very low genetic diversity in the coat protein gene. *J. Gen. Virol.* 82:929-933
- Saitou N, Nei M. 1987. The Neighbor-Joining Method—a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol.** 4:406–425.
- Schwinghamer, M.W. and Symons, R.H., 1975. Fractionation of Cucumber Mosaic Virus RNA and It's Translation in a Wheat Embriocell-Free System. **Virology**, 63: 252-262
- Sertkaya G. Sertkaya E., Yetişir H. ve Kaya K., 2004. Hatay İlinde Yetiştirilen Kabakgillerde Zucchini yellow mosaic potyvirus (ZYMV)“ünün Yaygınlığının ve Taşınmasının Araştırılması. **Türkiye Birinci Bitki Koruma Kongresi Bildirileri** (Eylül 2004, Samsun): 217.
- Sambrook, J. & Russell, D. (2000). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: **Cold Spring Harbor Laboratory**
- Shakeel, M.T., Amer, M.A., Al-Saleh, M.A. Al-Shahwan, I. M., Kamran, A., C. G. Orfanidou, Katis, N.I., 2018. Molecular characterization of Criniviruses involved in the etiology of cucumber yellowing disease in Riyadh region, Saudi Arabia. **Eur J Plant Pathol** 150: 39-47.
- Stobbs, L. W, and Van Schagen, J.G., 1990. First Report of Zucchini Yellow Mosaic Virus in Squash in Arkansas. **Plant Disease**, p.70-78.
- Şevik, M. A. ve Arlı- Sökmen, 2003. Viruses infecting cucurbites in Samsun, Turkey. **Plant Disease**, 87: 341-344.
- Şevik, M. A ve Balkaya, A. 2015 Samsun, Sinop ve Bolu İllerindeki Bal Kabağı (Cucurbita Moschata Duch) Popülasyonlarına Ait Tohum Örneklerinde Virüslerin Tanılanması ve Bulunma Durumlarının Belirlenmesi
- Tien, P. Zhang, X. Qiu, B. Qin, B. and Wu, G. 1987 Satellite RNA for the Control of Plant Diseases Caused by Cucumber Mosaic Virus. **Ann. Apply. Biol.**, 111:143-152.
- Tricoli, D. K. Carney, P. Russell, J. McMaster, D. Groff, K. Hadden, P. Himmel, J. Hubbard, M. Boeshore, J. Reynolds, and H. Quemada. 1995. Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to cucumber mosaic virus, watermelon mosaic virus 2, and/or zucchini yellow mosaic virus. **Bio/Technology** 13:14581465. [http://www.worldseed.org/cms/medias/file/TradeIssues/PhytosanitaryMatters/SeedHealthTesting/ISHIVeg/Cucurbits\\_SqMV\\_CGMMV\\_MNSV\\_010811\\_2012.pdf](http://www.worldseed.org/cms/medias/file/TradeIssues/PhytosanitaryMatters/SeedHealthTesting/ISHIVeg/Cucurbits_SqMV_CGMMV_MNSV_010811_2012.pdf)
- TUIK, 2017. <http://www.tuik.gov.tr/UstMenu.do?metod=temelist>
- Tzanetakis, I. E.; Martin, R. and Wintermantel, W. M. (2013). Epidemiology of criniviruses: an emerging problem in world agriculture. **Frontiers in Microbiology**, 119(4): 1-15.
- Wakman, W. Kontong M.S., Teakle D.S. and Persley D.M., 2002. Watermelon Mosaic Virus of Pumpkin (Cucurbita maxima) from Sulawesi: Identification,

