

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**KABAK SARI MOZAİK VİRÜSÜ İZOLATLARININ
KODLADIĞI GENLERİN DİZİLİMİNİN BELİRLENMESİ VE
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Şerife TOPKAYA

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2015**

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

24/06/2015

Şerife TOPKAYA

ÖZET

Doktora tezi

KABAK SARI MOZAİK VİRÜSÜ İZOLATLARININ KODLADIĞI GENLERİN DİZİLİMİNİN BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Şerife TOPKAYA

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Filiz ERTUNÇ

Bu çalışma, kabakgil alanlarında problem olan kabak sarı mozaik virüsü (*Zucchini yellow mosaic virus*–ZYMV) izolatlarının kodladığı genlerin dizilimlerinin belirlenmesi amacı ile yapılmıştır. Bu doğrultuda Ankara, Antalya, Burdur illerinden alınan enfekteli kabakgil bitkileri *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Papaya ringspot virus-W* (PRSV-W) ve *Squash mosaic virus* (SqMV) antiserumları ile DAS-ELISA testine tabi tutulmuştur. Test sonuçlarına göre 233 örneğin 86'sının (%36,9) ZYMV, 116'sının (%49,7) WMV, 36'sının (15,4) CMV, 22'sinin (%9) PRSV, 6' sının (%2,5) SqMV, 20'sinin (8,5) CGMMV ile enfekteli olduğu bulunmuştur. DAS-ELISA testleri sonunda Ankara ve Antalya illerinde en yaygın virüsler WMV ve ZYMV olarak belirlenmiştir. Çalışmada ilk defa sakız kabağı ve bal kabağı bitkilerinde CGMMV etmeninin varlığı serolojik olarak tespit edilmiştir. Test sonunda ZYMV ile enfekteli bitkiler seçilmiş ve Konya, Karaman ve Aksaray illerinden toplanan farklı kabakgillerden izole edilen ZYMV izolatları ile birlikte moleküler olarak, P1 protein, yardımcı bileşen protein (HC-Pro), P3 protein, silindirik inclusion protein (CI), Nüklear inclusion protein b (NIb) ve örtü proteini (CP) gen bölgelerinin baz dizilimi belirlenmiş ve MEGA 6 bilgisayar programı kullanılarak filogenetik ve protein analizi yapılmıştır. Çalışmada 53 izolatın gen bölgelerinin sekans verileri NCBI veri bankasında yer alan sekanslarla karşılaştırılmış ve 50 tane ZYMV Türkiye izolatı Dünya'da ve Avrupa'da en yaygın olan A1 grubunda yer alırken üç tane ZYMV Türkiye izolatı Avrupa'da yeni ortaya çıkan A4 grubunda yer almıştır. Bu sonuçlarla Türkiye'de ilk defa ZYMV izolatlarının gen bölgelerine ait bilgiler elde edilmiş ve rekombinant olan izolatların varlığı rapor edilmiştir.

Haziran 2015, 156 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Zucchini yellow mosaic virus*, kabakgil bitkileri, örtü protein, P3 protein, yardımcı bileşen proteini, ZYMV tarafından kodlanan proteinler

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

SEQUENCING and MOLECULAR CHARACTERIZATION of GENES ENCODED BY *ZUCCHINI YELLOW MOSAIC VIRUS (ZYMV) ISOLATES*

Şerife TOPKAYA

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Filiz ERTUNÇ

In this study, was performed to determine the sequences of the genes encoded by isolates of *Zucchini yellow mosaic virus* causing problem in cucurbits. Collected samples suspected to be infected from Ankara, Antalya, Burdur were tested with DAS-ELISA test to *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Papaya ringspot virus-W* (PRSV-W) and *Squash mosaic virus* (SqMV). According to the test results, samples were found to be infected with 86 ZYMV (36,9%), with 116 WMV (49,7%), with 36 CMV (15,4%), with 22 PRSV (9%), with 6 SqMV (2,5%) and with 20 CGMMV (8,5%). DAS-ELISA tests based on the results of Ankara and the most common viruses in Antalya province has been identified as WMV and ZYMV. In this study, CGMMV were determined first time in squash and pumpkins plants. Selected plants with infected by ZYMV and ZYMV isolates from different cucurbit plants obtained from Konya, Karaman and Aksaray, were sequenced the P1 protein, helper components protein (HC-Pro), P3 protein, cylindrical inclusion (CI), nuclear inclusion (NIB) protein and coat protein (CP) were determined according to sequence of the gene. Fifty three protein isolate sequence data were compared with sequences located in the NCBI data base. Fifty isolates from ZYMV Turkey were grouped in common group A1 and three ZYMV isolate Turkey took place in the newly emerging group in Europe A4.

July 2015, 156 pages

Key Words: *Zucchini yellow mosaic virus*, Cucurbitaceae, coat protein, P3 protein, Helper component protein, ZYMV encoded proteins

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının belirlenmesinde ve son haline kadar her aşamasında yol gösteren danışman hocam sayın Prof. Dr. Filiz ERTUNÇ'a (Ankara Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı) ve tez izleme komitesinde yer alan hocalarım Prof. Dr. İ. Özer ELİBÜYÜK (Ankara Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı) ve Prof. Dr. Bayram ÇEVİK (Süleyman Demirel Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı) hocalarıma yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam esnasında laboratuvarlarını kullandığım ve bilgilerinden yararlandığım Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) enstitüsü'ne ve Dr. Cecile DESBIEZ'e gönülden teşekkür ederim.

Ayrıca surveyler esnasında örnek toplamama yardımcı olan Beypazarı Tarım İlçe Müdürlüğü, Nallıhan Tarım İlçe Müdürlüğü, Çubuk Tarım İlçe Müdürlüğü Şereflikoçhisar Tarım İlçe Müdürlüğü, Aksu Tarım İlçe Müdürlüğü ve Serik Tarım İlçe Müdürlüğü'ne ve ilgili teknik personele teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarına maddi destek sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim. Bu çalışma 12B4347002 no'lu Ankara Üniversitesi BAP projesi tarafından desteklenmiştir.

Manevi desteği ile her zaman yanımda olan arkadaşlarıma ve özellikle Dr. Didem CANİK OREL'e ve tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı tüm aileme teşekkür ederim.

Şerife TOPKAYA
Ankara, Haziran 2015

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	6
2.1 ZYMV'nin Keşfi	6
2.2 Viral Etmenin Özellikleri	6
2.3 ZYMV'nin Belirtileri	7
2.4 Taşınması.....	8
2.5 Biyolojik ve Genetik Çeşitlilik	10
2.6 Epidemiyolojisi	11
2.7 Teşhis	12
2.8 ZYMV Protein Gen Bölgeleri	12
2.8.1 P1 protein	13
2.8.2 Yardımcı bileşen (HC-Pro) protein	14
2.8.3 P3 protein	16
2.8.4 CI rotein	17
2.8.5 Nüklear inclusion body (Nıb Protein)	17
2.8.6 Örtü proteini (CP)	18
2.9 Dünya'da ZYMV İle Yapılan Çalışmalar.....	19
2.9.1 P1 protein gen bölgesi üzerine çalışmalar.....	22
2.9.2 Yardımcı bileşen proteini (HC-Pro) üzerine yapılan çalışmalar	23
2.9.3 P3 protein üzerine çalışmalar	25
2.9.4 CI protein üzerine çalışmalar	26
2.9.5 Nüklear inclusion body (NIB) ve örtü proteini (CP) üzerine çalışmalar	26
2.10 Türkiye'de ZYMV ile Yapılan Çalışmalar	32
3. MATERYAL VE YÖNTEM	40
3.1 Materyal Temini.....	40
3.2 Serolojik Çalışmalar	41
3.3 Moleküler Çalışmalar	42
3.3.1 RNA izolasyonu	42
3.3.2 RNA konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	43
3.3.3 RT-PCR çalışmaları.....	44
3.4 Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları.....	46
3.5 Filogenetik Analiz Çalışmaları	46
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	48
4.1 Materyal Temini ve Survey Sonuçları	48
4.2 Serolojik Çalışma (DAS-ELISA) Sonuçları.....	59
4.3 RNA İzolasyonu ve RT-PCR Sonuçları	63
4.3.1 P1 protein gen bölgesi	63

4.3.2	HC-pro gen bölgesi.....	64
4.3.3	P3 protein gen bölgesi	64
4.3.4	CI protein gen bölgesi	65
4.3.5	N1b protein gen bölgesi	65
4.3.6	CP gen bölgesi.....	66
4.4	Filogenetik Analiz Çalışmalar.....	68
4.4.1	P1 gen bölgesi ile filogenetik analiz sonuçları.....	70
4.4.2	HC-Pro ile yapılan filogenetik analiz sonuçları.....	80
4.4.3	P3 bölgesi ile filogenetik analiz sonuçları.....	92
4.4.4	CI bölgesi ile filogenetik analiz sonuçları.....	99
4.4.5	N1b bölgesi ile filogenetik analiz sonuçları	107
4.4.6	CP bölgesi ile filogenetik analiz sonuçları.....	118
5	TARTIŞMA ve SONUÇ	127
5.1	Sonuçlar	130
	KAYNAKÇA	136
	EKLER.....	144
	EK 1 ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler	145
	EK 2 DAS-ELISA Sonuçları	146
	EK 3 Total RNA Analizlerinde Kullanılan Solüsyonlar	153
	EK 4 Gen Bankasında Depolanan İzolatlar ve Aksiyon Numaraları	154
	ÖZGEÇMİŞ	155

KISALTMALAR DİZİNİ

ZYMV	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>
WMV	<i>Watermelon mosaic virus</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CGMMV	<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>
SqMV	<i>Squash mosaic virus</i>
PRSV	<i>Papaya ring spot virus</i>
CABYV	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>
RNA	Ribonükleik asit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PCR	Reverse Transkriptaz -PCR
cDNA	Tamamlayıcı DNA
P1	P1 protein
HC-Pro	Yardımcı bileşen proteini (Helper-component protein)
P3	P3 protein
CI	Silindirik inclusion protein
NiB	Nüklear inclusion protein
CP	Örtü protein
VPg	Genoma bağlı protein
+ssRNA	Pozitif duyarlı tek iplikçikli RNA
DAS-ELISA	Double-Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay
PTGS	Transkripsiyon sonrası gen susturulması
VIGS	Virüsler tarafından teşvik edilen gen susturulması

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 ZYMV-RNA genomunun şematik gösterimi ve proteinlerin işlenmesi	7
Şekil 2.2 PVY protein bölgeleri ve fonksiyonlarının şematik olarak gösterimi	13
Şekil 2.3 HC-Pro bölgelerinin şematik olarak gösterimi	15
Şekil 3.1 Örneklerin toplandığı iller	40
Şekil 4.1 Karpuz bitkilerinde sistemik mozaik, kabarcık oluşumu ve şekil bozukluğu.....	55
Şekil 4.2 Balkabağında sistemik mozaik, şekil bozukluğu ve kabarcıklaşma belirtileri.....	56
Şekil 4.3 Sakız kabağı bitkilerinde mozaik, sararma, iplik yapraklılık ve şekil bozukluğu belirtileri	57
Şekil 4.4 Kavun bitkilerin de virüs belirtileri	58
Şekil 4.5 Çerezlik kabak üzerindeki virüs belirtileri.....	58
Şekil 4.6 P1-5' ve P1-3' ile RT-PCR ürünlerinin %1' lik agaroz jelde görünümü	63
Şekil 4.7 HC-pro bölgesi ile elde edilen bantlar	64
Şekil 4.8 P3 gen bölgesi ile elde edilen bantlar	64
Şekil 4.9 CI gen bölgesi ile elde edilen bantlar.....	65
Şekil 4.10 Nİb gen bölgesi ile elde edilen bantlar	65
Şekil 4.11 CP bölgesi ile elde edilen bantlar	66
Şekil 4.12 P1gen bölgesi ile elde edilen filogenetik ağaç.....	70
Şekil 4.13 HC-Pro ile elde edilen filogenetik ağaç	80
Şekil 4.14 P3gen bölgesi ile elde edilen filogenetik ağaç.....	92
Şekil 4.15 CI gen ile yapılan filogenetik ağaç	99
Şekil 4.16 Nİb gen bölgesi ile elde edilen filogenetik ağaç.....	107
Şekil 4.17 CP bölgesi ile elde edilen filogenetik ağaç.....	118

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Türkiye 2014 yılı kabakgil sebzeleri üretim miktarları	1
Çizelge 1.2 2014 verilerine göre Dünya’da kabakgil üretim sıralaması ve üretim değerleri (ton)	2
Çizelge 3.1 ZYMV gen bölgelerine spesifik olarak sentezlettirilen primerlerin baz dizilimi.....	45
Çizelge 3.2 Protein gen bölgeleri için kullanılan PCR döngüleri	46
Çizelge 4.1 Enfekteli bitkilerden alınan örnek sayıları ve gözlenen belirtiler	48
Çizelge 4.2 Konya, Karaman ve Aksaray izolatları	54
Çizelge 4.3 Bölgelere göre enfekteli bitkilerden alınan örnek sayıları	54
Çizelge 4.4 Toplanan yerlere göre enfekteli örnek sayıları	61
Çizelge 4.5 DAS-ELISA sonunda tespit edilen karışık enfeksiyonlar	62
Çizelge 4.6 Çalışmalarda kullanılan izolatların alındığı yer ve baz dizilimi elde edilen gen bölgeleri.....	67
Çizelge 4.7 Referans izolatların erişim numaraları ve bulundukları alt gruplar	69
Çizelge 4.8 P1 protein gen bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları	75
Çizelge 4.9 HC-Pro gen bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları	82
Çizelge 4.10 P3 protein gen bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları 1	94
Çizelge 4.11 CI protein gen bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları	101
Çizelge 4.12 NIb protein gen bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları	109
Çizelge 4.13 CP gen bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları	120

1. GİRİŞ

Sebze yetiştiriciliği Türkiye’de ekonomik açıdan önemli bir yere sahiptir. 2014 yılı Türkiye toplam sebze üretimi yaklaşık 24 milyon ton iken, kabakgil (Cucurbitaceae) familyasındaki sebzelerin üretim miktarı, yaklaşık 8 milyon ton ile toplam sebze üretiminin %33’ünü oluşturmaktadır (Çizelge 1.1).

Ülkemizde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan sebze türleri arasında kabakgillerin toplam üretim miktarı, domatesten sonra ikinci sırada yer almaktadır. Zengin iklimsel çeşitliliği sayesinde ülkemizde kabakgil familyasına ait olan birçok tür sorunsuz olarak yetiştirilmektedir. Çizelge 1.1’de 2014 yılı verilerine göre Türkiye kabakgil ekim alanları ve üretim miktarları verilmektedir. Yetiştiriciliği yapılan kabakgiller arasında birinci sırayı, yaklaşık 4 milyon ton ile karpuz alırken bunu kavun, hıyar ve kabak çeşitleri takip etmektedir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1 Türkiye 2014 yılı kabakgil türleri üretim miktarları (Anonim 2014)

Ürün adı	Ekim alanı (Dekar)	Üretim (Ton)
Karpuz(<i>Citrullus lanatus</i> L.)	954.627	3.885.617
Kavun(<i>Cucumis melo</i> L.)	791.488	1.707.302
Hıyar (Sofralık) (<i>Cucumis sativus</i> L.	312.954	1.701.708
Hıyar (Turşuluk) (<i>Cucumis sativus</i> L.)	75.005	144.041
Kabak (Sakız)(<i>Cucurbita sp.</i>)	92.242	299.858
Balkabağı (<i>Cucurbita moschata</i>)	40.816	93.672
Kabak (Çerezlik) (<i>Cucurbita pepo</i> L.)	552.648	36.331
Acur (<i>Cucumis melo</i> var. <i>flexuosus</i>)	18.927	33.238
Toplam (Kabakgil)		7.901.767
Toplam sebze üretimi		23.724.312

Ülkemizde yetiştirilen kabakgiller, taze tüketiminin yanında konserve ve hazır yemek sanayinde kullanılmakta olup, kabak tohumları da ülkemizde ve Akdeniz ülkeleri ile Ortadoğu ülkelerinde kuruyemiş olarak yaygın bir biçimde tüketilmektedir. Ayrıca kabak tohumlarının, ekmek ve pasta sanayisinde kullanımı da gün geçtikçe artmaktadır.

Ülkemiz genelinde yetiştirilen kabaklar yazlık, kışlık ve süs kabakları olmak üzere üç grupta incelenmektedir. Yazlık kabaklar arasında yer alan, sakız kabağı veya Zucchini tipindeki ince, uzun koyu renkli kabakların yanı sıra, çerezlik kabaklar da yer almaktadır. Çerezlik olarak tüketilen ürünler içerisinde büyük yeri olan kabak çekirdeğı, çiftçiler için iyi gelir getiren önemli bir üründür.

Türkiye, Dünya’da hıyar ve kavun üretimi açısından Çin’den sonra ikinci sırada, karpuz üretimi açısından üçüncü sırada ve kabak üretiminde 12. sırada yer almaktadır (Çizelge 1.2). Çizelge 1.2’de görüldüğü üzere özellikle kabak üretimi 2010 yılında 430,402 ton iken bu değer 2012’de 395,986 ve 2014 yılında 388,785 tona kadar düşmüştür. Türkiye’de verimin azalmasına neden olan pek çok hastalık etmeni bulunmaktadır. Kabakgillerde de önemli düzeylerde ürün kayıplarına neden olan etmenlerin başında virüs hastalıkları gelmektedir.

Çizelge 1.2 2014 verilerine göre Dünya’da kabakgil üretim sıralaması ve üretim değerleri (ton) (Anonymous 2014)

Sıra	Hıyar (Ton)	Karpuz (Ton)	Kavun (Ton)	Kabak (Ton)
1	Çin 54,315,900	Çin 72,943,838	Çin 14,336,814	Çin 7,100,000
2	Türkiye 1,754,613	İran 3,947,057	Türkiye 1,699,550	Hindistan 4,900,000
3	İran 1,570,078	Türkiye 3,887,324	İran 1,501,411	Rusya 1,128,205
4	Rusya 1,068,000	Brezilya 2,163,501	Mısır 1,020,679	İran 897,293
5	Ukrayna 1,044,300	Mısır 1,894,738	Hindistan 1,000,000	ABD 796,872
6	İspanya 754,400	ABD 1,771,734	ABD 986,066	Ukrayna 610,800
7	ABD 747,610	Özbekistan 1,558,301	İspanya 857,000	Meksika 544,988
8	Meksika 637,395	Cezayir 1,500,559	Kazakistan 774,190	Mısır 543,334
9	Mısır 631,129	Rusya 1,419,953	Fas 700,034	İspanya 533,200
10	Özbekistan 607,397	Viet Nam 1,162,553	Guatemala 569,050	İtalya 530,000
11				Küba 412,028
12				Türkiye 388,785

Kabakgiller dünya çapında önemli olan en az 59 karakterize edilmiş virüs tarafından hastalandırılmaktadır. Bunlar içerisinde 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 (*Watermelon mosaic virus*, WMV) ve Papaya halkalı leke virüsü (*Papaya ring spot virus-W*, PRSV-W) kabakgillere zarar veren önemli virüslerden bazılarıdır (Lisa ve Lecoq, 1984). Akdeniz bölgesinde kültürü yapılan kabakgillerde, en az 28 farklı virüs rapor edilmiştir. Bu virüs çeşitliliği muhtemelen konukçularının ekolojik ve genetik çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır. Kabakgiller klasik yağmurlama sulama yapılarak karpuz yetiştiriciliğinden, topraksız ısıtılmış seralarda hıyar yetiştiriciliğine kadar değişen farklı tarımsal ekosistemlerde yetiştirilmektedir. Bu çeşitli çevre koşulları spesifik virüsler ve onların vektörleri için istenen koşulları oluşturmaktadır. Ancak farklı virüsler benzer yaygınlığa ve ekonomik etkiye sahip değildir. Sadece 26 Akdeniz ülkesinin yarısından fazlasında yaygın olarak 4 virüs rapor edilmiştir. Bunlar; WMV, ZYMV, CMV ve *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) etmenleridir (Desbiez ve Lecoq 2012).

Kabak sarı mozaik virüsü (ZYMV) kabakgil ürünlerinde yoğun mozaik belirtilerine ve şekil bozukluğuna yol açan ekonomik açıdan çok önemli bir virüs olup, *Potyvirus* cinsi içinde yer almaktadır (Desbiez ve Lecoq 1997, Hull 2002, Choi vd. 2007). *Potyvirus* cinsi bitki virüslerinin en geniş grubunu oluşturmaktadır. Bu grubun 200'den fazla kesinleşmiş ve daha kesinleşmeyen türleri bulunmaktadır. Bu cinse ait virüsler kabakgil ürünlerinin (kavun, karpuz, hıyar, kabak) kalite ve kantitelerinde azalmaya neden olarak büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Desbiez ve Lecoq 1997).

Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)'nin bitkilerde oluşturduğu belirtiler genellikle yapraklarda sarı mozaik, şiddetli deformasyon, kabartı, yaprak ayasında önemli ölçüde küçülme ve şiddetli bodurlaşma şeklindedir. Meyvelerde ise yumru gibi şişkinlikler geliştirerek, meyvelerde şekil bozukluklarına neden olur. Enfekteli kavun ve karpuz meyvelerin de şekilsiz ve uzunlamasına derin çatlaklar meydana gelir. Enfekteli bitkilerde tohum oluşumu önemli ölçüde azalmakta ve tohumlar genellikle deforme olmaktadır. Virüsün belirtileri ırka bağlı olarak PRSV-W oluşturduğu belirtilere benzemektedir. Tropik bölgelerde ZYMV genellikle PRSV-W ve WMV ile birlikte

bulunmaktadır. Potyviruslerin diğ er türleri gibi ZYMV’de *Aphis gossypii* ve *Myzus persicae* gibi afit türleri ile nonpersistent olarak taşınmaktadır (Desbiez ve Lecoq 1997).

Etmenin taksonomik sınıflandırması;

Grup IV: Pozitif duyarlı tek sarmallı RNA virüsleri (+ssRNA)

Familya: Potyviridae

Cins: *Potyvirus*

T r: *Zucchini yellow mosaic virus*

Kısaltması: ZYMV

Kabak sarı mozaik virüsü (ZYMV) partikülleri, 750 nm uzunluğunda, ipliksi yapıda ve pozitif duyarlılığ a sahip RNA molekülünden oluşan bir polyproteindir (Lisa ve Lecoq 1984, Siaw vd. 1985, Hull 2002). Genomun 5’ucunda, genoma bağlı protein (VPg) ve 3’ucunda ise polyA kuyruğ  bulunmektedir. Virüs genomunun kodladığı 10 tane fonksiyonel protein ortaya çıkmaktadır (Revers vd. 1999, Urcuqui-Inchima vd. 2001, Glasa ve Pittnerova 2006). Bunlar genomun a ılmasında proteaz görevi yapan P1 protein, virüsün böceklerle sistemik taşınmasında ve gen susturulmasının baskılanmasında rol oynayan yardımcı bileşen proteini (helper komponent protein, HC-Pro), hücreden hücreye taşınmada rol oynayan ve RNA helikaz aktivitesine sahip olan silindirik inclusion protein (CI); genom replikasyonunda rol oynayan nüklear inclusion b protein (NIb) ve virüsün hücreden hücreye ve sistemik taşınmasında rol oynayan örtü protein (CP)’inden oluşmaktadır.

Potyviruslerde izolatları sınıflandırmada genellikle örtü proteini geni yaygın olarak kullanılmaktadır (Rybicki ve Shukla 1992). Ancak tüm genom sekans karşılaştırmaları virüs değişkenliğinin daha karmaşık olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda çeşitli Potyviruslerde gösterilen rekombinasyon gibi büyük evrimsel olayların varlığı virüslerin evrimsel geçmişi hakkında bilgi verebilmektedir (Tomimura vd. 2003, Glasa vd. 2004). Yapılan moleküler çalışmalarda ZYMV izolatları arasında önemli biyolojik, serolojik ve moleküler değişkenlikler olduğu belirlenmiştir. ZYMV’nin strainleri arasındaki varyasyonu bilmek, virüsün karmaşık yapısını anlamak ve bu virüse karşı etkili kontrol

stratejileri geliştirmek bakımından önemlidir. Bugüne kadar bazı coğrafik olarak farklı ZYMV izolatlarının tüm genom sekansı rapor edilmiş (Wisler vd. 1995, Lin vd. 2001, Desbiez vd. 2003, Zhao vd. 2003, Kwon vd. 2005) olup, henüz Türk izolatlarının genom dizilimi bilinmemektedir. Ele alınan bu çalışma ile bu boşluk doldurulmaya çalışılmıştır.

Çalışmamızda, kabakgil yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Ankara, Antalya ve çevre illerden (Konya, Karaman, Aksaray, Burdur) virüs simptomsu gösteren kabakgil bitkilerinden örnekler alınmıştır. Söz konusu etmenin serolojik ve morfolojik yöntemlerle tanısı yapılmış ve elde edilen ZYMV izolatlarının kodladığı önemli protein gen bölgelerinin sekans analizi yapıldıktan sonra literatürde mevcut olan ZYMV izolatlarının protein gen bölgeleri ile karşılaştırılarak filogenetik analizi yapılmıştır.

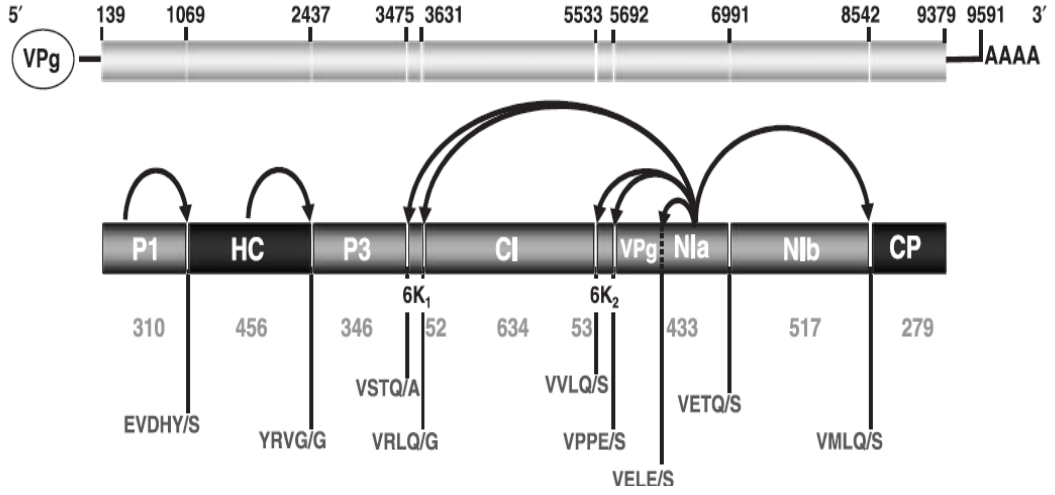
2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 ZYMV'nin Keşfi

Kuzey İtalya'da 1973 yılında bir aile bahçesinde yetiştirilen Zucchini kabaklarında bilinen kabakgil virüslerinden (CMV, WMV, ve PRSV-W) farklı olan belirtiler gözlenmiştir. Enfekteli bitkilerde yoğun bodurlaşma, sararma, yapraklarda ve meyvelerde deformasyonlar şeklinde belirtiler rapor edilmiştir. Yeni virüs ZYMV olarak adlandırmıştır (Lisa vd. 1981). Yine 1979'da Güney-Batı Fransa'da geçici olarak "*Muskmelon yellow stunt virus*" diye adlandırılan yeni bir virüs tarafından çok sayıda kavunun zarar gördüğü rapor edilmiştir. Kısa zaman sonra bu virüsün ZYMV'ye benzer olduğu anlaşılmış ve ZYMV olarak adı değiştirilmiştir. Virüs hastalığı İtalya ve Fransa'da kabak ve kavunlarda yoğun epidemilere yol açmış ve 5 yıl içinde Dünya'da kabakgil yetiştirilen her yerde rapor edilmiştir. Şu anda ZYMV 18 Akdeniz ülkesinde en önemli kabakgil virüsü olarak rapor edilmektedir. ZYMV son yıllarda literatürde en fazla karşılaşılan bitki virüsüdür (Desbiez ve Lecoq 1997 2012).

2.2 Viral Etmenin Özellikleri

Kabak sarı mozaik virüsü, Potyviridae familyasında *Potyvirus* cinsi içinde yer almaktadır. Viral etmen 750 nm uzunluğunda ipliksi partiküllere sahiptir. Partiküller, pozitif duyarlı tek iplikçikli RNA (+ssRNA) moleküllü olup, genom yaklaşık 9600 bazdan oluşmaktadır (Hull 2002). Viral genomun 5' ucunda translasyonu yapılmayan bölge (untranslated region-VPg) ve 3' ucunda poly (A) kuyruğu bulunmaktadır. RNA tek bir polyprotein kodlamakta ve bu polyprotein üç viral protein ile işlenerek yaklaşık 10 tane fonksiyonel protein açığa çıkmaktadır (Şekil 2.1). ZYMV, enfekteli bitkilerde genellikle tip1 silindirik inclusionlar oluşturmaktadır (Desbiez ve Lecoq 1997 2012).



Şekil 2.1 ZYMV-RNA genomunun şematik gösterimi ve proteinlerin işlenmesi (Gal-On 2007)

2.3 ZYMV Belirtileri

İlk tanımladığından beri ZYMV kabakgil ürünlerinde şiddetli semptomlara yol açan virüs olarak rapor edilmiştir. ZYMV, kültür bitkilerinde şiddetli belirtilere yol açmakta ve önemli verim kaybına neden olmaktadır. Enfekteli meyvelerde şiddetli deformasyonlar ve renk değişimleri görülmektedir. Bu meyveler pazara sürülemediği için önemli ekonomik kayıplar ortaya çıkmaktadır. ZYMV'in tür ve çeşide bağlı olarak hassas konukçularında çeşitli belirtiler oluşturduğu görülmüştür (Desbiez ve Lecoq 1997, 2012).

Kavunda yapraklarda ilk belirtiler damarlarda renk açılması ve sarı mozaikler şeklindedir. Ayrıca enasyon ve kabarcık oluşumu gibi yaprak deformasyonlarına da neden olmakta ve bitkiler genellikle bodur kalmaktadır. Bazı ZYMV izolatları Fn genine sahip çeşitlerin ani solmalarına neden olduğu rapor edilmiştir. Meyvelerde çeşitli belirtiler gözlenmiş olup bunlar; mozaik ve nekrotik çatlaklar, iç dokularda kararma ve meyve etinin sertleşmesi şeklindedir. ZYMV ile enfekteli tohumlar genellikle deforme olmakta ve çimlenme oranı düşük kalmaktadır (Desbiez ve Lecoq 2012).

Zucchini kabaklarında belirtiler sarı mozaik, sararma, damarlarda açılma, yapraklarda deformasyon ve iplikleşme şeklindedir. Meyvelerde genellikle şekilsiz ve üzerinde gözle görülür çıkıntılar bulunmaktadır. Sarı meyveli çeşitlerde meyveler, parlak sarı beneklerle kaplanmakta ve yeşil kalmaktadır (Desbiez ve Lecoq 2012).

Hıyar (*Cucumis sativus*) yaprak ve meyvelerinde yoğun mozaik ve deformasyonlar gözlenmektedir. Karpuzda genellikle yapraklarda mozaik, iplik yapraklılık ve beneklenme gözlenmekte ve meyvelerde düzensiz renklenme ile hafif ve şiddetli deformasyonlar görülmektedir (Desbiez ve Lecoq 1997).

Kabak sarı mozaik virüsü diğer kabakgil virüslerine göre kısmen dar konukçu aralığına sahiptir. Doğal koşullarda kültüre alınmış ve yabani kabakgillerde enfeksiyon yapmaktadır. Aynı zamanda hatmi çiçeği, begonya ve hezeran gibi süs bitkilerini de hastalandırdığı rapor edilmiştir (Desbiez ve Lecoq 2012).

2.4 Taşınması

Kabak sarı mozaik virüsü, mekanik olarak, tohumla, afitlerle non persistent tarzda kolayca taşınabilmektedir. Diğer Potyvirusler gibi ZYMV afitlerle nonpersistent olarak etkili şekilde taşınır ve en az 26 afit türü ile taşınmaktadır. *Aphis craccivora*, *A. gossypii*, *Macrosiphum euphorbiae*, *A. citricola* ve *Myzus persicae* etkili vektörleridir. Fakat bazı afit türleri (*Lipaphis erysimi*, *Myzus ascalonicus*) ise ZYMV'yi taşıyamamaktadır (Lisa vd. 1981). *M. persicae* ve *Aphis gossypii* bitki başına 3 virüsü taşıyan afit ile %70-90 oranında virüsü taşıdığı rapor edilmiştir (Lecoq vd. 1981).

ZYMV ve *A. gossypii* arasında ilginç bir etkileşim gözlemlenmiştir. *A. gossypii*'nin enfekteli olmayan bitkilere göre enfekteli bitkiler üzerinde daha uzun yaşadığı ve daha çok ürediği rapor edilmiştir. Aynı zamanda ZYMV'nin yayılmasını artıran daha fazla kanatlı afit formlar oluşturduğu gözlenmiştir (Desbiez ve Lecoq, 2012).

Pinto vd. (2008) *A. gossypii*, ve *M. persicae* türlerinin CMV'yi tek başına ve iki Potyvirus (ZYMV ve PRSV-W) ile karışık olarak taşıma yeteneğini araştırmak için yaptıkları çalışmada, her iki afit türünün Potyvirusleri daha etkili taşıdığını rapor etmişlerdir.

Potyviruslerin afitle taşınmasında iki tane fonksiyonel proteine (CP ve HC-Pro) ihtiyacı vardır. HC-Pro'nin taşınmada rol aldığı 1970'li yıllardan beri bilinmektedir.

Kabak sarı mozaik virüsünün afitle taşınmasında da önemli varyasyonlar rapor edilmiştir. Afitle taşınma yeteneğini kaybeden bazı ZYMV izolatları (ZYMV-NAT) karakterize edildiğinde, virüsün taşınmasından sorumlu olan üç önemli domainde tanımlanmış olan tek bir amino asit mutasyonuna rastlanmıştır. Bunlar ZYMV-NAT izolatının CP'inde yer alan DAG motifinde alanin amino asiti (A) yerine threonin (T) amino asitinin yer aldığı rapor edilmiştir. Yine ZYMV-R1A izolatının taşınmadan sorumlu olan HC-Pro bölgesinde bulunan KLSC motifinde lizin (K) yerine glutamat (E) ve ZYMV-PAT izolatında PTK motifinde threonin (T) yerine alanin (A) amino asitinin yer aldığı bildirilmektedir. Potyvirusler arasında tek olan bu mutant PTK ve DAG domainleri sayesinde CP ve HC-Pro arasındaki fonksiyonel etkileşimin tanımlanmasını sağladığı rapor edilmiştir.

Taşınma yeteneği olmayan ZYMV-NAT izolatı (CP'inde DAG motifi yerine DTG motifi vardır) enfekteli bitkilerden PRSV'nin taşınma yeteneğine sahip afitlerle taşınabilmektedir. Bu heterokapsidasyon olarak adlandırılan ZYMV RNA'sının fonksiyonel PRSV-W-CP tarafından kısmen ya da tamamen kaplanması ile gerçekleşmektedir. Yardımcı bileşen proteinin (HC-pro) eksik olan afitle taşınamayan bir izolatın, fonksiyonel HC-Pro'ine sahip olan izolatlarla karışık enfeksiyon olduğunda afitlerle taşınabildiği (heteroasistant) bildirilmektedir. Afitle taşınabilen izolat taşınma yeteneği eksik olan izolatın taşınmasına yardımcı olduğu ileri sürülmüştür. Bu iki mekanizma (heterokapsidasyon ve heteroasistant vektörler) düşük oranda taşınabilen

varyantların doğada devamını sağladığı düşünülmektedir. Heteroasistant'ın heterokapsidasyondan daha etkili olduğu rapor edilmiştir (Desbiez ve Lecoq 1997).

2.5 Biyolojik ve Genetik Çeşitlilik

İlk rapor edilişinden sonra ZYMV'nin geniş biyolojik çeşitliliğe sahip olduğu görülmüştür. Tarla izolatları biyolojik özellikleri ile karşılaştırıldığında, nekroz ya da solma, orta derecede ya da tipik olmayan belirtiler oluşturan izolatlarla hassas konukçularında simptomatolojide ve konukçu aralığında önemli varyasyonlar gözlenmiştir. Bu izolatların dayanıklılık geni taşıyan kabak çeşitlerine ya da kavuna inokule edildiğinde farklı patotiplere ayrıldığı görülmüştür (Desbiez ve Lecoq 2012).

ZYMV'ye karşı monoklonal antibodylerin (MAbs) gelişmesi CP moleküler varyasyonu ile ilişkili serotiplerin karakterizasyonuna izin vermiştir (Desbiez ve Lecoq 1997).

Gen bankasından, çoğunlukla CP kodlama bölgesi olmak üzere, 500'den daha fazla ZYMV izolatının kısmi sekansı elde edilebilmektedir. Dünya çapında Grup A, Grup B ve son yıllarda Vietnam ve Çin'den Grup C olmak üzere 3 büyük grup tanımlanmıştır. Bugüne kadar Akdeniz havzasında sadece Grup A belirlenmiştir. Ancak Grup C'den bir izolat Polonya'da bulunmuştur. Grup A içinde 3 (küme 1-3) küme orjinal olarak tanımlanmış ve diğer üç tanesi (küme 4-6) (Çin ve Kore izolatlarını içeren) elde edilen sekans sayısı arttıkça daha sonradan ayrılmıştır. Akdeniz bölgesinde küme 1, Fransa'da 1979'dan beri, İspanya, Tunus, Türkiye, İsrail, Suriye ve Ürdün'de gözlenmiştir. Küme 2, 1973'de İtalya'da, Tunus'da, 1979'da Ürdün ve Fransa'da; küme 3 ise, İspanya ve Güney Doğu Fransa'da rapor edilmiştir. Bu üç kümeye ilave olarak surveyler küme 4 ve 5'in Güney doğu Fransa'da 2004 ve 2005'den beri var olduğunu ortaya çıkarmıştır. 30 yıllık periyotta deney noktalarında yürütülen gözlemler, ZYMV populasyonlarında, populasyon değişikliklerinin birkaç yılda gerçekleştiğini göstermiştir. Bugüne kadar

Akdeniz havzasında Polonya ve Fransa dışında diğer ülkelerde 4-6 kümelerinin varlığı rapor edilmemiştir (Desbiez ve Lecoq 2012).

2.6 Epidemiyolojisi

ZYMV'nin tohumla taşınıp taşınmadığı, uzun süre soru işareti olarak kalmıştır. Tohumla taşınma olasılığı üzerine 1990'larda kafa karıştırıcı raporlara rağmen son yıllarda tohumla taşınmanın gerçekleştiği *C. pepo var styriaca* (Tobias ve Palkovics 2003), *C. pepo subsp. texana* (Simmons vd. 2011) ve Zucchini kabak (Uçar ve Ertunç 1998, Coutts vd. 2011) türlerinde çeşitli araştırmacılar tarafından açık şekilde kanıtlanmıştır.

Yapılan çalışmalar tohum yoluyla gerçekleşen enfeksiyonların semptomsuz olarak geliştiğini göstermiştir. Bu enfeksiyonlar standart serolojik yöntemlerle belirlenememekte sadece RT-PCR sonucunda belirlenebilmektedir. Maskelenme olarak bilinen bu özellik virüsün tohumla taşınması hakkındaki daha önceki kafa karışıklığına açıklık getirmekte ve tohumla taşınmanın belirlenebilmesi için özel belirleme yöntemlerine olan ihtiyacı göstermektedir (Desbiez ve Lecoq 2012).

ZYMV'nin uzun masafelere yayılımının diğer bir olası yolu sebze üretimi ve ticaretinin globalleşmesidir. Orta Amerika'dan Avrupa'ya ithal edilen ZYMV enfekteli meyveler afitler için çok etkili virüs kaynağı olabileceğini göstermiştir. Virüs kaynakları kışlayan yabani otları ve ürünleride enfekte edebilmektedir. Tropikal ve subtropikal bölgelerde, kabakgil ürünleri tüm yıl boyunca yetiştirilmekte ve virüsler yaşlı enfekteli bitkiden veya yabancı otlardan genç bitkilere kolayca taşınabilmektedir. Akdeniz Havzasında sadece birkaç kabakgil olmayan yabancı otun potansiyel ZYMV enfeksiyon kaynağı olduğu bulunmuştur (Desbiez ve Lecoq 2012).

2.7 Teşhis

ZYMV'nin teşhisi standart serolojik metotlarla kolayca yapılabilir. DAS–ELISA ticari kitleri bazı üretici firmalardan alınabilmekte olup son yıllarda tarlada ZYMV'nin hızlı ve kolay teşhisine izin veren lateral akış tekniğine dayalı serolojik testler de geliştirilmiştir. ZYMV'nin moleküler olarak teşhisi için, özellikle CP kodlama bölgesi, spesifik primerler üretilmiş olup çok sayıda tam ve kısmi nükleotit sekanslarına gen bankasından ulaşılabilir (Desbiez ve Lecoq 2012).

2.8 ZYMV Protein Gen Bölgeleri

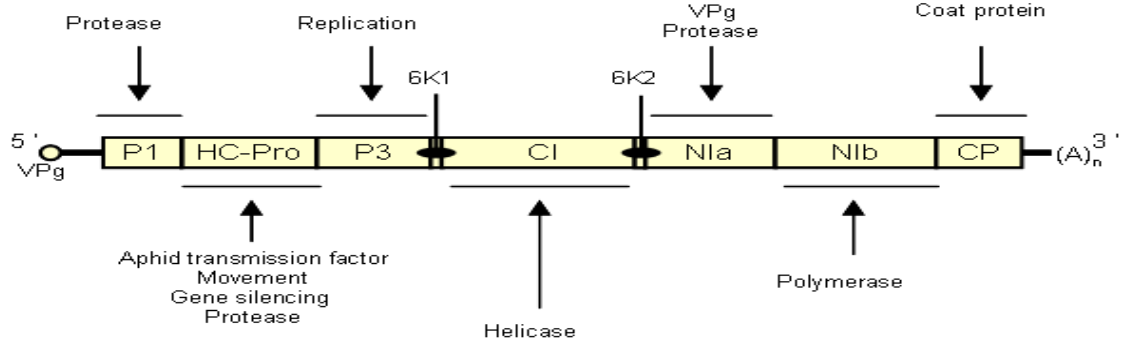
Potyvirus cinsine ait olan ZYMV-RNA'sı tek bir polypeptid kodlamakta ve bu polypeptid, virüs tarafından kodlanan üç tane viral proteinaz ile işlenerek yaklaşık 10 tane fonksiyonel protein açığa çıkmaktadır (Şekil 2.1). Bu proteinlerin fonksiyonları şekil 2.2'de Potyvirus tip üyesi olan PVY genomu üzerinde özetlenmektedir.

ZYMV enfekteli bitkilerde bugüne kadar 10 potyviral proteinin 4 tanesi tanımlanmıştır. Bunlar;

1. P1 protein, P1 (Wisler vd. 1995),
2. Yardımcı bileşen proteini, (HC-Pro) (Lecoq vd. 1991a, Peng vd. 1998)
3. Silindirik inclusion proteini, (Cylindrical inclusions) (CI) pinwheel type 1 (Lecoq vd. 1981)
4. Örtü proteini (CP) (Gal-On vd. 1990) araştırmacıları tarafından tanımlanmıştır (Gal-On 2007).

Diğer potyviral proteinler üçüncü protein (P3), 6K1, 6K2, genoma bağlı protein (viral protein genome linked-VPg), Nuclear Inclusion A (NIA) ve NIB replikaz ZYMV enfekteli bitkilerde henüz tanımlanmamıştır. Yakın akraba Potyvirusler arasında ve aynı potyvirusun strainleri arasında rekombinasyon olayı rapor edilmiştir. ZYMV genomu

üzerine yapılan çok sayıdaki çalışma HC-Pro ve CP üzerinde yoğunlaşmıştır. Protein bölgeleri ile yapılan çalışmalar aşağıda verilmiştir.



Şekil 2.2 PVY protein bölgeleri ve fonksiyonlarının şematik olarak gösterimi (Anonymus 2015)

2.8.1 P1 protein

Potyvirus genomunun N ucundaki proteindir ve polyproteinin açılmasına izin veren bir proteinaz (P1 proteinaz) kodlamaktadır. P1 proteinaz genomun C-terminal uç bölgesini açma fonksiyonuna ve aynı zamanda RNA'ya bağlanma aktivitesine sahiptir (Urciqui-Inchima 2001). P1 proteinaz serin tipi bir proteinaz olduğu ve bu proteinin iki fonksiyonel domaine sahip olduğu rapor edilmiştir. Bunlardan N –terminal ucunun yarısının Potyvirusler arasında amino asit sekans farklılığı gösterdiği bildirilmektedir. *Tobacco vein mottling potyvirus* analizlendiğinde bu proteinin sekansı, bitki virüslerinin taşınma proteinleri ile bazı benzerlikler göstermiş, fakat diğer Potyviruslerde bu benzerliğe rastlanmamıştır. Dougherty ve Semler (1993), P1 proteinin C-terminal uç bölgesinin yarısının proteolitik aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir. Serin tipi P1 proteinaz genom amplifikasyonu esnasında transaktivatör olarak rol oynamaktadır (Verchot ve Carrington 1995, Ryan ve Flint 1997). Tüm Potyviruslerde P1 proteinin C uç kısmında yer alan proteinaz aktivitesine sahip domain dışında P1 proteinin N uç kısmı ve P3 protein Potyviruslerde en az korunmuş proteinlerdir (Urciqui-Inchima 2001). ZYMV ve PVY izolatlarında P1 protein kodlama bölgesinde yüksek derecede polimorfizm gözlenmiştir.

Delesyon ve mutasyon analizleri P1 proteinin viral enfeksiyon için gerekli olmadığını göstermiştir. Aksine HC-Pro ve P1 protein arasındaki sınırın açılması virüsün canlılığı için gerekli olduğu rapor edilmiştir.

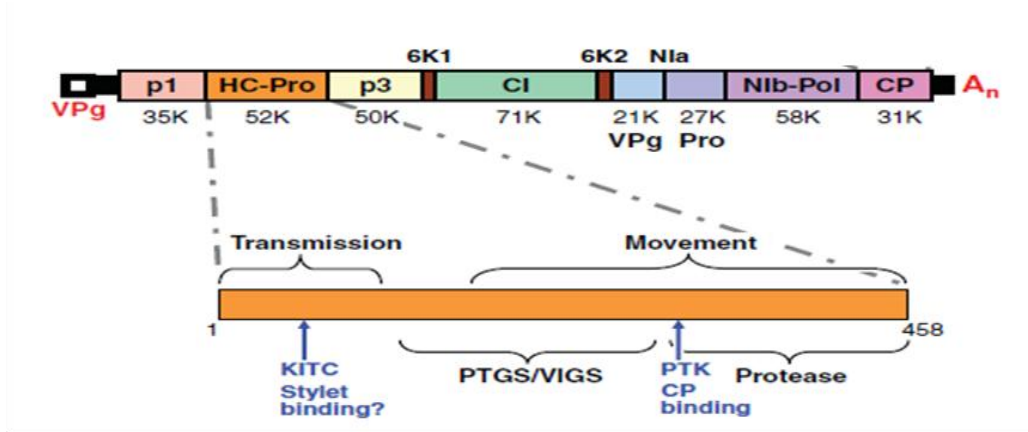
P1 proteini tek komponentli Potyviruslerde bulunmakta olup ancak Potyviridae familyasının üyesi olan bipartite genoma sahip olan Bymovirüslerde bu enzim bulunmamaktadır.

2.8.2 Yardımcı bileşen (HC-Pro) protein

Yardımcı bileşen (HC-Pro) proteinin multi fonksiyonel bir protein olduğu ve viral döngüde pek çok fonksiyonu gerçekleştirdiği bildirilmektedir. İlk olarak virüsün afit vektörleriyle konukçudan konukçuya taşınması için zorunlu yardımcı faktör olduğu fark edilmiştir. Daha sonralarda proteaz aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Sonraki çalışmalarda HC-Pro'nin daha çok fonksiyonu tanımlanmıştır. Bunlar; virüsün genom amplifikasyonunu ve enfekte etme yeteneğini artırıcı olduğu ve bitkide sistemik ve hücreden hücreye taşınma için zorunlu olduğu rapor edilmiştir. En son yapılan çalışmalarda ise transkripsiyon sonrası gen susturulması (Post-transcriptional gene silencing-PTGS) ve virüsler tarafından teşvik edilen gen susturulması (VIGS)'da baskılayıcı olarak tanımlanmıştır (Plisson vd. 2003, Ballut vd. 2005, Taliansky vd. 2008).

Mutasyon çalışmalarında ve genom sekansının çıkartılması ile HC-Pro gen bölgesinin şematik olarak üç bölgeye bölündüğü ileri sürülmüştür (Şekil 2.3).

1. Taşınma işleminde gerekli olan N- terminal bölgesi,
2. Proteinase aktivitesinin bulunduğu C- terminal bölgesi ve
3. Diğer tüm fonksiyonları içeren merkezi bölge bulunur.



Şekil 2.3 HC-Pro bölgelerinin şematik olarak gösterimi.

Taşınma fonksiyonu iki korunmuş bölgede yer almaktadır. Bir tanesi afit vektörünün styletine bağlanmasında rol oynayan N-terminal ucundaki KITC motifi ve diğeri ise gen bölgesinin C- terminal ucundaki PTK motifidir. Bu motifler HC-Pro'nin viral kapsid proteine bağlanmasını sağlamaktadır. DAG motif ve PTK motifi arasındaki interaksiyonun taşınma için gerekli olduğu bildirilmektedir. HC-Pro'nin yaklaşık 100 amino asitlik N terminal ucunun sadece taşınmada rol oynadığı görülmüştür. Bu bölgenin delesyona uğratıldığı viral mutantların tamamen enfeksiyon yeteneğini kaybettiği bildirilmektedir (Plisson vd. 2003, Ballut vd. 2005).

Potyvirus genomu, enfeksiyon döngüsü için viral genlerin ortaya çıkmasını sağlayan üç viral proteaz tarafından kodlanan tek bir polypeptid kodlar. Bu proteinlerden biri yardımcı bileşen proteinidir. Proteinaz domaini HC-Pro'nin C ucundaki 155 amino asitlik bölgede haritalanmıştır ve bu bölgenin aktif bölgelerde Cys³⁴⁴ ve His⁴¹⁷ kalıntılarıyla sistein proteaz benzeri aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Aynı zamanda bu bölge, *Bean common mosaic necrosis virus* HC-Pro'inde olduğu gibi, hücreden hücreye taşınma domaini ile üst üste gelebilmektedir (Plisson vd. 2003).

HC-Pro'nin merkezi bölgesi genellikle genom amplifikasyonunda, diğer virüslerle sinerjizmde ve konukçu bitkide sistemik taşınmada önemli olduğu düşünülmektedir.

Bütün merkezi bölgenin iki domain aralığı ssRNA spesifik olarak bağlanmayan nükleik asitler olarak tanımlanmıştır (Plisson vd. 2003).

Son yıllarda, HC-Pro'nin PTSG baskılayıcısı ve virüsler tarafından teşvik edilen gen susturulmasının baskılamasında rol oynadığı anlaşılmıştır. Virüsler tarafından teşvik edilen gen susturulması, PTSG ve diğer RNA susturulması olayı ökaryotlarda bulunan eski bir savunma sistemidir ve viral RNA gibi anormal RNA'ların spesifik degradasyonu yoluyla kısa karışık RNA'ların olduğu yerde alternatif bir bağışıklık sistemi oluşturabilmektedir. Bitkilerde, floem bitki yoluyla tanımlanmamış bir susturma sinyali dağıtır ve sonuç olarak tüm bitki ilgili genin ifadesini baskılar (Yelina vd. 2002, Plisson vd. 2003).

HC-Pro'nin merkezi bölgesi baskılama aktivitesinde karıştırılır ve viral taşınma ve genom amplifikasyonu için tanımlanmış bölge ile üst üste gelir. Mutasyon çalışmaları ile HC-Pro'nin çok sayıda fonksiyonu iyi karakterize edilmesine rağmen, moleküler mekanizması hakkında çok az şey bilinmektedir. Potyviruslerin hücreden hücreye taşınmasında genoma bağlı viral proteinlerde (VPg) rol oynamaktadır (Plisson vd. 2003).

2.8.3 P3 protein

P3 proteininin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte çeşitli çalışmalarda bitki patojenisitesinde rol aldığı ileri sürülmüştür. Dayanıklı bal kabağı (*Cucurbita moschata*) ile yapılan türler arası melezlemeler dayanıklı Zuchhini kabağı F1 hibridinin (*C. pepo*)'nın ortaya çıkmasını sağlamıştır. Ancak *C. moschata* tamamen dayanıklı olmasına rağmen ticari *C. pepo* hibridleri sadece tolerant olarak kalmıştır. Tolerant hibridlerde saldırganlığın artmasına karşı, tarlada ZYMV evrimi gözlenmiş ve deneysel olarak elde edilmiştir. Sekans karşılaştırmaları ve rekombinasyon denemeleri sonunda ZYMV'nin P3 proteininde bir nokta mutasyonun toleranslığı kırmak için yeterli olacağı gösterilmiştir. Yarı-izogenik yabancı tip ile monoklonal olarak ayrılan ZYMV saldırgan varyantları arasında rekabet deneyleri yapılmıştır. Tolerant Zucchini kabağının karışık

enfeksiyonlarında saldırgan mutantlar yabani tip strainlere göre daha uyumluluk göstermiş, fakat hassas kabak ya da kavunda karışık enfeksiyonlarda ciddi bir uyum kaybı gözlenmiştir. Bu çalışma bitki virüsleri için toleranslığın kırılmasıyla ilgili ilk nicel çalışmayı temsil etmektedir (Desbiez vd. 2003)

2.8.4 CI protein

Silindirik inclusion body (CI) proteinleri potyvirus enfeksiyonlarına özgü olan silindirik inclusion bodyleri oluşturmaktadır. CI protein iki önemli fonksiyona sahiptir. Bunlar ATPaz aktivitesi ve RNA çift sarmalını açma yani helikaz aktivitesidir. PPV'ün CI proteinin pozitif duyarlı RNA virüsleri tarafından kodlanan helikaz aktivitesine sahip olduğu gösterilen ilk proteindir. C- terminal uç bölgesinin yarısı ise RNA helikazlarla hiçbir benzerlik göstermemektedir. CI protein aynı zamanda NTP'ye bağlanma, NTPaz, RNA'ya bağlanma ve RNA helikaz aktivitesine sahiptir. Potyvirus CI süpergrup 2'ye dahildir ve 7 korunmuş segmente sahiptir.

CI protein potyvirus enfeksiyonlarına özgü olan silindirik inclusion bodyleri oluşturmaktadır. Bu protein helikaz domainine sahiptir ve RNA zincirinin açılmasından sorumludur. Bu proteinin plasmadesmata ve plasma membranları ile ilişkili olduğu ve virüsün hücreden hücreye taşınmasında rol oynadığı bulunmuştur.

2.8.5 Nüklear inclusion body (Nİb) Protein

Nüklear inclusion protein b (Nİb Protein) RNA'ya bağlı RNA polimerazdır ve virüs replikasyonunda rol oynamaktadır. Nİb proteini genellikle enfekteli bitkilerin nükleusunda inclusionlar oluşturur. Ayrıca viral RNA sentezi esnasında replikasyon kompleksleri ile ilişkili olan membranlarda ve sitoplazmada bulunur.

2.8.6 Örtü Proteini (CP)

ZYMV örtü proteini (CP) polyproteinin N uç bölgesinde yer alan 837 nükleotit tarafından kodlanmaktadır. 5' ucunun 8546 pozisyonundan başlayıp karboksil ucunun 9381 pozisyonunda bitmektedir. CP korunmuş bölünme motifi olan ve VLMQ/S Gln ve Ser arasını açan Nla proteinaz tarafından işlenir. ZYMV CP sekans dizileri CP'nin uzunluğunun değişmediğini ve VLMQ/S proteaz motifinde metionin proteinin Ile, Thr ve ya Lys ile yer değiştirdiğini göstermiştir.

ZYMV CP alt üniteleri bükülebilir iplikli partiküller halinde ve ZYMV RNA yokluğunda virüs benzeri partikül oluşturmak için birleşmektedir. Örtü proteini alt ünitelerinin potyviral RNA genomuyla interaksiyonundan sorumlu olan amino asitler hangileri olduğu henüz bilinmemektedir.

ZYMV örtü proteini 3 domaine ayrılmaktadır.

1. Değişken N- terminal ucu (virion yüzeyinde bulunur)
2. Çekirdek domain bölgesi ki bu bölge viral RNA etkileşim halindedir.
3. C terminal uc bölgesi ki bu bölgede 3 tane α helikaz ve üç tane β - strands'ları bulunur (Barotova vd. 2001).

ZYMV örtü proteinin N-terminal uç bölgesindeki, sadece altı amino asit hariç, amino asit sekansındaki değişimlerin virüs yaşam döngüsünü etkilemediği bildirilmiştir. ZYMV örtü proteinin çekirdek domaini ve karboksil ucu ZYMV izolatları arasında hem çekirdek hem de karboksil ucu yüksek oranda benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Potyviruslerin CP'nin çekirdek bölgesi parçacık oluşumu ile ilişkilidir. ZYMV'nin çekirdek bölgesinden beş amino asitin silinmesi virüsün canlılığını elemine ettiği ve bu durum virüsün sistemik taşınmasında ZYMV virionunun oluşumunun önemini göstermektedir. ZYMV örtü proteinin çekirdek bölgesini içeren Kimerik *Plum pox virus* (PPV) genomunu bükülebilir iplikli partikül içine paketleme yeteneğine sahiptir.

Virüslerin örtü proteinleri viral genomu kapsitlemektedir. Bunun yanı sıra virüsün afitle taşınmasında, hücreden hücreye taşınmasında ve sistemik taşınmasında rol aldığı bildirilmiştir.

2.9 Dünya’da ZYMV ile Yapılan Çalışmalar

ZYMV’nin zararına ilk olarak 1973’de İtalya’da kabakgil yetiştiriciliği yapılan alanlarda rastlanmıştır. Daha sonralarda 50’den fazla ülkede bu hastalık etmeninin varlığı rapor edilmiştir (Lin 2001, Wang vd. 2006). Ülkemizde ise ilk olarak Yılmaz ve Davis (1984) tarafından Akdeniz bölgesinde varlığı bildirilmiştir.

ZYMV, Martinique adasında 1992 yılında rapor edilmiş ve son yıllarda adada hızla yayılmıştır. 1992-93 yıllarında farklı kabakgil yetiştiriciliği yapılan alanlardan, monoklonal antibody serileri ve farklı konukçular kullanılarak biyolojik ve antijenik farklılık olduğu belirlenen 14 izolat toplanmıştır. 14 izolatın örtü proteinin ve polimeraz kodlama bölgesinin kısmi sekansı bazı moleküler değişkenliklerin olduğunu göstermiştir. Bu değişkenliğin ya farklı ZYMV strainlerinin adaya girmesinden ya da sınırlı genetik temel ile ortaya çıkan ZYMV populasyonun hızlı evriminden kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir. Gözlemlenen değişkenliğin oranı etkili ve sabit kontrol stratejilerinin gelişmesini etkileyeceğini bildirilmiştir (Desbiez vd. 1996).

Tayvan’ın farklı alanlarından toplanan ZYMV izolatlarının konukçu reaksiyonları SDS immonodifüzyon testi ve RT-PCR ürünlerinin kesim enzimleriyle kesimi sonucunda, 33 ZYMV izolatının Zucchini kabaklarında yol açtığı simptomlar 3 tipe bölünmüştür. Birinci grup yaprak kıvrılması ve daralma ile sarı mozaik belirtileri, ikinci grup yaprak kıvrılması ile sarı mozaik ve üçüncü grup damar bantlaşması ile sarı mozaik belirtilerinden oluşur. Bu izolatlar, su kabağı ve hıyarda yapraklarda nekroza neden olan CY2 izolatı dışında, kavun, su kabağı ve hıyarda sarı mozaik simptomları oluşturmaktadır. SDS immunodifüzyon testlerinde TN3 izolatına karşı hazırlanan serum 33 izolatın hepsiyle reaksiyona girmiştir. ZYMV’nin NIb ve CP gen bölgelerine spesifik primerler kullanılarak yapılan RT-PCR sonucunda ise 0.76kb DNA fragmenti

elde edilmiştir. Beş tane ZYMV izolatının CP bölgelerini değişkenliğinin analiz etmek için RT-PCR ürünlerinin *EcoRV*, *Taq* ve *NlaIII* enzimleri ile kesim sonuçlarında TC1, CY2 ve TNML1'in çok yakın akraba olduğunu ve TN3 ile NT'in daha değişken olduğunu göstermiştir (Lin vd. 1998).

Kwon vd. (2005) ZYMV'nin üç Kore izolatının nükleotit sekansını ve biyolojik karakteristiklerini belirledikleri çalışmada, ZYMV-PA hıyar ve kabak bitkilerinde yoğun mozaik lekeler, bodurlaşma ve şekil bozukluğuna neden olan en şiddetli izolat olarak bulunurken, ZYMV-PE ve ZYMV-PS izolatlarının hafif semptomlara neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu izolatların filogenetik analizleri sonucunda diğer ZYMV izolatları ile karşılaştırıldığında bu üç virüsün farklı bir sınıf oluşturduğu ve diğer Potyviruslerle uzaktan akraba olduğunu bulmuşlardır.

ZYMV Potyvirus üyesidir ve dünyada yaygın bir dağılıma sahiptir. Bu virüs İran'da kabakgil yetiştiriciliği yapılan yerlerde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. 2002-2003 yıllarında Tahran ilinden su kabağı yetiştirilen alanlardan örnekler toplanmış ve bu örneklerden elde edilen beş izolat *Cucurbitaceae*, *Chenopodiaceae*, *Amaranthaceae*, *Solanaceae*, *Leguminosae*, *Ranunculaceae* türlerine inokule edilmiştir. ZYMV izolatları *Chenopodium quinoa* ve *C. amaranticolor* türlerinde lokal lezyonlar, *Gomphrena globosa*'da nekrotik lezyon, *Ranunculus sardous* ve *Cucurbitaceae* familyasında sistemik semptomlara neden olmuştur. *Phaseolus vulgaris* cv. Red Kidney ve *P. vulgaris* cv. Khorram türlerinde Z2, Z4 ve Z5 izolatları mozaik semptoma neden olurken, Z1 ve Z3 izolatları bu konukçularda klorotik lokal lekeler neden olmuştur. *Cucurbita pepo*'dan virüs saflaştırılmış ve immunoelektron mikroskopi çalışmalarında ipliksi partiküller gözlenmiştir. SDS-PAGE ve western blotting çalışmalarında virüsün örtü proteinin moleküler ağırlığı 32kDa bulunmuştur. Desbiez vd. (2003) in tasarladığı primer çifti ile yaptıkları PCR amplifikasyonunda yaklaşık 458 nt uzunluğunda bant elde edilmiştir (Hosseini vd. 2007).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda ZYMV izolatları arasında hem serolojik hem de biyolojik değişkenlik olduğu rapor edilmiştir (Desbiez ve Lecoq 1997). Fransa, İsrail

ve Reunion adasından toplanan örneklerle yapılan TAS-ELISA testleri sonucunda, farklı coğrafik bölgelerden toplanan ZYMV izolatların 15 serotipe ayrıldığı belirlenmiştir. Ayrıca ZYMV izolatları arasında hassas bitkilerde hafiften şiddetliye kadar değişen ve nekrotik simptomlar şeklinde simptom değişkenliği de gözlenmiştir (Yakoubi vd. 2008a).

NIb-CP ve P3 sekans bilgileri birleştirildiğinde, Bizerte alanının Cap Bon bölgesinde ZYMV moleküler değişkenliğin yüksek olduğu gösterilmiştir. ZYMV'ye hassas ve dayanıklı kabakgillerde simptomatoloji bakımından 23 izolatta önemli biyolojik değişkenlik gözlenmiştir. Bazı izolatlar kavunda ve Zucchini kabaklarında dayanıklılığın ya da toleranslığın üstesinden gelmişler fakat hıyarda bu değişim gözlemlenmemiştir. Monoklonal antiserumların 13 seti kullanılarak üç serotip belirlenmiştir. 23 izolatı karakterize eden serolojik, biyolojik ve moleküler özellikler dahil yedi parametre multiple component analizi (MCA) için kullanılmıştır. Bu analiz, izolatların simptom yoğunluğunun farklı hassas kabakgil konukçularında benzer olduğunu göstermiştir (Yakoubi vd. 2008b).

İran'ın farklı bölgelerinden (İsfahan, Mazandaran, Karaj, Varamin, Horasan, Kerman, Khuzestan, Hamedan) farklı kabakgillerden elde edilen ZYMV strainleri kısmi olarak karakterize edilmiş ve karşılaştırılmıştır. Simptomatoloji ve konukçularına göre strainler arasında değişkenlikler olduğu belirlenmiştir. Bu strainler birbirlerinden farklı olup, özel konukçularını enfekte etme yeteneğine göre üç gruba ayrılmışlardır. Mazandaran Karaj ve tohumdan elde edilen Hamedan izolatı birinci grupta, Varamin Horasan, Kerman, İsfahan, Saveh, ve Markazi ikinci grupta ve Khuzistan 3. Grupta yer almıştır. Örtü proteinin N uç bölgesi ve NIb bölgesinin RT-PCR ve PCR ürünlerinin iki tane kesim enzimlerinin RFLP analizleri strainlerin ayırımında etkili bir yol olmamıştır (Safaizadeh 2008).

Kabakgil alanlarında önemli zararlara yol açan ZYMV hakkında serolojik ve moleküler olarak çok sayıda çalışma yapılmış olup burada daha çok ZYMV'nin protein bölgeleri

ile yapılmış olan çalışmalara yer verilmiştir. Aşağıda Dünya’da ZYMV protein bölgeleri ile yapılan bazı çalışmalar özetlenmiştir.

2.9.1 P1 protein gen bölgesi üzerine çalışmalar

Afitle taşınan bir ZYMV izolatının (ZYMV; strain FL/AT), orta derecede (MD) ve şiddetli (SV) enfeksiyona sebep olan birer ZYMV izolatları ile Florida ZYMV izolatlarının P1 proteinlerinin 5' uç bölgesinin nükleotit sekansı diğer iki ZYMV izolatı (ZYMV CA ve ZYMV RU) ile karşılaştırılmıştır. ZYMV MD, SV izolatları ve bir tane Kaliforniya (ZYMV CA) izolatının, ZYMV FL/AT izolatı ile %95-98 oranında sekans benzerliğine sahip olduğu bulunmuştur. Buna karşın Reunion adasından bir izolatın (ZYMV RU), ZYMV-FL/AT ile arasında %60 oranında sekans benzerliği tespit edilmiştir. ZYMV-MD izolatının P1 kodlama bölgesinin başlama kodonunu takip eden 18 tane ilave nükleotit bulunduğu belirlenmiştir. Tüm ZYMV izolatlarının P1 proteinlerin daha önceden rapor edilen diğer Ppotyviruslere benzer şekilde C-terminal uç bölgesinde korunmuş amino asitleri içerdiği görülmüştür (Wisler vd. 1995).

Lin vd. (2001), yaptıkları çalışmada, ZYMV Tayvan(ZYMV TW-TN3) izolatının tam nükleotit sekansını beş tane çakışan cDNA klonundan elde etmişler ve bilgisayar analizleri sonucunda büyük ORF’nin 3080 amino asit içerdiğini bulmuşlardır. TW-TN3 gen ürünlerinin Kaliforniya (CA), Reunion adası (RU), ve Singapur (S) izolatları ile karşılaştırılmasında % 59.0-93.2 amino asit benzerliği oranı ile en değişken proteinin P1 proteini olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, TW-TN3 izolatı diğer izolatlarla karşılaştırıldığında, genomun 5’translasyonu yapılmayan bölgesinin (UTR) % 61.6-83.3 ve 3' UTR bölgesinin ise % 90.4-95.7 oranında nükleotit benzerliği bulmuşlardır. Yine aynı çalışmada, TW-TN3 izolatının ve diğer 6 tane ZYMV izolatının P1 protein bölgelerinin filogenetik analizi karşılaştırılmasında 4 büyük genotip ortaya çıkmıştır. TW-TN3 genotip I, US izolatı genotip II, Reunion adası ve Singapur izolatları genotip III ve IV şeklinde ayrılmıştır. Genotip I’in P1 proteinlerinin akrabalık derecesinin genotip II’ye daha yakın olduğu ortaya çıkmış ve bu sonuç ile Tayvan ve ABD izolatlarının aynı atadan gelebileceği ileri sürülmüştür.

Singapur ZYMV (ZYMV-S) izolatının nükleotit sekansı viral cDNA klonlarıyla belirlenmiş ve genom uzunluğu poly A kuyruğu hariç 9603 nükleotit olarak rapor edilmiştir. ZYMV-S P1 proteininin ZYMV izolatları ile orta derecede sekans benzerliğine sahip olduğu fakat bütün Potyvirusler arasında sekans değişkenliğini yüksek olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca P1 proteinin filogenetik analizi viral genomda hayli değişken proteinlerin Potyviruslerin taksonomisinde ve strainlerin ayırımında kullanılabileceği bildirilmiştir (Lee ve Wong 1998).

9.2.2 Yardımcı bileşen proteini (HC-Pro) üzerine yapılan çalışmalar

Üç ZYMV izolatının helper component proteaz genlerinin nükleotit sekansı HC olmayan strainlerle karşılaştırıldığında, üç tane amino asit farklılığı ortaya çıkmıştır. Bu mutasyonların ikisi Potyviruslerin korunmuş bölgesinde yer almaktadır. Üç mutasyonun ikisini içeren ilk değişim, Asparagin (Asp) amino asitinin glisin (Gly) ile yer değiştirmesi (korunmamış bölge) değişimi için ilk kodlama ve Arg'nin Ile (FRNK-korunmuş bölge) dönüşümü için ikinci kodlama şeklindedir. Bu değişim taşınma etkinliğinin azalmasıyla sonuçlanmıştır. İkinci değişim tek bir mutasyonla (PTK: Pro-Thr-Ala) korunmuş motifindeki Thr'nin Ala'ya değişimi) birleştirilmiştir. Bu tek mutasyon hem bitkilerde hem de membranlarda afitle taşınmada HC aktivitesinin kaybolmasıyla sonuçlanmıştır. Lys-Ile-Thr-Cys (KITC) motifindeki lisin (Lys) amino asiti (Tobacco mottling virus, ZYMV Michigan straininde ve PVY'de HC aktivitesinin kaybolmasından sorumlu olan); HC olmayan strainlerde değişmemiştir. Bunun HC-Pro'nin birden fazla bölgesinin afitle taşınmada fonksiyonel olarak ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur (Huet 1994).

Lee ve Wong (1998), ZYMV-S Singapur izolatının nükleotit sekansını belirledikleri çalışmada, HC-Pro gen bölgesini analiz ettiklerinde afitle taşınmadan sorumlu olan korunmuş K-I-T-C motifinin K-L-S-C motifi olarak değiştiğini rapor etmişlerdir ve strainlerin ayırımında kullanılabileceğini önermiştir (Lee ve Wong 1998).

HC-Pro gen bölgesinin merkezi bölgesi baskılama aktivitesinde karıştırılmakta ve viral taşınma ve genom amplifikasyonu için tanımlanmış bölge ile üst üste geldiği bildirilmektedir. Mutasyon çalışmaları ile HC-Pro'nin çok sayıda fonksiyonu iyi karakterize edilmesine rağmen, moleküler mekanizması hakkında çok az şey bilinmektedir (Plisson vd. 2003).

Desbriez vd. (2010) yılında yaptıkları çalışmalar neticesinde, ZYMV'nin orta derecede hastalık yapan ırkında symptom şiddetinden sorumlu olan (HC-Pro)'nin korunmuş motifinde mutasyon içerdiği rapor etmişlerdir. Viral birikim kısmi olarak azaltılmasına rağmen, ZYMV'nin enfekteli bir cDNA klonunda meydana gelen mutasyon simptomların neredeyse tamamen kaybolduğunu bildirmişlerdir. FRNK(X)12CDNQLD sekansının Potyviruslerde korunmuş olan daha büyük bir motifin bir parçası olabileceğini ve simptomatolojide ve inhibisyonu susturmada rol oynayabileceğini önermişlerdir.

HC-Pro bölgesinin N-terminal uç bölgesi (yaklaşık 100 aa) en değişken bölgedir. Bu bölge sistein (C) amino asitince zengindir. 20-60 amino asit pozisyonunda 5 sistein amino asiti bulunmaktadır. Gen bankasında 20 aksesyonda amino asitlerin yarısı değişmektedir. Bu bölgenin afitle taşınmaya yardımda gerekli olduğu fakat virüs replikasyonu ve taşınma için gerekli olmadığı bildirilmiştir. Bu bölgesi eksik olan ZYMV'nin delesyon mutasyonları (A. Gal-On, yayınlanmamış bulgular), TEV (Dolja vd. 1993), *Lettuce mosaic virus* (Urcuqui-Inchima vd. 1999) ve *Onion yellow dwarf virus* (Takaki vd. 2006) bitkiyi sistemik olarak hala enfekte edebildiğini bildirmişlerdir.

HC-Pro merkezi bölgesi (100-300. amino asitler) iyi korunmuştur. Fakat supgroup A'da 18 aksesyonda 25 amino asit değişimi görülmüştür. Bu bölgenin Potyviruslerde genom aktivasyonu, bitkilerde gen susturulmasının baskılanmasında, symptom gelişmesinde ve RNA'ya bağlanmada, sinerjistik etkileşim gibi çok farklı aktivitelerde sorumlu olduğu gösterilmiştir. Korunmuş olan FRNK motifi (Phe-Arg-Asn-Lys) tüm ZYMV strainlerinde ve tüm Potyviruslerde bulunur. FRNK motifi RNA'ya bağlanma bölgesine

karşılık gelen α heliksce zengin bölgede bulunmaktadır. ZYMV'nin doğal yabani formlarında ise bazı mutasyonlar bulunmuştur.

2.9.3 P3 protein gen bölgesi üzerine çalışmalar

ZYMV, dünya çapında kabakgillerde çok zararlı bir virüstür. Dayanıklı *Cucurbita moschata* ile yapılan türler arası melezlemeler dayanıklı Zucchini kabağı F1 hibridinin (*C. pepo*)'nın ortaya çıkmasını sağlamıştır. Ancak *Cucurbita moschata* tamamen dayanıklı olmasına rağmen ticari *C. pepo* hibridleri sadece tolerant olarak kalmıştır. Tolerant hibridlerde virülensliğin artmasına karşı tarlada ZYMV evrimi gözlenmiş ve deneysel olarak elde edilmiştir. Sekans karşılaştırmaları ve rekombinasyon denemeleri ZYMV'nin P3 proteininde bir nokta mutasyonun toleranslığı kırmak için yeterli olacağını göstermiştir. Yarı- izogenik yabani tip ile monoklonal olarak ayrılan ZYMV saldırgan varyantları arasında rekabet deneyleri yapılmıştır. Tolerant Zucchini kabağının karışık enfeksiyonlarında virulent mutantlar yabani tip strainlere göre daha fazla uyumluluk göstermiş fakat hassas kabak ya da kavunda karışık enfeksiyonlarda ciddi bir uyum kaybı gözlenmiştir. Bu bitki virüsleri için toleranslığın kırılmasıyla ilgili ilk nicel çalışmayı temsil etmektedir. Bu yüzden toleranslık kolaylıkla kırılmasına rağmen virulent varyantlar bazı koşullarda devamlılık sağlayabilmektedir (Desbiez vd. 2003)

Dünyada kabakgil yetiştirilen alanlarda yoğun olarak zarara neden olan ZYMV izolatının populasyon yapısını daha iyi anlamak için Tunus'da bir çalışma yürütülmüş ve kabakgil yetiştirilen üç büyük alandan toplanan 83 izolatın polimeraz ve örtü proteini gen bölgelerinin kısmi sekans analiz çalışmalarında ZYMV'nin grup A içinde iki farklı küme oluşturduğu gösterilmiştir. ZYMV'ye toleranslı kabak çeşitlerinde toleranslığı kırmadan sorumlu olan P3 proteinin MREK motifinde önemli bir değişkenlik gözlemlenmemiş ve küme 1 ve küme 2'de daha yaygın olan MREK ve MKEK sekanslarının kısmi N1b-CP sekansı ile belirlenen iki kümede MREK motifinin dağılımında önemli farklılıklar bulunmuştur (Yakoubi vd. 2008b).

2.9.4 CI protein üzerine çalışmalar

Lee vd. (1997) 14 tane ZYMV Singapur izolatının CI protein gen bölgelerinin karşılaştırmasını yapmışlar ve RNA helikaz komplekslerinin membran bağlanma komponenti olarak görülen nükleotit bağlanma (GAVGSGKST) motifinin sekansına ilave olarak beş tane daha korunmuş bölge bulmuşlardır. Ayrıca CI ve CP gen bölgelerinin sekanları ile yaptıkları filogenetik ağaç sonucunda benzer dallanmalar bulunmuş olup Potyvirusler arasındaki filogenetik ilişkinin CI gen bölgesi kullanılarak belirlenebileceğini göstermişlerdir. Araştırmacılar Potyviruslerin evrim çalışmalarında CI gen bölgesinin alternatif yaklaşım olarak kullanılabileceğini önermişlerdir.

Avusturya, Almanya, İtalya ve Slovenya ZYMV izolatlarının (CP) ve (CI) proteinlerinin sekansları rapor edilmiştir. Dünya çapında farklı coğrafik bölgelerden alınan 30 ZYMV izolatının DNA sekansının karşılaştırılması sonucunda Avusturya izolatlarının Slovenya ve Macaristan izolatları ile yüksek düzeyde benzerlik gösterdiği görülmüştür. Almanya ve İtalya izolatlarının uzaktan akraba olduğu ortaya çıkmış ve dünyanın diğer bölgelerinde ki izolatlarla küme oluşturmuştur. Çalışmanın sonuçlarına göre, spesifik bir izolatın coğrafik olarak komşu alanlara hızla yayılabileceğini fakat diğer komşu ülkelerdeki bulunan izolatlarla akraba olmayabileceğini göstermiştir (Pfosser ve Baumann 2002).

2.9.5 Nüklear inclusion body (NIB) ve örtü proteini (CP) üzerine çalışmalar

İki tane Japon ZYMV (ZYMV-169 ve ZYMV-M) izolatının örtü proteininin (CP) nükleotit sekansı belirlenmiş ve her iki izolatın CP genlerinin 837 nt uzunluğunda olduğu ve 279 amino asit (aa) kodladığı rapor edilmiştir. Bu iki izolat arasındaki nükleotit sekansı ve amino asit sekans benzerliği %92-94.6 olarak bulunmuştur. Japon izolatlarının daha önceden rapor edilen ZYMV izolatlarının sekansları ile filogenetik analizleri karşılaştırıldığında, ZYMV izolatları üç gruba ayrılmıştır. Bunun sonucunda ZYMV-169 izolatı kendi grubunu oluşturmuştur (Kundu vd. 1997).

Tayvanın farklı alanlarından toplanan ZYMV izolatlarının konukçu reaksiyonları SDS immonudifüzyon testi ve RT-PCR ürünlerinin kesim enzimleri sonucunda, 33 ZYMV izolatının Zucchini kabaklarında yol açtığı belirtiler 3 tipe bölünmüştür. Birinci grup yaprak kıvrılması ve daralma ile sarı mozaik belirtileri, ikinci grup yaprak kıvrılması ile sarı mozaik ve üçüncü grup damar bantlaşması ile sarı mozaik belirtilerinden oluşur. Bu izolatlar, su kabağı ve hıyarda yapraklarda nekroza neden olan CY2 izolatı dışında, kavun, su kabağı ve hıyarda sarı mozaik belirtileri oluşturmaktadır. SDS immunodifüzyon testlerinde TN3 izolatına karşı hazırlanan serum 33 izolatın hepsi ile reaksiyona girmiştir. ZYMV'nin NIb ve CP gen bölgelerine spesifik primerler kullanılarak yapılan RT-PCR sonucunda 0.76 kb DNA fragmenti elde edilmiştir. Beş tane ZYMV izolatının CP bölgelerini değişkenliğinin analiz etmek için RT-PCR ürünlerinin *EcoRV*, *TaqI* ve *NotI* enzimleri ile kesim sonuçlarında TC1, CY2 ve TNML1'in çok yakın akraba olduğunu ve TN3 ile NT'in daha değişken olduğunu göstermiştir (Lin vd. 1998).

Sidek vd. (1999), ZYMV'nin iki Malezya izolatını izole etmişler ve bunların konukçu bitkiler üzerinde çok az farklılıklar gösterdiğini, CP geni nükleotit ve amino asit dizilimlerini mukayese ettiklerinde ise, CP'in 9. ve 32. amino asitlerinde fark olduğunu saptamışlardır.

Prieto vd. (2001), ZYMV'nün Şili izolatının 740 nm iplikli partiküllere sahip olduğunu, kılıf proteininin yaklaşık 36 kDa ağırlığında olduğunu ve kılıf proteininin 3' geninin Connecticut ve Kaliforniya ırkları ile yüksek oranda benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

ZYMV Macaristan'da son birkaç yılda kabakgillerde zararlı en önemli patojen olarak ortaya çıkmıştır. Macaristan izolatı yüksek oranda biyolojik çeşitlilik göstermekte, örtü proteinin N-terminal uç bölgesinde spesifik nükleotit ve aminoasit dizilimine sahiptir ve filogenetik ağacının farklı bir bölümünü oluşturmaktadır. Virüs tarla koşullarında oldukça yaygın bir şekilde birçok yaprak biti türü ile non-persistent yolla taşınmaktadır.

Cucurbita pepo (L) var *styriaca* kabak çeşidinde çok düşük bir miktarda da olsa ZYMV tohumla taşınmaktadır. Tohum taşınımında testlenerek analiz edilen 3 izolat seçilmiş ve onların örtü -proteinlerindeki nükleotit dizilimi ZYMV'nün kullanılır CP nükleotit dizilimi ile karşılaştırılmıştır. Bu nükleotit dizilim analizlerine göre Macaristan izolatı filogenetik ağacın Orta Avrupa grubunda yer almıştır. ZYMV'nün Avusturya ve Slovenya izolatı ile birlikte sadece Macaristan izolatına karakteristik olan 16, 17, 27 ve 37 konumundaki spesifik aminoasitleri benzer olduğu bildirilmiştir (Tobias ve Palcovics 2003).

ZYMV'nin Slovak izolatının (ZYMV-Kuchyna) tüm genomunun nükleotit sekans verileri elde edilmiştir. Viral genomun 9593 nt, (PolyA kuyruğu hariç) içerdiği ve 3080 amino asit kalıntısından oluşan bir protein kodladığı belirlenmiştir. ZYMV-Kuchyna izolatında potyviral proteinlerin temel viral özelliklerinin tüm karakteristik motifleri ve vektörle taşınma özelliği korunmuştur. ZYMV-Kuchyna'nın tüm genom sekansı, diğer 12 ZYMV izolatı ile nükleotit ve amino asit seviyesinde karşılaştırıldığında sırasıyla %90.4–98.8 ve %78–98.8 seviyesinde benzerlik bulunmuştur. Coğrafik olarak 50'den farklı bölgeden toplanan ZYMV izolatlarının örtü proteinlerinin filogenetik analizi karşılaştırıldığında, Orta Avrupa izolatlarının yakından akraba olduğu ve filogenetik olarak homojen bir grup oluşturduğu belirlenmiştir (Glasa ve Pittnerova 2006).

ZYMV izolatlarının çeşitliliği, 2001 ve 2006 yılları arasında Slovakya ve Çek Cumhuriyeti'nin çeşitli alanlarından toplanan hıyar, kabak ve Zucchini kabaklarından alınan 11 izolat ile yapılan biyolojik ve moleküler çalışmalarla analiz edilmiştir. ZYMV genomunun hedeflenen 3 ayrı genomik bölgesinin moleküler çeşitliliğinin analizi, izolatlar arasında düşük seviyede nükleotit değişkenliği göstermiştir. Slovak, Çek Cumhuriyeti ve Orta Avrupa izolatlarının CP gen bölgelerinin yakın akraba olduğu bildirilmiştir. Orta Avrupa izolatları içinde görülen düşük seviyedeki genetik çeşitlilik diğer coğrafik bölgelerdeki izolatlarda gözlenenden farklı olduğu rapor edilmiştir. Araştırmacılar ZYMV genomunda rekombinasyona rastlanmadığını bildirmişlerdir. Hastalık yapma yeteneği yüksek olan izolatların, düşük hastalık yapma yeteneğine sahip olanlarla karşılaştırıldığında, P3 proteinin N-terminal uç kısmında bir amino asit

farklılığının potansiyel olarak toleranslılığın kırılmasında rol oynadığını ileri sürmüşlerdir (Glasa vd. 2007)

Hatmi çiçeğinden izole edilen ZYMV-A strainin tüm genom sekansı primer setleri kullanılarak RT-PCR ile çoğaltıldıktan sonra sekans analizi yapılmış ve virüs genomunun 9593 nükleotit içerdiği belirlenmiştir. ZYMV-A polyproteini 3080 amino asitten oluşmakta ve 351 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. ZYMV-A'nın tüm proteolitik açılma alanlarını diğer ZYMV strainleri arasında korunmuş olan açılma alanlarını gösteren ZYMV izolatları ile karşılaştırılmıştır. ZYMV-A izolatının afitle taşınmayı sağlayan CP bölgesindeki DAG motifinin ve HC-pro'nin KITC ve PTK motiflerini içermektedir. Ayrıca ZYMV strainleri arasında yapılan tüm genoma veya CP ORF'lerine göre yapılan filogenetik ağaç analizleri ZYMV strainlerinin farklı gruplar oluşturduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar ile, ZYMV-A'nın moleküler seviyede diğer ZYMV strainlerinden farklı bir strain olduğu gösterilmiştir (Choi vd. 2007).

Ha vd. (2008) 61 tüm nükleotit sekansına göre, ZYMV izolatları arasında üç 3 ana grup olduğunu öne sürmüştür. Buna göre; Grup I dünyada en yaygın grup, Grup II Reunion, Singapur ve Vietnam ve Grup III Vietnam ve Çin izolatları olarak gruplandırmıştır.

ZYMV İran'da ilk kez 1988 yılında rapor edilmiş fakat izolatlar karakterize edilmemiştir. İran ZYMV izolatları arasındaki genetik ve biyolojik çeşitliliği ortaya koymak amacıyla 2003-2006 yılları arasında kabakgil yetiştirilen alanlardan 12 izolat elde edilmiştir. Bu izolatların konukçu aralığını gösteren deneysel bir çalışma sonucunda biyolojik özelliklerinde bazı değişiklikler gözlenmiştir. CP bölgesinin N-terminal uç bölgesi ve Nlb proteininin C-terminal uç bölgesinin genomik kısmını kapsayan nükleotit sekansı çıkartılmış ve daha önceden rapor edilen sekanslarla karşılaştırılmıştır. İran ZYMV izolatları arasında amino asit seviyelerinde ki benzerlik ise % 95.6-100 seviyelerinde belirlenmiştir. İran ZYMV izolatları filogenetik ağaçta kompakt bir küme oluşturmamış ve bu sonuç bu izolatların ayrı ayrı evrimleşen birbirinden bağımsız bazı izolatlardan oluştuğunu göstermiştir (Bananej vd. 2008).

Simmon vd. (2008, 55 izolatin CP bölgesinin tüm nükleotit sekansını karşılaştırdıklarında grup I ve grup II'yi birleştirmeyi önemişlerdir. Fakat bu araştırmacılar İran ve Vietnam'dan olan 2 yeni sekansı kullanmamışlardır.