- Transmission, and Host Range. **Indonesian Journal of Agricultural Science** 3(1) 2002: 33-36.
- Wang, H.L.Gonsalves, D., Provvidenti, R., and Lecoq, H.L., 1991. Effectiveness of Cross Protection by Mild Strain of Zucchini Yellow Mosaic Virus in Cucumber, Melon and Squash. **Plant Disease**, 75: 203-207.
- Webb, R.E.Bohn, G.W. and Scott, H.A. 1965. Watermelon mosaic viruses 1 and 2 in southern and western cucurbit production areas. **Plant Dis. Repr.**, 50:49-52.
- White, P. S. Morelas, F. J., and Roosinck, M. J., 1995. Interspecific Reassortment in the Evolution of a Cucumovirus. **Virology**, 207: 334-337.
- Wintermantel, W.M. and G.C. Wisler, 2006. Vector specificity, host range and genetic diversity of Tomato chlorosis virus. **Plant Disease** 90: 814-819.
- Wintermantel, W. M.; Gilbertson, L.; McCreight, J. D.; Natwick, Eric T. (2016). Host-Specific relationship between virus titer and whitefly transmission of Cucurbit yellow stunting disorder virus. *Plant Dis.*, 100 (1):192-98.
- Wintermantel, W. M.; Hladky, L. L.; Cortez, A. A. and Natwick, E. T. (2009). A new expanded host range of Cucurbit yellow stunting disorder virus includes three agricultural crops. **Plant Disease** 93: 685-690.
- Wisler, G.C. J.E. Duffus, H.-Y. Liu, and R.H. Li. 1998. Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted closteroviruses. **Plant Disease** 82:270-280
- Yalçın Mendi Y. Sarı N. Akyıldız A. Solmaz İ. Ünek C, Özkaya O, Serçe S. 2010. Determination of gene escape and fruit quality characteristics in transgenic melon (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*). **Türk J. Agric For.** 34: 135-143
- Yılmaz, M. A. H. Lecoq, K. Abak, S. Baloğlu ve N. Sarı, 1992. Türkiye’de kabakgil sebze türlerinde zarar yapan virüsler. **Türkiye I. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Cilt:II. E.Ü. Ziraat Fakültesi Bornova, İzmir, 13-16 Ekim 1992**, 439442.
- Yılmaz, M.A, Baloğlu, S., ve Nas, Z. 1990. Çukurova Bölgesi’nde Yetiştirilen Turfanda Patateslerde Patates Yaprak Kıvrıklığı Virüsünün (PLRV) ELİSA testiyle surveyi. **Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi**, 5(3) 95-106.
- Yılmaz, M.A. Abak, K., Lecoq, H., Baloglu, S., Sarı, N., Kesici, S., Özaslan, M. ve Guldur, M., 1994. Control of Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV) in Cucurbits by ZYMV-WK Strain. 9th Congress of Mediterranean **Phytopathological Union, Kuşadası-Aydın-Türkiye**, s.353-35.
- Yılmaz, M.A., and Davis R.F., 1984. Purification and particle morphology of TMV, CMV and ZYMV isolated from various cultivated crops grown along the Mediterranean Coast of Turkey. **J. Turkish Phytopathology**, 13, 20-28.
- Yuan, C. And Ullman, D.E., 1996. Comparison of Efficiency and Propensity as Measures of Vector Importance in Zucchini Yellow Mosaic Potyvirus Transmission by *Aphis gossypii* and *A. craccivora*. **Pytopathology**, 86: 69 703.
- Zitter, T.A, Hopkins, D.L., and Thomas, C.E., 1996. **Compendium of Cucurbit Diseases**. The American Phytopathological Society APS Press, St. Paulk Minnesota, 87p

## ÖZGEÇMİŞ

Yazar, 1990 yılında Konya Ereğli’de doğdu. İlk ve Ortaokulu Ereğli İlçesi Kazım Karabekir İlköğretim okulunda, Lise öğrenimini Ereğli- Atatürk Lisesin ’de tamamladı. 2012 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünü kazandı. 2013 Yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma bölümüne bölüm içi yatay geçiş yaptı ve 2016 yılında mezun oldu. 2016 Yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalında Yüksek Lisansına başlamıştır.



## **EKLER**

### **SİLİCA RNA EXT. BUFFER( 1000 ml) (Rott and Jelkmann-2001)**

24,2 gr Tris- Base

12,66 gr LiCl

15 gr SDS

2,92 gr EDTA veya 3,72 gr EDTA\*2H<sub>2</sub>O

10 gr Sodium Deoxycholate

10 ml NP- 40

% 1 β-MCE ( Kullanmadan hemen önce eklenmelidir).

### **5,8 M POTASYUM ASETAT ( pH 6.5) ( 100 ml)**

60 ml 5 M Potasyum Asetat( pH 7.5)

28,5 ml H<sub>2</sub>O

11,5 ml Gleyial asetic asit

1 M Katı Potasyum Asetat

### **SİLİCA WASH BUFFER ( 1000 ml) (Rott and Jelkmann-2001)**

10 mM Tris- HCl ( pH 7.5)

1 ml 0.5 M EDTA

1 ml 5M NaCl

500 ml 100% EtOH

479 ml sterile H<sub>2</sub>O

### **TE BUFFER ( pH 8) ( 1000 ml) (Rott and Jelkmann-2001)**

10 ml 1 M Tris- HCl ( pH 8)

2 ml 0,5 M EDTA

Sterile H<sub>2</sub>O ile tamamlanır.

### **MACKENZİE EZME TAMPONU (100 ml)**

Guanidine isothiacyonate 47.26 g

Sodium acetat 2.72 g

25 mM EDTA	0.7305 g
PVP-40	2.5 g

Karışım 100 ml d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O' ya tamamlanıp oda sıcaklığında saklanmıştır.

#### **AGAROS JEL ELEKTROFOREZ (MANIATIS ve ark., 1992)**

##### **TAEX50 (100 ml)**

0.5 M EDTA pH:8	10 ml
0.6 Glacial acetic acide	5.71 ml
Trizma base	24.2 g

Çözelti 100 ml d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O'ya tamamlanıp otoklav edilmiş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

##### **PCR ürününün yükleme ortamı (15 ml 6X stok için)**

Bromophenol blue	15 ml
Glycerol	18 g
TAEX50	6 ml

Hazırlanan ortam -20 °C'de saklanmıştır.

##### **Ethidium Bromide çözeltisi (1 mg/ml 200 ml stok için)**

0.5X TAE	200 ml
Ethidium bromide	200 µl

Koyu renkli bir kap içinde karanlık ortamda oda sıcaklığında saklanmıştır. 5-10 kullanımdan sonra çözelti tazelenmiştir.