Avustralya'nın 4 eyaletinden kabakgil yetiştiriciliği yapılan 5 yerden toplanan enfekteli yaprak örnekleri ZYMV'nin varlığı için test edilmiştir. Elde edilen yeni 42 adet ZYMV izolatinin CP geninin nükleotit sekansı, 5 kıtadan gelen 101 izolatin CP geni nükleotit sekansı ile karşılaştırıldığında, 143 ZYMV izolatinin sekansının filogenetik analizi ile 3 farklı grup (A, B ve C) olduğu ve A grubunun 4 alt grup (I-IV), B grubunun iki alt grup (I-II) olduğu ortaya çıkmıştır. Yeni Avustralya sekansları toplanma konumuna göre A-I, A-II ve B-II grupları içinde yer almışlardır. Tropik I içinde yer almıştır. Merkez batı kıyı ve iki doğu kıyı bölgelerinden gelen 23 yeni Kuzey Batı Avustralya'nın izole bir bölgesinden elde edilen 16 yeni izolatin CP gen sekansının hepsi B-II (başka izolat içermeyen) alt grubunda toplandığı görülmüştür. Aksine kuzey bölgeden gelen 3 sekans ABD, İran ve Çin izolatları ile %94.6-99.0 nt benzerliği ile A-I sekans Avrupa ve Japonya'dan gelen sekanslarla %95.9-98.9 oranında nükleotit benzerliği ile A-I içinde yer almıştır. Bu bulgular ile, Avustralya'da en az 3 ayrı ZYMV izolatinin olduğu ve yerel izolatların CP sekanslarında birkaç değişikliğin olduğunu göstermiştir. A-I ve B-II gruplarındaki izolatların *Chenopodium quinoa* yapraklarında klorotik simptomlar oluşturduğu, fakat A-II içinden bir izolatin ise simptomsuz enfeksiyon oluşturduğu bildirilmiştir. ZYMV'ye spesifik üç ticari antibadiden biri Avustralya izolatlarını ELİSA ile güvenli olarak belirleyemediği gözlenmiştir. A-I, A-II ve B-II filogenetik gruplardaki Avustralya izolatlarını ayıran, çift etiketli probler kullanılarak multipleks realtime PCR geliştirilmiştir (Coutts vd. 2011).

Bananej vd. (2008), iki ana grup (A ve B) olduğunu önermişlerdir. Buna göre Dünya'da en yaygın olan Grup A üç alt gruptan oluşurken, grup B Çin, Reunion adası, Singapur ve Wietnam izolatlarını içermektedir. Bu filogenetik analiz sonuçlarına göre iki ya da üç büyük grup ortaya çıkmaktadır (Coutts vd. 2011)

ZYMV izolatları arasındaki biyolojik özelliklerdeki farklılıklar CP, HC-Pro ve P3 genlerindeki nükleotit sekanslarındaki değişimleri göstermektedir (Glasa vd. 2007, Galon vd. 2011). Serolojik farklılıklar 15 farklı serotip gösteren farklı coğrafik bölgelerden toplanan ZYMV izolatlarına karşı üretilen monoklonal antibodyler kullanılarak bulunmuştur (Desbiez vd. 2007). İlk olarak Desbiez vd. (2002), CP gen bölgesini içeren 47 tane kısmi nükleotit sekansı ile yapılan çalışmalarda izolatların iki gruba ayrıldığını göstermiştir. Bu sonuçlara göre A grubu Avrupa, Kuzey Amerika ve Doğu Asya'dan toplanan izolatların bulunduğu üç alt gruptan oluşurken, grup B Reunion adasından bir izolatla sınırlı kalmıştır. Sonraki çalışmalarda ise Zhao vd. (2003) karşılaştırdıkları 39 ZYMV CP sekansına göre 3 grup belirlemişlerdir. Grup I dünyanın her yerinde yaygın izolatlardan oluşurken, grup II sadece Asya'dan örnekleri içermektedir. Grup III'te de sadece Çin yer almıştır (Coutts vd. 2011)

Polonyanın kabak ve hıyar yetiştiriciliği yapılan farklı bölgelerindeki ZYMV izolatlarının çeşitliliği biyolojik testler ve moleküler biyoloji teknikleriyle analiz edilmiştir. İzolatlar konukçu aralığında ve bitkilerde oluşturdıkları belirtiler bakımından farklılık göstermiştir. Ayrıca CP geninin genetik çeşitliliğinin analizi izolatlar arasında yüksek oranda nükleotit değişkenliği göstermiştir. Farklı coğrafik bölgeden 70 izolatın CP gen sekanslarının karşılaştırması sonucunda Polonya izolatları farklı gruplara ayrılmış ve Avrupa izolatlarıyla tek bir küme oluşturmamıştır. Orta Avrupa izolatları arasında düşük oranda varyasyon önceden gözlenmiştir. Pozitif ve negatif polimorfik alanların oranı dominant negatif seleksiyon olduğunu ancak kodonların pozitif seçim geçirebileceklerini göstermiştir. Ayrıca analiz edilen ZYMV izolatlarının CP geninin analizlenen sekanslarında rekombinasyon olayına kanıt sağlamıştır (Hasiów-Jaroszewska vd. 2013).

Hassas kabakgillerde hafif ve şiddetli semptom gösteren ve farklı patojeniteye sahip, tam genom sekansı çıkarılan iki Slovak izolatının (ZYMV-H ve ZYMV-SE04T) sekansları karşılaştırıldığında, iki izolatında 9593 nükleotit ve 3080 amino asit içerdiğini bildirmişlerdir. Bu iki izolat farklı biyolojik özelliklere sahip olmasına rağmen yüksek oranda (%99.8) nükleotit benzerliği göstermişlerdir. İki izolatın sekansları arasında HC-Pro, P3 ve NIb gen bölgesinde yer alan sadece 5 amino asitin farklı olduğunu rapor

etmişlerdir. Kabakgillerde farklı simptom oluşturduğu bilinen, tüm sekansı çıkarılmış ve filogenetik olarak yakın akraba olan ilave beş tane daha sekans siliko analizinde kullanıldığında, P3 proteinin N-terminal ucundaki tek bir mutasyonun patojenisiteden sorumlu olduğunu ileri sürmüştür (Nováková vd. 2014).

2.10 Türkiye’de ZYMV ile Yapılan Çalışmalar

Ülkemizde ZYMV ilk olarak Yılmaz ve Davis (1984) tarafından rapor edilmiştir. Araştırmacılar biyolojik, serolojik testler ve elektron mikroskop çalışmaları ile yaptıkları virüs teşhis çalışmaları sonucunda Akdeniz bölgesinde karpuzlarda ZYMV ve CMV, kabaklarda ise ZYMV tespit etmişlerdir.

1991 yılında Akdeniz Bölgesinde Adana ve İçel, Ege Bölgesinden İzmir, Manisa ve Afyon, İç Anadolu Bölgesinden Konya illerinden; hıyar, karpuz, kavun, su kabağı, yazlık kabak, kışlık kabak, acur, lif kabağından olmak üzere toplam 76 örnek toplanmıştır. Kabakgil virüslerinin varlığını test etmek için toplanan örneklerle uygulanan DAS-ELISA testi sonucunda; örneklerde ZYMV, WMV, CMV, CABYV ve PRSV-W virüslerinin varlığı tespit edilirken SqMV, ZYFV, WMV-M ve WMV-A virüslerinin varlığı saptanmamıştır. Söz konusu çalışmada örnek toplanan bölgelerde en yaygın virüs ZYMV olarak belirlenirken, CABYV bu çalışma ile ülkemizde ilk kez rapor edilmiştir (Yılmaz vd. 1992).

Ankara ilinde kabak bitkilerinde yapraklarda sistemik mozaik, meyvelerde kabarcıklar ve deformasyon belirtileri gözlenlemiştir. Konukçu dizisinin tespiti, serolojik testler, özsu içindeki virüsün fiziksel özelliklerinin tespiti ve elektron mikroskop çalışmaları sonucu etmen ZYMV olarak saptanmıştır (Ertunç 1992).

Yılmaz vd. (1994), Çukurova bölgesi koşullarında ZYMV’nün şiddetli ırkının ZYMV’nün zayıf ırkı ZYMV-WK ile kontrolünü amaçlamışlardır. Bitkilere ZYMV’nün şiddetli ırkı, zayıf ırk ZYMV-WK, ZYMV ve ZYMV-WK birlikte ve

kontrol olmak üzere 4 uygulama yapılmıştır. Uygulamalar sonunda toplam verimde istatistiki olarak uygulamalar arasında fark bulunmamıştır. Ancak meyve sayısı ve meyvenin ticari değeri yönünden farklar saptanmıştır. Kabak bitkilerinde ticari değeri olan meyve çapraz koruma yapılan parsellerde %69–80, korumasız parsellerde % 32; hıyar bitkilerinde çapraz koruma yapılan parsellerde %83–87, korumasız parsellerde % 33–40 olarak bulunmuştur.

Kabakgillerde etkili olan çok sayıda virüs hastalığı bulunmakla birlikte, Türkiye’de bunlardan en yaygın olarak bulunanlarının kavunda ZYMV ve CMV (Yılmaz ve Davis 1984, Yılmaz vd. 1992) olduğu tespit edilmiştir.

Vargün ve Ertunç (1995), sakız kabağı (*Cucurbita pepo* L.) bitkisinde viral enfeksiyona neden olan CMV ve ZYMV’nün birlikte ve ayrı ayrı enfeksiyonlarının bitki gelişim komponentlerine (bitki boyu, çiçek ve yaprak sayısı, genç, orta ve yaşlı yaprak alanı) etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, bitki boyunda en fazla düşüşe ZYMV+CMV uygulaması, çiçek sayısında en fazla düşüşe CMV, yaprak sayısında en fazla düşüşe CMV ve ZYMV karışımının neden olduğu saptanmıştır. Yaprak alanlarına enfeksiyonların etkisi incelendiğinde ise yaşlı yaprak alanında en fazla azalmaya CMV+ZYMV karışımı uygulaması, orta yaşlı yaprak alanında azalmaya CMV, ZYMV ve CMV+ZYMV karışımı uygulamalarının ve genç yaprak alanı üzerine ve kontrol hariç tüm uygulamaların etkili olduğu rapor edilmiştir.

Çıtır vd. (1998), 1995 yılında Amasya, Çorum, Samsun ve Tokat illerinde balkabağı, sakız kabağı, karpuz ve kavun bitkilerinde verim ve kaliteyi düşüren bazı önemli virüs hastalıkları belirlemişlerdir. Tarla ve sera koşullarında söz konusu kültür bitkilerindeki simptomlara ve enfekteli bitki yapraklarının öz sularının indikatör test bitkilerine mekanik inokulasyonları sonucu bu bitkilerde sergiledikleri belirtilere göre üç ayrı virüs saptanmıştır. Bunlar bal kabağında ve karpuzda CMV, sakız kabağı ve kavunda ZYMV’dür.

Uçar ve Ertunç (1998), Antalya ilinde örtü altı kabak yetiştiriciliğinde başlıca problem olan ZYMV'nün taşınması ve yayılmasında etkili olan yabancı ot ve vektör türlerini belirlemek ve etmenin tohumla taşınma durumunu ortaya koymak amacıyla yaptıkları çalışma sonucunda ZYMV'nün varlığı *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* yaprak biti türleriyle, *Chenopodium sp.*, *Trifolium sp.*, *Amaranthus sp.*, *Medicago sp.*, *Vicia sp.*, *Ranunculus sp.*, *Veronica sp.*, *Onobrichus sp.*, *Erysimum sp.*, *Euphorbia sp.*, *Anthemis sp.*, *Cynorus sp.* yabancı ot cinslerinde rapor edilmiştir. Ayrıca çiftçi tarafından kullanılan tohumların da etmen ile bulaşık olduğu saptanmıştır.

Yardımcı vd. (2000), Isparta ilinde kabakgil familyası bitkilerinde hastalığa neden olan viral etmenleri belirlemek amacıyla yaptıkları simptomatolojik ve serolojik testler sonunda enfeksiyona ZYMV, CABYV ve WMV virüslerinin sebep olduğunu rapor etmişlerdir.

Yılmaz ve Sherwood (2000), kabakgillerde hastalık yapan CMV, PRSV-W, SqMV, ZYMV, WMV virüslerinin belirlenmesinde en uygun metodu belirlemek için yaptıkları çalışmada, Protein-A ELISA(PAS-ELISA), antijen kaplı ELISA tabağı ve ticari indirekt ELISA kitlerinin elverişliliğini karşılaştırmışlar ve çalışma sonucunda; indirekt ELISA kitlerinin CMV, PRSV-W, WMV ve ZYMV virüslerinin tespitinde en uygun yöntem olduğunu rapor ederken, SqMV'un belirlenmesinde PAS-ELISA yöntemini uygun bulmuşlardır.

Erzurum ve Artvin illerinde kabakgil bitkilerinde sorun olan viral etmenleri belirlemek için yapılan survey çalışması sonunda, araştırmacılar topladıkları örneklerle serolojik ve biyolojik test uygulamışlardır. Testler sonucunda tüm örneklerde ZYMV'nin varlığını tespit etmişlerdir (Bostan vd. 2002).

Şevik ve Sökmen (2003), 1999-2000 yıllarında Samsun ilinde Temmuz-Ekim ayları arasında 18 köyde, 45 tarlada kabakgil virüslerini ortaya koymak ve oranlarını saptamak amacıyla yaptıkları survey çalışması sonucunda topladıkları 165 adet örneği ELISA ile testlemiştir. ELİSA testi sonucunda %38,8 oranında ZYMV, %20,6 oranında CMV ve

%53,9 oranında WMV'nün varlığını saptamışlardır. ZYMV ve WMV'ne karşı testledikleri tüm kabakgil türlerinde rastlarken, CMV karpuz ve bal kabağında saptanmamıştır.

Yardımcı ve Korkmaz (2004)'ın Isparta'da yaptıkları çalışmada ZYMV hastalığının belirtilerini gösteren yaprak ve meyvelerden örnek alıp klasik inokulasyon metoduyla mekanik inokulasyon yaparak kabak bitkilerinde virüsü çoğaltmıştır. Double-strand RNA (dsRNA), CF-11 selüloz kromatografi ile saflaştırılmış ve agaroz jelde dsRNA'nın varlığına bakılmıştır. Isparta'da kabakgil yetiştirilen alanlardaki hastalıklı bitkiler sayılarak ZYMV'nin hastalık oranı %62,70 olarak bulunmuştur.

Hatay ilinin farklı yörelerinden 2003 yılında yazlık kabak (*C. pepo*), kışlık kabaklar (*C. maxima* ve *C. mochata*), kavun (*C. melo*) ve hıyar (*C. sativus*) bitkilerinden belirtiler gösteren yaprak ve meyve örnekleri toplanmıştır. Tarla koşullarında doğal enfekteli bitkilerde şiddetli mozaik lekeler, sararma, uç sürgünlerdeki yapraklarda ayakkabı bağı görünümü, bodurlaşma ve meyvelerde şekil bozukluğu gibi belirtiler gözlenmiştir. Belirli bitkiler ELISA ile testlenmiştir. Şiddetli belirtiler gösteren meyvelerden çıkarılan tohumlar çimlendirilerek her bir çeşitten 100'er fide ELISA ile testlenmiş, 200'er bitkide belirtiler gözlemleri yapılmıştır. Tohumlardan %86-94 oranında bitki elde edilmiştir. Özellikle *C. pepo* ve *C. maxima* fidelerinde %2-3 oranında genel kloroz, bodurlaşma ve yaprak deformasyonu gözlenmiş, ELISA sonucunda tohumlarından elde edilen fidelerin hiç birinde ZYMV belirlenmemiştir. Şiddetli belirtiler sergileyen *C. sativus* örneklerinin hiçbirinde ZYMV belirlenmemiştir. Şiddetli belirtiler gösteren *C. pepo* yapraklarından elde edilen özsu ile biyolojik testleme çalışmaları yapılmıştır. Mekanik inokulasyondan iki hafta sonra değişik test bitkilerinde ZYMV'ye özgü belirtiler gözlenmiştir. ELISA sonucu ZYMV ile enfekteli olduğu belirlenen *C. pepo* bitkileri üzerinde 7 gün süre ile beslenen *Myzus persicae* bireyleri 10'arlı gruplar halinde sağlıklı *C. pepo* fideleri üzerine aktararak 3 gün süre ile tutulmuştur. Afitle taşıma çalışmalarında kullanılan test bitkilerinde üç hafta içerisinde yapraklarda klorotik ve mozaik lekelenmeler, şekil bozukluğu, bodurlaşma ve fide ölümleri gibi belirtiler ortaya çıkmıştır (Sertkaya vd. 2004).

2004 yılı Temmuz-Ağustos ayları arasında Gaziantep ili ve ilçelerinde kabakgil tarımının yapıldığı bazı bölgelerden toplanan örnekler laboratuara getirilerek DAS-ELISA yöntemiyle CMV, CABYV, ZYMV, *Tomato Mosaic Virus* (ToMV), *Potato Virus X* (PVX), *Potato Virus X* (PVY), *Pepper Mild Mottle Virus* (PMMV)'ye karşı testlenmiştir. Yapılan testler sonucunda 56 örnekten 10 tanesinin bir veya daha fazla virüsle bulaşık olduğu ortaya konulmuştur. Bununla birlikte mevcut örneklerden 20 tanesinin CMV, 24'ünün ise ZYMV ve 3 örneğin ise PVY ile bulaşık olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Dağ 2005).

Kabak sarı mozayik virüsünün zayıf ırkı (ZYMV-WK) hıyar bitkisi üzerinde şiddetli ırkının zararına karşı çapraz koruma yöntemi ile sera şartlarında denendiği çalışmada, çapraz koruma yönteminin toplam verim, pazarlanabilir verim ve virüs hastalıkları belirtileri üzerine etkileri araştırılmıştır. Çapraz korumanın uygulandığı parsellerde semptom şiddeti 0-5 arasında yoğunlaşırken uygulamanın yapılmadığı parsellerde 4-9 arasında yoğunlaşmıştır. Çapraz koruma pazarlanabilir üründe 5 kat bir ürün artışına sebep olurken ZYMV-WK herhangi bir ürün azalmasına neden olmamıştır (Değirmenci ve Güldür 2006)

Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ'da 2005 yılında Haziran-Temmuz aylarında 19 karpuz ve 17 kavun tarlasında, (CMV), (PRSV-W), (SqMV), (MNSV), (CGMMV), (ZYMV) ve (WMV-2)'nin varlığını belirlemek için yapılan çalışmada, DAS-ELISA testleri sonunda, karpuzlarda ZYMV (%45,5), WMV (%34,2), CMV (%19,9), PRSV-W (%2,1), SqMV (%1,8) ve MNSV (%0,4) oranlarında ve kavunlarda (%40,3), WMV (%31,2), CMV (%7,2), PRSV-W (%2,3), SqMV (%0,5) ve MNSV (%1,8) tespit etmişlerdir. Ayrıca WMV+ZYMV karışık enfeksiyon hem karpuzda hem de kavunlarda en yaygın karışık enfeksiyon olarak bulunmuş ve bu oranın karpuzlarda %16,7 iken kavunda %11,4 olduğunu bildirmişlerdir (Köklü ve Yılmaz 2006).

Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde yetiştirilen kabakgillerde zararlı ZYMV ve CMV'nün biyolojik, serolojik ve moleküler tanısının yapılması amacıyla bir çalışma yürütülmüştür. 2006- 2007 yılları arasında yürütülen çalışmada araziden toplanan virüs

belirtisi gösteren bitkiler, öncelikle ELISA yöntemi ile testlenmiş ve hastalık oranı CMV için %8,07 ve ZYMV için %34,5 olarak saptanmıştır. Ayrıca her iki virüsün karışık hastalık oranını da %7,4 olarak bulunmuştur. CMV ve ZYMV ile enfekteli indikatör bitkilerinden total RNA ekstraksiyonu yapmışlar ve bunlardan RT-PCR sonunda CMV ve ZYMV için sırasıyla 250 ve 650 baz çifti büyüklüğünde bant elde etmişlerdir (Karamanlı 2007).

Ülkemizde taze tüketim ve tohumluk üretimi için öneme sahip olan bazı sebze türlerinin tohumlarındaki viral hastalık etmenlerinin bulunma durumlarını belirlemek, enfekteli olan tohumlardaki virüsleri elimine etmek ve bu etmenler için bir savaşım programı geliştirmek amaçlanmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmada toplam 325 adet tohum örneği alınmış ve bu örneklerdeki viral etmenlerin tanımlanmasında biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılmıştır. Domates çeşitlerine ait 102 tohum örneğinin %18'inin TMV, %16'sının ToMV ve %14'ünün CMV ile enfekteli olduğu görülmüştür. Değişik virüslere karşı testlenen biber çeşitlerine ait 32 tohum örneğinin 12'sinde CMV, 8'inde TMV ve 5'inde ToMV enfeksiyonu olduğu saptanmıştır. 30 karpuz örneğinin %17'sinde CMV, 32 kavun örneğinin %38'inde CMV ve %6'sında SqMV, 30 hıyar örneğinin %13'ünde CMV, 15 kabak örneğinin %27'sinde CMV ve %20'sinde ZYMV adlı etmenlerin bulunduğu görülmüştür. Yapılan testler sonucunda; 12 fasulye tohum örneğinin 3'ünde SMV, 2'sinde CMV, 10 börülce tohum örneğinin 1'inde CMV ve 10 marul tohumu örneğinin 2'sinin de LMV ile enfekteli olduğu belirlenirken, bakla, ıspanak ve patlıcan tohumlarına ait tohum örneklerinde herhangi bir viral etmenin bulunmadığı saptanmıştır (Paylan 2011).

2003 ve 2004 yıllarında İzmir, Aydın, Manisa ve Balıkesir illerinin kabakgil üretim alanlarındaki virüsleri belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, kabakgil bitkilerinden toplanan örnekler önce DAS-ELISA testine tabi tutulmuş ve daha sonra enfekteli olanlar test bitkilerine mekanik olarak inokule edilmiştir. Bu illerde tarla bazında virüslerin yaygınlık oranlarının %4,98 ile %15,60 arasında değiştiği rapor edilmiştir. DAS-ELISA testleri sonucunda ise, örneklerin %42 oranında WMV, CMV, PRSW ve ZYMV ile enfekteli olduğu ortaya konmuştur. Kabakgil örneklerinde en yaygın virüsün % 21,5 oranı ile WMV olduğu ve bu virüsün kavun, sakız kabağı ve bal kabağında

mevcut olduğu tespit edilmiştir. CMV'nin en yüksek oranda hıyar (%29,7), daha düşük oranlarda da ise sakız kabağı (%5,2) ve kavun (%3,4) bitkilerinde enfeksiyon oluşturduğu saptanmıştır. WMV-1 sadece karpuz (% 24,0), ZYMV ise kavun (%2,8) ve bal kabağı (%4,4) örneklerinde belirlenmiştir. Kavun, bal kabağı ve sakız kabağı bitkilerinde karışık enfeksiyonların bulunduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar örneklerde SqMV ve CGMMV enfeksiyonlarına rastlamamışlardır (Kaya ve Erkan 2011).

Özer vd (2012) Kabak ve kavundan izole ettikleri iki tane şiddetli ZYMV Türkiye izolatlarının (ZYMV-Adana (Ad) ve ZYMV-Ahlat (Ah) genomik RNA'ları üzerinde yer alan CP genlerinin tamamını klonlamışlar ve nükleotit dizileri ile amino asit sekanslarını belirlemişlerdir. Çalışma sonunda her iki Türk ZYMV izolatının CP geninin 837 nükleotitten oluştuğu ve 31.2 kDa büyüklüğünde CP kodladıklarını tespit etmişler ve filogenetik analiz yapmışlar ve analiz sonucunda iki Türk izolatının nükleik asitleri arasında yüksek oranda (%97) benzerlik bulmuşlardır. ZYMV-Ad ve ZYMV-Ah izolatların CP gen sekansları 23 dünya izolatı ile karşılaştırıldığında sırasıyla %93 -%98 ve %94 -%99 oranında değiştiği bildirilmiştir. İki izolatın farklı coğrafik bölgelerden izole edilen 23 izolatın nükleotit sekansları ile karşılaştırıldığında ZYMV-Ad izolatı Ortadoğu ülkelerinden (İsrail, Ürdün, Suriye) gelen izolatlar ile, ZYMV-Ah izolatı ise Uzak Doğu ülkeleri olan Kore ve Tayvan ile gruplandığını bildirmişlerdir. ZYMV-Ah izolatının CP N-terminal uç kısmının oldukça farklı sekans yapısına sahip olduğunu ve karşılaştırdıkları 23 dünya izolatından farklılık gösterdiğini rapor etmişlerdir. Her iki izolatın CP genlerinin 279 amino asitten oluştuğunu ve izolatların diğer Potyvirus cinsine dahil 22 farklı üyesi ile yaptıkları nükleotit karşılaştırmalarında %58-%70 düzeyinde benzerlik olduğunu bildirmişlerdir. Mekanik inokulasyonlar sonunda, kabak bitkilerinde ZYMV-Ah izolatının daha hızlı sistemik belirti oluşturduğunu ve buna göre ZYMV-Ah izolatının ZYMV-Ad izolatına göre şiddetli bir izolat olduğunu bildirmişlerdir.

Konya, Karaman ve Aksaray illeri kabakgil ekim alanlarındaki virüs enfeksiyonlarını ve bunların enfeksiyon kaynaklarını belirlemek amacıyla 2009 ve 2010 yıllarında, toplam olarak virüs hastalığı belirtileri gösteren 652 kabakgil bitki örneği, 92 tohum örneği ve 85 yabancı ot örneği toplanmıştır. Virüsler DAS-ELISA ve RT-PCR ile tanımlanmıştır.

Sonuçlar, bitki örneklerinin %83,4'ünün, yabancı ot örneklerinin %50,6'sının ve tohum örneklerinin ise %8,7'sinin ZYMV, WMV, CMV, PRSV-W veya SqMV ile enfekteli olduğunu göstermiştir. Test sonuçlarına göre, bitki örnekleri için ZYMV (%51,7), WMV (%45,2) ve CMV (%21,3), tohum örnekleri için ZYMV (%4,3), WMV (%3,3) ve CMV (%1,1) ve yabancı ot örnekleri için CMV (% 36,5), WMV (%22,3) ve ZYMV (%15,3) hakim virüslerdir. Bunun yanında, özellikle bitki örneklerinde karışık enfeksiyonların, oldukça yaygın olduğu belirlenmiştir. Testi yapılan hiçbir örnekte ise *Cucumber green mottle mosaic Tobamovirus* (CGMMV) enfeksiyonu saptanmamıştır. Aynı zamanda, bu çalışmada, kabakgıl bitkilerinden toplanan 17 afit örneği RT-PCR testine tabi tutulmuştur. Bu örneklerde ise CMV, ZYMV (%17,6) ve WMV (%11,7) enfeksiyonları tespit edilmiştir. Çalışmanın sonraki aşamasında ise 5 ZYMV, 3 WMV-2 ve 2 CMV izolatının dizileri belirlenerek, WMV-2 (KF021298, KF021299 ve KF021300) ve CMV (KC989614 ve KC989615) izolatlarının dizileri GenBankasına kaydettirilmiştir (Yeşil 2013)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal temini

Çalışmanın araştırma materyalini oluşturan hastalıklı bitki örnekleri Akdeniz bölgesinde Antalya ili merkez ve ilçelerinden açık alanlarda ve örtü altı kabakgil yetiştiriciliği yapılan alanlardan ve İç Anadolu bölgesinde Ankara ilinin merkez ve ilçelerinden kabakgil tarımının yapıldığı tarlalardan toplanmıştır. 2010 yılı Temmuz-Ağustos aylarında Ankara ilinin Çubuk, Şereflikoçhisar, Beypazarı, Nallıhan ilçelerine ve Antalya ilinin Elmalı ilçesinin köylerine surveyler yapılmıştır. Antalya ilinin Kumluca, Demre, Aksu ve Serik ilçelerinden 2011 yılı kış döneminde örtü altı yetiştiricilik yapılan seralardan örnekler toplanmıştır. Burdur ilinden alınan örnekler 2014 yılı temmuz ayında toplanmıştır. Örnek toplanan iller şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Örneklerin toplandığı iller

Çalışmada kullandığımız Konya, Aksaray, Karaman ili izolatları ise Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü’nden Dr. Serkan Yeşil tarafından temin edilmiştir. Surveylerde, virüs ile enfekteli bitki materyali olarak üretim alanlarından toplanan hıyar (*Cucumis sativus* L.), kavun (*C. melo* L.), karpuz (*Citrullus vulgaris* Schrad.), sakız kabağı (yazlık kabak) (*Cucurbita pepo* L.), bal kabağı (kışlık kabak) (*C. moschata* Duch.) ve çerezlik kabak türleri dikkate alınmış ve bunlardan alınan örnekler kullanılmıştır.

Surveyler esnasında örnekler, yaprak deformasyonu, yapraklarda kıvrırcıklaşma, çalılışma, yaprak renginde açılmalar, yaprak şekil bozukluğu, yeşilimsi sarı renkli mozaik, bitkide bodurluk, tepe sürgünlerinde kıvrılmalar, yapraklarda ayakkabı bağı gibi incelmeler, bitkide cücelik, yapraklarda mozaikleşme ve sivilceli meyve oluşumu tipinde simptom gösteren kabakgillerin yaprak ve sürgünlerinden toplanmıştır.

3.2 Serolojik Çalışmalar

Çalışmada kullanılmak üzere Ankara, Burdur, Antalya illerinden toplanan ve virüs belirtisi gösteren örnekler DAS-ELISA testine tabi tutulmuştur. DAS-ELISA testi Clark ve Adams (1977) tarafından bildirilen yöntemine göre yapılmış olup örnekler LOEWE firmasından alınan ZYMV, CMV, WMV, CGMMV, PRSV-W ve SqMV virüslerine karşı spesifik antiserumlar ile test edilmiştir. Çalışmada kullanılan sulandırma oranları ELISA kitlerinin temin edildiği ticari firmanın belirttiği oranlar dikkate alınarak yapılmıştır. Örneklerin absorbans değerleri ELISA okuyucuda 405 nm dalga boyunda okunmuştur. Çalışmalar Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Seroloji Laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan solüsyonlar ve hazırlanışı EK 1’de verilmiştir.

DAS-ELISA yönteminde ilk olarak belirtilen virüslere karşı spesifik olarak üretilmiş IgG’ler 1/200 oranında kaplama tampon çözeltisinde sulandırılmış ve ELISA tabağında her kuyucuğa 100µl gelecek şekilde yükleme yapıldıktan sonra ELISA tabakları 4 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. Süre sonunda ELISA tabağı 3 defa 3’er dakika süre yıkama çözeltisi ile yıkama yapıldıktan sonra örnek tampon çözeltisinde ezilen örneklerden, her örnekten üç tekrerrür olacak şekilde kuyucuklara 100 µl eklenmiştir. ELISA tabakları bir gece +4°C’de inkubasyona tabi tutulduktan sonra 3 defa 3’er dakikalık yıkama yapılmıştır. Alkalın fosfataz ile işaretli IgG (Konjugate) konjugat tampon çözelti içerisinde 1/200 oranında sulandırılarak her kuyuya 100’er µl konulduktan sonra 37°C’de 4 saat inkübe edilmiş ve ELISA tabağı yıkama tampon çözeltisi ile 3 defa 3’er dakika tekrar yıkanmıştır. Bu işlemlerden sonra ELISA tabağının her bir kuyusuna diethalonamin substrat tampon çözeltisinde 1mg/ml olacak şekilde hazırlanan 4-

Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (Fluka BioChemica) substrattan 100'er µl ilave edilmiş ve ELISA tabağı 90 dakika oda sıcaklığında ışıksız ortamda bekletildikten sonra ELISA okuyucuda 405 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır. Okuma sonucunda ELISA okuyucusunda negatif kontrolün absorbands değerinin en az iki katı ve daha fazla oranda değer veren örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Her bir ELISA tabağında negatif kontrol olarak sağlıklı kabak bitkisi, pozitif olarak antiserumların alındığı firmadan temin edilen örnekler kullanılmıştır. Konya, Karaman ve Aksaray illerinden toplanan örnekler Dr. Serkan Yeşil tarafından teşhisi yapılmış örneklerdir.

3.3 Moleküler çalışmalar

Serolojik ve moleküler çalışmalar sonucunda ZYMV ile enfekteli olarak saptanan bitkilerden alınan örnekler, alındıkları bölge ve bitki türlerine göre seçilerek dizi belirleme ve analiz çalışmalarında izolat olarak kullanılmıştır.

3.3.1 RNA izolasyonu

Çalışmada Konya, Karaman, Aksaray, Burdur, Ankara ve Antalya ilinden toplanan örneklerden toplam RNA izolasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Toplam RNA izolasyonu çalışmalarında iki farklı izolasyon yöntemi ile çalışılmıştır. İlkinde Astruc vd. (1996)'nın önerdiği yönteme göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

Astruc vd. (1996)'nın önerdiği yönteme göre izlenen basamaklar sırasıyla şu şekildedir;

a. Örnekler ekstraksiyon tampon çözeltisi (100 mM Tris-HCl pH.8.0, 50 mM EDTA, pH. 7.0, 5 mM NaCl, 10 mM 2-mercapto-ethanol (1/1000) ile 1:2(w/v) oranında sulandırılarak ezme işlemi yapılmıştır.

- b.** Bitki öz suyundan 1 ml eppendorf tüpüne alınarak örnekler 3 dakika 4.000 rpm’de santrifüj edildikten sonra, pellet üzerine 50 µl Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) (% 20) ilave edilerek vorteks ile karıştırılmıştır.
- c.** Daha sonra tüpler 65 °C’de 30 dakika ısı bloklarında inkube edilmiştir.
- d.** Tüplere 250 µl potasyum asetat (5M) ilave edilerek 20 dakika buz içerisinde bekletilmiş ve daha sonra 15 dakika 13.000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- e.** Süpernatant iki kısma ayrılarak, 500 µl’si yeni hazırlanmış eppendorf tüplerine konmuş -70°C’de saklanmıştır. Geriye kalan 500 µl süpernatant yeni hazırlanan eppendorf tüplerine konularak üzerine % 96’lık Ethanol’den 500 µl ilave edilmiş ve 1 ml ye tamamlandıktan sonra vorteks ile karıştırılmıştır.
- f.** Sonra tüplere 50 µl sodium asetat (3M) ilave edilerek örnekler tekrar karıştırılmış ve -70 °C’de bir gece bekletilmiştir.
- g.** Ertesi gün örnekler 15 dakika 14.000 rpm’de santrifüj edildikten sonra sıvı kısım ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- h.** Eppendorf tüpleri ters çevrilerek filtre kağıdı üzerinde 5 dakika süre ile kurtulmuş ve pellet üzerine 1 ml ethanol (% 70) ilave edilerek yıkama işlemi yapılmıştır.
- i.** Eppendorf tüplerde RNA’leri çöktürmek için 5 dakika 13.000 rpm’de santrifüj edilmiş ve tüp içerisindeki ethanol atılarak eppendorf tüpleri kurutulmaya bırakılmıştır.
- Örneklerden elde edilen toplam RNA’lar 50 µl distile su ile sulandırılmış ve -20 °C’de muhafaza edilmektedir. Çalışmada kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları EK 3’de verilmiştir.

İkinci RNA izolasyonu ise Molecular Research Center firmasından temin edilen RNazol®RT kiti kullanılmış ve firmanın verdiği prosedür takip edilmiştir.

3.3.2 RNA konsantrasyonlarının belirlenmesi

RNA izolasyonu çalışmalarından elde edilen RNA’ların miktar tayinleri nanodrop ile ölçülmüş ve çalışma konsantrasyonu olan 500-600 ng olacak şekilde sulandırılmıştır.

3.3.3 RT-PCR çalışmaları

Farklı illerden ve farklı kabakgil bitkilerinden alınan örneklerden toplam RNA izolasyonundan sonra elde edilen RNA'lar kullanılarak RT-PCR işlemi yapılmıştır. RT-PCR işlemi tek ve iki aşama şeklinde denenmiş olup tek basamaklı RT-PCR işleminde RT-PCR işlemi tek basamaklı olarak yapılmış olup, PCR mix hazırlanmasında her örnek için, 2 µl örnek RNA'sı, 2,5 µl Taq polimeraz buffer (Promega), 2,5 µl MMLV RT enzim buffer (Fermentas), 1 µl dNTP (2,5mM), 0,3µl primer (100 pmol), 1,5 µl MgCL₂ (Promega), 0,3 µl RNase inhibitör, 0,08 MMLV RT enzimi (Fermentas), 0,3 µl Taq polimeraz enzimi (Promega) ve 1 µl Dimetilsülfoxid (DMSO) karıştırılmış ve PCR cihazına yerleştirilmiştir.

Çalışmada iki aşamalı RT-PCR işleminden daha iyi sonuç alınmış olup bu yöntem tercih edilmiştir. İki aşamalı RT-PCR işleminde ise ilk olarak, RNA izolasyonundan elde edilen RNA'lardan random heksamer primer ve MMLV-RT enzimi kullanılarak cDNA eldesi yapılmıştır. İkinci aşamada bu cDNA'lar kalıp olarak kullanılmış ve protein bölgelerine spesifik olarak sentezlettirilen primerlerle PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

1. Aşama Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Toplam RNA izolasyonu yapılan örneklerden elde edilen RNA'lar kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi yapılırken ependorf tüpler içerisinde 2 µl toplam RNA, 1µl random heksamer primer (5'-d(NNNNNN)-3'N = G, A, T veya C)(10µmol) ve 8 µl distile su ile karıştırılmıştır. Karışım 65 °C'de 5 dak. inkübasyondan sonra buz üzerine alınmış ve 3 dakika buzda bekletilmiştir. Tüplerin içerisine 5X MMLV buffer (5X), 0,2 mM dNTP (25 mM), 0,5 µl random heksamer primer (10 µmol), 0,25 µl RNase inhibitör (10u/µl), 0,25 µl Reverse transcriptase (20-20u/µl) ve distile su bulunan karışımdan 10 µl ilave edilerek her bir tüp 20 µl'ye tamamlanmıştır. Tüpler daha sonra thermocyler cihazında 25 °C'de

5 dakika, 42 °C’de 60 dakika ve 72 °C’de 10 dakika inkube edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

2. Aşama PCR çalışmaları

İlk aşamada elde edilen cDNA kalıp olarak kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada 2 µl cDNA, 5 µl 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 0,2 µl dNTP , 0,5 µl forward primer (100 pmol), 0,5 µl reverse primer (100 pmol), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), 0,25 µl Taq polimeraz enzimi (Promega) ve 0,25 µl Dimetilsülfoxid (DMSO) karıştırılmış ve saf su ile ye tamamlanıp PCR cihazına yerleştirilmiştir.

Çizelge 3.1 ZYMV gen bölgelerine spesifik olarak sentezlettirilen primerlerin baz dizilimi

Hedef bölge	Primer adı	Baz dizilimi (5’-3’)	Literatür	Baz büyüklüğü
P1	P1-5’ P1-3’	CATGAGAATTCAAGCTTACATGGCCTCTATCATG CTGACTTCTAGACCTGTCCAGCGCGT	Wisler vd. 1995	930 bp
HC	HC-ZYMV-5’ HC-ZYMV-3’	GTCAGGTCACCCATACAGAG TGTGTAGCGTGGTCAACAAG	Desbiez*	1400bp
P3	ZYMV-1500-5’ ZYMV-3100-3’	CAAGACGAATTGGACTTAGC ACAAGTTCCGACGAGAGCC	Desbiez vd. 2003	1635bp
CIP	ZY-debCI-5’ ZY-milCI-3’	GTTCATTTTGATGATTGGTGG TATMCGCAATGCAGTTCAGG	Desbiez*	1000bp
Nİb	ZY-finNİb-3’ ZY-debNİb-5’	CTTRCGRAGTGCTGTCTCAGC ACACACGCAGAAGCGAGCGC	Desbiez*	1600bp
CP	ZYCP-F ZYCP-R	AGAGGCTATYTGCGCTGC TAAAGCTTCCGACAGGACTAC	Ali vd. 2009	1260 bp

* Primer dizilimleri Dr. Cecile Desbiez tarafından temin edilmiştir.

Kabak sarı mozaik virüsünün (ZYMV) CP, P1, P3, HC-Pro, Nİb ve CI protein bölgelerine spesifik primerler (Çizelge 1) sentezlettirilmiştir. P1 protein bölgesi için P1-5’ ve P1-3’, CIP bölgesi için ZY-debCI-5 ile ZY-milCI-3’, Nİb protein bölgesi için ZY-debNİb-5’ ve ZY-finNİb-3’, CP bölgesi için ZYCP-F ve ZYCP-R primer çiftleri sentezlettirilmiştir. HC-Pro bölgesi için HC-ZYMV-5’ ve HC-ZYMV-3’, P3 bölgesi için ZYMV-1500-5’ ve ZYMV-3100-3’ primerleri ile çalışılmıştır. Protein bölgelerine spesifik olarak sentezlettirilen primerlerin baz dizilimi çizelge 3. 1’de verilmiştir.

Sentezlettirilen primerlerle RT-PCR denemeleri yapılmış olup, tüm primerler için 55 °C primer bağlanma sıcaklığı kullanılmış, uzama sıcaklığı CIP, P1, HC bölgeleri için 60 saniye, örtü proteini (CP) için 40 saniye N1b ve P3 bölgelerine spesifik sentezlettirilen primerler için 90 saniye olarak ayarlanmıştır. Protein bölgeleri için kullanılan PCR döngüleri çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Protein bölgeleri için kullanılan PCR döngüleri

CIP, P1, HC-pro primerleri için PCR koşulları	CP primeri için PCR koşulları	N1b ve P3 primerleri için PCR koşulları
94 °C 5 dak. 94 °C 30 saniye } 55 °C 30 saniye } 35 döngü 72 °C 60 saniye } 72 °C 10 dak.	94 °C 5 dak. 94 °C 30 saniye } 55 °C 30 saniye } 35 döngü 72 °C 40 saniye } 72 °C 10 dak.	95 °C 5 dak. 94 °C 30 saniye } 55 °C 30 saniye } 35 döngü 72 °C 90 saniye } 72 °C 10 dak.

3.4 Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları

ZYMV’ye spesifik protein bölgelerine göre sentezlettirilen primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri % 1,2 oranında hazırlanan agaroz jelde 100 V’da 1 saat elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez işlemi sonunda jel 10 mg/ml ethidium bromid ile boyanmış ve görüntüleme cihazında görüntüleme işlemi yapılmıştır.

3.5 Filogenetik Analiz Çalışmaları

RT-PCR sonunda pozitif sonuç veren farklı il ve ilçelerden 35 bitkinin protein bölgeleri ile çalışılmıştır. Filogenetik çalışmalar RT-PCR işlemi sonunda pozitif bant elde edilen PCR ürünleri Sanger yöntemi ile DNA dizi analizine gönderilmiştir. Sekanslama sonunda elde edilen veriler Chromas programı kullanılarak temizlenmiş ve tek bir dosya halinde kaydedilmiştir. Dizileme çalışmaları çift yönlü yapılmış olup elde edilen

forward ve reverse diziler “CAP3 Sequence Assembly” bilgisayar programı kullanılarak birleştirilip konsensus diziler elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda izolatların çoğaltılan kısımlarıdaha önceden NCBI gen bankasında rapor edilen izolatlarla karşılaştırılarak benzerlik oranlarıbelirlenmiştir. Bu amaçla veriler MEGA 6 programı kullanılarak dizilenmiş ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Filogenetik analiz “Neighbors joining tree” analiz yöntemi, 1000 bootstrap ve Kimura 2 parametreleri kullanılarak elde edilmiştir.

Dizileme işlemi yapılırken kullanılan web programları aşağıda verilmiştir.

1. NCBI (The National Center for Biotechnology Information)
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

2. BLAST (Basic Local Alignment SearchTool),
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

3. Chromas
(www.technelysium.com.au/chromas.html)

4. DAMBE5.2.65 (Data Analysis and Molecular Biology and Evolution)
<http://dambe.bio.uottawa.ca/dambe.asp>

5. MEGA6
<http://www.megasoftware.net/>

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Materyal Temini ve Survey Sonuçları

Antalya ilinin ilçelerinden açık alanlarda (Elmalı) ve örtü altı kabakgil yetiştiriciliği yapılan alanlardan (Kumluca, Demre, Aksu, Serik), Burdur ili ve İç Anadolu bölgesinde Ankara ilinin ilçelerinden (Çubuk, Beypazarı, Nallıhan, Gölbaşı, Ayaş, Şereflikoçhisar) kabakgil tarımının yapıldığı açık tarlalardan 2011 ve 2012 yıllarında hastalık belirtisi gösteren bitkilerden yaprak ve meyve örnekleri alınmıştır. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe bitkileri (AÜZF) deneme parselinden balkabağı yetiştirilen parselden enfekteli bitkilerden örneklerler toplanmıştır. Bölgelere göre enfekteli bitkilerden alınan örnek sayıları ve gözlemlenen belirtiler çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Enfekteli bitkilerden alınan örnek sayıları ve gözlenen belirtiler

Alındığı İl	İlçe	Alındığı Yıl	Örnek kodu	Alındığı Bitki	Belirti
ANKARA	Çubuk	2011	Ç1	Bal kabağı	K, M
			Ç2	Bal kabağı	K, Ş.B, M, İ
			Ç3	Karpuz	K, M, İ, B
			Ç4	Bal kabağı	İ, K
			Ç5	Bal kabağı	M, S
			Ç6	Kavun	B, K, M
			Ç7	Bal kabağı	K, M
			Ç8	Bal kabağı	İ, M
			Ç9	Sakız kabağı	İ, K
			Ç10	Karpuz	K, M,
			Ç11	Bal kabağı	K, Ş.B
			Ç12	Bal kabağı	K, M,
			Ç13	Bal kabağı	K, Ş.B
			Ç14	Bal kabağı	K, Ş.B, M
			Ç15	Kavun	K
			Ç16	Kavun	K
			Ç17	Kavun	K
			Ç18	Bal kabağı	K, S
			Ç19	Bal kabağı	S, Ş.B
			Ç20	Bal kabağı	S, Ş.B., K
			Ç21	Sakız kabağı	İ, M
			Ç22	Sakız kabağı	K, Ş.B, İ
			Ç23	Sakız kabağı	K, Ş.B, İ
			Ç24	Sakız kabağı	K, Ş.B

Çizelge 4.1 Enfekteli bitkilerden alınan örnek sayıları ve gözlenen belirtiler (devam)

Alındığı İl	İlçe	Alındığı Yıl	Örnek kodu	Alındığı Bitki	Belirti
Ankara	Beypazarı	2011	B1	Sakız kabağı	K, Ş.B, İ
			B2	Sakız kabağı	K, Ş.B, İ
			B3	Sakız kabağı	K, Ş.B, İ
			B4	Sakız kabağı	Ş.B, İ
			B5	Sakız kabağı	K,
			B6	Sakız kabağı	K,
			B7	Sakız kabağı	M
			B8	Sakız kabağı	K, , M
			B9	Bal kabağı	K, S
			B10	Sakız kabağı	Ş.B, İ, K
			B11	Sakız kabağı	Ş.B, İ, K
			B12	Sakız kabağı	Ş.B, İ
			B13	Bal kabağı	Ş.B, S
		2014	Be1	Sakız kabağı	İ, S
			Be2	Sakız kabağı	İ, S
			Be3	Sakız kabağı	İ, S
			Be4	Sakız kabağı	K, M
			Be5	Sakız kabağı	K, M
			Be6	Sakız kabağı	K, M
			Be7	Bal kabağı	K, M
			Be8	Bal kabağı	K, M, S
			Be9	Bal kabağı	K, M, S
			Be10	Sakız kabağı	K, Ş.B
			Be11	Bal kabağı	Bnk, K, Ş.B
			Be12	Sakız kabağı	M, K
			Be13 (m)	Sakız kabağı	S
			Be14 (m)	Sakız kabağı	S, Bnk
			Be15	Sakız kabağı	S, K
			Be16	Sakız kabağı	M, K, Bnk
			Be17 (m)	Sakız kabağı	Bnk
			Be18	Sakız kabağı	M K, Bnk
			Be19	Sakız kabağı	S
			Be20(m)	Sakız kabağı	Bnk
			Be21 (m)	Sakız kabağı	Bnk
			Be22 (m)	Sakız kabağı	Bnk
			Be26(m)	Sakız kabağı	Bnk
			Be27 (m)	Sakız kabağı	Bnk
	Nallıhan	2011	N1	Bal kabağı	S
			N2	Bal kabağı	S, DB
			N3	Kavun	B, Ş.B
			N4	Sakız kabağı	İ
			N5	Sakız kabağı	İ

Çizelge 4.1 Enfekteli bitkilerden alınan örnek sayıları ve gözlenen belirtiler (devam)

Alındığı İl	İlçe	Alındığı Yıl	Örnek kodu	Alındığı Bitki	Belirti
Ankara	Nallıhan	2011	N6	Sakız kabağı	İ
			N7	Bal kabağı	Ş.B, S
			N8	Bal kabağı	Ş.B, S
			N9	Bal kabağı	Ş.B, S
			N10	Kavun	DB ve Ş.B
			N11	Bal kabağı	DB ve Ş.B
	Şereflikoçhisar	2011	Ş1	Kavun	K, Ş.B
			Ş2	Kavun	K, Ş.B
			Ş3	Kavun	K, Ş.B
			Ş4	Kavun	K, Ş.B
			Ş5	Kavun	K, Ş.B
			Ş6	Kavun	K, Ş.B
			Ş7	Çerezlik kabak	İ, K
			Ş8	Çerezlik kabak	İ, K
			Ş9	Çerezlik kabak	İ, K
			Ş10	Çerezlik kabak	İ, K
			Ş11	Çerezlik kabak	İ
			Ş12	Çerezlik kabak	K, Ş.B
	Gölbaşı	2011	G1(m)	Sakız kabağı	Bnk
			G2	Sakız kabağı	Ş.B, İ, Bnk
			G3	Sakız kabağı	Ş.B, İ
			G4	Bal kabağı	S, Bnk Ş.B, DB
			G5 (m)	S.k	Ş.B, Bnk
	AÜZF	2011	AÜ-1	Bal kabağı	K, S
			AÜ-2	Bal kabağı	K, S
			AÜ-3	Bal kabağı	K, S
			AÜ-4	Bal kabağı	S, K
			AÜ-5	Bal kabağı	S
			AÜ-6	Bal kabağı	S, K, Ş.B
			AÜ-7	Bal kabağı	S, DB, K
			AÜ-8	Bal kabağı	S, K
			AÜ-9	Bal kabağı	S
			AÜ-10	Bal kabağı	K, S
			AÜ-11	Bal kabağı	S, K
			AÜ-12	Bal kabağı	M
			AÜ-13	Bal kabağı	K
			AÜ-14	Bal kabağı	K, M
			AÜ-15	Bal kabağı	S, K, Ş.B
			AÜ-16	Bal kabağı	K
			AÜ-17	Bal kabağı	K, S

Çizelge 4.1 Enfekteli bitkilerden alınan örnek sayıları ve gözlenen belirtiler (devam)

Alındığı İl	İlçe	Alındığı Yıl	Örnek kodu	Alındığı Bitki	Belirti
Ankara		2011	AÜ-18	Bal kabağı	S
			AÜ-19	Bal kabağı	S, Bnk,
			AÜ-20	Bal kabağı	S, K
			AÜ-21	Bal kabağı	S, K
			AÜ-22	Bal kabağı	S, K
			AÜ-23	Bal kabağı	S, K
			AÜ-24	Bal kabağı	S, K
			AÜ-25	Bal kabağı	S, K
			AÜ-26	Bal kabağı	S, K
			AÜ-27	Bal kabağı	S, DB
			AÜ-28	Bal kabağı	K, DB
			AÜ-29	Bal kabağı	S, DB
			AÜ-30	Bal kabağı	S, K
	Kazan	2010	Kz1	Sakız kabağı	M, Ş.B
			Ahm1(	Sakız kabağı	M, Ş.B
	Ayaş	2013	AYS1	Sakız kabağı	Ş.B, K,
			AYS2	Sakız kabağı	İ, Ş.B
			AYS3	Sakız kabağı	İ, Ş.B
			AYS4	Sakız kabağı	K,
			AYS5	Sakız kabağı	K,
			AYS6	Sakız kabağı	K,
			AYS7	Sakız kabağı	K,
Antalya	Kumluca	2012	K1	Sakız kabağı	S, M, D
			K2	Sakız kabağı	S, M, D
			K3 (m)	Sakız kabağı	Ş.B
			K4	Sakız kabağı	S, M, D
			K5	Sakız kabağı	D
			K6	Sakız kabağı	D
			K7	Sakız kabağı	D
			K8	Sakız kabağı	S, M, D
			K9	Sakız kabağı	S, M, D
			K10	Sakız kabağı	S, M, D
			K11	Sakız kabağı	S, M, D
			K12	Sakız kabağı	S, M, D
			K13	Sakız kabağı	S, M, D
			K14	Sakız kabağı	S, M, D
			K15	Sakız kabağı	S, M, D
			K16	Sakız kabağı	S, M, D
			K17	Sakız kabağı	S, M, D
			K18	Sakız kabağı	S, M, D
	Aksu	2012	AS1	Sakız kabağı	S, M, D
			AS2	Sakız kabağı	S, M, D

Çizelge 4.1 Enfekteli bitkilerden alınan örnek sayıları ve gözlenen belirtiler (devam)

Alındığı İl	İlçe	Alındığı Yıl	Örnek kodu	Alındığı Bitki	Belirti
Antalya	Aksu	2012	AS3 (m)	Sakız kabağı	K
			AS4(m)	Sakız kabağı	K
			AS5	Sakız kabağı	D
			AS6	Sakız kabağı	D
			AS7 (m)	Sakız kabağı	K
			AS8 (m)	Sakız kabağı	K
			AS9	Sakız kabağı	S, M, D
			AS10	Sakız kabağı	S, M, D
			AS11	Sakız kabağı	S, M, D
	Demre	2012	D1	Sakız kabağı	S, D
			D2	Sakız kabağı	S, D
			D3	Sakız kabağı	S, D
			D4	Sakız kabağı	S, D
			D5	Sakız kabağı	S, D
			D6	Sakız kabağı	S, D
			D7	Sakız kabağı	S, D
			D8	Sakız kabağı	S, D
			D9	Sakız kabağı	D
			D10 (m)	Sakız kabağı	D, K
			D11	Sakız kabağı	D
			D12	Sakız kabağı	D
			H1(m)	Hıyar	Ş.B, K
		2013	Demre-13	Hıyar	Ş.B, K
		2014	D14 (m)	Hıyar	BNK
	Serik	2012	Se1	Sakız kabağı	M, B
			Se2	Sakız kabağı	M, B
			Se3	Sakız kabağı	M, B
			Se4	Karpuz	Bnk, K
			Se5	Karpuz	Bnk, K
			Se6	Karpuz	Bnk, K
			Se7	Karpuz	Bnk, K
			Se8	Kavun	Bnk, K, S, M, D
			Se9	Kavun	Bnk, K, S, M, D
			Se10	Kavun	Bnk, K, S, M, D
			Se11(m)	Kavun	K
	Elmalı	2011	S1	Sakız kabağı	Ş.B,DB
			S2	Sakız kabağı	Ş.B,DB
			S3	Sakız kabağı	Ş.B,DB
			S4	Sakız kabağı	S, İ
			S5	Sakız kabağı	Ş.B,DB
			S6	Sakız kabağı	Ş.B,DB
			S7	Sakız kabağı	Ş.B,DB

Çizelge 4.1 Enfekteli bitkilerden alınan örnek sayıları ve gözlenen belirtiler (devam)

Alındığı İl	İlçe	Alındığı Yıl	Örnek kodu	Alındığı Bitki	Belirti
Antalya	Elmalı	2011	S8	Sakız kabağı	İ,
			S9	Sakız kabağı	Ş.B, İ
			BK1	Kavun	Bnk, B
			BK2	Kavun	Bnk, B,
			BK3	Kavun	Bnk, B,
			BK4	Kavun	Bnk, B,
			BK5	Kavun	Bnk, B,
			E-1	Bal kabağı	Ş.B, S
			E-2	Kavun	Bve K
			E-3	Kavun	Bve K
			E-4	Sakız kabağı	İ
			E-5	Sakız kabağı	Ş.B, K, S
			E-6	Bal kabağı	S, K, Ş.B
			E-7	Kavun	Bve K
			E-8	Kavun	Bve K
			E-9	Kavun	Bve K
			E-10	Sakız kabağı	Ş.B, İ
			E-11	Sakız kabağı	S, ŞB
			E-12	Kavun	B ve K
			E-13	Kavun	B ve K
			E-14	Kavun	B ve K
			E-15	Sakız kabağı	İ, Ş.B
			E-16	Sakız kabağı	Ş.B
			E-17	S.kabak(meyve)	Ş.B, Bnk
			E-18	S.kabak(meyve)	Ş.B, Bnk
			E-19	S.kabak(Meyve)	Ş.B, Bnk
			E-20	Sakız kabağı	İ
			E-21	Kavun	B ve K
			E-22	Sakız kabağı	S, Ş.B
			E-23	Sakız kabağı	S, M
			Y1	Sakız kabağı	İ
			Y2	Sakız kabağı	İ
			Y3	Sakız kabağı	
			Y4	Kavun	M, K
			Y21(m)	Sakız kabağı (m)	Bnk
			Y22	Sakız kabağı	Bnk
			Y23(m)	Sakız kabağı	Bnk
			Y24	Sakız kabağı	Bnk
Burdur		2014	Brd1	Bal kabağı	M, Ş.B
			Brd2	Bal kabağı	M, Ş.B
			Brd3	Bal kabağı	M, Ş.B
			Brd4	Bal kabağı	M, Ş.B
			Brd5	Bal kabağı	M, Ş.B

İ: İplik Yapraklılık, M: Sistemik Mozaik , ŞB: Şekil bozukluğu, K: kabarcık oluşumu, Bnk: Beneklenme, B: Bodurlaşma, DB: Damar bantlaşması, S: Sararma, D: Dişlenme

Çalışmada kullanılan Konya (4 adet), Karaman (2 adet) ve Aksaray (3 adet) illerinden gelen teşhisi yapılmış toplam 9 örnek (Çizelge 4.2) Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü’nden Dr. Serkan YEŞİL tarafından temin edilmiştir.

Çizelge 4.2 Konya, Karaman ve Aksaray izolatları

Alındığı İl	İlçe	Alındığı Yıl	Örnek kodu	Alındığı Bitki	Belirti
Aksaray	Merkez	2010	AKS 2/5	Bal kabağı	M, K
	Ortaköy	2009	AK 5/7	Çerezlik kabak	M,Ş.B, K
	Ortaköy	2009	AK 6/2	Çerezlik kabak	M,K
Karaman	Kazımkarabekir	2010	KAR15/1	Bal kabağı	M
			KAR12/4	Çerezlik kabak	M,Ş.B, K
Konya	Merkez	2010	A 3/1	Çerezlik kabak	M
	Ereğli	2009	ER 2/8	Hıyar	M
	Yunak	2010	YUN8/4	Çerezlik kabak	M,Ş.B, K, İ
	Ereğli	2009	ER 6/8	Çerezlik kabak	M,Ş.B, K

Çizelge 4.3 Bölgelere göre enfekteli bitkilerden alınan örnek sayıları

İl	İlçe	Kavun	Bal	Sakız	Karpuz	Çerezlik	Hıyar	Toplam
Ankara	Nallıhan	2	6	3	-	-	-	11
	Çubuk	4	13	5	2	-	-	24
	Şereflikoçhisar	6	-	-	-	6	-	12
	Beypazarı	-	6	31	-	-	-	37
	AÜZF	-	30	-	-	-	-	30
	Gölbaşı	-	1	4	-	-	-	5
	Kazan	-	-	2	-	-	-	2
	Ayaş	-	-	7	-	-	-	7
Toplam		12	56	39	2	6	-	128
Antalya	Elmalı	15	2	28	-	-	-	45
	Kumluca	-	-	18	-	-	-	18
	Demre	-	-	12	-	-	3	15
	Aksu	-	-	11	-	-	-	11
	Serik	4	-	3	4	-	-	11
Toplam		19	2	72	4	-	3	98
Burdur		-	5	-	-	-	-	5
Aksaray			1	-		2		3
Karaman			1	-		1		2
Konya		-	-	-	-	3	1	4

Çalışmada 31 adet kavun, 65 adet bal kabağı, 124 adet sakız kabağı, 6 adet karpuz, 12 adet çerezlik kabak ve 4 adet hıyar bitkisi olmak üzere toplam 242 enfekteli bitkiden alınan yaprak ve meyve örnekleri ile çalışılmıştır (Çizelge 4.3). Toplanan örneklerin 222 tanesi yaprak örneği iken 20 tanesi meyve örneğinden oluşmaktadır.

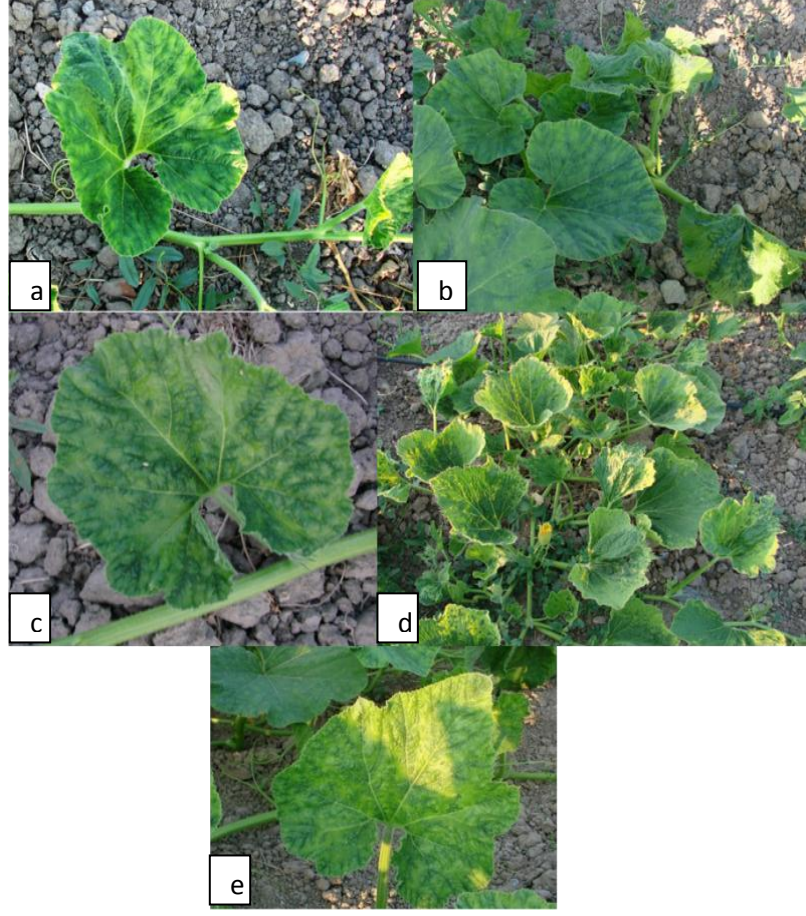
Belirtiler

Antalya, Burdur ve Ankara illerinden toplanan bitkilerde gözlemlenen belirtiler genel olarak sistemik mozaik, yapraklarda şekil bozukluğu, damar bantlaşması, dişlenme, iplik yapraklılık, kabarcık oluşumu, sararma, bitki boyunda bodurlaşma ve meyvelerde beneklenme şeklindedir (Şekil 4.1- 4.3).

ZYMV'nin farklı kabakgil türlerinde oluşturduğu belirtilere baktığımızda; Karpuz bitkilerinde gözlemlenen belirtiler yapraklarda sistemik mozaik, kabarcıklaşma ve bitkilerde bodurlaşma şeklindedir (Şekil 4.1-4.3).

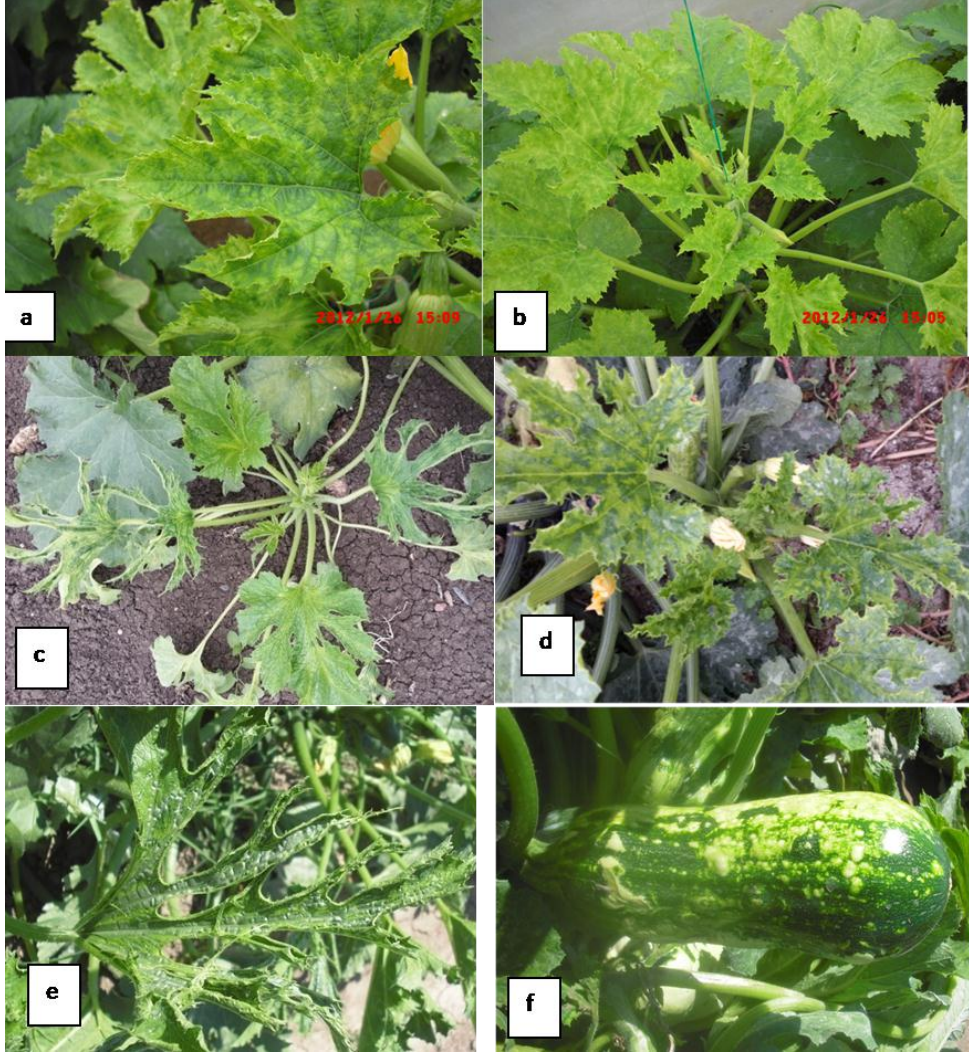


Şekil 4.1.a.b.c Karpuz bitkilerinde sistemik mozaik, kabarcık oluşumu ve şekil bozukluğu Ankara-Çubuk, 2011



Şekil 4.2.a.b.c.d.e Balkabağında sistemik mozaik, şekil bozukluğu ve kabarcıklaşma belirtileri
Ankara- AÜZF, 2011

Arazi çalışmalarında toplanan bal kabağı örneklerinin çoğunda virüs belirtileri mozaik, beneklenme, damar aralarında renk açılması ve şekil bozukluğu şeklindedir (Şekil 4.2).



Şekil 4.3 Sakız kabağı bitkilerinde mozaik, sararma, iplik yapraklılık ve şekil bozukluğu belirtileri
a.b Kumluca 2012, c.d Beypazarı 2011; e Elmalı 2011; f Elmalı 2011



Şekil 4.4.a.b.c.d Kavun bitkilerinde virüs belirtileri

Antalya , 2012

Kavun bitkilerinde ise bodurlaşma, yapraklarda kabarcıklaşma, iplik yapraklılık, yaprak ayasında daralma ve meyvelerde şekil bozuklukları şeklinde belirtiler gözlenmiştir (Şekil 4.4)



Şekil 4.5.a.b.c Çerezlik kabak üzerindeki virüs belirtileri

Ankara-Şereflikoçhisar, 2011

Çalışmada kullanılmak üzere toplanan çerezlik kabak bitkilerinin yapraklarında mozaik, şekil bozukluğu, iplik yapraklılık, meyvelerde şekil bozukluğu ve bitkinin genel görünümünde bodurlaşma belirtileri gözlenmiştir (Şekil 4.4, Şekil 4.5).

Antalya ilinde örtü altı kabak yetiştiriciliği yapılan Kumluca ilçesinden alınan örneklerdeki belirtiler genellikle sararma ve mozaik belirtileri şeklindedir (Şekil 4.3 a-b). Açık yetiştiricilik yapılan tarlalardan alınan örneklerde ise belirtilerin daha çok beneklenme ve yapraklarda şekil bozukluğu şeklinde olduğu görülmektedir (Şekil 4.3c.e).

AÜZF deneme parselinden alınan örneklerin çoğu benzer belirtiler göstermektedir. Çalışmada kullanılmak üzere örnek alınan bitkilerdeki belirtiler daha önce yapılmış çalışmalardakiler ile bezerlik göstermektedir.

4.2 Serolojik çalışma (DAS-ELISA) sonuçları

Antalya, Burdur ve Ankara illerinden virüs belirtisi gösteren bitkilerden alınan toplam 233 örnek DAS-ELISA testine tabi tutulmuş olup Konya, Karaman ve Aksaray'dan alınan 9 örnek DAS-ELISA testine tabi tutulmamıştır. DAS-ELISA ile elde edilen sonuçlar EK 2'de verilmiştir. Test sonuçlarına göre 233 örneğin 86'sının (%36,9) ZYMV, 116'sının (%49,7) WMV, 36'sının (15,4) CMV, 22'sinin (%9) PRSV, 6'sının (%2,5) SqMV, 20'sinin (%8,5) CGMMV ile enfekteli olduğu bulunmuştur.

DAS-ELISA testi sonuçlarına göre, Ankara ilinin Şereflikoçhisar ilçesinden alınan örneklerin 7 tanesinde ZYMV, 4 tanesinde WMV, 5 tanesinde CMV, 2 tanesinde PRSV ve 1 adedinde SqMV ile enfeksiyon belirlenmiştir. Bu örneklerden 2 tanesinde ZYMV+WMV+PRSV karışık enfeksiyonu bulunurken 1 tane örnekte ZYMV +WMV karışık enfeksiyonu tespit edilmiştir. Yine 2 adet örnekte ZYMV+WMV+PRSV +CMV karışık enfeksiyonu belirlenmiştir. Şereflikoçhisar ilçesinden toplanan örneklerde DAS-ELISA sonuçlarında CGMMV ile enfeksiyonun varlığı belirlenmemiştir.

Nallıhan ilçesinden 2011 yılı yaz döneminde açık alanlardan toplanan 11 örnekten, 1 adet (%9,09) ZYMV, 9 adet (%81,8) WMV, 3 adet (%27,2) CMV ile enfekteli bitki bulunmuştur. 1 adet ZYMV ile enfekteli örneğin aynı zamanda WMV ile karışık enfeksiyona sahip olduğu görülmüştür. Yine 3 adet CMV ile enfekte olan örneklerin de WMV ile karışık enfeksiyona sahip olduğu bulunmuştur. Nallıhan ilçesinden toplanan örneklerde DAS-ELISA sonuçlarında PRSV, SqMV ve CGMMV ile enfeksiyon belirlenmemiştir.

Çubuk ilçesinde 9 adet (%37,5) ZYMV, 19 adet (%79,1) WMV, 1 adet CMV ve 1 adet (%2,6) PRSV ile enfekteli bitki bulunmuştur. ZYMV ile enfekteli bulunan 9 örneğin WMV ile karışık enfeksiyona sahip olduğu belirlenmiştir. Yine 1 tane CMV+WMV ve 1 tane de WMV+PRSV karışık enfeksiyonu belirlenmiştir. Çubuk ilçesinden toplanan örneklerde DAS-ELISA sonuçlarında SqMV ve CGMMV ile enfeksiyon tespit edilmemiştir.

Beyazır ilçesinden toplam 37 örnek toplanmış olup bunlardan 23 adedi DAS-ELISA testine tabi tutulmuştur. Test edilen örneklerde 8 adet (% 34,7) ZYMV, 9 adet (% 39,1) WMV, 1 adet CMV (% 4,34) ve 2 adet (%8,6) PRSV, 6 adet (%26) CGMMV ile enfekteli bitki örneği bulunmuştur. Test edilen bitkilerin 5 tanesi ZYMV+WMV ile 1 tanesinin de ZYMV+PRSV+ CGMMV üçlü karışık enfeksiyona sahip oldukları tespit edilmiştir (Çizelge 4.4).

AÜZF deneme parselinden alınan 30 örnekten 23 adedi (%76) ZYMV, 27 adedi (%90) WMV, 9 adedi (%30) CMV, 11 adedi (%36,6) PRSV, 5 adet (%16,6) SqMV ve 12 adet (%40) CGMMV ile enfeksiyona sahip olduğu tespit edilmiştir. 21 adet ZYMV ile enfekteli bulunan örneklerin aynı zamanda WMV ile de enfekteli olduğu bulunmuştur. ZYMV ile enfekteli diğer iki örneğin CMV ile enfekteli olduğu görülmektedir. 11 adet ZYMV+WMV+CMV karışık enfeksiyonu, 6 tane ZYMV+WMV+CMV+PRSV karışık enfeksiyonu, 5 adet ZYMV+WMV+CMV+PRSV+ CGMMV karışık enfeksiyonu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4’de görüldüğü üzere Ankara’nın Ayaş ilçesinden 2013 yılının Temmuz ayında toplanan 7 sakız kabağı bitkisinden 2 adet ZYMV, 5 adet WMV enfeksiyonu belirlenmiştir.

Burdur ilinden 2014 yılının Ekim ayında toplanan 5 balkabağı örneğinin 2 tanesinde ZYMV, 2 tanesinde WMV ve 3 tanesinde PRSV virüslerine rastlanmıştır. Bu örneklerden bir tanesinde ZYMV+WMV+ PRSV karışık enfeksiyonu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4).

Antalya ilinin Demre ilçesinden 2012 yılında örtü altı seracılık yapılan yerlerden 12, 2013 ve 2014 yıllarında 1’er örnek olmak üzere toplam 15 adet enfekteli bitki örneği alınmış olup DAS-ELISA testi sonunda 3 adet (% 20) ZYMV, 2 adet CMV (%13,3) ile enfeksiyon belirlenmiştir. Demre ilçesinden alınan örneklerde WMV, SqMV, PRSV ve CGMMV virüslerine rastlanmamıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Toplanan yerlere göre enfekteli örnek sayıları

Ankara ili	Toplam	ZYMV	WMV	CMV	PRSV	SqMV	CGMMV
Şereflikoçhisar	12	7	4	5	2	1	0
Beypazarı	37	11	11	1	2	0	6
Nallıhan	11	1	9	3	-	-	-
Çubuk	24	9	19	1	1	-	-
Gölbaşı	5	5	-	-	-	-	-
AÜZF	30	23	27	9	11	5	12
Kazan	2	2	-	-	-	-	-
Ayaş	7	2	5	-	3	-	-
Antalya ili							
Demre	15	3	-	2	-	-	-
Kumluca	18	9	11	2	-	-	-
Elmalı	45	12	28	7	-	-	2
Aksu	11	3	-				
Serik	11	-	-	6	-	-	-
Burdur ili	5	2	2	-	3	-	-
Toplam	233	89	116	36	22	6	20

Kumluca ilçesinden 2012 yılında kış döneminde örtü altı kabak yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlardan toplam 18 örnek alınmış ve bunlardan 9 adedi (%50) ZYMV, 11

adedi (%61,1) WMV ve 2 adedinde (%11,1) CMV virüslerine rastlanmıştır. Kumluca ilçesinden toplanan örneklerde, PRSV, SqMV ve CGMMV virüslerine rastlanmamıştır. Elmalı ilçesinin farklı köylerinden 2011 yılının yaz döneminde toplanan 45 enfekteli bitki örneğinin 12 tanesinde ZYMV, 28 tanesinde WMV ve 7 tanesinde CMV virüsleri tespit edilmiştir. Ayrıca Antalya ilinde sadece Elmalı ilçesinden 2 tane örnekte CGMMV ile enfekteli bitki tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5’de görüldüğü üzere enfekteli bitkilerde en fazla ZYMV+WMV ikili karışık enfeksiyonuna rastlanırken bunu CMV+WMV karışık enfeksiyonu takip etmektedir.

Çizelge 4.5 DAS-ELISA sonunda tespit edilen karışık enfeksiyonlar

	ZYMV + WMV	WMV+ CMV	ZYMV+ CMV+ PRSV	WMV + PRSV	ZYMV +CMV	ZYMV +WMV +PRSV	ZYMV+ WMV+ PRSV+ SqMV	WMV+ CMV+ ZYMV
Ankara ili								
Şereflikoçhisar	2	1	1				1	
Beypazarı	6			1				
Nallıhan		3						1
Çubuk	9	1		1				
Gölbaşı								
AÜZF		2			2	3		
Kazan								
Ayaş	1							
Antalya ili								
Demre								
Kumluca	7	1						1
Elmalı	4							2
Aksu								
Serik								
Burdur ili				1				
Toplam	25	8	1	2	2	3	1	3

4.3 RNA İzolasyonu ve RT-PCR Sonuçları

Moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere, RNA izolasyonu Astruc vd. (1996) yöntemine göre yapılmış olup elde edilen RNA'lar nanodrop ile ölçülmüş ve 500-600ng RNA konsantrasyonlarında çalışılmıştır. İzole edilen RNA'lar kullanılarak random heksamer primer ile komplementer DNA (cDNA) sentezlenmiş ve daha sonra protein gen bölgelerine spesifik olarak sentezlettirilen primer çiftleri ile PCR işlemine devam edilmiştir. RT-PCR işlemi sonunda P1, HC-Pro, P3, CI, NIb ve CP bölgeleri çoğaltılmıştır.

4.3.1 P1 protein gen bölgesi

Kabak sarı mozaik virüsü izolatlarının kodladığı genlerin diziliminin belirlenmesi ve moleküler karakterizasyonu konulu tez çalışmasında, filogenetik analiz için seçilen ZYMV izolatlarının 930 nükleotitten oluşan P1 protein gen bölgesinin çoğaltılmasında ZYMV'ye spesifik olan ve yaklaşık 1000 baz çifti (bç) büyüklüğünde bant veren P1-5' ve P1-3' primerleri kullanılmıştır. Spesifik primerlerle yapılan RT-PCR işlemi sonucunda elde edilen PCR ürünleri, %1,2'lik agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulmuş ve beklenen yaklaşık 1000 bç bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.6).

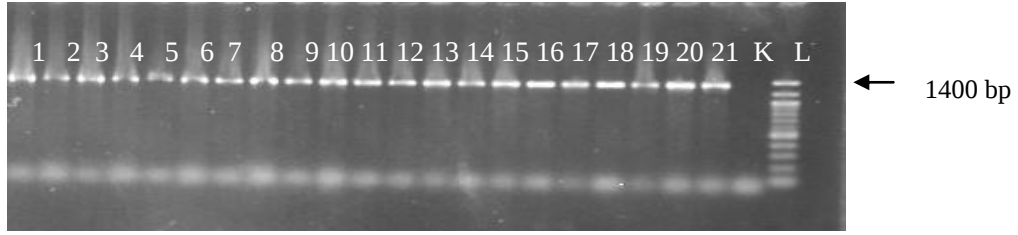


Şekil 4.6 P1-5' ve P1-3' ile RT-PCR ürünlerinin %1' lik agaroz jelde görünümü

L:100 bp ladder (NEB), K: Negatif kontrol, 1: C3, 2:C5, 3:C11, 4:C13, 5:C17, 6:C24, 7:BE5, 8:BE6, 9:BE7 10:BE10, 11:BE13, 12:BE15, 13:BE18, 14:BE22, 15:BE26, 16:BE27, 17:S1, 18:S3, 19:S5, 20:S8, 21:G1, 22:G2, 23:G3, 24:KZ1, 25:AHM1, 26:AYS7, 27:K3, 28:K17, 29:K13, 31:AS5, 32:AS6, 33:AS8, 34:AS11, 35:H1M, 36 Y4

4.3.2 HC-Pro gen bölgesi

Çalışmada kullanılan ZYMV izolatlarının HC-Pro gen bölgesinin çoğaltılması için HC-ZYMV-5' ve HC-ZYMV-3' primerleri kullanılmış olup RT-PCR işlemi sonunda, %1'lik agaroz jel ortamında yaklaşık 1400 bp büyüklüğünde PCR ürünü elde edilmiştir (Şekil 4.7).

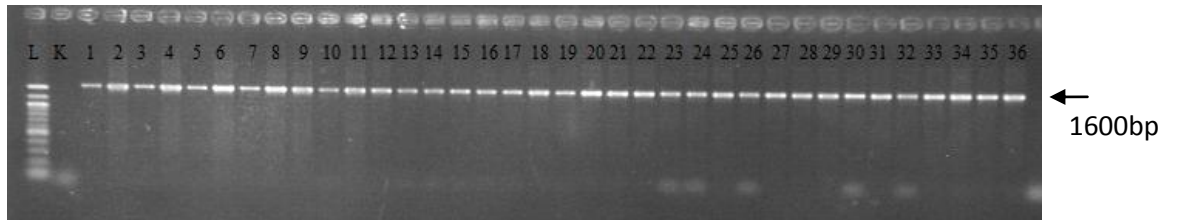


Şekil 4.7 HC-pro gen bölgesi ile elde edilen bantlar

L:100 bp ladder (NEB), K: Negatif kontrol, 1: C3, 2:C5, 3:C11, 4:C13, 5:C17, 6:C24, 7:BE5, 8:BE6, 9:BE7 10:BE10, 11:BE13, 12:BE15, 13:BE18, 14:BE22, 15:BE26, 16:BE27, 17:S1, 18:S3, 19:S5, 20:S8, 21:G1

4.3.3 P3 protein gen bölgesi

P3 protein bölgesinin çoğaltılması için HC-Pro bölgesinin C uç kısmını ve P3 protein gen bölgesinin N uç kısmını çoğaltan ZYMV-1500-5' ve ZYMV-3100-3' primerleri kullanılmış ve RT-PCR işlemi sonunda %1'lik agaroz jel ortamında yaklaşık 1600 baz çifti büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.8).

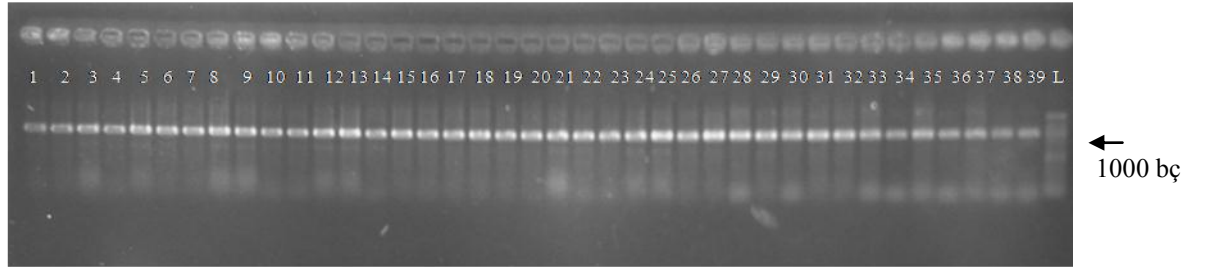


Şekil 4. 8 P3 protein gen bölgesi ile elde edilen bantla

L:100 bp ladder, K: Negatif kontrol, 1: C3, 2:C5, 3:C11, 4:C13, 5:C17, 6:C24, 7:BE5, 8:BE6, 9:BE7 10:BE10, 11:BE13, 12:BE15, 13:BE18, 14:BE22, 15:BE26, 16:BE27, 17:S1, 18:S3, 19:S5, 20:S8, 21:G1, 22:G2, 23:G3, 24:KZ1, 25:AHM1, 26:AYS7, 27:K3, 28:K17, 29:K13, 31:AS5, 32:AS6, 33:AS8, 34:AS11, 35:H1M, 36 Y4

4.3.4 CI protein gen bölgesi

Çalışmada kullanılan ZYMV izolatlarının CI protein gen bölgesinin çoğaltılmasında, CI bölgesinin kısmi bölgesini (N-terminal kısmı) (yaklaşık 1000 bp) çoğaltan ZY-debCI-5' ve ZY-milCI-3' primerleri kullanılmış ve RT-PCR işlemi sonunda %1'lik agaroz jel ortamında yaklaşık 1000 bç büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.9).

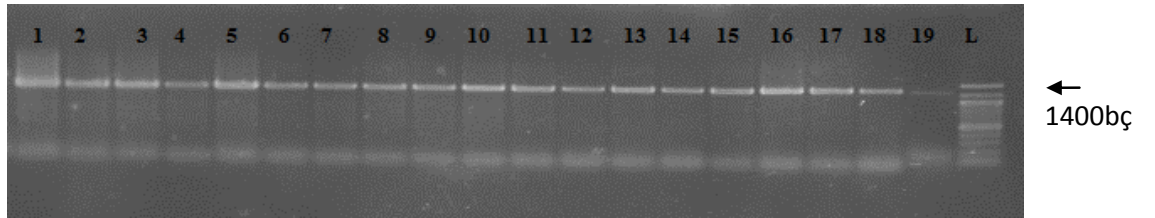


Şekil 4.9 CI protein bölgesi ile elde edilen bantlar.

L:100 bp ladder (NEB), K: Negatif kontrol, 1: C3, 2:C5, 3:C11, 4:C13, 5:C17, 6:C24, 7:BE5, 8:BE6, 9:BE7, 10:BE10, 11:BE13, 12:BE15, 13:BE18, 14:BE22, 15:BE26, 16:BE27, 17:S1, 18:S3, 19:S5, 20:S8, 21:G1, 22:G2, 23:G3, 24:KZ1, 25:AHM1, 26:AYS7, 27:K3, 28:K17, 29:K13, 31:AS5, 32:AS6, 33:AS8, 34:AS11, 35:H1M, 36 Y4, 37: BRD1, 38: BRD2, 39: AK 5/7

4.3.5 Nİb protein gen bölgesi

Dizi belirleme çalışmalarına kullanılan ZYMV izolatlarının Nİb protein gen bölgesinin çoğaltılması için ZY-finNİb-3' ve ZY-debNİb-5' primerleri kullanılmış ve RT-PCR işlemi sonunda %1'lik agaroz jel ortamında yaklaşık 1400 bç büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.10).

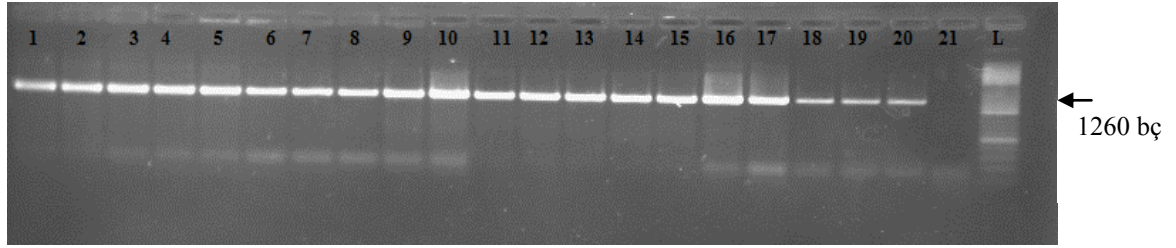


Şekil 4.10 Nİb protein bölgesi ile elde edilen bantlar

L:100 bp ladder(Promega), 1: C3, 2:C5, 3:C11, 4:C13, 5:C17, 6:C24, 7:BE5, 8:BE6, 9:BE7 10:BE10, 11:BE13, 12:BE15, 13:BE18, 14:BE22, 15:BE26, 16:BE27, 17:S1, 18:S3, 19:S5

4.3.6 CP gen bölgesi

Coat proteini oluşturan 837 nükleotitlik tüm protein gen bölgesini çoğaltmak için Nİb bölgesinin C uç kısmını ve CP bölgesinin tamamını çoğaltan ZYCP-F ve ZYCP-R primerleri kullanılmış ve RT-PCR işlemi sonunda %1'lik agaroz jel ortamında yaklaşık 1260 baz çifti büyüklüğünde elde edilen bantlar Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11 CP bölgesi ile elde edilen bantlar

L:100 bp ladder(Promega), 21: Negatif kontrol, 1: C3, 2:C5, 3:C11, 4:C13, 5:C17, 6:C24, 7:BE5, 8:BE6, 9:BE7 10:BE10, 11:BE13, 12:BE15, 13:BE18, 14:BE22, 15:BE26, 16:BE27, 17:S1, 18:S3, 19:S5, 20:S8, 21:G1, 22:G2, 23:G3, 24:KZ1, 25:AHM1, 26:AYS7, 27:K3, 28:K17, 29:K13, 31:AS5, 32:AS6, 33:AS8, 34:AS11, 35:H1M, 36 Y4, 37: BRD1 , 38: BRD2 , 39: AK 5/7

RT-PCR çalışmaları sonunda ZYMV'nin kodladığı protein gen bölgelerine spesifik olarak sentezlettirilen primerler ile P1, HC-Pro, P3, CI, Nİb ve CP bölgeleri çoğaltılmış ve elde edilen PCR ürünleri protein bölgelerinin diziliminin belirlenmesi için sekans analizine gönderilmiştir. Sekans analizi sonunda P1 (930 bç), HC-Pro (1368 bç) ve CP (837 bç) gen bölgelerinin tam sekansı elde edilmiş olup; P3, CI ve Nİb protein bölgelerinin kısmi sekansı belirlenmiştir.

Kabak sarı mozaik virüsü izolatlarının kodladığı genlerin diziliminin belirlenmesi ve moleküler karakterizasyonunu yapmak için protein gen bölgelerinin belirlenmesi çalışmalarında kullanılmak üzere izolatlar, farklı bölgeden birden fazla örnekle ve farklı konukçulardan olmasına dikkat edilerek RNA konsantrasyonu yüksek olan izolatlardan seçilmesine dikkat edilmiştir. İzolatların alındığı yer ve baz dizilimi elde edilen protein bölgeleri çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6 Çalışmada kullanılan izolatların alındığı yer ve baz dizilimi elde edilen protein bölgeleri

İZOLAT NO	İZOLAT KODU	ALINDIĞI İL	ALINDIĞI İLÇE	P1	HC PRO	P3	CI	NIB	CP
1	C3	Ankara	Çubuk	-	+	+	+	-	-
2	C5			+	+		+	+	+
3	C11			+	+	+	+	+	+
4	C13			+	+	+	+	+	+
5	C17			-	-	+	+		+
6	C24			-	-	-	+	-	-
7	BE5		Beypazarı	+	+	+	+	+	+
8	BE6			+	+	+	+	+	+
9	BE7			+	+	+	+	+	+
10	BE10			+	+	+	+	+	+
11	BE13			+	+	+	+	+	+
12	BE15			+	+	+	+	+	+
13	BE18			+	+	+	+	+	+
14	BE22			+	+	+	+	-	+
15	BE26			+	+	+	+	-	+
16	BE27				-	+	+	-	+
17	S1		Şereflikoçhisar	+	+	+	+	+	-
18	S3				+	+	+	+	-
19	S5			-	-	+	-	-	-
20	S8			+	+	+	+	+	+
21	G1		Gölbaşı	+	+	+	+	+	+
22	G2			+	+	+	+	+	+
23	G3			+	+	+	+	+	+
24	KZ1		Kazan	+	+	+	+	+	+
25	AHM1			+	+	+	+	+	+
26	DİD7		Ayaş	+	+	+	+	+	+
27	K3	Antalya	Kumluca	+	+	+	+	+	+
28	K17			+	+	+	+	+	+
29	K13			-	-	+	+	-	-
30	AS1		Aksu	-	+	+	+	-	+
31	AS5			-	+	+	+	+	+
32	AS6M	Antalya	Aksu	+	+	+	+	+	+
33	AS8			-	-	+	+	-	+
34	AS11			+	+	+	+	+	+
35	H1M		Demre	+	+	+	+	+	+
36	DEMRE			+	+	+	+	+	+
37	D14			+	+	+	+	+	+
38	E7		Elmalı	+	+	+	+	+	+
39	Y4			+	+	+	+	-	+
40	Y21			+	+	+	+	+	+
41	Y23			+	+	+	+	+	+
42	BRD1	Burdur	Burdur	+	+	+	+	+	+
43	BRD2			+	+	+	+	+	+
44	BRD4			+	+	+	+	+	+
45	AKS 2/5	Aksaray		+	+	+	+	+	+
46	AK 5/7			+	+	+	+	+	+
47	AK 6/2			+	+	+	+	+	+

Çizelge 4.6 Çalışmada kullanılan izolatların alındığı yer ve baz dizilimi elde edilen protein bölgeleri (devam)

İZOLA T NO	İZOLAT İSMİ	ALINDIĞI İL	ALINDIĞI İLÇE	P1	HC PRO	P3	CI	NIB	CP
48	KAR 15/1	Karaman		+	+	+	+	+	+
49	KAR12/4			+	+	+	+	+	+
50	A3/1	Konya	Merkez	+	+	+	+	+	+
51	ER 2/8		Ereğli	+	+	+	+	+	+
52	YUN 8/4		Yunak	+	+	+	-	-	+
53	ER 6/8		Ereğli	+	+	+	+	+	+

(-) Olanlar çoğaltılamamıştır.

4.4 Filogenetik Analiz Çalışmaları

Ülkemizin farklı kabakgil üretim alanlarından elde edilen ZYMV izolatlarının birbirleriyle ve Dünya'daki diğer sekanslarla olan genetik ilişkisini belirlemek amacıyla 53 izolatın, P1, HC-Pro, P3, CI, Nib, ve CP protein gen bölgelerine ait nükleotit ve amino asit dizileri kullanılarak filogenetik analizler yapılmıştır.

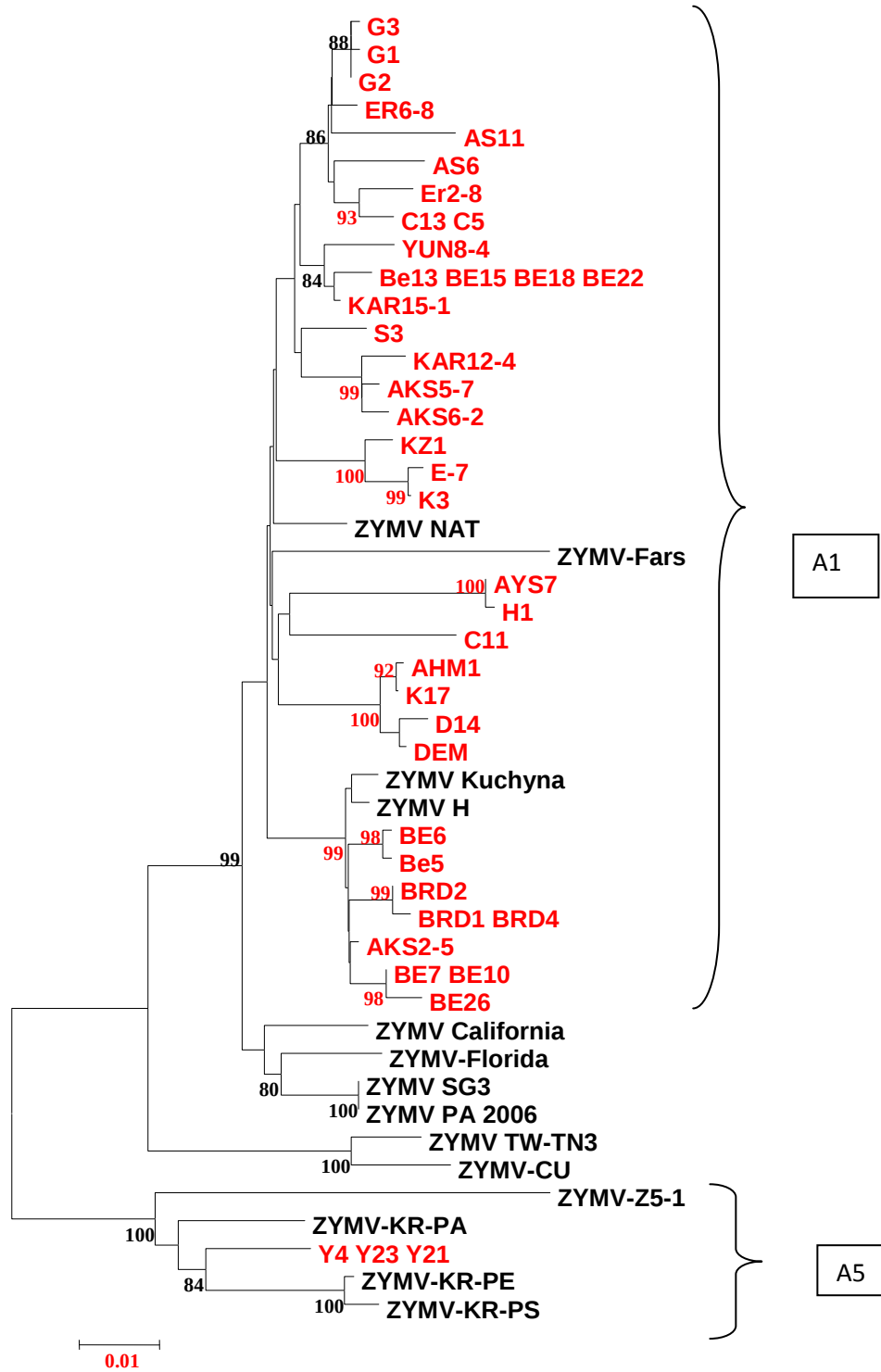
RT-PCR sonunda pozitif sonuç veren örnekler sekans analizine gönderilmiş ve elde edilen sekans dizilimi Choromas programı kullanılarak baştaki ve sondaki istenmeyen kısımları kesilmiştir. Bir örnek için forward ve reverse olarak elde edilen çift yönlü veriler “CAP3 Sequence Assembly” Programı kullanılarak birleştirilmiş ve ortak dizilim (consensus) elde edilmiştir. Tüm izolatlardan elde edilen consensus veriler, MEGA6 programı kullanılarak NCBI Gen bankasında daha önceden depolanmakta olan referans ZYMV sekansları ile karşılaştırılması yapılmış ve her protein gen bölgesi için MEGA 6 programında Neighbor Joining yöntemi ve 1000 tekrarlı bootstrap değeri kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Protein gen bölgeleri ile oluşturulan filogenetik ağaçlar ve karşılaştırmalar aşağıda değerlendirilmiştir. Sekans karşılaştırmalarında referans olarak kullanılan sekanslar ve Genbankası erişim numaraları çizelge 4.7’de verilmektedir. Referans izolatlar daha önce literatürde gruptandırılan ZYMV izolatlarının her bir grup ve alt grubu temsil edecek şekilde tüm genom sekansına sahip olan izolatlardan seçilmiştir. Daha önceki yapılan çalışmalarda

ZYMV izolatları üç ana gruba ayrılmış olup Reunion adasından ve Martinik adasından alınan izolatlar grup dışı bırakıldığı için çalışmada referans olarak kullanılmamıştır.

Çizelge 4.7 Referans izolatların erişim numaraları ve bulundukları alt gruplar

Referans ismi	Erişim numarası	Grup	Ülke
ZYMV KUCHNA	DQ124239	A1	Slovakya
ZYMV-NAT	EF062582	A1	İsrail
ZYMV-FARS	JN183062	A1	Fars
ZYMV- H	KF976712	A1	Çek Cumhuriyeti
ZYMV-Florida	L35590	A3	Florida
ZYMV-California	L31350	A2	California
TW-TN3	AF127929	A6	Tayvan
ZYMV-SG3	KC665633	A2	USA
ZYMV_PA_2006	JQ716413	A2	USA
ZYMV-CU	AJ307036	A6	Çin
ZYMV-Z5-1	AB188115	A5	Japonya
ZYM-KR-PA	AY278998	A5	Kore
ZYMV-KR-PS	AY279000	A5	Kore
ZYMV-KR-PE	AY278999	A5	Kore
ZYMV- AG	EF062583	A1	İsrail
ZYMV-RDA	AB369279.	A5	Güney kore
ZYMV-ADANA	JF317296	A1	Türkiye
VE10-160	JX310115	A1	Venezuela
VE10-129	JX310103	A1	Venezuela
ZYMV -AHLAT	JF317297	A1	Türkiye
TN TNV CUCU 2	KJ866939	A1	Hindistan
ZYMV-Liaocheng	EF122498	A4	Çin
ZYMV-CO5-205	JN861008	A4	Fransa

4.4.1 P1 Gen Bölgesi ile Filogenetik Analiz Sonuçları



Şekil 4.12 P1 protein gen bölgesi ile elde edilen filogenetik ağaç
Bu çalışmada elde edilen izolatlar kırmızı renk ile genbank veritabanından alınan izolatlar siyah renk ile gösterilmiştir. %80 üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmektedir.

Farklı kabakgil bitkilerinden elde edilen ZYMV izolatlarının moleküler çeşitliliği farklı protein gen bölgelerine spesifik primerlerle çoğaltılan cDNA'ların dizilenmesiyle belirlenmiştir. Sekans analizleri izolatlar arasında yüksek oranda nükleotit çeşitliliği olduğunu göstermiştir. Türkiye ZYMV izolatlarının dünyanın çeşitli ülkelerinden daha önceden karakterize edilen ZYMV izolatları ile olan ilişkilerini açıklamak ve aralarındaki genetik farklılığı tanımlamak için sekans analizleri yapılmıştır.

P1 gen bölgesinin sekans dizilimi çizelge 4.7'de yer alan, daha önceden NCBI veri tabanlarında depolanmakta olan A1 alt grubunda olan ZYMV-NAT, ZYMV-FARS, ZYMV KUCHNA, ZYMV-H, A5 alt grubundan ZYMV-KR-PS, ZYMV-KR-PE, ZYM-KR-PA, A3 grubunda yer alan ZYMV-California, ZYMV-Florida ve A6 alt grubunda yer alan TW-TN3 referans izolatları ile karşılaştırılması yapılmıştır.

Çalışmada kullandığımız Ankara, Antalya, Burdur, Konya, Aksaray ve Karaman illerinden toplam 41 adet ZYMV izolatının P1 protein bölgelerinin 930 nükleotitten oluşan 310 amino asitlik full sekansları, gen bankasından elde edilen 12 adet ZYMV izolatının sekansları ile MEGA6 programı kullanılarak karşılaştırılması yapılmış ve P1 gen bölgesine ait filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 4.12).

Nükleotit sekans karşılaştırmaları ile elde edilen filogenetik ağacı incelediğimizde, P1 protein bölgesine göre izolatlar 3 ana grup oluşturmuştur. Şekil 4.14'de görüldüğü üzere, çalışmada kullandığımız izolatların çoğunluğu Dünya'da ve Avrupa'da en yaygın grup olan A1 grubunda yer almıştır. A1 grubu içinde de izolatlar farklı dallanmalar göstermiş olup BE5, BE6, BRD1, BRD2, BRD4, AKS2-5, BE7, BE10, BE26 izolatları Slovakya izolatı olan Kuchyna ile aynı kümede yer almışlardır. Yine AYS7, H1M, C11, AHM1, K17, D14 VE DEM izolatları ZYMV-Fars izolatı ile aynı alt kümede yer alırken, G1, G2, G3, ER6-8, AS6, AS11, ER2-8, C5, C13, YUN8-4, BE13, BE15, BE18, BE22, KAR15-1, S3, KAR12-4, AKS5-7, AKS6-2, KZ1, E-7, K3 izolatları ise ZYMV-NAT izolatı ile aynı alt kümede yer almışlardır (Şekil 4.14). P1 gen bölgesinin ZYMV izolatları arasında çok yüksek değişkenliğe sahip olduğu nükleotit ve amino asit karşılaştırmalarında görülmektedir (Şekil 4.12).

Elmalı ilçesinden gelen Y4, Y21 ve Y23 izolatlarının P1 protein gen bölgeleri A5 altgrubunda yer alan Kore izolatları olan RDA ile %98 ve ZYMV KR-PE ve ZYMV KR-PS izolatları ile %97 oranında benzerlik göstermiştir. ZYMV KR-PE ve ZYMV KR-PS ile filogenetik ağaçta % 84 bootstrap değeri ile aynı dallanmaya sahiptirler. Bu izolatlar A1 grubunda yer alan izolatlarla %93'den daha düşük oranlarda benzerlik oranına sahip olup filogenetik ağaçta A1 altgrubundan farklı bir dallanma göstermişlerdir (Şekil 4.12). CP gen bölgesi ile oluşturulan filogenetik ağaçta A4 grubunda yer alan referans izolatların P1 protein gen bölgesine ait sekans bilgileri bulunmadığı için bu izolatlarla karşılaştırılması yapılamamıştır.

P1 protein gen bölgesinin nükleotit dizilimi kullanılarak oluşturulan protein dizilimi ve referans izolatlarla olan karşılaştırması MEGA 6 bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.8'de gösterilmektedir.

P1 protein karşılaştırmaları

Çizelge 4.8 P1 protein gen bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları

#ZYMV_Kuchyna	MASIMIGSIS	VPITKTEQCA	NTQVSNRVNI	VAPGHMATCP	LPLKTHMYR	HESKK	[55]
#ZYMV_NAT		...A.....					[55]
#ZYMV-Fars		...A.....			P.P.....		[55]
#ZYMV_H							[55]
#ZYMV_california		...A.....	A..				[55]
#ZYMV_SG3		...A.....					[55]
#ZYMV-FLORDA		...A..K..					[55]
#ZYMV_PA_2006	.?.....	?..A??...					[55]
#ZYMV_TW-TN3	...V.....	...AQPA.Y.	...A.....		P.....T...		[55]
#ZYMV-CU	...V.....	...AQPA.Y.	...A.....		P.....T...		[55]
#ZYMV-KR-PA	V.	...A.PA...	...A.G..S.		..S.....		[55]
#ZYMV-KR-PE	V.	...A.SA..V	...A.S..S.		R....		[55]
#ZYMV-KR-PS	V.	...A.SA..V	...A.S..S.		R....		[55]
#ZYMV-Z5-1		...A.PA...	...A.S..G.		..S...T...		[55]
#AKS2-5							[55]
#AHM1		...A.....					[55]
#AKS5-7		...A.....					[55]
#AS6		...A.....					[55]
#AS11		...A.....	V	..S.....			[55]
#BE6			...I.....				[55]
#BE7_BE10							[55]
#BE13_15_18_22		...A.....					[55]
#BE26							[55]
#AKS6-2		...A.....	...A.....				[55]
#ER6-8		...A.....					[55]
#BRD2			V				[55]
#BRD1_BRD4			V				[55]
#C11		..T.A.....			..R.....		[55]
#AYS7		..L.A.....S			..P.....T..		[55]
#E-7		...A.....					[55]
#H1		..L.A.....S			..P.....T..		[55]
#K3		...A.....					[55]
#K17		...A.....					[55]
#KAR15-1		...A.....					[55]
#KZ1		...A.....					[55]
#G2		...A.....			F..		[55]
#G3		...A.....			F..		[55]
#D14		...A.....					[55]
#Be5			...I.....				[55]
#S3		...A.....			I...		[55]
#YUN8-4		..F..A.N...			..R.....		[55]
#KAR12-4		...A.....					[55]
#G1		...A.....			F..		[55]
#DEM		...A.....					[55]
#Y4_Y23_Y21		...A.PA...	...A.S..S.		P.....		[55]
#Er2-8		..F..AE			P.....		[55]
#C13_C5		..L..AE	...N.....		P.....		[55]

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.8 P1 protein gen bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları (devam)

#ZYMV_Kuchyna	LMQSNKSIDI	LNNFFSTDEM	KFRLTRNEMS	KVKKGPSGEI	ILRKPSKQRV	FARIE	[110]
#ZYMV_NAT		..H.....			V.....		[110]
#ZYMV-Fars	...Q.....				...A.....		[110]
#ZYMV_H							[110]
#ZYMV_california				.L.....	V.....		[110]
#ZYMV_SG3					V.....		[110]
#ZYMV-FLORDA					V.....		[110]
#ZYMV_PA_2006				?	???		[110]
#ZYMV_TW-TN3					V...N.....		[110]
#ZYMV-CU					V...N.....		[110]
#ZYMV-KR-PA				N.....			[110]
#ZYMV-KR-PE		S.....			V.....		[110]
#ZYMV-KR-PS		S.....			V.....		[110]
#ZYMV-Z5-1		N.....		N.....			[110]
#AKS2-5							[110]
#AHM1					V.....		[110]
#AKS5-7					V.....		[110]
#AS6				S.....	V.....		[110]
#AS11	N.....				V.....		[110]
#BE6					V.....		[110]
#BE7_BE10		N.....					[110]
#BE13_15_18_22					V.....		[110]
#BE26		N.....					[110]
#AKS6-2					V.....		[110]
#ER6-8					V.....		[110]
#BRD2				S.....			[110]
#BRD1_BRD4				S.....	V.....		[110]
#C11		N.....			V.....		[110]
#AYS7			I.....	N.....	V.....	T.....	[110]
#E-7				S.....	V.....		[110]
#H1			I.....	N.....	V.....	T.....	[110]
#K3				S.....	V.....		[110]
#K17					V.....		[110]
#KAR15-1					V.....		[110]
#KZ1				S.....	V.....		[110]
#G2					V.....		[110]
#G3					V.....		[110]
#D14							[110]
#Be5							[110]
#S3					V.....		[110]
#YUN8-4					V.....		[110]
#KAR12-4				N.....	V.....		[110]
#G1					V.....		[110]
#DEM							[110]
#Y4_Y23_Y21				S.....	V.....		[110]
#Er2-8					V.....		[110]
#C13_C5					V.....		[110]

Pozitif seleksiyon bölgesi

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.8 P1 protein gen bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları (devam)

#ZYMV_Kuchyna	QDEAARKEEA	VFLEGNYYDS	ITNIARVLPP	EVTHNV	DVSL	RSPFYKRTYK	KERKT	[165]
#ZYMV_NAT								[165]
#ZYMV-Fars	..K.S.....	..N.....	..Y.....	T K.....				[165]
#ZYMV_H								[165]
#ZYMV_california			..L.....	A.....			...K	[165]
#ZYMV_SG3		..N.....	..I.L.....				...K	[165]
#ZYMV-FLORDA	K.T		..L.....		T.S.....		...K	[165]
#ZYMV_PA_2006		..N.....	..I.L.....				...K	[165]
#ZYMV_TW-TN3							...K	[165]
#ZYMV-CU			S.....				...K	[165]
#ZYMV-KR-PA	..K.....		..TLEGI..S	..R.....			...R	[165]
#ZYMV-KR-PE			..TLKS...S	..RD G...			...R	[165]
#ZYMV-KR-PS			..TLKS...S	..RD G...			...R	[165]
#ZYMV-Z5-1	H.....		..TLES...S	..R...G...			...R	[165]
#AKS2-5								[165]
#AHM1	...V.....			..D.....				[165]
#AKS5-7		..F.....		..Y.....				[165]
#AS6		..F.....		..E.....	H.....			[165]
#AS11		..F.....	..C.....					[165]
#BE6	..G.....							[165]
#BE7_BE10								[165]
#BE13_15_18_22		..F.....	..S.....					[165]
#BE26								[165]
#AKS6-2	C.....	..F.....		..Y.....				[165]
#ER6-8		..F.....E.....						[165]
#BRD2								[165]
#BRD1_BRD4	..N.....							[165]
#C11	..N..T.....		L.....		C.....			[165]
#AYS7			II.....					[165]
#E-7	..E.....	L.....						[165]
#H1			II.....					[165]
#K3	..E.....	L.....						[165]
#K17	...V.....			..D.....				[165]
#KAR15-1		..F.....						[165]
#K21	..E.....K.....			..A.....				[165]
#G2		..F.....						[165]
#G3		..F.....						[165]
#D14	...V...K.....			..DI.....				[165]
#Be5	..G.....							[165]
#S3		..F.....		G...A.....				[165]
#YUN8-4							...P	[165]
#KAR12-4		..F.....		..Y.....			...R	[165]
#G1		..F...V.....						[165]
#DEM	...V...K.....			..D.....				[165]
#Y4_Y23_Y21			..TLES...S	..RD.....	C.....		...R	[165]
#Er2-8		..F.....						[165]
#C13_C5		..F.....						[165]

Pozitif seleksiyon bölgesi

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.8 P1 protein gen bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları (devam)

#ZYMV_Kuchyna	VAQKQIVQAP	LNSLCTRVLK	IAFN	R	NIPVD	IIGNKKARHT	LTFKRFRGCF	VGKVS	[220]
#ZYMV_NAT					E				[220]
#ZYMV-Fars		A.....			E	...S.....	...K.....		[220]
#ZYMV_H					E				[220]
#ZYMV_california					E	M.....T...			[220]
#ZYMV_SG3	T.				E	M.....	...K...Y.		[220]
#ZYMV-FLORDA					E	M.....	...Y.		[220]
#ZYMV_PA_2006	?...?				E	M.....	...K...Y.		[220]
#ZYMV_TW-TN3	.V...T.L.				E	M.....	...Y.		[220]
#ZYMV-CU	.V...T...	A...			E	M.....	...Y.		[220]
#ZYMV-KR-PA	.V.....	I.		D	E	M.....K.	...E...Y.		[220]
#ZYMV-KR-PE	S	I.			E	M.....K.	...L...N.		[220]
#ZYMV-KR-PS	S	I.			E	M.....K.	...N.		[220]
#ZYMV-Z5-1	.V.....	...G...I.			E	M...R...K.			[220]
#AKS2-5		I.....			E				[220]
#AHM1				R	E	V.....			[220]
#AKS5-7	T.				E				[220]
#AS6		...S.....			E				[220]
#AS11	H.	...N.....			E				[220]
#BE6					E				[220]
#BE7_BE10					E	...K.....			[220]
#BE13_15_18_22					E				[220]
#BE26					E	...K...N.....			[220]
#AKS6-2	T.				E				[220]
#ER6-8					E				[220]
#BRD2					E				[220]
#BRD1_BRD4					E				[220]
#C11					E	...K.....	...L.....		[220]
#AYS7		...N.....			E				[220]
#E-7	M...	...N.....		R	E	...I.....			[220]
#H1		...N.....			E				[220]
#K3	M...			R	E	...I.....			[220]
#K17				R	E	V.....			[220]
#KAR15-1					E				[220]
#KZ1				R	F	E			[220]
#G2					E				[220]
#G3					E				[220]
#D14				R	E				[220]
#Be5					E				[220]
#S3					E				[220]
#YUN8-4					E				[220]
#KAR12-4	T.				E				[220]
#G1					E				[220]
#DEM				R	E				[220]
#Y4_Y23_Y21		I.....			E	M.....K.	...H.....		[220]
#Er2-8					E				[220]
#C13_C5		...R.....			E	...K.....			[220]

Pozitif seleksiyon

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.8 P1 protein gen bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları (devam)

#ZYMV_Kuchyna	VAHEE	GRMRH	TEMSYKQFKW	ILKAICQVTH	TKRICEEDIK	PGCSGW	VLGT	NHTLT	[275]
#ZYMV_NAT			E.....		..EQ.....				[275]
#ZYMV-Fars			E..E.....		..E.....		..D.....		[275]
#ZYMV_H			E.....						[275]
#ZYMV_california			E.....	L.....	..E..R.....				[275]
#ZYMV_SG3			E.....		..E..R.....				[275]
#ZYMV-FLORDA		...R.....	E.....		..E..R.....				[275]
#ZYMV_PA_2006			E.....		..E..R.....				[275]
#ZYMV_TW-TN3			E.....		..E..R.....				[275]
#ZYMV-CU			E.....		..E..R.....				[275]
#ZYMV-KR-PA			E.....		..E..R.....				[275]
#ZYMV-KR-PE			E.....		..E..R.....				[275]
#ZYMV-KR-PS			E.....		..E..R.....				[275]
#ZYMV-Z5-1			E..R.....	..Q...H..Y	..E..R.....		I...I..		[275]
#AKS2-5			E.....						[275]
#AHM1			E.....		..E..R.....				[275]
#AKS5-7			E.....	...V.....	..E.....				[275]
#AS6	..S.....	..S.....	E.....		..D.....				[275]
#AS11			E.....		..EQ.....				[275]
#BE6			E.....		R.....				[275]
#BE7_BE10			E.....						[275]
#BE13_15_18_22			E.....		..E.....				[275]
#BE26			E.....						[275]
#AKS6-2			E.....	...V.....	..E.....				[275]
#ER6-8			E.....		..E.....				[275]
#BRD2			E.....						[275]
#BRD1_BRD4			E.....						[275]
#C11			E.....		..E.....	L.....			[275]
#AYS7			E.....		..E.....		...A.....		[275]
#E-7			E.....	..R.....	..E.....				[275]
#H1			E.....		..E.....		...A.....		[275]
#K3			E.....	..R.....	..E.....				[275]
#K17			E.....		..E.....				[275]
#KAR15-1			E.....		..E.....				[275]
#KZ1			E.....	..R.....	..E.....				[275]
#G2			E.....		..E.....				[275]
#G3			E.....		..E.....				[275]
#D14			E.....		..E.....				[275]
#Be5			E.....		R.....				[275]
#S3			E.....		..E.....				[275]
#YUN8-4			E.....		..E.....				[275]
#KAR12-4			E.....	...V.....	..E.....				[275]
#G1			E.....		..E.....				[275]
#DEM			E.....		..E.....				[275]
#Y4_Y23_Y21			E.....	..Q.....	..E..R.....		..D...A.....		[275]
#Er2-8			E.....		..E.....				[275]
#C13_C5	...A.....		E.....		..E.....				[275]

Proteaz aktivitesi

Serin tipi proteaz

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.8 P1 protein gen bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları (devam)

#ZYMV_Kuchyna	KRYSRL	HLV	IRGR	DDDGIV	NALEPVLFYS	EVDHY	[310]
#ZYMV_NAT							[310]
#ZYMV-Fars							[310]
#ZYMV_H							[310]
#ZYMV_california					Q.....	S	[310]
#ZYMV_SG3					Q.....	D.....	[310]
#ZYMV-FLORDA					Q.....		[310]
#ZYMV_PA_2006					Q.....	D.....	[310]
#ZYMV_TW-TN3							[310]
#ZYMV-CU							[310]
#ZYMV-KR-PA							[310]
#ZYMV-KR-PE							[310]
#ZYMV-KR-PS							[310]
#ZYMV-Z5-1	.K.....						[310]
#AKS2-5							[310]
#AHM1		V.....					[310]
#AKS5-7							[310]
#AS6							[310]
#AS11							[310]
#BE6							[310]
#BE7_BE10							[310]
#BE13_15_18_22							[310]
#BE26							[310]
#AKS6-2							[310]
#ER6-8							[310]
#BRD2							[310]
#BRD1_BRD4			K.....				[310]
#C11		Y.....					[310]
#AYS7							[310]
#E-7							[310]
#H1							[310]
#K3							[310]
#K17		V.....					[310]
#KAR15-1							[310]
#KZ1							[310]
#G2							[310]
#G3							[310]
#D14		V.....					[310]
#Be5	.K.....						[310]
#S3							[310]
#YUN8-4							[310]
#KAR12-4							[310]
#G1							[310]
#DEM		V.....					[310]
#Y4_Y23_Y21							[310]
#Er2-8	..H.....						[310]
#C13_C5							[310]

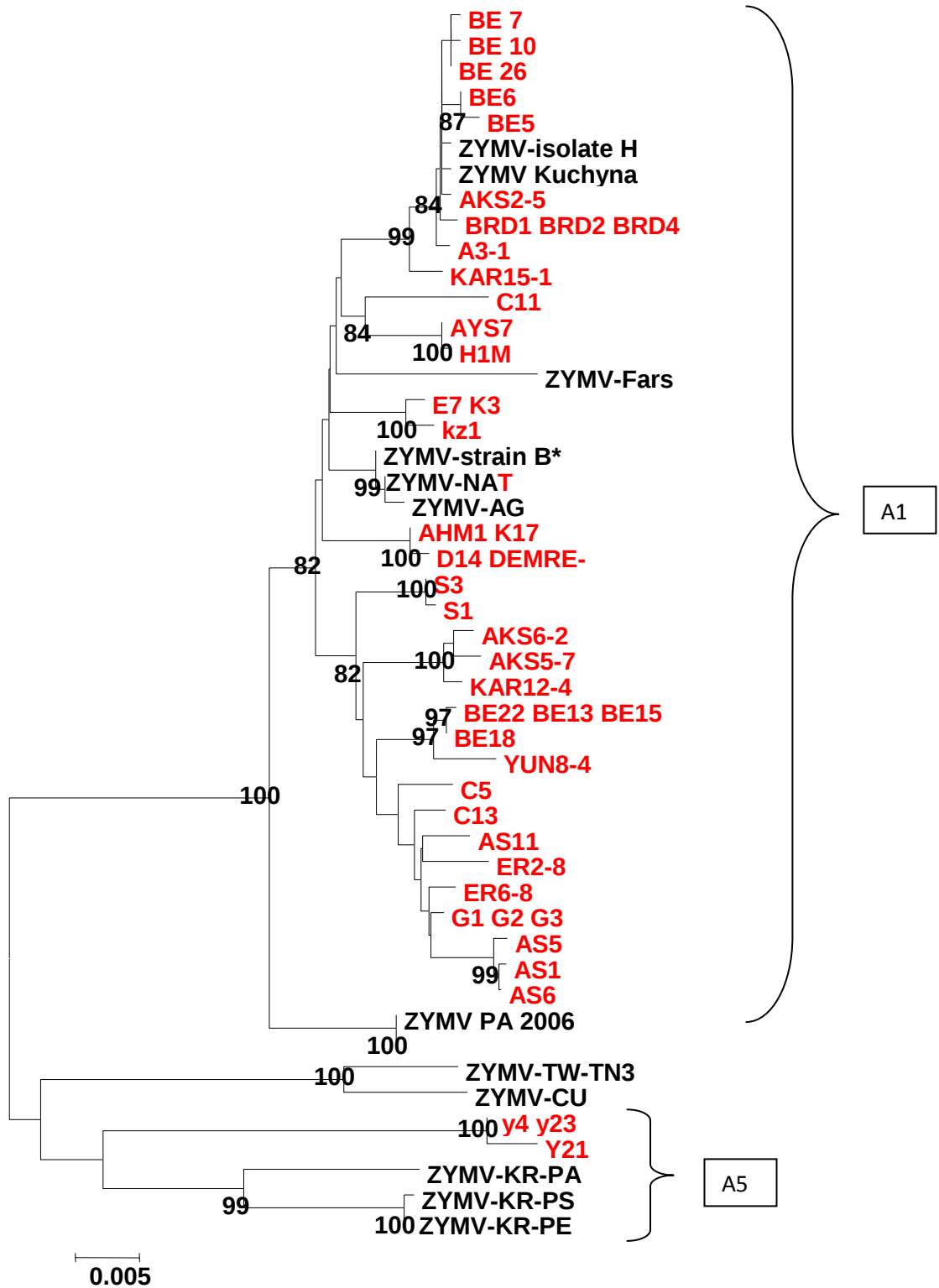
Potyviruslerde korunmuş bölge (Verchot vd. 1991)

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

P1 proteinin yüksek oranda protein değişikliği içerdiği ve P1 protein bölgesinin HC-Pro ve P3 proteinlerine göre daha az korunmuş olduğu görülmektedir. Proteinin N-terminal kısmının daha değişken ve C uç kısmının daha korunmuş olduğu sonuçlardan elde edilmektedir. Benzer sonuçları Wisler vd. (1995) yaptıkları çalışmada da bildirmişlerdir. P1 protein C-terminal uç bölgesinin, otokatalitik açılmadan sorumlu olan serin tipi proteaz motifinin (GCSG) korunmuş olduğu görülmektedir. P1 ve HC-Pro arasında otokatalitik açılmanın gerçekleştiği “VDHY/SSQ” bölgesinin tüm ZYMV izolatlarında korunduğu anlaşılmaktadır. Yine proteaz aktivitesine sahip histidine (HEE) motifinin C5 ve C13 izolatlarında glutamat (E) amino asitinin alanin (A) ile yer değiştirdiği görülmektedir (izelge 4.8).

Bilgisayar analizleri sonunda, IFEL sonuçlarına göre, P1 protein bölgesinde pozitif seleksiyon alanları bulunmuştur (izelge 4.8). Bu alanlardaki nükleotitlerde meydana gelen mutasyonların, baz dizilimindeki amino asiti değiştirdiği ve değişimin virüsün gen ifadesini olumlu yönde etkilediği belirtilmektedir.

4.4.2 HC-Pro ile yapılan filogenetik analiz sonuçları



Şekil 4.13 HC-Pro ile elde edilen filogenetik ağaç

Bu çalışmada elde edilen isolatlar kırmızı renk ile genbank veritabanından alınan isolatlar siyah renk ile gösterilmiştir. %80 üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmektedir.

Çalışmada kullanılan 41 adet ZYMV izolatının HC-Pro bölgesinin 1368 nükleotit ve 456 amino asitten oluşan tam sekansı çıkartılmış ve referans izolatlarla karşılaştırılması MEGA 6 programı kullanılarak yapılmıştır.

Şekil 4.14'te görüldüğü üzere, ZYMV izolatlarının HC-Pro bölgesinin nükleotit dizilimine göre yapılan filogenetik ağaçta, izolatlar 3 ana grup oluşturmuşlar ve çalışmada kullandığımız izolatların çoğunluğu A1 altgrubunda yer alırken üç tane Elmalı izolatı olan Y4, Y21 ve Y23 izolatlarının HC-Pro bölgelerinin sekansı Kore izolatları olan ZYMV KR-PS, KR-PE ve KR-PA izolatlarının yer aldığı A5 altgrubunda görülmektedir. A1 grubu içinde yer alan izolatlar BE5, BE6, BE7, BE10, BE26, AKS2-5, BRD1, BRD2, BRD4 ve KAR15-1 Slovak izolatı olan Kuchyna ile aynı altgrupta yer alırken, C11, H1M ile AYS7, KZ1 ile E7 ve D14 ile AHM (KZN)1 kendi aralarında dallanma gösterip ZYMV-NAT izolatı ile benzerlik göstermişlerdir. S3, AKS6-2, KAR12-4, BE18, BE22, BE13, BE15, YUN8-4, C5, C3, ER2-8, AS11, AS6, G1, G2, G3, ER6-8 izolatları ZYMV-Fars ve ZYMV-NAT izolatından farklı bir dallanma göstermiştir (Şekil 4.13).

Sekans sonunda elde edilen dizilim MEGA 6 programında temizlendikten sonra DAMBE programı kullanılarak benzer sekansa sahip olan izolatlar tek bir konsensus olarak değerlendirilmiştir. DAMBE analizi sonunda HC-Pro bölgesine göre; çalışmada kullandığımız Beypazarı izolatı olan BE13 ile BE15 izolatları, Gölbaşı izolatları olan G1 ile G3 izolatları, Burdur izolatları olan BRD1 ile BRD4 ve Aksaray izolatı olan AKS2-5, referans izolat olan ZYMV-H ile aynı sekans dizilimi göstermiş olup tek bir konsensus olarak değerlendirilmiştir. P1 protein bölgesine göre aynı dizilime sahip olan Elmalı izolatları (Y4, Y21 ve Y23) HC-pro bölgesine göre değerlendirildiğinde farklı dizimlere sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.13).

HC-Pro bölgesinin nükleotit dizilimi kullanılarak oluşturulan protein dizilimi ve referans izolatlarla olan karşılaştırması MEGA 6 bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.9'da gösterilmektedir.

HC-Pro protein karşılaştırmaları

Çizelge 4.9 HC-Pro bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları

#ZYMV_Kuchyna	SSQPEVQFFQ	GWRRMFDKFR	PSPDHVCKVD	HNNEECGELA	AIFCQALFPV	VKLSC	[55]
#ZYMV-NAT			..L.....				[55]
#ZYMV-Fars					.V.....		[55]
#ZYMV-TW-TN3		L.		Y.....	.T.....		[55]
#ZYMV_PA_2006							[55]
#ZYMV_H							[55]
#ZYMV_CU				Y.....	.T.....		[55]
#ZYMV-KR-PA					.T.....		[55]
#ZYMV-KR-PE		E..					[55]
#ZYMV-KR-PS		E..					[55]
#AKS2-5							[55]
#AKS5-7			..T.....		.T.....		[55]
#AS6			..T.....		.T.....		[55]
#AS11			..T.....		.T.....		[55]
#be6							[55]
#BE7							[55]
#BE10							[55]
#BE13			..T.....		.T.....		[55]
#BE15			..T.....		.T.....		[55]
#BE18			..T.....		.T.....		[55]
#BE22			..T.....		.T.....		[55]
#BE26							[55]
#AKS6-2			..T.....		.T.....		[55]
#ER6-8			..T.....		.T.....		[55]
#BRD1_BRD2_BRD4							[55]
#C11					.F.....		[55]
#AYS7							[55]
#H1							[55]
#E7_K3							[55]
#AHM1_K17			..S.....				[55]
#KAR15-1							[55]
#KZ1							[55]
#Y4_Y23		L.					[55]
#G2_G3			..T.....		.T.....		[55]
#BE5							[55]
#S3			..T.....		.T.....		[55]
#C13			..T.....		.T.....		[55]
#YUN8-4			..T.....		.T.....		[55]
#KAR12-4			..T.....		.T.....		[55]
#G1			..T.....		.T.....		[55]
#D14_DEM			..S.....				[55]
#Y21		L.					[55]
#ER2-8			..T.....		.T.....		[55]
#C5			..T.....		.T.....		[55]

Pozitif seleksiyon

Afitle taşınma

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.9 HC-Pro bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları (devam)

#ZYMV_Kuchyna	QTCRGKLSRV	SFEEFKDSIN	ANFIHKDEW	NSPKES	SHYD	NVFKLIKVAT	QATQN	[110]
#ZYMV-NAT	...E.....			D.....	..I.....			[110]
#ZYMV-Fars	...E.....			D.....	..I.....			[110]
#ZYMV-TW-TN3	...E.....		..T.....	DN.....	..Q..	..I.....		[110]
#ZYMV_PA_2006	...E.....			G.....	..Q..	..I.....		[110]
#ZYMV_H	...E.....							[110]
#ZYMV_CU	..R.EG....			DN.....	..QH..	..I.....		[110]
#ZYMV-KR-PA	...E.....			D.....		..I.....		[110]
#ZYMV-KR-PE	...E.....			D.....	D.....	..I.....		[110]
#ZYMV-KR-PS	...E.....			D.....	D.....	..I.....		[110]
#AKS2-5	...E.....							[110]
#AKS5-7	...E.....		..N.....	D.....	S.....	..I.....	..V...	[110]
#AS6	...E.....			D.....	S.....	..I.....	..V...	[110]
#AS11	...E.....			D.....	S.....	..I.....	..V...	[110]
#be6	...E.....							[110]
#BE7	...E.....							[110]
#BE10	...E.....							[110]
#BE13	...E.....		..T.....	DN.....	S.....	..I.....	..V...	[110]
#BE15	...E.....		..T.....	DN.....	S.....	..I.....	..V...	[110]
#BE18	...E.....			DN.....	S.....	..I.....	..V...	[110]
#BE22	...E.....		..T.....	DN.....	S.....	..I.....	..V...	[110]
#BE26	...E.....							[110]
#AKS6-2	...E.....			D.....	K.....	..I.....	..V...	[110]
#ER6-8	...E.....			D.....	S.....	..I.....	..V...	[110]
#BRD1_BRD2_BRD4	...E.....							[110]
#C11	...E.....			D.....		..I.....		[110]
#AYS7	...E.....			D.....		..I.....		[110]
#H1	...E.....			D.....		..I.....	..P...	[110]
#E7_K3	...E.....		V.....	D.....	K.....	..I.....		[110]
#AHM1_K17	...E.....			D.....		..I.....		[110]
#KAR15-1	...E.....							[110]
#KZ1	...E.....		V.....	D.....		..I.....		[110]
#Y4_Y23	...E.....			D.....		G...		[110]
#G2_G3	...E.....			D.....	S.....	..I.....	..V...	[110]
#BE5	...E.....							[110]
#S3	...E.....			D.....	S.....	..I.....		[110]
#C13	...E.....			D.....	S.....	..I.....	..V...	[110]
#YUN8-4	...E.....			DN.....	S.....	..I.....	..V...	[110]
#KAR12-4	...E.....			D.....	S.....	..I.....	..V...	[110]
#G1	...E.....			D.....	S.....	..I.....	..V...	[110]
#D14_DEM	...E.....			D.....		..I.....		[110]
#Y21	...K..NK..		..N...	D.....		G...		[110]
#ER2-8	...E.....			D.....	S.....	..I.....	..V...	[110]
#C5	...E.....			D.....	S.....	..I.....	..V...	[110]

Pozitif seleksiyon

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.9 HC-Pro bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları
(devam)

#ZYMV_Kuchyna	LKLSSEVMKL	AQNHTSTHMK	QIQDINKALM	KGSLVTQDEL	DLALKQLEEM	TQWFK	[165]
#ZYMV-NAT	V.....						[165]
#ZYMV-Fars	V.....						[165]
#ZYMV-TW-TN3	V.....					R	[165]
#ZYMV_PA_2006	V..?.....						[165]
#ZYMV_H	Y.....						[165]
#ZYMV_CU	V.....						[165]
#ZYMV-KR-PA	V.....	V.....					[165]
#ZYMV-KR-PE	V.....	V.....					[165]
#ZYMV-KR-PS	V.....	V.....					[165]
#AKS2-5							[165]
#AKS5-7	V.....					A....	[165]
#AS6	V.....					A....	[165]
#AS11	V.....					A....	[165]
#be6							[165]
#BE7							[165]
#BE10							[165]
#BE13	V.....					A....	[165]
#BE15	V.....					A....	[165]
#BE18	V.....					A....	[165]
#BE22	V.....					A....	[165]
#BE26							[165]
#AKS6-2	V.....					A....	[165]
#ER6-8	V.....					A....	[165]
#BRD1_BRD2_BRD4							[165]
#C11	V.....						[165]
#AYS7	V.....						[165]
#H1	V.....						[165]
#E7_K3	V.....					L....	[165]
#AHM1_K17	V.....						[165]
#KAR15-1							[165]
#KZ1	V.....	L.....				L....	[165]
#Y4_Y23	V.....						[165]
#G2_G3	V.....					A....	[165]
#BE5							[165]
#S3	V.....					A....	[165]
#C13	V.....					A....	[165]
#YUN8-4	V.....					A....	[165]
#KAR12-4	V.....					A....	[165]
#G1	V.....					A....	[165]
#D14_DEM	V.....						[165]
#Y21	V.....						[165]
#ER2-8	V.....					A....	[165]
#C5	V.....					A....	[165]

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.9 HC-Pro bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları (devam)

#ZYMV_Kuchyna	NHMHLTGEEA	LKMF	FRNK	ESS	KAMINPSLLC	DNQLDKNGNF	VWGERGYHSK	RLFKN	[220]
#ZYMV-NAT									[220]
#ZYMV-Fars									[220]
#ZYMV-TW-TN3									[220]
#ZYMV_PA_2006							R		[220]
#ZYMV_H									[220]
#ZYMV_CU				N					[220]
#ZYMV-KR-PA									[220]
#ZYMV-KR-PE									[220]
#ZYMV-KR-PS									[220]
#AKS2-5									[220]
#AKS5-7									[220]
#AS6									[220]
#AS11									[220]
#be6									[220]
#BE7									[220]
#BE10									[220]
#BE13									[220]
#BE15									[220]
#BE18									[220]
#BE22									[220]
#BE26									[220]
#AKS6-2									[220]
#ER6-8									[220]
#BRD1_BRD2_BRD4									[220]
#C11									[220]
#AYS7									[220]
#H1									[220]
#E7_K3									[220]
#AHM1_K17									[220]
#KAR15-1									[220]
#KZ1									[220]
#Y4_Y23									[220]
#G2_G3									[220]
#BE5									[220]
#S3									[220]
#C13									[220]
#YUN8-4									[220]
#KAR12-4									[220]
#G1									[220]
#D14_DEM									[220]
#Y21									[220]
#ER2-8									[220]
#C5									[220]

Simptomatoloji (Gal-on ve Raccah 2000)

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.9 HC-Pro bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları (devam)

#ZYMV_Kuchyna	FFEEVIPSEG	YTKYVVRNFP	NGTRKLAIGS	LIVPLNLDRA	RIALLGESIE	KKPLT	[275]
#ZYMV-NAT					.T.....		[275]
#ZYMV-Fars					.T.....		[275]
#ZYMV-TW-TN3					.T.....		[275]
#ZYMV_PA_2006					.T.....		[275]
#ZYMV_H							[275]
#ZYMV_CU					.T.....		[275]
#ZYMV-KR-PA					.T.....		[275]
#ZYMV-KR-PE					.T.....N..		[275]
#ZYMV-KR-PS					.T.....N..		[275]
#AKS2-5							[275]
#AKS5-7					.T.....		[275]
#AS6					.T.....		[275]
#AS11					.T.....		[275]
#be6							[275]
#BE7							[275]
#BE10							[275]
#BE13					.T.....		[275]
#BE15					.T.....		[275]
#BE18					.T.....		[275]
#BE22					.T.....		[275]
#BE26							[275]
#AKS6-2					.T.....		[275]
#ER6-8		.R.....			.T.....		[275]
#BRD1_BRD2_BRD4							[275]
#C11					.T.....		[275]
#AYS7					.T.....		[275]
#H1					.T.....		[275]
#E7_K3					.T.....		[275]
#AHM1_K17					.T.....		[275]
#KAR15-1					.T.....		[275]
#KZ1					.T.....		[275]
#Y4_Y23					.T.....		[275]
#G2_G3					.T.....		[275]
#BE5							[275]
#S3					.T.....		[275]
#C13					.T.....		[275]
#YUN8-4					.T.....		[275]
#KAR12-4					.T.....		[275]
#G1					.T.....		[275]
#D14_DEM					.T.....		[275]
#Y21					.T.....		[275]
#ER2-8					.T.....		[275]
#C5					.T.....		[275]

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.9 HC-Pro bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları
(devam)

#ZYMV_Kuchyna	SACVSQQNGN	YIHS	CCCV	VTM	DDGTPMYSEL	KSP	TKRHLVI	GASGDPKYID	LPTSE	[330]
#ZYMV-NAT									..A..	[330]
#ZYMV-Fars									..A..	[330]
#ZYMV-TW-TN3	K.....								..A..	[330]
#ZYMV_PA_2006							?		..A..	[330]
#ZYMV_H										[330]
#ZYMV_CU									..A..	[330]
#ZYMV-KR-PA									..A..	[330]
#ZYMV-KR-PE									..A..	[330]
#ZYMV-KR-PS									..A..	[330]
#AKS2-5										[330]
#AKS5-7									..A..	[330]
#AS6									..A..	[330]
#AS11									..A..	[330]
#be6										[330]
#BE7										[330]
#BE10										[330]
#BE13									..A..	[330]
#BE15									..A..	[330]
#BE18									..A..	[330]
#BE22									..A..	[330]
#BE26										[330]
#AKS6-2									..A..	[330]
#ER6-8									..A..	[330]
#BRD1_BRD2_BRD4										[330]
#C11									..A..	[330]
#AYS7									..A..	[330]
#H1									..A..	[330]
#E7_K3									..A..	[330]
#AHM1_K17									..A..	[330]
#KAR15-1										[330]
#KZ1									..A..	[330]
#Y4_Y23									..A..	[330]
#G2_G3									..A..	[330]
#BE5										[330]
#S3									..A..	[330]
#C13									..A..	[330]
#YUN8-4									..A..	[330]
#KAR12-4									..A..	[330]
#G1									..A..	[330]
#D14_DEM									..A..	[330]
#Y21									..A..	[330]
#ER2-8	..S..								..A..	[330]
#C5									..A..	[330]

Afitle taşınmada rol oynayan motifler (Huet vd. 1994)

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.9 HC-Pro bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları
(devam)

#ZYMV_Kuchyna	AERMYIAKEG YCYLNIFLAMLVNVNENEAK DFTKMIRDVL IPMLGQWPSL MDVAT	[385]
#ZYMV-NAT		[385]
#ZYMV-Fars		[385]
#ZYMV-TW-TN3		[385]
#ZYMV_PA_2006	?	[385]
#ZYMV_H		[385]
#ZYMV_CU	 V	[385]
#ZYMV-KR-PA		[385]
#ZYMV-KR-PE		[385]
#ZYMV-KR-PS		[385]
#AKS2-5		[385]
#AKS5-7		[385]
#AS6		[385]
#AS11		[385]
#be6		[385]
#BE7		[385]
#BE10		[385]
#BE13		[385]
#BE15		[385]
#BE18		[385]
#BE22		[385]
#BE26		[385]
#AKS6-2		[385]
#ER6-8		[385]
#BRD1_BRD2_BRD4		[385]
#C11		[385]
#AYS7		[385]
#H1		[385]
#E7_K3		[385]
#AHM1_K17		[385]
#KAR15-1		[385]
#KZ1		[385]
#Y4_Y23		[385]
#G2_G3		[385]
#BE5		[385]
#S3		[385]
#C13		[385]
#YUN8-4		[385]
#KAR12-4		[385]
#G1		[385]
#D14_DEM		[385]
#Y21		[385]
#ER2-8		[385]
#C5		[385]

Proteaz motifi

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.9 HC-Pro bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları
(devam)

#ZYMV_Kuchyna	AAYILGVFHP	ETRCALPRI	LVDHATQTMH	VIDSYGSLTV	GYHVLKAGTV	NHLIQ	[440]
#ZYMV-NAT							[440]
#ZYMV-Fars							[440]
#ZYMV-TW-TN3			R....				[440]
#ZYMV_PA_2006							[440]
#ZYMV_H							[440]
#ZYMV_CU							[440]
#ZYMV-KR-PA							[440]
#ZYMV-KR-PE							[440]
#ZYMV-KR-PS							[440]
#AKS2-5							[440]
#AKS5-7							[440]
#AS6							[440]
#AS11							[440]
#be6							[440]
#BE7							[440]
#BE10							[440]
#BE13							[440]
#BE15							[440]
#BE18							[440]
#BE22							[440]
#BE26							[440]
#AKS6-2							[440]
#ER6-8							[440]
#BRD1_BRD2_BRD4							[440]
#C11							[440]
#AYS7							[440]
#H1							[440]
#E7_K3							[440]
#AHM1_K17							[440]
#KAR15-1							[440]
#KZ1							[440]
#Y4_Y23							[440]
#G2_G3							[440]
#BE5							[440]
#S3							[440]
#C13							[440]
#YUN8-4							[440]
#KAR12-4							[440]
#G1							[440]
#D14_DEM							[440]
#Y21							[440]
#ER2-8							[440]
#C5							[440]

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.9 HC-Pro bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları
(devam)

#ZYMV_Kuchyna	FASNDLQSEM KHYRVG	[456]
#ZYMV-NAT	M.....	[456]
#ZYMV-Fars		[456]
#ZYMV-TW-TN3		[456]
#ZYMV_PA_2006		[456]
#ZYMV_H		[456]
#ZYMV_CU		[456]
#ZYMV-KR-PA		[456]
#ZYMV-KR-PE		[456]
#ZYMV-KR-PS		[456]
#AKS2-5		[456]
#AKS5-7		[456]
#AS6		[456]
#AS11		[456]
#be6		[456]
#BE7		[456]
#BE10		[456]
#BE13	D.....	[456]
#BE15		[456]
#BE18		[456]
#BE22		[456]
#BE26		[456]
#AKS6-2		[456]
#ER6-8		[456]
#BRD1_BRD2_BRD4		[456]
#C11		[456]
#AYS7		[456]
#H1		[456]
#E7_K3		[456]
#AHM1_K17		[456]
#KAR15-1		[456]
#KZ1		[456]
#Y4_Y23		[456]
#G2_G3		[456]
#BE5		[456]
#S3		[456]
#C13		[456]
#YUN8-4	.V.....	[456]
#KAR12-4		[456]
#G1		[456]
#D14_DEM		[456]
#Y21		[456]
#ER2-8		[456]
#C5		[456]

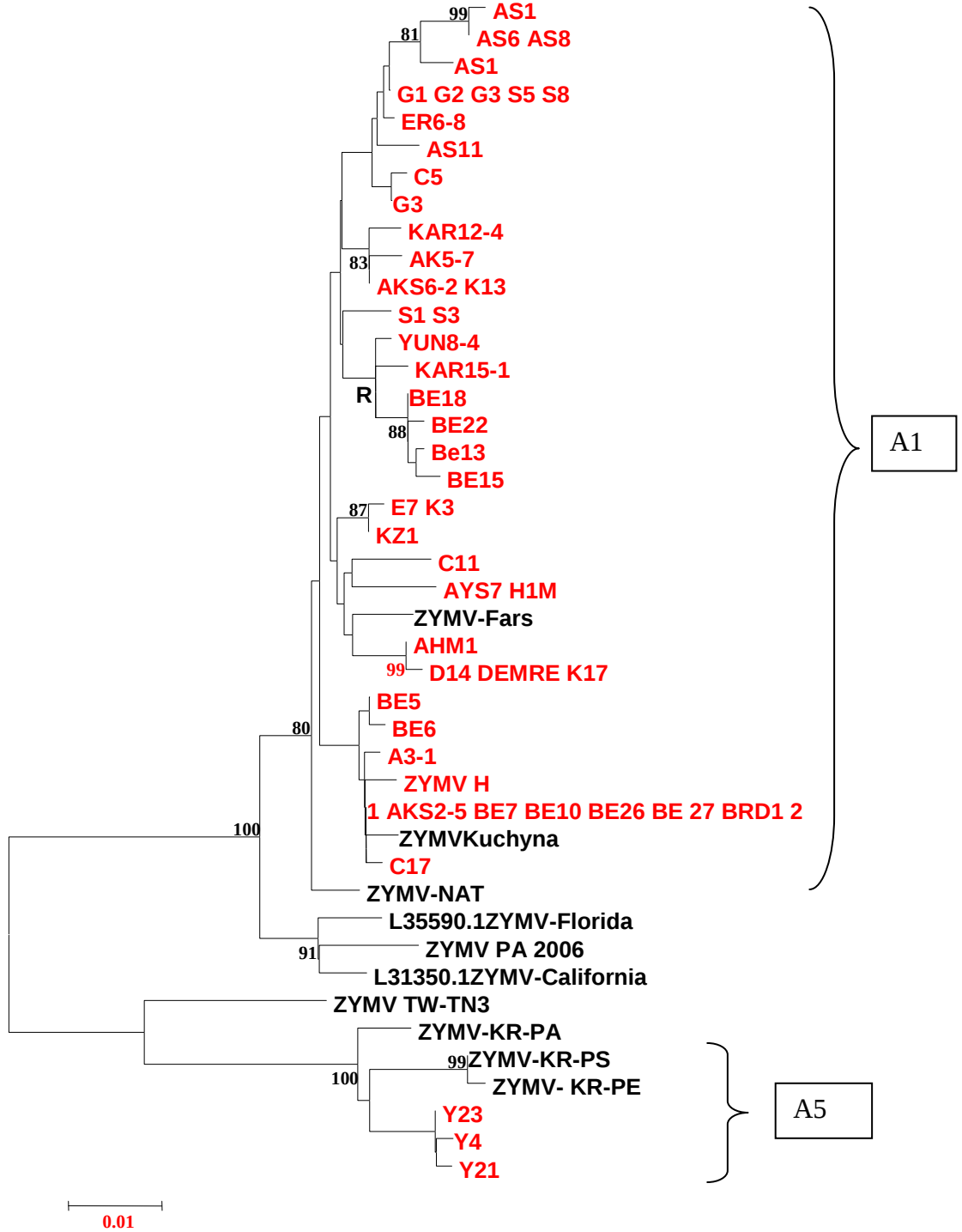
Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

HC-Pro bölgesinin nükleotit dizilimi kullanılarak oluşturulan protein dizilimi ve referans izolatlarla yapılan karşılaştırmasına baktığımız zaman, afitle taşınmadan sorumlu olan motiflerin çalışmada kullanılan tüm izolatlarda korunduğu görülmektedir. HC-Pro bölgesinin taşınmadan sorumlu olduğu ileri sürülen N-terminal kısmının değişken olduğu, merkezi ve C-terminal uç kısmının ise daha korunmuş olduğu çizelge 4.9’da görülmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız izolatların HC-Pro bölgesinde KLSC ve PTK motiflerinin korunduğu görülmektedir (Çizelge 4.9). Afitlerin ağız parçaları ile interaksiyonunda HC-Pro N-terminal uç bölgesinin rol oynadığı (Desbiez 2001) bildirilmiştir. PTK motifindeki mutasyonlar sonucu taşınmada ve HC-Pro’nin virionlara yapışmasında azalma olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada kullandığımız izolatların ve referans izolatların HC-Pro bölgesini incelediğimizde N-terminal uç bölgesinin değişken olduğu ve C-terminal uç bölgesinin daha korunmuş olduğu görülmektedir (Çizelge 4.9). CP bölgesinde korunmuş olan DAG motifi ile PTK motifinin etkileşiminin taşınma için gerekli olduğu rapor edilmiştir (Desbiez 2003).

Çizelge 4.9’da görüldüğü üzere Potyvirusler arasında korunmuş olan ve proteinaz fonksiyonu olan “GYCY” motifinin korunduğu görülmektedir.

4.4.3 P3 Bölgesi ile filogenetik analiz sonuçları



Şekil 4.14 P3 protein bölgesi ile elde edilen filogenetik ağaç

Bu çalışmada elde edilen izolatlar kırmızı renk ile genbank veritabanından alınan izolatlar siyah renk ile gösterilmiştir. %80 üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmektedir.

Çalışmada kullanılan 53 ZYMV izolatının, P3 protein bölgesinin, 525 nükleotitten oluşan 195 amino asitlik kısmi bölgesi sekanslanmış ve MEGA6 programında sekans karşılaştırmaları yapılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur. P3 protein bölgesinin kısmi sekansı kullanılarak oluşturulan filogenetik ağacı incelediğimizde, çalışmada kullandığımız izolatların büyük çoğunluğu A1 altgrubunda küme oluşturmuşlardır. Yine Antalya ilinin Elmalı ilçesinden alınan Y4, Y21 ve Y23 izolatları bu gruptan ayrı bir grupta (A5) yer alan Kore izolatları ile aynı kümeyi oluşturmuştur (Şekil 4.14).

DAMBE programında P3 protein bölgesine göre Aksu izolatı olan AS6 ile AS8, Gölbaşı izolatları olan G1, G2, G3 ile Şereflikoçhisar izolatları olan S5 ve S8 izolatları , Beypazarı izolatları olan BE7, BE10, BE26, BE27 ve Burdur izolatları olan BRD1, BRD2, BRD4 izolatları ile Aksaray izolatı olan AKS2-5 benzer sekans dizilimi göstermişlerdir. Aynı şekilde AKS6-2 ile K13, S1 ile S3, E7 ile K3, AYS7 ile H1 ve D14, DEMRE ile K17 izolatları benzer dizilime sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.14).

P1 gen bölgesine göre aynı dizilime sahip olan Elmalı izolatları (Y4, Y21 ve Y23), HC-pro bölgesinde de olduğu gibi farklı dizimlere sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.14).

P3 gen bölgesinin nükleotit dizilimi kullanılarak oluşturulan protein dizilimi ve referans izolatlarla olan protein karşılaştırması MEGA6 bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.10'da gösterilmektedir.

P3 protein bölgesi amino asit karşılaştırmaları

Çizelge 4.10 P3 protein gen bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları

#ZYMV_Kuchyna	GTPTQRIKLE	EQLIKGIFKP	KLMMQLLHDD	PYILLGGMIS	PTILVHMYRM	RHFER	[55]
#ZYMV-Fars							[55]
#ZYMV_PA_2006							[55]
#ZYMV_H							[55]
#ZYMV-NAT							[55]
#ZYMV-KR-PA							[55]
#ZYMV-KR-PS	.A.....						[55]
#ZYMV-strain_KR-PE	.A.....						[55]
#L35590.1ZYMV-florida							[55]
#L31350ZYMV_California							[55]
#ZYMV_TW-TN3							[55]
#A3-1							[55]
#AHM1				I.....	I.....		[55]
#AK5-7							[55]
#AS1		E.....					[55]
#AS5							[55]
#AS6_AS8							[55]
#AS11							[55]
#BE5							[55]
#BE6							[55]
#Be13							[55]
#BE15							[55]
#BE18							[55]
#BE22			I.....				[55]
#BRD1_BRD2_BRD4							[55]
#AKS2-5_BE7							[55]
#BE10_BE26_BE27							[55]
#C5							[55]
#C11	..S.....						[55]
#C13							[55]
#C17		N.....					[55]
#ER6-8							[55]
#AYS7_H1M							[55]
#E7_K3	H.....						[55]
#AKS6-2_K13							[55]
#D14_DEMRE_K17	R.....			I.....	I.....		[55]
#KAR12-4							[55]
#KAR15-1							[55]
#YUN8-4							[55]
#KZ1							[55]
#S1_S3							[55]
#G1_G2_G3_S5_S8							[55]
#Y4							[55]
#Y21							[55]
#Y23							[55]

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.10 P3 protein gen bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları (devam)

#ZYMV_Kuchyna	GIEVWIKRDH EIGKIFVILE QLTRKVALAE VLVDQLNLIS EASPHLLEIM KGCQD	[110]
#ZYMV-Fars		[110]
#ZYMV_PA_2006	...I.....F....R....	[110]
#ZYMV_H		[110]
#ZYMV-NAT		[110]
#ZYMV-KR-PA	...I.....D....	[110]
#ZYMV-KR-PS	...I.....I....D....L....	[110]
#ZYMV-strain_KR-PE	...I.....I....D....L....	[110]
#L35590.1ZYMV-florida	...I.....	[110]
#L31350ZYMV_California	...I.....	[110]
#ZYMV_TW-TN3	...I.....D....	[110]
#A3-1		[110]
#AHM1		[110]
#AK5-7		[110]
#AS1		[110]
#AS5		[110]
#AS6_AS8		[110]
#AS11		[110]
#BE5		[110]
#BE6		[110]
#Be13		[110]
#BE15		[110]
#BE18		[110]
#BE22		[110]
#BRD1_BRD2_BRD4		[110]
#AKS2-5_BE7		[110]
#BE10_BE26_BE27		[110]
#C5		[110]
#C11		[110]
#C13		[110]
#C17		[110]
#ER6-8		[110]
#AYS7_H1M		[110]
#E7_K3		[110]
#AKS6-2_K13		[110]
#D14_DEMRE_K17		[110]
#KAR12-4		[110]
#KAR15-1		[110]
#YUN8-4		[110]
#KZ1		[110]
#S1_S3		[110]
#G1_G2_G3_S5_S8		[110]
#Y4	...I.....D....	[110]
#Y21	...I.....D....	[110]
#Y23	...I.....D....	[110]

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.10 P3 protein gen bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları (devam)

#ZYMV_Kuchyna	NQRAYVPALD	LLTIQVEREF	SNKELKTNGY	PDLQQTLFDM	REKMYAKQLH	NSWQE	[165]
#ZYMV-Fars					N.....		[165]
#ZYMV_PA_2006		...??...					[165]
#ZYMV_H					K.....		[165]
#ZYMV-NAT							[165]
#ZYMV-KR-PA					...I.....		[165]
#ZYMV-KR-PS					...I.....		[165]
#ZYMV-strain_KR-PE					...I.....		[165]
#L35590.1ZYMV-florida							[165]
#L31350ZYMV_California							[165]
#ZYMV_TW-TN3						.A...	[165]
#A3-1							[165]
#AHM1							[165]
#AK5-7							[165]
#AS1					W.....		[165]
#AS5					N.....		[165]
#AS6_AS8					W.....		[165]
#AS11							[165]
#BE5							[165]
#BE6							[165]
#Be13					W.....		[165]
#BE15					W.....		[165]
#BE18					W.....		[165]
#BE22					W.....		[165]
#BRD1_BRD2_BRD4							[165]
#AKS2-5_BE7							[165]
#BE10_BE26_BE27							[165]
#C5							[165]
#C11							[165]
#C13							[165]
#C17							[165]
#ER6-8							[165]
#AYS7_H1M							[165]
#E7_K3							[165]
#AKS6-2_K13							[165]
#D14_DEMRE_K17							[165]
#KAR12-4							[165]
#KAR15-1							[165]
#YUN8-4							[165]
#KZ1							[165]
#S1_S3						.A...	[165]
#G1_G2_G3_S5_S8							[165]
#Y4					...I.....		[165]
#Y21					...I.....	..G..	[165]
#Y23					...I.....		[165]

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.10 P3 protein gen bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları (devam)

#ZYMV_Kuchyna	LSLLEKSCVT	VR	LK	Q	F	S	I	F	T	ERNLIQRAKE	[195]
#ZYMV-Fars											[195]
#ZYMV_PA_2006										T.....	[195]
#ZYMV_H											[195]
#ZYMV-NAT										E.	[195]
#ZYMV-KR-PA											[195]
#ZYMV-KR-PS											[195]
#ZYMV-strain_KR-PE											[195]
#L35590.1ZYMV-florida											[195]
#L31350ZYMV_California											[195]
#ZYMV_TW-TN3											[195]
#A3-1											[195]
#AHM1											[195]
#AK5-7											[195]
#AS1											[195]
#AS5											[195]
#AS6_AS8											[195]
#AS11											[195]
#BE5											[195]
#BE6											[195]
#Be13											[195]
#BE15											[195]
#BE18											[195]
#BE22											[195]
#BRD1_BRD2_BRD4											[195]
#AKS2-5_BE7											[195]
#BE10_BE26_BE27											[195]
#C5											[195]
#C11											[195]
#C13											[195]
#C17											[195]
#ER6-8											[195]
#AYS7_H1M										V..	[195]
#E7_K3											[195]
#AKS6-2_K13											[195]
#D14_DEMRE_K17											[195]
#KAR12-4											[195]
#KAR15-1											[195]
#YUN8-4											[195]
#KZ1											[195]
#S1_S3											[195]
#G1_G2_G3_S5_S8											[195]
#Y4											[195]
#Y21											[195]
#Y23											[195]

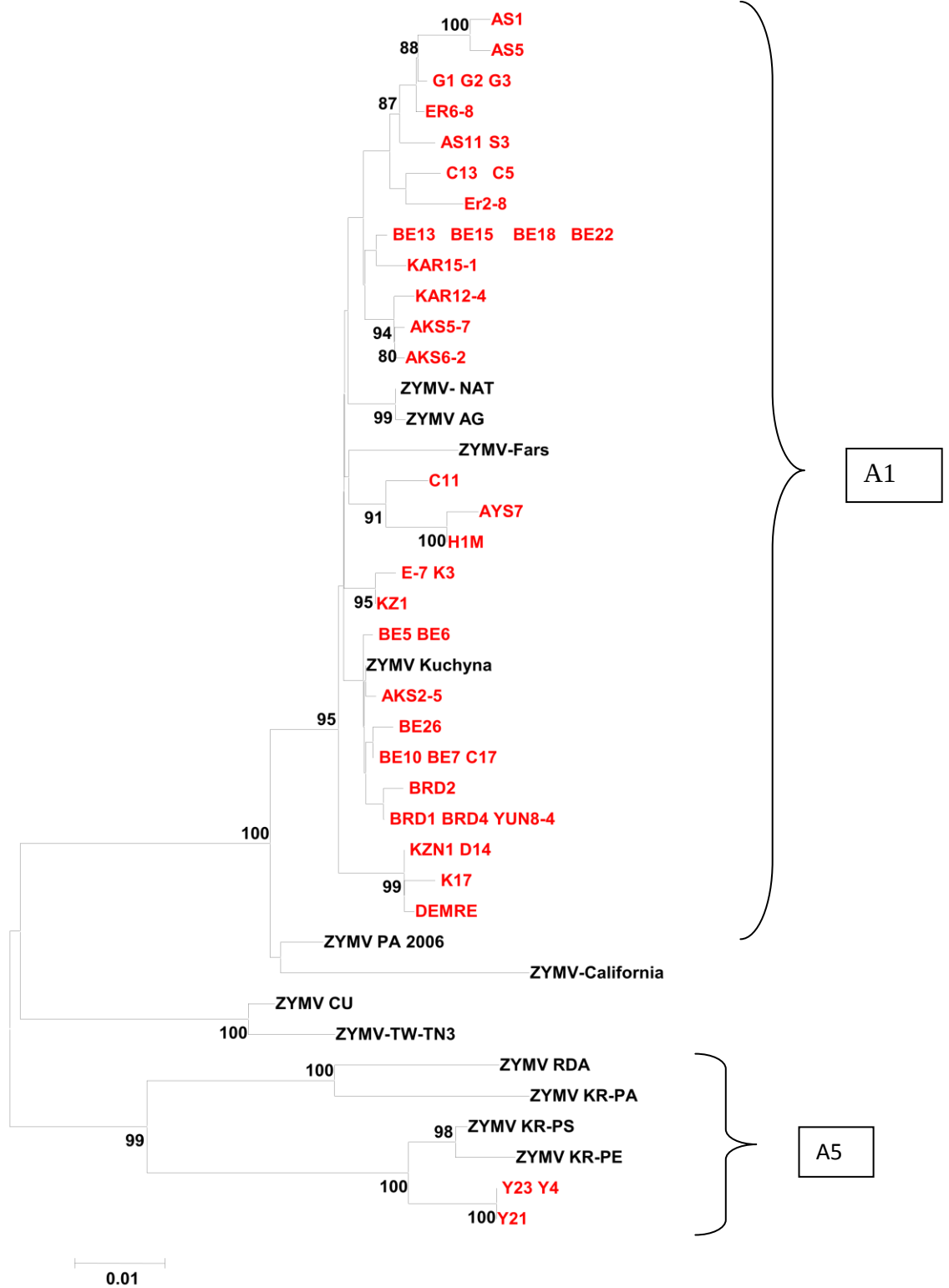
Pozitif seleksiyon

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

P3 protein bölgesinin RT-PCR ile çoğaltılan bölgesinin sekans analizi sonucunda 195 amino asitlik kısmi bölgesi, gen bankasından elde edilen referans sekanslar ile karşılaştırılmıştır. P3 protein bölgesi ile yapılan protein karşılaştırmalarında, bu bölgenin amino asitlerinin çok fazla değişmediği fakat virüsün patojenisitesinde rol oynayan “MREK” motifinde mutasyonların olduğu görülmektedir. Ankara ilinin Beypazarı ilçesinden izole edilen BE13, BE15, BE18, BE22 ve Antalya ilinin Aksu ilçesinden elde edilen AS1, AS6, AS8 izolatlarında MREK motifinde arginin (R) amino asiti, triptofan (W) amino asiti (MWEK) ile yer değiştirmiştir. AS5 izolatında ise arginin (R) amino asiti, asparagin (N) amino asiti (MNEK) ile yer değiştirmiştir. Bu mutasyon referans olarak kullandığımız Fars izolatı ile benzerlik göstermektedir (Çizelge 4.10).

Yapılan bilgisayar analizi sonucunda, 180. amino asit bölgesinde yer alan amino asit değişimi pozitif seleksiyon olarak bulunmuştur (Çizelge 4.10). Bu bölgede yer alan glutamin (Q) amino asiti ise, Y4, 21, 23 izolatlarında arginin (R) ile yer değiştirmiştir. Bu mutasyonda yine referans olarak kullandığımız Kore izolatlarına benzemektedir. Bu üç izolattan farklı olarak AKS5-7 izolatında glutamin amino asiti, histidine (H) ile yer değiştirmiştir (Çizelge 4.10).

4.4.4 CI Bölgesi ile Filogenetik Analiz Sonuçları



Şekil 4.15 CI protein ile yapılan filogenetik ağaç

Bu çalışmada elde edilen izolatlar kırmızı renk ile genbank veritabanından alınan izolatlar siyah renk ile gösterilmiştir. %80 üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmektedir.

CI protein bölgesinin nükleotit dizilimi ile elde edilen filogenetik ağacı incelediğimizde çalışmada kullandığımız izolatların çoğunluğu Dünya’da ve Avrupa’da yaygın olan A1 altgrubu içinde yer aldığı görülmektedir. BE5, BE6, BE7, BE10, BRD1, BRD2, BRD4, C17, AKS2-5, BE26 ve YUN8-4 izolatları A1 grubunda yer alan Slovak izolatı olan Kuchyna ile; C11, AYS7 ve H1 izolatları, ZYMV-Fars izolatı ile benzer dallanma göstermiştir. KZN1, D14, K17, DEMRE izolatları A1 alt grubunda yer almışlar fakat refereans ve diğer izolatlardan farklı bir küme oluşturmuşlardır. AS1, AS5, G1, G2, G3, ER6-8, AS11, S3, C13, C5, ER2-8, KAR15-1, KAR12-4, AKS5-7, AKS6-2 izolatları ZYMV-NAT izolatı ile benzer dallanma göstermiştir (Şekil 4.15).

P3 protein bölgesinde benzer dizilime sahip olan E7 ve K3 izolatlarının CI bölgesinde de benzer dizilime sahip olduğu görülmektedir. DAMBE programında CI bölgesine göre izolatlar, G1, G2, G3 izolatları; BE13, BE15, BE18, BE22 izolatları; BE5 ve BE6 izolatları; BE7, BE10 ile C17 izolatları; BRD1, BRD4 ile YUN8-4 izolatları; KZN1 ve D14 izolatları kendi aralarında benzer baz dizilimi göstermişlerdir. A5 altgrubunda yer alan Y23 ile Y4 benzer baz dizilimi gösterirken Y21 bu iki izolattan farklı bir dizilim göstermiştir (Şekil 4.15).

P3 protein bölgesinin nükleotit dizilimi kullanılarak oluşturulan protein dizilimi ve referans izolatlarla olan protein karşılaştırması MEGA6 bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.11’de gösterilmektedir.

CI protein karşılaştırmaları

Çizelge 4.11 CI protein bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları

#ZYMV_Kuchyna	HYRTTGKFLE	FTRNTAAFVA	NEIASSEGE	FLV	RGAVGSG	KSTSLPAHLA	[50]
#ZYMV-_NAT							[50]
#ZYMV_AG							[50]
#ZYMV-Fars							[50]
#ZYMV_PA_2006							[50]
#ZYMV-California					R.....		[50]
#ZYMV_CU							[50]
#ZYMV-TW-TN3							[50]
#ZYMV_RDA							[50]
#ZYMV_KR-PS							[50]
#ZYMV_KR-PE	I.....						[50]
#ZYMV_KR-PA							[50]
#AKS2-5							[50]
#AKS5-7							[50]
#AKS6-2							[50]
#AS1							[50]
#AS5			G.....				[50]
#BE13_BE15_BE18_BE22							[50]
#BE26							[50]
#BE5_BE6							[50]
#BRD2							[50]
#C11							[50]
#BE10_BE7_C17							[50]
#C13_C5			S.....				[50]
#KZN1_D14							[50]
#AYS7							[50]
#ER6-8							[50]
#G1_G2_G3							[50]
#H1M							[50]
#K17							[50]
#E-7_K3			G.....				[50]
#KAR12-4							[50]
#KAR15-1							[50]
#KZ1							[50]
#AS11_S3							[50]
#Y23_Y4							[50]
#BRD1_BRD4_YUN8-4							[50]
#DEMRE							[50]
#Y21							[50]
#Er2-8		S.....					[50]

NTP bağlanma motifi

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.11 CI protein bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları
(devam)

#ZYMV_Kuchyna	KKGK VLLLEP TRPL AENVSR	QLAGDPFFQN	VTLRMRGLSC	FGSSNITVMT	[100]
#ZYMV- NAT					[100]
#ZYMV_AG					[100]
#ZYMV-Fars					[100]
#ZYMV_PA_2006					[100]
#ZYMV-California					[100]
#ZYMV_CU					[100]
#ZYMV-TW-TN3			N.		[100]
#ZYMV_RDA			N.		[100]
#ZYMV_KR-PS			N.		[100]
#ZYMV_KR-PE	P.....		N.	A.....	[100]
#ZYMV_KR-PA			N.		[100]
#AKS2-5					[100]
#AKS5-7					[100]
#AKS6-2					[100]
#AS1					[100]
#AS5					[100]
#BE13_BE15_BE18_BE22					[100]
#BE26					[100]
#BE5_BE6					[100]
#BRD2			T.....		[100]
#C11					[100]
#BE10_BE7_C17					[100]
#C13_C5					[100]
#KZN1_D14					[100]
#AYS7					[100]
#ER6-8					[100]
#G1_G2_G3					[100]
#H1M					[100]
#K17					[100]
#E-7_K3					[100]
#KAR12-4					[100]
#KAR15-1					[100]
#KZ1					[100]
#AS11_S3					[100]
#Y23_Y4			N.		[100]
#BRD1_BRD4_YUN8-4					[100]
#DEMRE					[100]
#Y21			N.		[100]
#Er2-8					[100]

RNA helikaz bölgesi

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.11 CI protein bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları
(devam)

#ZYMV_Kuchyna	SGFAFHYYVN	NPHQLMEFDF	VIIDECHVTD	SATIAFNCAL	KEYNFAGKLI	[150]
#ZYMV-_NAT						[150]
#ZYMV_AG						[150]
#ZYMV-Fars						[150]
#ZYMV_PA_2006	?					[150]
#ZYMV-California						[150]
#ZYMV_CU			I.....			[150]
#ZYMV-TW-TN3						[150]
#ZYMV_RDA			I.....			[150]
#ZYMV_KR-PS		D.....		S.....		[150]
#ZYMV_KR-PE		D.....		S.....		[150]
#ZYMV_KR-PA		R.I.....				[150]
#AKS2-5						[150]
#AKS5-7						[150]
#AKS6-2						[150]
#A						[150]
#AS5						[150]
#BE13_BE15_BE18_BE22						[150]
#BE26						[150]
#BE5_BE6						[150]
#BRD2						[150]
#C11						[150]
#BE10_BE7_C17						[150]
#C13_C5						[150]
#KZN1_D14						[150]
#AYS						[150]
#ER6-8						[150]
#G1_G2_G3						[150]
#H1M						[150]
#K17				G.....		[150]
#E-7_K3						[150]
#KAR12-4						[150]
#KAR15-1						[150]
#KZ1						[150]
#AS11_S3						[150]
#Y23_Y4		D.....		S.....		[150]
#BRD1_BRD4_YUN8-4						[150]
#DEMRE						[150]
#Y21		D.....		S.....		[150]
#Er2-8						[150]

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.11 CI protein bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları
(devam)

#ZYMV_Kuchyna	KVSATP	PGRE	CDFDTQFAVK	VKTEDHLSFQ	AFVGAQKTGS	NADMVQHGNN	[200]
#ZYMV-_NAT							[200]
#ZYMV_AG							[200]
#ZYMV-Fars							[200]
#ZYMV_PA_2006				H			[200]
#ZYMV-California				H			[200]
#ZYMV_CU				H			[200]
#ZYMV-TW-TN3				H			[200]
#ZYMV_RDA			Y				[200]
#ZYMV_KR-PS	R.....			H			[200]
#ZYMV_KR-PE		G		H		R	[200]
#ZYMV_KR-PA							[200]
#AKS2-5							[200]
#AKS5-7							[200]
#AKS6-2							[200]
#AS1					I		[200]
#AS5							[200]
#BE13_BE15_BE18_BE22							[200]
#BE26							[200]
#BE5_BE6							[200]
#BRD2							[200]
#C11							[200]
#BE10_BE7_C17							[200]
#C13_C5							[200]
#KZN1_D14							[200]
#AYS7							[200]
#ER6-8							[200]
#G1_G2_G3							[200]
#H1M							[200]
#K17					S		[200]
#E-7_K3							[200]
#KAR12-4							[200]
#KAR15-1							[200]
#KZ1							[200]
#AS11_S3							[200]
#Y23_Y4				H			[200]
#BRD1_BRD4_YUN8-4							[200]
#DEMRE							[200]
#Y21				H			[200]
#Er2-8							[200]

RNA helikaz bölgesi

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.11 CI protein bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları
(devam)

#ZYMV_Kuchyna	ILVYV	AS	YNE	VD	ML	SK	LL	TE	RQ	FS	VT	KV	DG	RT	MQ	LG	KTT	I	ETH	GT	SQ	KPH	[250]
#ZYMV-_NAT		..																					[250]
#ZYMV_AG		..																					[250]
#ZYMV-Fars		..																					[250]
#ZYMV_PA_2006		..																					[250]
#ZYMV-California		..																					[250]
#ZYMV_CU		..																					[250]
#ZYMV-TW-TN3		..																					[250]
#ZYMV_RDA		..																					[250]
#ZYMV_KR-PS		..																					[250]
#ZYMV_KR-PE		..																					[250]
#ZYMV_KR-PA		..																					[250]
#AKS2-5		..																					[250]
#AKS5-7		..																					[250]
#AKS6-2		..																					[250]
#AS1		..																					[250]
#AS5		..																					[250]
#BE13_BE15_BE18_BE22		..																					[250]
#BE26		..																					[250]
#BE5_BE6		..																					[250]
#BRD2		..																					[250]
#C11		..																					[250]
#BE10_BE7_C17		..																					[250]
#C13_C5		..																					[250]
#KZN1_D14		..																					[250]
#AYS7		..																					[250]
#ER6-8		..																					[250]
#G1_G2_G3		..																					[250]
#H1M		..																					[250]
#K17		..																					[250]
#E-7_K3		..																					[250]
#KAR12-4		..																					[250]
#KAR15-1		..																					[250]
#KZ1		..																					[250]
#AS11_S3		..																					[250]
#Y23_Y4		..																					[250]
#BRD1_BRD4_YUN8-4		..																					[250]
#DEMRE		..																					[250]
#Y21		..																					[250]
#Er2-8		..																					[250]

RNA helikaz bölgesi

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

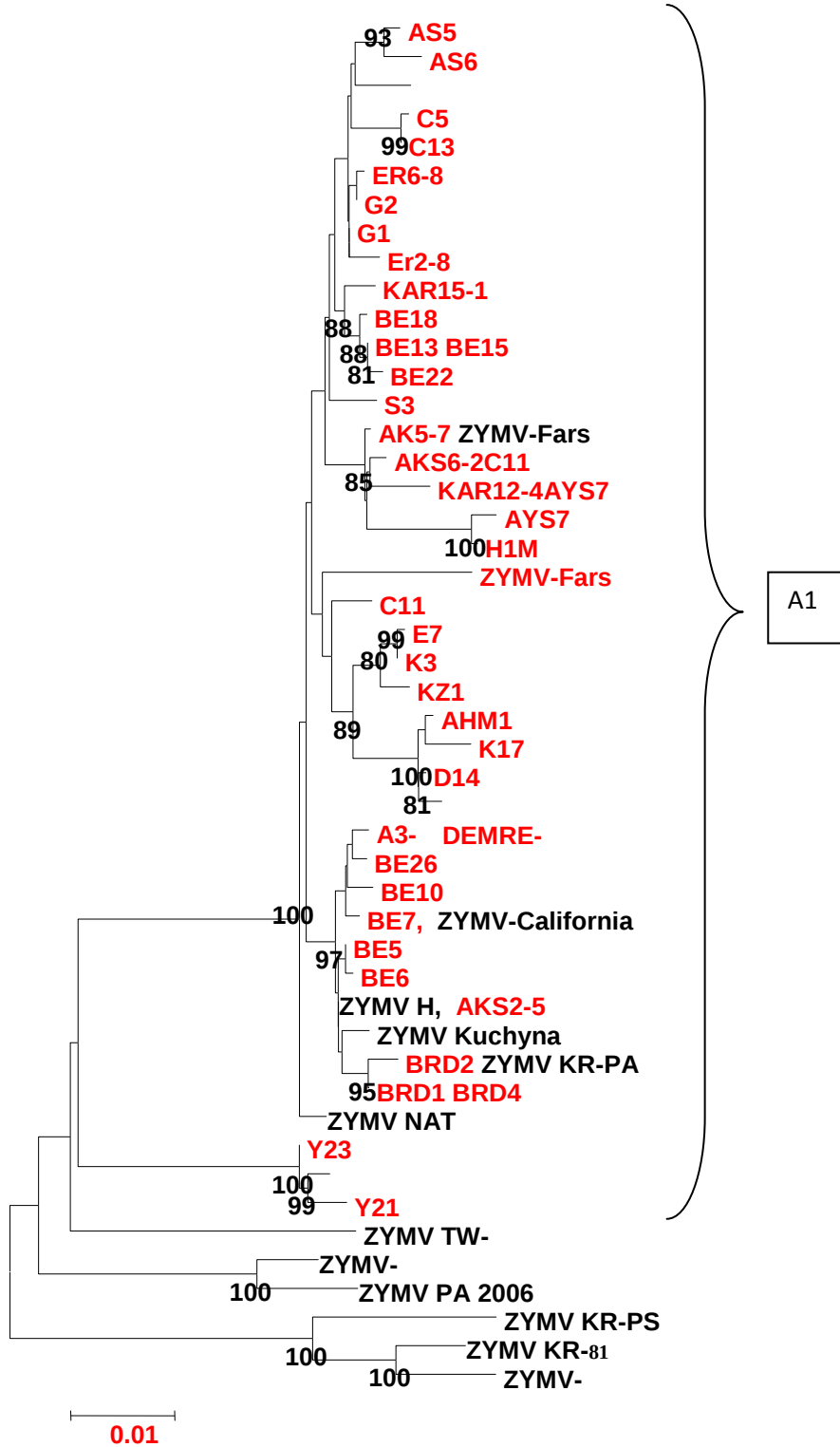
Çizelge 4.11 CI protein bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları (devam)

#ZYMV_Kuchyna	FIVATNIEN	GVTL	DEECVV	DFGLKVVAEL	DSENRVRYN	KKSVSY	[296]
#ZYMV-_NAT							[296]
#ZYMV_AG							[296]
#ZYMV-Fars					..P..		[296]
#ZYMV_PA_2006							[296]
#ZYMV-California					GRRT	GQR.....	[296]
#ZYMV_CU							[296]
#ZYMV-TW-TN3	...R.....						[296]
#ZYMV_RDA							[296]
#ZYMV_KR-PS							[296]
#ZYMV_KR-PE							[296]
#ZYMV_KR-PA							[296]
#AKS2-5							[296]
#AKS5-7							[296]
#AKS6-2							[296]
#AS1							[296]
#AS5							[296]
#BE13_BE15_BE18_BE22							[296]
#BE26							[296]
#BE5_BE6							[296]
#BRD2							[296]
#C11							[296]
#BE10_BE7_C17							[296]
#C13_C5							[296]
#KZN1_D14							[296]
#AYS7							[296]
#ER6-8							[296]
#G1_G2_G3							[296]
#H1M							[296]
#K17							[296]
#E-7_K3							[296]
#KAR12-4							[296]
#KAR15-1							[296]
#KZ1							[296]
#AS11_S3							[296]
#Y23_Y4							[296]
#BRD1_BRD4_YUN8-4							[296]
#DEMRE							[296]
#Y21							[296]
#Er2-8							[296]

RNA helikaz bölgesi

CI protein bölgesinin 888 nükleotitten oluşan 296 amino asitlik kısmı protein sekansı NCBI gen bankasındaki mevcut sekanslardan seçilen referans izolatlarla karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalar sonunda amino asit bölgeleri değerlendirildiğinde CI protein bölgesinin çok fazla değişken olmadığı ve daha önceden araştırmacılar tarafından rapor edilen NTP bağlanma motifi olan “GAVGSGKST” (26-35. aa) ve RNA helikaz fonksiyonu olan “VLLLEP”, “TRPL”, “KVSAT”, “LVYV” ve “VATNIIENGVT” motiflerinin korunmuş olduğu görülmektedir (Çizelge 4.11).

4.4.5 Nİb Bölgesi ile filogenetik analiz sonuçları



Şekil 4.16 Nİb protein bölgesi ile elde edilen filogenetik ağaç

Bu çalışmada elde edilen izolatlar kırmızı renk ile genbank veritabanından alınan izolatlar siyah renk ile gösterilmiştir. %80 üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmektedir.

Çalışmada kullandığımız Ankara, Antalya, Burdur, Konya, Aksaray ve Karaman illerinden toplam 42 adet ZYMV izolatının Nİb protein bölgelerinin 1361 nükleotitten oluşan 458 amino asitlik kısmi sekansları, gen bankasından elde edilen referans ZYMV izolatlarının sekansları ile MEGA 6 programı kullanılarak karşılaştırılması yapılmış ve Nİb protein bölgesine ait filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 4.16).

ZYMV izolatlarının gen bölgelerinin belirlenmesi konulu çalışmada Nİb bölgesi ile yapılan filogenetik ağaca göre izolatların çoğunluğu A1 alt grubunda yer alırken yine Elmalı izolatları olan Y4, Y21 ve Y23 farklı grup oluşturmuşlar ve A1 altgrubundan farklı bir grupta toplanmışlardır. Diğer protein bölgelerinde daha önceden Kore izolatları ile benzer dallanma gösteren bu izolatlar Nİb bölgesinde bu izolatlardan farklı bir dallanma göstermişlerdir (Şekil 4.16). Y4, Y21 ve Y23 izolatları NCBI’da diğer referans izolatlarla %92-96 oranında benzerlik oranına sahiptir. A1 altgrupta yer alan izolatlar kendi aralarında %98-99 benzerlik oranına sahip iken diğer A1 grubundaki izolatlarla %93-95 benzerlik göstermektedirler.

Nİb protein bölgesinin nükleotit dizilimi kullanılarak oluşturulan protein dizilimi ve referans izolatlarla olan karşılaştırması MEGA 6 bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.12’de gösterilmektedir.

Nİb protein karşılaştırmaları

Çizelge 4.12 Nİb protein bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları

!Domain=Data;									
#ZYMV_Kuchyna	QPSKLNKEAF	KKDFFKYNKP	VTVNQLDHDK	FLEAVDGVIR	MMCDFEFNEC	RFITDPEEIIY	[60]		
#ZYMV_NAT				F..			[60]		
#ZYMV-Fars							[60]		
#ZYMV_TW-TN3							[60]		
#ZYMV_Clifornia				..G.....			[60]		
#ZYMV_PA_2006							[60]		
#ZYMV_KR-PA							[60]		
#ZYMV_KR-PS							[60]		
#ZYMV-RDA							[60]		
#A3-1							[60]		
#AHM1				R.....			[60]		
#AK5-7							[60]		
#ZYMV_H_AKS2-5							[60]		
#AKS6-2							[60]		
#AS11							[60]		
#AS5							[60]		
#AS6							[60]		
#BE5							[60]		
#BE6							[60]		
#BE7							[60]		
#BE10							[60]		
#BE13_BE15							[60]		
#BE18							[60]		
#BE22							[60]		
#BE26							[60]		
#BRD2							[60]		
#BRD1_BRD4							[60]		
#C5							[60]		
#C11							[60]		
#C13							[60]		
#D14				R.....			[60]		
#AYS7							[60]		
#E7				R.....			[60]		
#ER6-8							[60]		
#G2							[60]		
#G1_G3							[60]		
#H1M							[60]		
#K3				R.....			[60]		
#K17				R.....			[60]		
#KAR12-4							[60]		
#KAR15-1						S.....	[60]		
#KZ1				R.....			[60]		
#S3							[60]		
#Y4							[60]		
#Y21							[60]		
#Y23							[60]		
#DEMRE-				R.....			[60]		
#Er2-8			I.....				[60]		

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.12 Nİb protein bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları
(devam)

#ZYMV_Kuchyna	NSLNMKAAIG	AQYRGKKKEY	FEGLDDFDRE	RLLFQSCERL	FNGYKGLWNG	SLKAE LRPLE	[120]
#ZYMV_NAT							[120]
#ZYMV-Fars							[120]
#ZYMV_TW-TN3							[120]
#ZYMV_Clfornia							[120]
#ZYMV_PA_2006							[120]
#ZYMV_KR-PA							[120]
#ZYMV_KR-PS							[120]
#ZYMV-RDA							[120]
#A3-1							[120]
#AHM1							[120]
#AK5-7							[120]
#ZYMV_H_AKS2-5							[120]
#AKS6-2				R.....			[120]
#AS11							[120]
#AS5			N.....				[120]
#AS6			N.....				[120]
#BE5							[120]
#BE6							[120]
#BE7							[120]
#BE10							[120]
#BE13_BE15							[120]
#BE18							[120]
#BE22							[120]
#BE26							[120]
#BRD2							[120]
#BRD1_BRD4							[120]
#C5							[120]
#C11			L.....				[120]
#C13							[120]
#D14							[120]
#AYS7							[120]
#E7							[120]
#ER6-8			G.....				[120]
#G2							[120]
#G1_G3							[120]
#H1M							[120]
#K3							[120]
#K17							[120]
#KAR12-4				K.....			[120]
#KAR15-1							[120]
#KZ1							[120]
#S3							[120]
#Y4							[120]
#Y21						R	[120]
#Y23							[120]
#DEMRE-							[120]
#Er2-8							[120]

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.12 Nİb protein bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları
(devam)

#ZYMV_Kuchyna	KVRANKTRTF	TAAPIDTLLG	AKVCVDDFNN	EFYSKNLKCP	WTVGMTKFYG	GWDKLMRALP	[180]
#ZYMV_NAT							[180]
#ZYMV-Fars							[180]
#ZYMV_TW-TN3						...R...S..	[180]
#ZYMV_Clfornia				...R.....		S..	[180]
#ZYMV_PA_2006		?		...R.....		S..	[180]
#ZYMV_KR-PA						S..	[180]
#ZYMV_KR-PS						S..	[180]
#ZYMV-RDA						S..	[180]
#A3-1							[180]
#AHM1							[180]
#AK5-7							[180]
#ZYMV_H_AKS2-5							[180]
#AKS6-2							[180]
#AS11							[180]
#AS5							[180]
#AS6							[180]
#BE5							[180]
#BE6							[180]
#BE7							[180]
#BE10							[180]
#BE13_BE15							[180]
#BE18							[180]
#BE22							[180]
#BE26							[180]
#BRD2							[180]
#BRD1_BRD4							[180]
#C5						K..	[180]
#C11							[180]
#C13						K..	[180]
#D14							[180]
#AYS7							[180]
#E7							[180]
#ER6-8							[180]
#G2							[180]
#G1_G3							[180]
#H1M							[180]
#K3							[180]
#K17	L						[180]
#KAR12-4							[180]
#KAR15-1							[180]
#KZ1							[180]
#S3							[180]
#Y4							[180]
#Y21	E.....						[180]
#Y23							[180]
#DEMRE-							[180]
#Er2-8							[180]

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.12 Nİb protein bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları
(devam)

#ZYMV_Kuchyna	DGWL	YCHADG	SQFDSSLTPA	LINAVLIIRS	FYMEDWVVRQ	EMLENLYAEI	VYTPILAPDG	[240]
#ZYMV_NAT	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#ZYMV-Fars	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#ZYMV_TW-TN3	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#ZYMV_Clifornia	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#ZYMV_PA_2006	...	...	...	...	...	?G.	...	[240]
#ZYMV_KR-PA	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#ZYMV_KR-PS	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#ZYMV-RDA	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#A3-1	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#AHM1	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#AK5-7	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#ZYMV_H_AKS2-5	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#AKS6-2	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#AS11	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#AS5	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#AS6	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#BE5	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#BE6	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#BE7	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#BE10	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#BE13_BE15	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#BE18	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#BE22	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#BE26	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#BRD2	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#BRD1_BRD4	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#C5	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#C11	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#C13	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#D14	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#AYS7	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#E7	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#ER6-8	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#G2	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#G1_G3	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#H1M	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#K3	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#K17	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#KAR12-4	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#KAR15-1	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#KZ1	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#S3	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#Y4	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#Y21	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#Y23	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#DEMRE-	...	...	...	...	...	G.	...	[240]
#Er2-8	...	...	...	...	...	G.	...	[240]

Polymeraz aktivitesi

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.12 Nİb protein bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları
(devam)

#ZYMV_Kuchyna	TIFKKFRGNN	SGQPSTVVDN	TLMVVISIYY	ACMKFGWNCE	EIENKLVFFA	NGDDLILAVK	[300]
#ZYMV_NAT							[300]
#ZYMV-Fars				..L.....		R	[300]
#ZYMV_TW-TN3					...R.I...		[300]
#ZYMV_Clfornia							[300]
#ZYMV_PA_2006					...R.I...		[300]
#ZYMV_KR-PA	A.....			H.	D.....		[300]
#ZYMV_KR-PS				H.			[300]
#ZYMV-RDA				H.	D.....		[300]
#A3-1							[300]
#AHM1							[300]
#AK5-7							[300]
#ZYMV_H_AKS2-5							[300]
#AKS6-2							[300]
#AS11							[300]
#AS5							[300]
#AS6					..G.....		[300]
#BE5							[300]
#BE6							[300]
#BE7							[300]
#BE10							[300]
#BE13_BE15							[300]
#BE18							[300]
#BE22							[300]
#BE26							[300]
#BRD2					..D..NF.		[300]
#BRD1_BRD4					..D..		[300]
#C5							[300]
#C11					...D..		[300]
#C13							[300]
#D14							[300]
#AYS7							[300]
#E7							[300]
#ER6-8							[300]
#G2							[300]
#G1_G3							[300]
#H1M							[300]
#K3							[300]
#K17							[300]
#KAR12-4							[300]
#KAR15-1							[300]
#KZ1							[300]
#S3							[300]
#Y4							[300]
#Y21							[300]
#Y23							[300]
#DEMRE-							[300]
#Er2-8							[300]

Polymeraz aktivitesi (RdRp)

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.12 Nİb protein bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları
(devam)

#ZYMV_Kuchyna	DEDSGLLDNM	SSSFSELGLN	YDFPERTHKR	EDLWFMSHQ	MLVDGMYIPK	LEKERIVSIL	[360]
#ZYMV_NAT			...S.....				[360]
#ZYMV-Fars			...S.....		I.....		[360]
#ZYMV_TW-TN3		.A.....	...S.....				[360]
#ZYMV_Clfornia		...C.....	...S.....		T..		[360]
#ZYMV_PA_2006		...C.....	...S.....				[360]
#ZYMV_KR-PA		...C.....	...S.....				[360]
#ZYMV_KR-PS		...C.....	...S.....				[360]
#ZYMV-RDA		...C.....	...S.....				[360]
#A3-1			...S.....				[360]
#AHM1			...S.....				[360]
#AK5-7			...S.....				[360]
#ZYMV_H_AKS2-5			...S.....				[360]
#AKS6-2			...S.....				[360]
#AS11			...S.....				[360]
#AS5			...S.....				[360]
#AS6			...S.....				[360]
#BE5			...S.....				[360]
#BE6			...S.....				[360]
#BE7			...S.....				[360]
#BE10		...F.....	...S.....				[360]
#BE13_BE15			...S.....				[360]
#BE18			...S.....				[360]
#BE22			...S.....				[360]
#BE26			...S.....				[360]
#BRD2			...S.....				[360]
#BRD1_BRD4			...S.....				[360]
#C5			...S.....				[360]
#C11			...S.....				[360]
#C13			...S.....				[360]
#D14			...S.....				[360]
#AYS7	D.....		...S.....				[360]
#E7			...S.....				[360]
#ER6-8			...S.....				[360]
#G2			...S.....				[360]
#G1_G3			...S.....				[360]
#H1M	D.....		...S.....				[360]
#K3			...S.....				[360]
#K17			...S.....				[360]
#KAR12-4			...S.....				[360]
#KAR15-1			...S.....				[360]
#KZ1			...S.....				[360]
#S3			...S.....				[360]
#Y4	E.....	...C.....	...S.....	...I.....			[360]
#Y21		...C.....	...S.....				[360]
#Y23		...C.....	...S.....				[360]
#DEMRE-			...S.....				[360]
#Er2-8			...S.....				[360]

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.12 Nİb protein bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları
(devam)

#ZYMV_Kuchyna	EWDRSKEIMH	RTEAICAAMI	EAWGHTELLQ	EIRKFYLVFV	EKEEVRELAA	LGKAPYIAET	[420]
#ZYMV_NAT							[420]
#ZYMV-Fars			N.....				[420]
#ZYMV_TW-TN3							[420]
#ZYMV_Clifornia							[420]
#ZYMV_PA_2006							[420]
#ZYMV_KR-PA						I.....	[420]
#ZYMV_KR-PS	.R.....					I.....	[420]
#ZYMV-RDA						I.....	[420]
#A3-1							[420]
#AHM1							[420]
#AK5-7							[420]
#ZYMV_H_AKS2-5							[420]
#AKS6-2							[420]
#AS11							[420]
#AS5							[420]
#AS6							[420]
#BE5							[420]
#BE6							[420]
#BE7							[420]
#BE10			P.....				[420]
#BE13_BE15							[420]
#BE18							[420]
#BE22							[420]
#BE26							[420]
#BRD2			P.....				[420]
#BRD1_BRD4							[420]
#C5							[420]
#C11							[420]
#C13							[420]
#D14							[420]
#AYS7							[420]
#E7							[420]
#ER6-8			P.....				[420]
#G2			P.....				[420]
#G1_G3							[420]
#H1M							[420]
#K3							[420]
#K17							[420]
#KAR12-4			PP.....				[420]
#KAR15-1							[420]
#KZ1							[420]
#S3							[420]
#Y4							[420]
#Y21							[420]
#Y23							[420]
#DEMRE-		T.....					[420]
#Er2-8					T.....		[420]

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

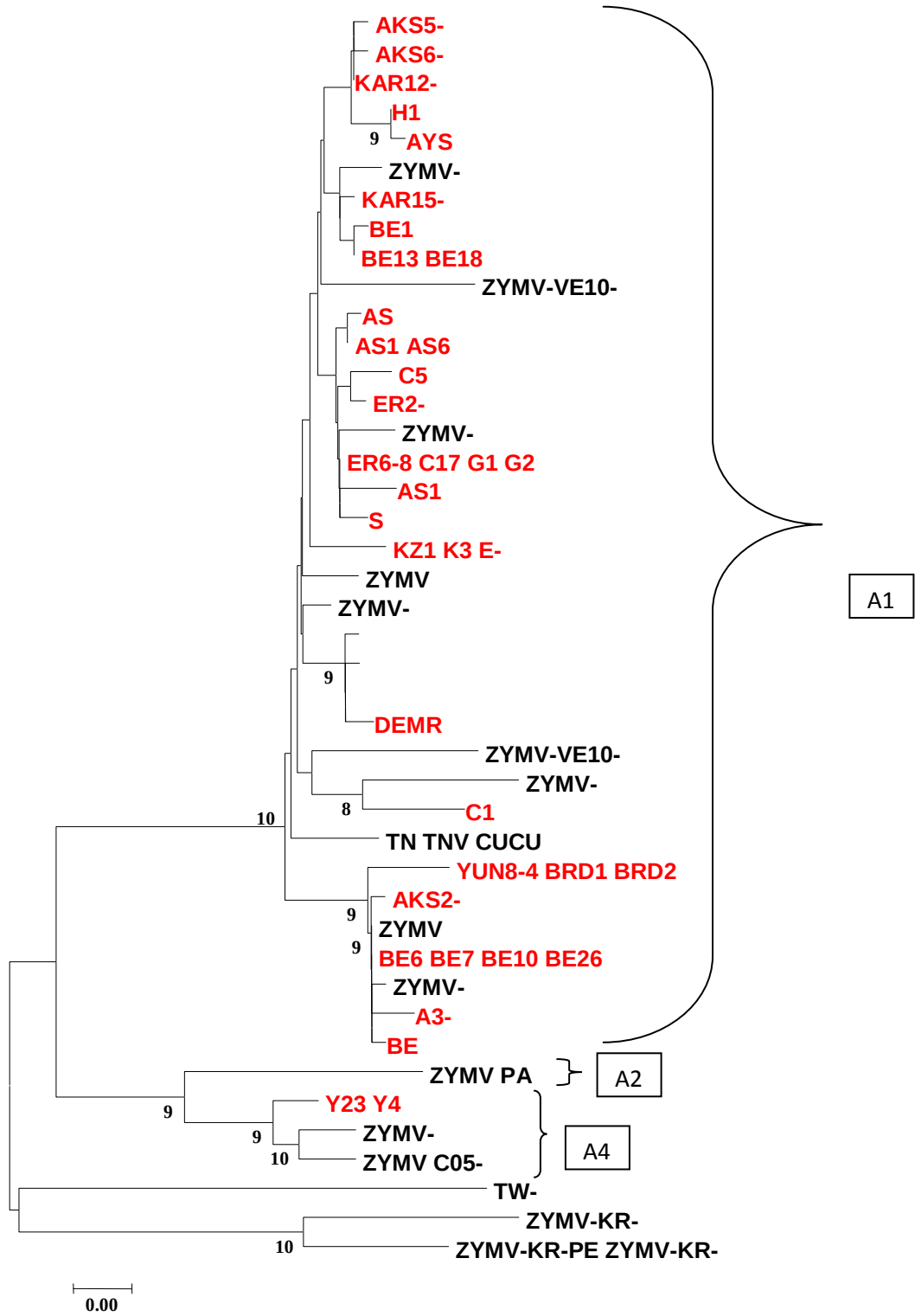
Çizelge 4.12 Nİb protein bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları
(devam)

#ZYMV_Kuchyna	ALRKLYTDKG	ADTSELARYL	QALHQDIFFE	QGDTVMLQ	[458]
#ZYMV_NAT					[458]
#ZYMV-Fars					[458]
#ZYMV_TW-TN3		.E.....			[458]
#ZYMV_Clfornia					[458]
#ZYMV_PA_2006		..K.....	L..		[458]
#ZYMV_KR-PA		.R..E.....			[458]
#ZYMV_KR-PS		.E.....			[458]
#ZYMV-RDA		.E.....			[458]
#A3-1					[458]
#AHM1		.N.....			[458]
#AK5-7				.D.....	[458]
#ZYMV_H_AKS2-5					[458]
#AKS6-2				.D.....	[458]
#AS11		.E.....	.V.....	.K.....	[458]
#AS5		.E.....			[458]
#AS6		.E.....			[458]
#BE5					[458]
#BE6					[458]
#BE7		.E.....			[458]
#BE10					[458]
#BE13_BE15		.E.....			[458]
#BE18		.E.....			[458]
#BE22		.E.....			[458]
#BE26					[458]
#BRD2					[458]
#BRD1_BRD4					[458]
#C5		.E.....			[458]
#C11					[458]
#C13		.E.....			[458]
#D14		.N.....			[458]
#AYS7				.D.....	[458]
#E7					[458]
#ER6-8		.E.....			[458]
#G2		.E.....			[458]
#G1_G3		.E.....			[458]
#H1M				.D.....	[458]
#K3					[458]
#K17		.N.....			[458]
#KAR12-4				.D.....	[458]
#KAR15-1		.E.....			[458]
#KZ1		.N.....			[458]
#S3					[458]
#Y4		.E.....			[458]
#Y21		.E.....			[458]
#Y23		.E.....			[458]
#DEMRE-		.N.....	R.....		[458]
#Er2-8		.E.....			[458]

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çalışmada kullandığımız ZYMV izolatlarının referans izolatlarla Nİb protein bölgesinin protein dizilim karşılaştırılması yapılmıştır. Nİb bölgesi potyviruslerin RNA'ya bağlı RNA polimeraz (RdRp) enzimini kodlamaktadır. Çizelge 4.12'de görüldüğü üzere, üç tane motif “YCHADGS”, “GNNSGQPSTVVDNTLMV” ve “NGDDL” amino asit motifleri polimeraz aktif alanları olup tüm izolatlarda korunduğu görülmektedir. Potyviruslerde ve ZYMV izolatlarında Nİb protein bölgesinin N-terminal uç kısmının korunmuş olduğu ve C-terminal uç kısmının daha değişken olduğu görülmektedir (Çizelge 4.12).

4.4.6 CP Bölgesi ile filogenetik analiz sonuçları



Şekil 4.17 CP bölgesi ile elde edilen filogenetik ağaç

Bu çalışmada elde edilen izolatlar kırmızı renk ile genbank veritabanından alınan izolatlar siyah renk ile gösterilmiştir. %80 üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmektedir.

ZYMV izolatlarının gen bölgelerinin belirlenmesi konulu çalışmada CP bölgesi ile yapılan filogenetik ağaca göre izolatların çoğunluğu A1 alt grubunda yer alırken yine Elmalı izolatları Y4, Y21 ve Y23 farklı grup oluşturmuşlar ve A4 altgrubunda yer almışlardır. Daha önceden Kore izolatları ile benzer dallanma gösteren bu izolatlar, CP bölgesinde Avrupa’da yeni ortaya çıkan grup olan “Liaocheng” ve “ZYMV-C05-205”izolatları ile benzerlik göstermiştir. Bu sonuca göre Elmalı izolatlarının diğer izolatlardan oldukça farklı olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır (Şekil 4.17).

Sekans analizleri sonunda CP gen bölgesinin tam nükleotit sekansı elde edilmiş olup sekans dizilimi NCBI veri bankasında depolanmaktadır. Veri bankasına kaydedilen izolatların erişim numaraları EK 2’de verilmiştir.

CP bölgesi protein karşılaştırmaları

Çizelge 4.13 CP protein bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları

!Domain=Data;						
#ZYMV-Kuchyna	SGTQPTVADA	GATKKNEDD	KGKNRDATGS	GSGEKTMAAV	T KDKD VNAGS	[50]
#ZYMV-Fars		DK...	K.V...	V...		[50]
#ZYMV_NAT	T	DK...	K.V...	..S...V...		[50]
#ZYMV-Ahlat		EK...	..R.DKGV...	D....V...		[50]
#TN_TNV_CUCU_2		DK...	K...	V...		[50]
#ZYMV-Iraq		DK...	K.V...	..S...V...		[50]
#ZYMV-Adana		DK...	K.V...	V...		[50]
#ZYMV-VE10-160	.D.K.....	..I..DK...	K.V...	V...		[50]
#ZYMV-VE10-129	..N.....	DK...	K.VI...	V...		[50]
#ZYMV-Liaocheng	...T.....	DK...	..R.K.V...	V..A		[50]
#ZYMV_C05-205	...T.....	DK...	..R.K.V...	V..A		[50]
#TW-TN3	A...	DK...	K.V...	V...		[50]
#ZYMV-KR-PA	...Q.....	DK...	..A..K...S.	V...	..E.....	[50]
#ZYMV-KR-PE_ZYMV-KR-PS	...Q.....	DK...	..A..K...S.	V...		[50]
#ZYMV_H			K.....			[50]
#ZYMV_PA_2006	S..	DK...	K.V...	...R.V...		[50]
#KZN1		 DK...	 K.V...	 V...		[50]
#AKS2-5			 K...	S		[50]
#AKS5-7		 DK...	 K.V...	 V...		[50]
#AKS6-2		 DK...	 K.V...	 V...		[50]
#A3-1			 K...			[50]
#KAR12-4		 DK...	 K.V...	 V...		[50]
#KAR15-1		 DK...	 K.V...	 V...		[50]
#AS5		 DK...	 K.V...	 V...		[50]
#AS1_AS6_AS8		 DK...	 K.V...	 V...		[50]
#AS11		 DK...	 K.V...	 V...		[50]
#BE5			 K...			[50]
#BE15		 DK...	 K.V...	 V...		[50]
#BE13_BE18_BE22		 DK...	 K.V...	 V...		[50]
#BE6_BE7_BE10_BE26_BE27			 K...			[50]
#YUN8-4_BRD1_BRD2_BRD4			 K...			[50]
#C11		 EK...	..M..K.V...	N....V...		[50]
#C5_C13	.D.K.....	 DK...	 K.V...	 V...		[50]
#H1M		 DK...	 K.V...	..S...V...		[50]
#D14		 DK...	 K.V...	 V...		[50]
#AYS7		 DK...	 K.V...	..S...V...		[50]
#ER6-8_C17_G1_G2_G3		 DK...	 K.V...	 V...		[50]
#K17		 DK...	..D..K.V...	 V...		[50]
#KZ1_K3_E-7		 DK...	 K.V...	 V...		[50]
#S5		 DK...	 K.V...	 V...		[50]
#DEMRE		 DK.Y	 K.V...	 V...		[50]
#Y23_Y4_Y21	...T.....	 DK...	..R..KEV...	 V..A		[50]
#ER2-8		 DK...	 K.V...	 V...		[50]

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.13 CP protein bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları
(devam)

#ZYMV-Kuchyna	HGKIVPRLSK	ITKKMSLPRV	KGNVILDIDH	LLEYKPDQIE	LYNTRASHQQ	[100]
#ZYMV-Fars						[100]
#ZYMV_NAT						[100]
#ZYMV-Ahlat						[100]
#TN_TNV_CUCU_2						[100]
#ZYMV-Iraq						[100]
#ZYMV-Adana						[100]
#ZYMV-VE10-160						[100]
#ZYMV-VE10-129						[100]
#ZYMV-Liaocheng						[100]
#ZYMV_C05-205			...T.N...			[100]
#TW-TN3			..K.....			[100]
#ZYMV-KR-PA			..K.....			[100]
#ZYMV-KR-PE_ZYMV-KR-PS			..T.....			[100]
#ZYMV_H						[100]
#ZYMV_PA_2006						[100]
#KZN1						[100]
#AKS2-5						[100]
#AKS5-7						[100]
#AKS6-2						[100]
#A3-1						[100]
#KAR12-4						[100]
#KAR15-1						[100]
#AS5						[100]
#AS1_AS6_AS8						[100]
#AS11						[100]
#BE5						[100]
#BE15						[100]
#BE13_BE18_BE22						[100]
#BE6_BE7_BE10_BE26_BE27						[100]
#YUN8-4_BRD1_BRD2_BRD4						[100]
#C11						[100]
#C5_C13						[100]
#H1M						[100]
#D14						[100]
#AYS7			V.....			[100]
#ER6-8_C17_G1_G2_G3						[100]
#K17						[100]
#KZ1_K3_E-7						[100]
#S5						[100]
#DEMRE						[100]
#Y23_Y4_Y21						[100]
#ER2-8						[100]

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.13 CP protein bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları
(devam)

#ZYMV-Kuchyna	FASWFNQVKT	EYDLINEQQMG	VVMNGFMVWC	IENGTSPDIN	GVWVMMDGNE	[150]
#ZYMV-Fars						[150]
#ZYMV_NAT					Q	[150]
#ZYMV-Ahlat						[150]
#TN_TNV_CUCU_2						[150]
#ZYMV-Iraq	S.....					[150]
#ZYMV-Adana						[150]
#ZYMV-VE10-160					...F.....	[150]
#ZYMV-VE10-129					...F.....	[150]
#ZYMV-Liaocheng					...A.....	[150]
#ZYMV_C05-205						[150]
#TW-TN3	.S.....R.				...F....D.	[150]
#ZYMV-KR-PA	R.	D.....				[150]
#ZYMV-KR-PE_ZYMV-KR-PS	R.	D.....				[150]
#ZYMV_H						[150]
#ZYMV_PA_2006					...?.....	[150]
#KZN1						[150]
#AKS2-5						[150]
#AKS5-7						[150]
#AKS6-2						[150]
#A3-1	V.....					[150]
#KAR12-4						[150]
#KAR15-1						[150]
#AS5						[150]
#AS1_AS6_AS8						[150]
#AS11						[150]
#BE5						[150]
#BE15						[150]
#BE13_BE18_BE22						[150]
#BE6_BE7_BE10_BE26_BE27						[150]
#YUN8-4_BRD1_BRD2_BRD4	R.....					[150]
#C11						[150]
#C5_C13		D.....				[150]
#H1M						[150]
#D14		D.....				[150]
#AYS7						[150]
#ER6-8_C17_G1_G2_G3						[150]
#K17						[150]
#KZ1_K3_E-7						[150]
#S5						[150]
#DEMRE	R.....					[150]
#Y23_Y4_Y21						[150]
#ER2-8						[150]

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.13 CP protein bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları
(devam)

#ZYMV-Kuchyna	QVEYPLKPIV	ENAKPTLRQI	MHHFSDAAEA	YIEMRNAEAP	YMPRYGLLRN	[200]
#ZYMV-Fars						[200]
#ZYMV_NAT						[200]
#ZYMV-Ahlat						[200]
#TN_TNV_CUCU_2						[200]
#ZYMV-Iraq						[200]
#ZYMV-Adana						[200]
#ZYMV-VE10-160						[200]
#ZYMV-VE10-129						[200]
#ZYMV-Liaocheng						[200]
#ZYMV_C05-205						[200]
#TW-TN3						[200]
#ZYMV-KR-PA						[200]
#ZYMV-KR-PE_ZYMV-KR-PS						[200]
#ZYMV_H						[200]
#ZYMV_PA_2006						[200]
#KZN1						[200]
#AKS2-5						[200]
#AKS5-7						[200]
#AKS6-2						[200]
#A3-1						[200]
#KAR12-4						[200]
#KAR15-1						[200]
#AS5						[200]
#AS1_AS6_AS8						[200]
#AS11						[200]
#BE5						[200]
#BE15						[200]
#BE13_BE18_BE22						[200]
#BE6_BE7_BE10_BE26_BE27						[200]
#YUN8-4_BRD1_BRD2_BRD4						[200]
#C11						[200]
#C5_C13						[200]
#H1M						[200]
#D14						[200]
#AYS7						[200]
#ER6-8_C17_G1_G2_G3						[200]
#K17						[200]
#KZ1_K3_E-7						[200]
#S5						[200]
#DEMRE						[200]
#Y23_Y4_Y21						[200]
#ER2-8						[200]

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.13 CP protein bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları
(devam)

#ZYMV-Kuchyna	LRDRSLARYA	FDFYEVNSKT	PERAREEVAQ	MKAAALSNVS	SRLFGLDGNV	[250]
#ZYMV-Fars						[250]
#ZYMV_NAT						[250]
#ZYMV-Ahlat						[250]
#TN_TNV_CUCU_2						[250]
#ZYMV-Iraq						[250]
#ZYMV-Adana						[250]
#ZYMV-VE10-160		T...				[250]
#ZYMV-VE10-129		T...				[250]
#ZYMV-Liaocheng						[250]
#ZYMV_C05-205						[250]
#TW-TN3						[250]
#ZYMV-KR-PA						[250]
#ZYMV-KR-PE_ZYMV-KR-PS						[250]
#ZYMV_H						[250]
#ZYMV_PA_2006						[250]
#KZN1						[250]
#AKS2-5						[250]
#AKS5-7						[250]
#AKS6-2						[250]
#A3-1						[250]
#KAR12-4						[250]
#KAR15-1						[250]
#AS5						[250]
#AS1_AS6_AS8						[250]
#AS11						[250]
#BE5						[250]
#BE15						[250]
#BE13_BE18_BE22						[250]
#BE6_BE7_BE10_BE26_BE27						[250]
#YUN8-4_BRD1_BRD2_BRD4						[250]
#C11						[250]
#C5_C13						[250]
#H1M						[250]
#D14						[250]
#AYS7						[250]
#ER6-8_C17_G1_G2_G3						[250]
#K17						[250]
#KZ1_K3_E-7						[250]
#S5						[250]
#DEMRE						[250]
#Y23_Y4_Y21						[250]
#ER2-8			?			[250]

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.13 CP protein bölgesinin referans izolatlarla protein dizilim karşılaştırmaları
(devam)

#ZYMV-Kuchyna	ATTSEDTERH	TARDVNRNMH	TLLGVNTMQ	[279]
#ZYMV-Fars				[279]
#ZYMV_NAT				[279]
#ZYMV-Ahlat				[279]
#TN_TNV_CUCU_2				[279]
#ZYMV-Iraq				[279]
#ZYMV-Adana				[279]
#ZYMV-VE10-160				[279]
#ZYMV-VE10-129				[279]
#ZYMV-Liaocheng				[279]
#ZYMV_C05-205				[279]
#TW-TN3				[279]
#ZYMV-KR-PA				[279]
#ZYMV-KR-PE_ZYMV-KR-PS				[279]
#ZYMV_H				[279]
#ZYMV_PA_2006				[279]
#KZN1				[279]
#AKS2-5				[279]
#AKS5-7				[279]
#AKS6-2				[279]
#A3-1				[279]
#KAR12-4				[279]
#KAR15-1				[279]
#AS5				[279]
#AS1_AS6_AS8				[279]
#AS11				[279]
#BE5				[279]
#BE15				[279]
#BE13_BE18_BE22				[279]
#BE6_BE7_BE10_BE26_BE27				[279]
#YUN8-4_BRD1_BRD2_BRD4				[279]
#C11				[279]
#C5_C13				[279]
#H1M				[279]
#D14				[279]
#AYS7				[279]
#ER6-8_C17_G1_G2_G3				[279]
#K17				[279]
#KZ1_K3_E-7				[279]
#S5				[279]
#DEMRE				[279]
#Y23_Y4_Y21				[279]
#ER2-8				[279]

Not: Noktalar aynı amino asit olduğunu ve parantez içindeki sayılar ise amino asit sayılarını göstermektedir.

ZYMV Türkiye izolatlarının 279 amino asitten oluşan CP bölgesi, gen bankasında yer alan çeşitli ZYMV sekanlarının CP bölgeleri ile karşılaştırmalarını incelediğimizde potyviruslerin afitlerle taşınmasında rol oynayan “DAG” motifinin ZYMV Türkiye izolatlarının tümünde korunmuş olduğu görülmektedir. CP’nin N-terminal uç bölgesinin tüm Potyviruslerde en değişken bölge olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda da referans ve Türkiye izolatlarının N-terminal uç bölgesinin değişken olduğu görülmektedir. Daha önceki yapılan çalışmalarda bildirildiği üzere CP’nin çekirdek bölgesi tüm izolatlarda korunmuştur (Çizelge 4.13).

CP N-terminal uç bölgesinin karakteristik değişkenliğine rağmen afitle taşınan izolatlarda DAG motifinin korunmuş olduğu ve taşınabilirliğin kaybının DAG motifindeki değişkenliklerle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu motifi “DTG” olan ZYMV-NAT izolatının afitlerle taşınmadığı bildirilmektedir (Desbiez vd 2003).Çalışmada kullandığımız izolatlarda DAG motifi korunmuş olup izolatların afitlerle taşınma yeteneklerini korudukları görülmektedir. Coat proteinin merkezi ve C uç kısmının izolatlar arasında korunduğu görülmektedir (Çizelge 4.13).

Coat protein kodlama bölgesinin N-terminal uç kısmını içeren 250 nükleotitin sekans analizi sonucunda farklı izolatların varlığını ortaya konulmuştur. Buna göre çalışmada kullandığımız izolatlar da kendi aralarında farklı gruplara ayrılmışlardır (Çizelge 4.13).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Antalya, Ankara ve Burdur illerinden toplanan ve virüsle enfekteli olduğundan şüphelenilen bitkilerden alınan örneklerde ZYMV, WMV, CMV; PRSV, SqMV ve CGMMV viral etmenlerinin test edildiği DAS-ELISA sonuçlarında, hem Antalya hem de Ankara ilinde en yaygın virüslerin WMV ve ZYMV olduğu tespit edilmiştir. Benzer çalışmalar çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Yılmaz vd., 1994, Şevik ve Sökmen 2003, Dağ 2006, Karamanlı 2007, Yeşil 2013). Bu çalışma ile örnek alınan illerde, sakız kabağı ve bal kabağı bitkilerinde CGMMV etmenin varlığı ilk kez saptanmıştır.

Kabak sarı mozaik virüsü izolatlarının kodladığı genlerin diziliminin belirlenmesi ve moleküler karakterizasyonu konulu bu tez çalışmasının moleküler kısmında, ZYMV ile enfekteli bitkilerden elde edilen RNA'lar RT-PCR yöntemiyle çoğaltılmış ve sekanslaması yapılmıştır. Sekans analizleri sonucunda veriler değerlendirilip, izolatlar arasındaki ilişki incelenmiştir.

Lee vd. (1998) P1 gen bölgesinin değişken sekans bilgisinin strainların ayırımında kullanılabileceğini bildirmiştir. Bizim çalışmamızda da P1 protein bölgesi ile elde edilen filogenetik analiz sonuçlarına baktığımızda CP bölgesi ile benzer sonuca sahip olduğu görülmektedir ve P1 bölgesinin filogenetik analiz için kullanılabileceği sonucu ortaya çıkmaktadır.

Farklı illerden alınan izolatlar benzer sekans dizilimine sahip iken, aynı bölgeden alınan bitkiler arasında sekans farklılığı görülmektedir. Örneğin Kumluca ilçesinden alınan K17 sakız kabağı izolatı ile Kazan izolatı olan AHM1 izolatı aynı kümede yer almaktadır (Şekil 4.12). İran izolatları arasında yapılan çalışmalarda izolatlar arasındaki değişimin izolasyon zamanlarına ve ya coğrafik olarak ilişkili gözlenmemiştir (Bananej vd. 2008). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde izolatlar arasındaki

değişimin, toplandığı bölge ve zamanla ilişkili olmadığı görülmektedir. Benzer sonuçlar Glasa vd. 2004 tarafından da rapor edilmiştir.

Potyviruslerde korunmuş bölge olduğu bildirilen ve P1 protein bölgesinde yer alan “FIVRG” motifinin ZYMV izolatlarında “LVIRG” olarak değiştiği bildirilmektedir (Verchot vd. 1991, Wisler vd. 1995). Çalışmamızda benzer şekilde izolatlar arasında bu bölgenin “LVIRG” olarak değiştiği sonucu ortaya çıkmaktadır. Çalışmada kullandığımız DEM, D14, KZN1 ve K17 izolatlarında da bu bölgede mutasyon olduğu ve “LVVVRG” olarak değiştiği görülmektedir (Çizelge 4.8). Bu dört izolattan 2 tanesi (DEM, D14) Antalya ilinin Demre ilçesinden hıyar bitkisinden, bir tanesi (K17) Kumluca ilçesinden ve bir tanesi ise Ankara ilinin Kazan ilçesinden (KZN1) sakız kabağı bitkilerinden alınan örneklerden oluşmaktadır. Bu da izolatlar arasındaki amino asit değişiminin yer ve konukçuya bağlı olmadığını göstermektedir.

Potyviruslerin HC-Pro bölgesinin proteolitik aktivite, afitle taşınma, hücreden hücreye taşınma, virülenslik, viral genomun çoğaltılması ve gen susturulmasının baskılanması dahil pek çok fonksiyona sahip olduğu bilinmektedir. Bu bölgede oluşan bir mutasyonun potyvirus enfeksiyonu sonucu oluşan belirtileri değiştirdiği rapor edilmiştir. Gal-On (2000) yaptığı çalışmalarda HC-Pro’nin FRNK bölgesinde meydana gelen tek bir amino asit değişiminin sadece ZYMV ile enfekteli bitkilerin semptom oluşturmalarını etkilediğini bildirmiştir (Desbiez vd. 2010).

Potyviruslerin afitle taşınmasında iki viral proteinin 3 motifinin rol oynadığı bildirilmektedir. Bunlar CP’nin N-terminal uç bölgesinde bulunan “DAG” motifi ile HC-Pro’nin N-terminal uç bölgesinde ki “KLSC” motifi ve merkezi bölgede bulunan “PTK” motifidir. Bu motifler HC-Pro’nin afit styletine bağlanmasını sağlamaktadır (Wang vd. 2006, Atreya vd. 1992, Atreya ve Pirone 1993). Çalışmada kullandığımız izolatlar arasında bu bölgelerin korunmuş olduğu görülmektedir.

P3 ve P1 potyvirusler arasında en az korunmuş bölgelerdir. PYV ve ZYMV izolatlarında P1 bölgelerinde yüksek oranda polimorfizm gözlenmiştir. P3 gen

bölgesindeki tek bir amino asit değişiminin ZYMV'nin semptom şiddetini etkilediği bildirilmiştir (Desbiez vd. 2003). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde “MREK” motifinde mutasyona uğrayan izolatlar elde edilmiştir. Bu sonuç doğrultusunda ZYMV'ye dayanıklı olarak üretilen ticari tohumlarda virüsün dayanıklılığı kırıp enfeksiyon yapan ırkların ortaya çıkması ile etmenin yayılması devam etmekte olduğu sonucuna varılmaktadır.

Desbiez vd. (2002), Nİb protein bölgesinin C uç kısmının değişken olduğunu ve N uç kısmının daha korunmuş olduğunu bildirmişlerdir. Potyviruslerde ve ZYMV izolatlarında Nİb bölgesi virüsün RdRp'sidir ve bölgenin en korunmuş bölge olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiş olup izolatlar arasında Nİb bölgesinde çok fazla bir değişkenlik bulunamamış olup bölgenin özellikle N uç kısmının korunduğu görülmektedir (Çizelge 4.12).

Serolojik olarak birbirinden ayrılan küme 1 ve küme 3 izolatları arasında ki farkın, örtü proteinlerin N-terminal uç kısmına bakıldığında küme 1 ve 2'de bulunan “AAVT” amino asitlerinin yerine küme 3'de “VAAK” amino asitlerinin olduğu rapor edilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız izolatlarda bu motiflere baktığımızda “AAVT” motifinin A1 altgrupta yer alan izolatlarda korunmuş olduğu görülmekte ve izolatların A3 alt grubuna ait olmadığı anlaşılmaktadır. Bu sonuç izolatların filogenetik ağaçta A1 alt grubunda toplanmasını doğrulamaktadır. Yine A1 alt grubundan ayrılan ve A4 alt grubunda toplanan Y4, Y21 ve Y23 izolatlarının bu bölgelerinde mutasyon olduğu ve bu mutasyonun yine A4 alt grubuna ait olan ZYMV-Liaocheng ve C05-205 izolatlarıyla benzer olduğu görülmektedir (Çizelge 4.13).

Martinik ve Guadeloupe adalarında takip eden yıllarda ZYMV'nin değişkenliğinin evrimi çalışılmıştır. Martinik adasında 6 yıl sonunda moleküler sapma düşük kalmıştır. Strainler arasında ki etkileşimlerde serolojik çeşitliliğin azalmasına rağmen yüksek biyolojik çeşitlilik ve moleküler sapma düşük kalmıştır. Guadolap adasında, virüsün adaya girişinden sonra serolojik değişkenlik son derece artmıştır.

Dünyada 200'den fazla izolatın örtü proteini kodlama bölgesinde dahil genomun 3'ucunun sekans verileri elde edilmiştir (Desbiez vd. 2002). Farklı ZYMV izolatların CP'lerinin aminoasit sekans benzerliğinin %90'dan daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu oran potyvirus genomunun en değişken bölgelerinden olan CP'nin N uç bölgesindeki 41 amino asitten kaynaklandığı bildirilmektedir (Yakoubi vd. 2008). Şekil 4.23'de görüldüğü üzere çalışmamızda da benzer şekilde örtü proteininin ilk 40 amino asitlik kısmının çok değişken olduğu ve merkez ile C uç kısmının daha az değişken olduğu görülmektedir. Çalışmamızda kullandığımız izolatlarda da benzer sonuçlar elde edilmiş olup CP'nin N uç kısmındaki 40 amino asitin değişkenliği görülmektedir.

CP'lerin amino asit dizilerinin kullanımı son yıllarda farklı potyviruslerin akraba strainlerin taksonomik sınıflandırılmasında kullanılan yararlı bir araç haline gelmiştir (Shukla vd. 1994, Kundu vd. 1997). Bizim çalışmamızda da önceki yapılan çalışmalar ile paralellik göstermekte ve özellikle CP N uç kısmı izolatlar arasında yüksek oranda değişken olduğu görülmektedir.

Örtü proteinlerinin N-terminal uç kısmında yer alan DAG motifi tüm Potyviruslerde korunmuştur ve bu motif virüslerin afitle taşınmasında rol oynamaktadır. Bu bölgede meydana gelen bir mutasyon sonucu virüs afitle taşınma yeteneğini kaybettiği bildirilmiştir (Desbiez vd. 2003, Tobias vd. 2003). Çalışmamızda kullandığımız ZYMV Türkiye izolatlarında bu motifin korunduğu görülmekte ve bu sonuç da izolatların etkin şekilde afitler ile kolayca komşu tarlalara yayılmasını sağladığı düşünülmektedir.

5.1 Sonuçlar

Bu çalışma ile 2011-2012 yılları arasında Antalya, Ankara ve Burdur illerinden kabakgil alanlarından toplanan izolatlardaki virüs etmenlerinin varlığı serolojik olarak testlenmesi ve Konya, Karaman, ve Aksaray illerinden toplanan izolatlarla birlikte ZYMV izolatlarının kodladığı protein gen bölgelerinin moleküler karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda Antalya ilinin Kumluca, Aksu, Serik ve Demre ilçelerinden, kabakgil tarımının yapıldığı örtü altı alanlardan kış döneminde,

Elmalı ilçesinin çeşitli köylerinden ise kabakgil tarımının yapıldığı açık alanlardan örnekler toplanmıştır. Ankara ilinin Çubuk, Şereflikoçhisar, Nallıhan, Beypazarı, Gölbaşı, Kazan ilçelerinden açıkta kabakgil tarımı yapılan alanlarından virüs belirtisi gösteren bitkilerden örnekler alınmıştır. Burdur ilinde survey yapılmamış olup rastlantı sonucu enfeksiyon görülen iki farklı tarladan örnek alımı yapılmıştır.

Örnekler virüs belirtisi gösteren kabak, kavun, karpuz, hıyar ve çerezlik kabak bitkilerinden alınmıştır. Surveyler esnasında virüs belirtisi gösteren bitkilerden yaprak ve meyve örnekleri alınmıştır. Bitkilerde görülen yapraklarda kabarcık oluşumu, sararma, mozaik, şekil bozukluğu, meyvelerde beneklenme gibi belirti gösteren bitkilerden alınan örnekler çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Yine çalışmada kullandığımız Konya, Karaman ve Aksaray izolatları Dr. Serkan Yeşil tarafından temin edilmiş olup teşhisi yapılmış izolatlardır.

Çalışmada 30 adet kavun, 66 adet bal kabağı, 126 adet sakız kabağı, 6 adet karpuz, 12 adet çerezlik kabak ve 4 adet hıyar bitkisi olmak üzere toplam 242 enfekteli bitki örneği (219yaprak ve 23 meyve örneği) ile çalışılmıştır.

Çalışma için farklı bölgelerden ve farklı bitkilerden alınan enfekteli yaprak ve meyve örnekleri ZYMV, WMV, CMV, PRSV, SqMV ve CGMMV virüslerine karşı testlenmiştir. Antalya ilinin Kumluca ilçesinden 18, Aksu 12, Demre 15, Elmalı 40, Serik 11 olmak üzere toplam 96 örnek ELISA testine tabi tutulmuştur. Ankara ilinden Çubuk 24, Şereflikoçhisar 12, Nallıhan 13, Beypazarı 37, AÜZF 30, Gölbaşı 5, Ayaş 7 olmak üzere 128 örnekle çalışılmıştır. Burdur ilinden alınan 5 örnekte ELISA testine tutulmuştur. Konya, Karaman ve Aksaray'dan gelen örnekler teşhisi yapılmış örnekler olduğu için ELISA testine tabi tutulmamıştır.

ELISA testleri sonunda Antalya ilinden toplanan örneklerin %39 WMV, %27 ZYMV, %16 CMV ve %1 CGMMVetmenlerinin varlığı tespit edilirken bu ilde SqMV ve PRSV enfeksiyonlarına rastlanmamıştır. Ankara ilinden alınan örneklerde testlenen tüm

virüsler farklı oranlarda tespit edilmiştir. Antalya iline benzer şekilde bu ilden alınan örneklerde yine ZYMV ve WMV en yaygın virüsler olarak belirlenmiştir. AÜZF deneme tarlasında virüslerin varlığı daha yoğun çıkmış olup bunda etken faktörün melezleme çalışmaları esnasında virüsün mekanik olarak hızlı yayılmasına sebep olmuş olabileceği düşünülmektedir. Ankara ilinden alınan örneklerin hepsinde testlenen virüsler tespit edilmiş olup CGMMV, Elmalı ilçesinde, Beypazarı ve AÜZF deneme parselinde bu çalışma ile ilk defa bölgede tespit edilmiştir.

RT-PCR işlemi sonunda izolatların farklı gen bölgeleri ZYMV'ye spesifik primer çiftleri ile çoğaltılmış ve istenen uzunlukta bantlar elde edilmiştir.

Proteaz aktivitesine sahip olan P1 protein bölgesinin 930 bazdan oluşan 310 amino asitlik tam sekansı, multifonksiyonel olan HC-Pro bölgesinin 1368 bazdan oluşan 462 amino asitlik tam sekansı ve genomu kapsitleme ve taşınma gibi birçok fonksiyona sahip olan CP bölgesinin 837 nükleotit ve 279 amino asitten oluşan tüm sekans verileri elde edilmiştir.

Enfekteli bitkilerin hücrelerinde silindirik inclusionlar oluşturan CI gen bölgesi 1902 bazın oluşturduğu 634 amino asit uzunluğunda olup çalışmamızda sadece CI proteinin N-terminal uç kısmını oluşturan 296 amino asitten oluşan kısmi sekansı ile çalışılmıştır.

P3 gen bölgesi 346 amino asit uzunluğunda olup filogenetik analiz çalışmalarında 195 amino asitlik kısmi sekansı ile çalışılmıştır. Tüm Potyviruslerde olduğu gibi ZYMV'de de RdRp enzimini kodlayan N1b protein gen bölgesi 516-517 amino asit uzunluğunda olup çalışmamızda 458 amino asitten oluşan kısmi sekansı ile çalışılmıştır.

Kabak sarı mozaik virüsünün protein gen bölgelerinin karakterizasyonu için yapılan bu çalışmada Ankara, Antalya, Konya, Burdur, Aksaray ve Karaman'dan elde edilen

izolatların P1, HC-Pro, P3, CI, NlB ve Cp protein gen bölgelerinin sekans verileri elde edilmiş, bu verilerin NCBI’da kayıtlı olan ZYMV verileri ile karşılaştırılarak filogenetik ve amino asit analizleri yapılmıştır. Yaptığımız çalışma sonuçlarına göre Türk izolatlarının çoğu Dünya’da ve Avrupa’da en yaygın grup olan A1 altgrubunda yer almıştır. Yalnız Antalya ilinin Elmalı ilçesinden alınan Y4 (kavun), Y21 ve Y23 (sakız kabağı) izolatları sadece NlB protein gen bölgesinde A1 alt grubu izolatları ile benzer dallanma gösterirken, CP gen bölgesi açısından Fransa’da yeni ortaya çıkan C05-205 ve Güney Kore izolatı olan ZYMV-Liaocheng izolatları ile aynı dallanmayı göstererek A4 grubunda yer almışlardır. ZYMV-Liaocheng ve ZYMV-C05-205 izolatlarının NCBI veri bankasında sadece CP bölgelerine ait sekans verileri bulunmakta olup diğer gen bölgelerine ait veriler bulunmadığı için karşılaştırma yapılamamıştır. Bugüne kadar A4 grubu Avrupa’da Fransa ve Polonya’da rapor edilmiştir. Çalışmamız ile ZYMV Türkiye izolatlarının protein bölgeleri ilk defa çalışılmış olup, izolatlar A1 ve A4 olmak üzere iki ayrı küme oluşturmuşlardır.

Çalışma kapsamında kabakgil yetiştirilen alanlardan sakız kabağı, bal kabağı, kavun, karpuz, hıyar bitkilerinden örnekler alınmış olup DAS-ELISA sonuçlarında ZYMV ile enfekteli olan örneklerin protein gen bölgeleri çoğaltılmış ve MEGA 6 programı kullanılarak analizleri yapılmıştır. Analizler incelendiğinde izolatlar arasında nükleotit farklılıkları belirlenmiş olup bu farklılıkların alındığı bitki ve alındığı yer ile ilişkilendirilemeyeceği ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda kullanılan ve diğer izolatlardan ayrı bir grupta yer alan izolatlar Antalya ilinin Elmalı ilçesinden alınmış olup Y4 izolatı kavun bitkisinden ve Y21 ile Y23 izolatları ise sakız kabağı meyvelerinden alınmıştır. Bu izolatlar DAS-ELISA sonuçlarına göre sadece ZYMV ile enfekteli tespit edilmiş olup karışık enfeksiyon bulunmamaktadır. Bu örneklerin aynı grupta yer alması izolatlarda meydana gelen mutasyonun konukçuya bağlı olmadığı sonucunu ortaya çıkarmaktadır.

Çalışmamızda Potyviruslerde ve ZYMV izolatları arasında korunmuş olan önemli bazı motiflerin Türk izolatlarında da korunduğu görülmektedir. Fakat bazı izolatlarda MREK

gibi önemli motiflerde mutasyon olduğu belirlenmiştir. P3 protein bölgesi ile yapılan çalışmalarda MREK motifinde meydana gelen bir mutasyonun sonucu, virüsün dayanıklı bitkilerde dayanıklılığı kırdığı ve bitkilerde hastalık oluştuğu bildirilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız Aksu izolatları olan AS1, AS5, AS6, AS8, BE13, BE15, BE18, BE22 izolatlarında bu bölgede mutasyon belirlenmiştir. Bu sonuca göre yetiştiriciler ZYMV'ye dayanıklı bitki yetiştirse bile dayanıklılığı kıran bu ZYMV izolatları arazide bulunduğu sürece hastalığın devamının sağlanacaktır. Ayrıca bu sonuç, ileride planlanacak olan dayanıklılık çalışmaları için temel oluşturacağı düşünülmektedir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda ZYMV izolatlarının sınıflandırılmasında genellikle en değişken bölge olarak bildirilen Nİb proteinin C uç kısmı ile CP bölgesinin N uç kısmının birleştiği bölge kullanılmıştır. Çalışmamızda ZYMV izolatlarının sınıflandırılmasında P1, HC-Pro, P3 ve CI protein gen bölgeleri, CP gen bölgesi ile benzer sonuçlar vermiş olup bu bölgelerin ZYMV izolatlarının ayırımında kullanılabileceği anlaşılmaktadır.

Bitki patojeni virüsler tarım alanlarında önemli hastalık etmenleri olup herhangi bir kimyasal mücadele yöntemleri bulunmamaktadır. Ayrıca bu etmenlerin afit vektörleri ile kolayca yayılma yeteneklerine sahip olmaları onların tarım alanlarında yayılmalarını kolaylaştırmaktadır. Virüslerin mücadelesinde afit vektörlerine karşı kimyasal mücadele olmasına karşın onların mekanik olarak taşınabilmeleri ve yabancı otlar üzerinde taşınmaları virüslerle mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Bitki patojeni virüslerin moleküler yapıları ve viral döngüde proteinlerin fonksiyonları hakkında bilgi edinilmesi halinde, onlarla etkili mücadele yöntemlerini bulma yolu açılmış olacaktır. Yapılan çalışma ile öncelikle ZYMV'nin moleküler yapısı hakkında bilgi edinilmiş olup bu çalışma, ileride yapılacak olan diğer çalışmalara temel oluşturmaktadır.

Çalışmamızda kullandığımız izolatların çoğu A1 grubu içinde yer alırken, farklı grup oluşturan izolatlar A4 grubunda yer almaktadır. Bu grupta yer alan Y4, Y21, Y23 izolatlarının rekombinant izolatlar olabileceği düşünülmektedir. A4 grubu ilk defa

Fransa ve Polonya’da belirlenmiş olup diğer ülkelerde bugüne kadar rapor edilmemiştir. Yaptığımız çalışma ilk defa Fransa ve Polonya dışında ülkemizde A4 grubunun varlığı tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışma kısıtlı süre içinde toplanan izolatlardan elde edilmiştir. Birbirini takip eden yıllar içinde virüsün değişimini takip eden bir çalışma ile, ZYMV Türkiye izolatlarının virüsün değişkenliği hakkında daha geniş bilgi elde edilmesi ile birlikte diğer grupların varlığının araştırılması gereken önemli konulardır.

Çalışmamızda elde edilen gen bölgelerine ait sekans verileri NCBI gen bankasında depolanmakta olup erişim numaraları EK 2’de verilmiştir.

KAYNAKLAR

- Anonim. 2014. Web Sitesi. <http://www.tuik.gov.tr>, 2014
- Anonymous. 2014. Web Sitesi. <http://faostat.fao.org>.The FAO Statistical Database (FAOSTAT): Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2015
- Anonymous. 2015. Web Sitesi. https://www6.inra.fr/pvy_organization_eng/Potato-virus-Y/Genome, 2015.
- Atreya, C.D., Atreya, P.L., Thornbury, D.W. and Pirone, T.P. 1992. Site-directed mutations in the potyvirus HC-Pro gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in infected tobacco plants. *Virology*, 191; 106-111.
- Atreya, C.D. and Pirone, T.P. 1993. Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: effects of amino acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 11919–11923, USA.
- Astruc, N., Marcos, J.F., Macquaire, G., Candresse, T. and Pallas, V. 1996. . Studies on the diagnosis of hop stunt viroid in fruit trees : identification of new hosts and application of nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents. *European Journal of Plant Pathology*, 102 (9); 837-846
- Ballut, L, Drucker M, Pugnier M, Cambon F, Blanc S, Roquet F, Candresse T, Schmid HP, Nicolas P, Le Gall O, Badaoui S. 2005. HcPro, a multifunctional protein encoded by a plant RNA virus, targets the 20S proteasome and affects its enzymic activities. *Journal of General Virology*. 86:2595–2603
- Bananej, K., Keshavarz, T., Vahdat, A., Hosseini-Salekdeh, G. and Glasa, M. 2008. Biological and Molecular Variability of Zucchini yellow mosaic virus in Iran. *Journal of Phytopathology*. 156; 654–659.
- Baratova, L.A., Efimov, A.V., Dobrov, E.N., Fedorova, N.V., Hunt, R., Badun, G.A., Ksenofontov, A.L., Torrance, L. and Järvekülg, L. 2001. In situ spatial organization of *Potato virus A* coat protein subunits as assessed by tritium bombardment. *Journal of Virology*. 75, 9696–9702.
- Bostan, H., Kaymak, H, Ç., and Haliloğlu K., 2002. Detection of CMV and ZYMV in Squash in Erzurum, Erzincan and Artvin Provinces by Serological and Biological Methods. *The Journal of Turkish Phytopathology*, No:1, 32; 9-14.
- Choi, S.K., Yoon, J.Y. and Sohn, S.H. 2007. Analysis of the complete genome sequence of ZYMV strain A isolated from Hollyhock. *The Plant Pathology Journal*, 23; 245-250

- Clark, M.F. and Adams, S.A.N. 1977. Characteristics of Micro Plates Method of Enzyme-linked-immunosorbent Assay for Detection of Plant Viruses. *Journal of General Virology*. 34; 475-483.
- Coutts, B.A., Kehoe, M. A., Webster, C. G., Wylie, S. J., and Jones, A. L. 2011. Zucchini yellow mosaic virus: Biological properties, detection procedures and comparison of coat protein gene sequences. *Archives of Virology*. 156; 2119–2131.
- Çıtır, A., Kutluk, N. D., Sağlam, N. ve İlbağı, H. 1998. Amasya, Çorum, Samsun ve Tokat illerinde hıyar ve kabak kültürlerinde görülen virüs hastalıklarının simptomatolojik ve biyolojik yöntemlerle tanıları. VIII. Türkiye Fitopatoloji Kongre Bildirileri, 21–25 Eylül 1998, Ankara, 331–335.
- Dağ, D.S. 2005. Gaziantep İl Ve İlçelerinde Yetiştirilen Kabakgillere (Cucurbitaceae) Zarar Veren Virüslerin DAS-ELISA Yöntemiyle Saptanması. Yüksek Lisans Tezi. Gaziantep Üniversitesi
- Değirmenci, K. ve Güldür, M.E. 2006. Hıyarlarda Zucchini yellow mosaic virüs (ZYMV)'ün çapraz koruma (cross protection) ile kontrolü. *Bitki Koruma Bülteni* 2007, 46 (1-4): 13-23.
- Desbiez, C., Wipf-Scheibel, C., Granier, F., Robaglia, C., Delaunay, T., Lecoq, H. 1996. Biological and molecular variability of zucchini yellow mosaic virus in the island of Martinique. *Plant Disease*. 80; 203–207
- Desbiez, C. and Lecoq, H. 1997. Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Pathology* 46, 809–29.
- Desbiez, C., Wipf-Scheibel, C. and Lecoq, H. 2002. Biological and serological variability, evolution and molecular epidemiology of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, *Potyvirus*) with special reference to Caribbean islands. *Virus Research* 85; 5- 16
- Desbiez, C., Gal-On, A., Girard, M., Wipf-Scheibel, C. and Lecoq, H. 2003. Increase in *Zucchini yellow mosaic virus* symptom severity in tolerant zucchini cultivars is related to a point mutation in P3 protein and is associated with a loss of relative fitness on susceptible plants. *Phytopathology* 93:1478-1484.
- Desbiez, C., Girard, M. and Lecoq, H. 2010. A novel natural mutation in HC-Pro responsible for mild symptomatology of Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, *Potyvirus*) in cucurbits. *Archives of Virology*. Volume 155, Issue 3; pp. 397-401
- Desbiez C., Lecoq H., 2012. Viruses of Cucurbit Crops in the Mediterranean Region: An Ever-Changing Picture. *Advances in Virus Research*. Academic Press. 68-114

- Dougherty, W.G., and Semler, B.L. 1993. Expression of Virus Encoded Proteinases, Functional and Structural Similarities with Cellular Enzymes. *Microbiological Reviews.*, 57: 781-822.
- Dolja, V.V., Herndon, K.L., Pirone, T.P. and Carrington, J.C. 1993. Spontaneous mutagenesis of a plant potyvirus genome after insertion of a foreign gene. *Journal of Virology.* 67, 5968–5975
- Ertunc, F. 1992. Ankara ilinde kabaklarda enfeksiyon oluşturan viral etmenin teşhisi üzerinde araştırmalar. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 1252, 13s.
- Gal-On, A., Antignus, Y., Rosner, A. and Raccach, B. 1990. Nucleotide sequence of the zucchini yellow mosaic virus capsid-encoding gene and its expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 87; 273–277.
- Gal-On, A and Raccach B. 2000. A point mutation in the FRNK motif of the potyvirus HC-Pro gene alters symptom expression in cucurbits and exhibits protection against the severe homologous virus. *Phytopathology* 90:467-473.
- Gal-On, A. 2007. Zucchini yellow mosaic virus: insect transmission and pathogenicity – the tails of two proteins. *Molecular Plant Pathology.* 8:139–150.
- Glasa M, Palkovics L, Kománek, P., Labonne, G., Pittnerová S, Kudela O, Candresse T, Šub Z. 2004. Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of Plum pox virus are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. *Journal of General Virology*, 85; 2671–2681.
- Glasa, M. ve Pittnerová, S. 2006. Complete Genome Sequence of a Slovak Isolate of Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV) Provides Further Evidence of a Close Molecular Relationship Among Central European ZYMV Isolates. *Journal of Phytopathology* 154, 436–440
- Glasa M, Svoboda J, Nováková S 2007. Analysis of the molecular and biological variability of Zucchini yellow mosaic virus isolates from Slovakia and Czech Republic. *Virus Genes* 35; 415–421
- Ha, C., Coombs, S., Revill, P. A., Harding, R. M., Vu, M., and Dale, J. L. 2008. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. *Archives Virology.* 153:25–36.
- Hasiów-Jaroszewska B., Rymelska N., Borodynko N., Pospieszny H., 2013. Biological and Molecular Characterization of The Polish *Zucchini Yellow Mosaic Virus* Isolates. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus* 12(2) 2013, 75-85
- Hosseini, S., Mosahebi, G. H., Koohi Habibi M. ve Okhovvat S. M. 2007. Characterization of the *Zucchini Yellow Mosaic Virus* from Squash in Tehran Province. *Journal of Agricultural Science and Technology.* Vol. 9; 137-143

- Huet H, Gal-On A, Meir E, Lecoq H, Raccach B. 1994. Mutations in the helper component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. *Journal of General Virology*, 75; 1407–1414
- Hull, R. 2002. *Matthews' Plant Virology*, 4th. ed. San Diego; Academic Press, USA.
- Karamanlı A., 2007. Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti (KKTC)'nde Kabakgil Yetiştirilen Alanlarda Hıyar Mozayik Virüsü (*Cucumber Mosaic Virus*, CMV) Ve Kabak Sarı Mozayik Virüsü (*Zucchini Yellow Mosaic Virus*, ZYMV)'Nün Surveyi. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kaya, A. ve Erkan, S., 2011. İzmir, Aydın, Manisa ve Balıkesir İllerinde Üretilen Kabakgillerdeki Viral Etmenlerin Tanımlanması ve Yaygınlıklarının Belirlenmesi. *Bitki Koruma Bülteni* 2011, 51 (4); 387-405
- Köklü G ve Yılmaz Ö., 2006. Occurrence of cucurbit viruses on field-grown melon and watermelon in the Thrace region of Turkey. *Phytoprotection* 87; 123-130
- Kundu, A.K., Ohshima, K., Sako, N., 1997. Nucleotide sequences of the coat protein genes of two Japanese zucchini yellow mosaic virus isolates. *Acta Virology*. 41; 297–301.
- Kwon, S.-W., Kim, M.-S., Choi, H.-S. and Kim, K.-H. 2005. Biological characteristics and nucleotide sequences of three Korean isolates of *Zucchini yellow mosaic virus*. *Journal of General Plant Pathology*, 7; 80-85.
- Lecoq, H., Pitrat, M., and Cle'ment, M. 1981. Identification et caracté'risation d'un potyvirus provoquant la maladie du rabougrissement jaune du melon. *Agronomie* 1; 827–834.
- Lecoq, H., Bourdin, D., Raccach, B., Hiebert, E., and Purcifull, D. E. 1991. Characterization of a Zucchini Yellow Mosaic Virus isolate with a deficient helper component. *Phytopathology*, 81; 1087–1091.
- Lee KC, Wong SM, Mahtani PH, Chng CG 1997. Sequence and phylogenetic analysis of the cytoplasmic inclusion protein gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: its role in classification of the potyviridae. *Virus Genes* 14; 41–53
- Lee, K.C. ve Wong S. M., 1998. Variability of P1 protein of Zucchini yellow mosaic virus for strain differentiation and phylogenetic analysis with other potyviruses. *DNA Sequence*, 9: 275-293.
- Lin, S.-S., Hou, R.F., Huang, C.-H., Yeh, S.-D., 1998. Characterization of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) isolates collected from Taiwan by host reactions, serology, and RT-PCR. *Plant Protection Bulletin*. 40, 163–176.

- Lin, S. S., Hou, R. F. and Yeh, S. D. 2001. Complete genome sequence and genetic organization of a Taiwan isolate of *Zucchini yellow mosaic virus*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 42; 243-250
- Lisa V, Boccardo G, D'Agostino G, Dellavalle G, d'Aquilio M. 1981. Characterization of a potyvirus that causes zucchini yellow mosaic. *Phytopathology* 71; 667–672.
- Lisa, V., and Lecoq, H. (1984). *Zucchini Yellow Mosaic Virus*. CMI/AAB Description of plant viruses, no 282.
- Nováková, S. Svoboda, J., Glasa, M. 2014. Analysis of the complete sequences of two biologically distinct Zucchini yellow mosaic virus isolates further evidences the involvement of a single amino acid in the virus pathogenicity. *Acta Virology*, 58(4); 364-7.
- Özer M, Sipahioğlu H. M., Usta M, Fidan H., 2012. Cloning and sequencing of coat protein gene of Zucchini yellow mosaic virus isolated from squash and muskmelon in Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 36; 423-429
- Paylan İ. C. 2011. Bazı Sebze Türlerinin Tohumlarındaki Virüslerin Belirlenmesi ve Tohumlardaki Viral Enfeksiyonların İnaktifleştirilmesi Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi
- Peng, Y.H., Kadoury, D., Gal-On, A., Huet, H., Wang, Y. and Raccah, B. 1998. Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: effects on aphid transmission and binding to purified virions. *Journal of General Virology*. 79; 897–904.
- Pinto, Z.V., Rezende, J.A.M., Yuki, V.A., Piedade, S.M.S., 2008. Ability of *Aphis gossypii* and *Myzus persicae* to transmit Cucumber mosaic virus in single and mixed infection with two potyviruses to zucchini squash. *Summa Phytopathologica* 34; 183-185.
- Pfossner, M.F. and Bauman, H. 2002. Phylogeny and geographical differentiation of ZYMV isolates based on molecular analysis of the coat protein and part of the cytoplasmic inclusion protein genes. *Archives Virology*., 147; 1599-1609
- Plisson, C. Drucker, M. Blanc, S. German-Retana, S. Le-Gall, O., Thomas, D., Bron, P. 2003. Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 278; 23753–23761
- Prieto, H., Bruna, A., Hinrichsen, P. ve Munoz, C., 2001. Isolation and Molecular Characterization of a Chilean Isolate of Zucchini Yellow Mosaic Virus. *Plant Disease*, 85:644-648.)
- Revers, F. Le-Gall, O., Candresse, T., Maule, A.J. 1999. New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*. 12; 367–376.

- Ryan, M.D., Flint, M., 1997. Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. *Journal of General Virology*. 78; 699–723.
- Rybicki, E.P., Shukla, D.D. 1992. Coat protein phylogeny and systematics of potyviruses. *Archives Virology* 5; 139–170.
- Safaeizadeh, M. 2008. Comparative Biological and Molecular Variability of *Zucchini yellow mosaic virus* in Iran. *Asian Journal of Plant Pathology*, 2; 30-39.
- Sertkaya, G., Sertkaya, E., Yetisir, E., Kaya, K., 2004. Investigations on Incidence and Transmission of ZYMV in Cucurbites in Hatay Province. *Proceedings of the First Plant Protection Congress of Samsun in Turkey*, s.217.
- Sevik, M. A ve Arlı-Sökmen, M., 2003. Viruses Infecting Cucurbites in Samsun, Turkey. *Plant Disease*, 87; 341-344.
- Siaw, M. F. E., Shahababuddin, M., Ballad, S., Shaw, J. G. And Roads, R. E. 1985. Identification of a protein covalently linked to the 5' terminus of Tobacco vein mottling virus RNA. *Virology* 142; 134-143.
- Sidek, Z., Tokumasu, T., ve Sako, N., 1999. Biological Properties and Coat Protein Sequence Comparison of Two Isolates of Zucchini Yellow Mosaic Potyvirus in Malaysia. *Proceedings MARRS Fifth International Conference on Plant Protection in the Tropics*, 415-418p.
- Simons, H.E., Holmes, E.C., Stephenson, A.G., 2008. Rapid evolutionary dynamics of Zucchini yellow mosaic virus. *Journal of General Virology*, 89; 1081–1085.
- Simmons, H. E., Holmes, E. C., Gildow, F. E., Bothe-Goralczyk, M. A., and Stephenson, A. G. 2011. Experimental verification of seed transmission of zucchini yellow mosaic virus. *Plant Disease*. 95; 751–754.
- Shukla, D.D., Ward, C.W. and Brunt, A.A. 1994. *The Potyviridae*. CAB International, Wallingford.
- Syller, J., 2006. The roles and mechanisms of helper component proteins encoded by potyviruses and caulimoviruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67 119–130
- Takaki, F., Sano, T., Yamashita, K., 2006. The complete nucleotide sequence of attenuated onion yellow dwarf virus: a natural potyvirus deletion mutant lacking the N-terminal 92 amino acids of HC-Pro. *Archives of Virology*, Volume 151, Issue 7, pp 1439-1445
- Taliansky, M., Torrance, L., and Kalinina, N., 2008. Role of Plant Virus Movement Proteins. From: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 451, *Plant Virology Protocols: 33 From Viral Sequence to Protein Function* Edited by G.D. Foster, I.E. Johansen, Y. Hong, and P.D. Nagy © Humana Press, Totowa, NJ.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30; 2725-2729.
- Thomson, K.G., Dietzgen, R.G., Gibbs, A.J., Tang, Y.C., Liesack, W., Teakle, D.S., Stackebrandt, E., 1995. Identification of zucchini yellow mosaic potyvirus by RT-PCR and analysis of sequence variability. *Journal of Virology Methods*, 55; 83–96.
- Tóbiás, I., and Palkovics, L. 2003. Characterization of Hungarian isolates of zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, potyvirus) transmitted by seeds of *Cucurbita pepo* var. *Styriaca*. *Pest Management Science*, 59; 493–497.
- Tomimura, K., Gibbs, A.J., Jenner, C.E., Walsh, J.A., Ohshima, K. 2003. The phylogeny of turnip mosaic virus; comparisons of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent emergence in East Asia. *Molecular Ecology* 12; 2099–2111.
- Urcuqui-Inchima, S., Walter, J., Drugeon, G., German-Retana, S., Haenni, A.L., Candresse, T., Bernardi, F. and Le Gall, O. 1999. Potyvirus helper component–proteinase self interaction in the yeast two-hybrid system and delineation of the interaction domain involved. *Virology*, 258; 95–99.
- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A., Bernardi, F., 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research*. 74; 157–175.
- Wang, W-Q., Natsuaki, T., Kosaka, Y., Okuda, S., 2006. Comparison of the nucleotide and amino acid sequences of parental and attenuated isolates of Zucchini yellow mosaic virus. *Journal of General Plant Pathology*. 72; 52–56
- Wisler, G.C., Purcifull, D.E., Hiebert, E. 1995. Characterization of the P1 protein and coding region of the zucchini yellow mosaic virus. *Journal of General Virology* 76; 37–45
- Uçar, F. ve Ertunç, F., 1998. Antalya ili kabak seralarında görülen zucchini sarı mozaik virüsü'nün enfeksiyon kaynaklarının belirlenmesi üzerine araştırmalar. VIII. Türkiye Fitopatoloji Kongre Bildirileri, 21–25. Eylül. 1998, Ankara, 228–233.
- Vargün, Z. ve Ertunç, F., 1995. Sera koşullarında hıyar mozaik ve Zucchini sarı mozaik virüslerinin kabak bitkisinde karşılıklı etkileşimleri üzerinde araştırmalar. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongre Bildirileri, 26–29. Eylül. 1995, Adana, 387–391.
- Verchot, J., Koonin, E.V. and Carrington, J.C. (1991). The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology*, 185, 527-535.

- Verchot, J., Carrington, J.C., 1995. Evidence that the potyvirusP1 proteinase functions in *trans* as an accessoryfactor for genome amplification. Journal of Virology. 69; 3668–3674.
- Yakoubi, S., Desbiez, C., Fakhfakh, H., Wipf-Scheibel, C., Fabre, F., Pitrat, M., Marrakchi, M., and Lecoq, H. 2008a. Molecular, biological and serological variability of Zucchini yellow mosaic virus in Tunisia. Plant Pathology. 57; 1146–1154.
- Yakoubi, S., Desbiez, C., Fakhfakh, H., Wipf-Scheibel, C., Marrakchi, M., and Lecoq, H. 2008b. Biological characterization and complete nucleotide sequence of a Tunisian isolate of Moroccan watermelon mosaic virus. Archives Virology. 153: 775–781.
- Yardımcı, N. ve Korkmaz, S., 2004. Studies on Spread and Identification of Zucchini Yellow Mosaic Virus Disease in the North-West Mediterranean Region of Turkey by Biological Indexing and Double-stranded RNA Analysis. Plant Pathology Journal, 3: 1-4.
- Yelina, N. E., Savenkov, E. I., Solovyev, A. G., Morozov, S. Y. and Valkonen, J. P.T. 2002. Long Distance Movement, Virulence, and RNA Silencing SuppressionControlled by a Single Protein in Hordei- and Potyviruses:Complementary Functions between Virus Families. Journal of Virology, p. 12981–12991
- Yeşil S., 2013. Konya, Karaman ve Aksaray illeri kabakgil ekim alanlarında görülen virüs hastalıklarının serolojik ve moleküler yöntemlerle tespiti ve enfeksiyon kaynaklarının belirlenmesi. Doktora Tezi. Şelçuk Üniversitesi
- 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. Journal of Turkish Phytopathology, 13(1); 29-38.
- Yılmaz, M. A. ve Davis, R. F., 1985, Identification of viruses infecting vegetable crops along the Mediterranean Sea coast in Turkey. Journal of Turkish Phytopathology, 14 (1); 1–8.
- Yılmaz, M.A., Lecoq, H., Abak, K., Baloglu, S. ve Sarı, N., 1992. Türkiye’de Kabakgil Sebze Türlerinde Zarar Yapan Virüsler. Türkiye I. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, İzmir, Cilt 2; 439-442.
- Yılmaz, M.A., Abak, K., Lecoq, H., Baloglu, S., Sarı, N., Kesici, S., Ozaslan, M. ve Güldür, 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.353-356.
- Yılmaz, S. ve Sherwood, J. L., 2000, Comparison of the formats of three ELISA (PAS-ELISA, ACP-ELISA, Indirect ELISA Kit) and reagents for detection of some viruses infecting cucurbits. JJournal of Turkish Phytopathology. 29 (2–3); 121–131.
- Zhao, M. F., Chen, J., Zheng, H. Y., Adams, M. J., & Chen, J. P. 2003. Molecular analysis of Zucchini yellow mosaic virus isolates from Hangzhou, China. Journal of Phytopathology, 151; 307–311.

EKLER

EK 1 ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

EK 2 DAS-ELISA Sonuçları

EK 3 Total RNA Analizlerinde Kullanılan Solüsyonlar

EK 4 Gen Bankasında Depolanan İzolatlar ve Aksesyon Numaraları

EK 1 ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4 (Fosfat tampon çözeltisi)

8.0 gr NaCl
0.2 gr KH_2PO_4
2.9 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ veya
2.3 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1.44. gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1.15 gr Na_2HPO_4 (anhydrous)
0.2 gr KCl
0.2 gr NaN_3

Yukarıda miktarlar ıverilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH's ı0.1 N NaOH veya 0.1 N HCl ile ayarlanmışve 4 °C'de saklanmıştır.

2. Coating Buffer pH 9.6 (Kaplama tampon çözeltisi)

1.59 gr Na_2CO_3
2.93 gr NaHCO_3
0.2 gr NaN_3

Yukarıda miktarıverilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH'sıayarlanmışve 4 °C'de saklanmıştır.

3. Washing Buffer (Yıkama tampon çözeltisi)

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

4. Sample Extraction Buffer (Örnek tampon çözeltisi)

Bir litre y ıkama tamponu çözeltisi içine 20 gr Polyvinylpyrrolidone (PVP-40) ilave edilerek hazırlanmıştır.

5. Enzyme Conjugate Buffer (Konjugat tampon çözeltisi)

Bir litre örnek tampon çözeltisine 2 gr ovalbumin (BSA- Bovine Serum Albumin) ilave edilerek hazırlanmıştır.

6. Substrat Buffer pH 9.8 (Substrat tampon çözeltisi)

97 ml Diethanolamine 800 ml saf su içine ilave edildikten sonra HCl ile pH 9.8'e ayarlanarak 1 litreye tamamlanmıştır.

EK 2 DAS-ELISA Sonuçları

Örnek İsmi	Alındığı Bitki	ZYMV	WMV-II	CMV	PRSV	SqMV	CGMMV
Ç1	Bal kabağı	-	+	-	-	-	-
Ç2	Bal kabağı	+	+	-	-	-	-
Ç3 *	Karpuz	+	+	-	-	-	-
Ç4	Bal kabağı	-	-	-	-	-	-
Ç5 *	Bal kabağı	-	+	-	-	-	-
Ç6	Kavun	+	+	-	-	-	-
Ç7	Bal kabağı	+	+	-	-	-	-
Ç8	Bal kabağı	+	+	-	-	-	-
Ç9	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
Ç10	Karpuz	+	+	-	-	-	-
Ç11 *	Bal kabağı	-	+	-	-	-	-
Ç12	Bal kabağı	+	+	-	-	-	-
Ç13 *	Bal kabağı	+	+	-	-	-	-
Ç14	Bal kabağı	+	+	-	-	-	-
Ç15	Kavun	-	-	-	-	-	-
Ç16	Kavun	-	-	-	-	-	-
Ç17 *	Kavun	-	+	-	-	-	-
Ç18	Bal kabağı	-	+	-	-	-	-
Ç19	Bal kabağı	-	+	-	-	-	-
Ç20	Bal kabağı	-	+	-	-	-	-
Ç21	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
Ç22	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
Ç23	Sakız kabağı	-	+	-	+	-	-
Ç24 *	Sakız kabağı	-	+	+	-	-	-
B1	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
B2	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
B3	Sakız kabağı	+	+	-	-	-	-
B4	Sakız kabağı	+	+	-	-	-	-
B5	Sakız kabağı	-	-	+	-	-	-
B6	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	+
B7	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	+
B8	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
B9	Bal kabağı	-	+	-	-	-	+
B10	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	+
B11	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
B12	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	+

EK 2 DAS-ELISA sonuçları (Devam)

B13	Bal kabağı	-	-	-	-	-	+
Be1	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
Be2	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
Be3	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
Be4	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
Be5 *	Sakız kabağı	-	+	-	+	-	-
Be6 *	Sakız kabağı	+	+	-	-	-	-
Be7 *	Bal kabağı	+	+	-	-	-	-
Be8	Bal kabağı	+	-	-	-	-	-
Be9	Bal kabağı	+	-	-	-	-	-
Be10 *	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
Be11	Bal kabağı	+	-	-	-	-	-
Be12	Sakız kabağı	+	-	-	-	-	-
Be13 (m) *	Sakız kabağı	+	-	-	-	-	-
Be14 (m)	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
Be15 *	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
Be16	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
Be17 (m)	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
Be18 *	Sakız kabağı	+	+	-	-	-	-
Be19	Sakız kabağı	+	+	-	-	-	-
Be20(m)	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
Be21 (m)	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
Be22 (m) *	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
Be26(m) *	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
Be27 (m) *	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
N1	Bal kabağı	-	+	-	-	-	-
N2	Bal kabağı	-	-	-	-	-	-
N3	Kavun	-	-	-	-	-	-
N4	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
N5	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
N6	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
N7	Bal kabağı	-	+	+	-	-	-
N8	Bal kabağı	+	+	+	-	-	-
N9	Bal kabağı	-	+	-	-	-	-
N10	Kavun	-	+	+	-	-	-
N11	Bal kabağı	-	+	-	-	-	-
Ş1*	Kavun	+	+	-	-	-	-
Ş2	Kavun	+	-	-	-	-	-
Ş3 *	Kavun	+	-	-	-	-	-
Ş4	Kavun	-	+	-	-	-	-

EK 2 DAS-ELISA sonuçları (Devam)

Ş5 *	Kavun	+	-	-	-	-	-
Ş6	Kavun	-	-	-	-	-	-
Ş7	Çerezlik kabak	-	-	+	-	-	-
Ş8 *	Çerezlik kabak	+	-	-	-	-	-
Ş9	Çerezlik kabak	-	+	+	-	-	-
Ş10	Çerezlik kabak	-	-	+	-	-	-
Ş11	Çerezlik kabak	+	+	+	+	+	-
Ş12	Çerezlik kabak	+	-	+	+	-	-
G1(m) *	Sakız kabağı	+	-	-	-	-	-
G2 *	Sakız kabağı	+	-	-	-	-	-
G3 *	Sakız kabağı	+	-	-	-	-	-
G4	Bal kabağı	+	-	-	-	-	-
G5 (m)	S.k	+	-	-	-	-	-
AÜ-1	Bal kabağı	+	+	-	+	-	-
AÜ-2	Bal kabağı	+	-	+	-	-	-
AÜ-3	Bal kabağı	-	+	+	-	-	-
AÜ-4	Bal kabağı	-	+	+	+	-	+
AÜ-5	Bal kabağı	+	+	-	-		
AÜ-6	Bal kabağı	+	-	+	-	-	-
AÜ-7	Bal kabağı	+	+	-	-	-	
AÜ-8	Bal kabağı	-	-	+	-	-	-
AÜ-9	Bal kabağı	-	+	+	-	-	+
AÜ-10	Bal kabağı	+	+	-	-	-	-
AÜ-11	Bal kabağı	-	+	-	-	-	-
AÜ-12	Bal kabağı	-	+	-	-	-	-
AÜ-13	Bal kabağı	+	+	-	+	+	+
AÜ-14	Bal kabağı	+	+	-	+	-	+
AÜ-15	Bal kabağı	+	+	-	+	-	+
AÜ-16	Bal kabağı	+	+	-	+	-	+
AÜ-19	Bal kabağı	+	+	-	-	-	-
AÜ-20	Bal kabağı	+	+	-	-	+	-
AÜ-21	Bal kabağı	+	+	-	+	+	+
AÜ-22	Bal kabağı	+	+	-	+	+	+
AÜ-23	Bal kabağı	+	+	-	-	-	+
AÜ-24	Bal kabağı	+	+	-	-	+	+
AÜ-25	Bal kabağı	+	+	-	+	-	+
AÜ-26	Bal kabağı	-	+	+	-	-	-
AÜ-29	Bal kabağı	+	+	+	-	-	-
AÜ-30	Bal kabağı	+	+	+	-	-	+

EK 2 DAS-ELISA sonuçları (Devam)

AÜ-31	Bal kabağı	+	+	-	-	-	-
AÜ-32	Bal kabağı	+	+	-	-	-	-
AÜ-51	Bal kabağı	+	+	-	+	-	-
AÜ-53	Bal kabağı	+	+	-	+	-	-
Kz1 *		+	-	-	-	-	-
Ahm1(KZN1)*		+	-	-	-	-	-
AYS1	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
AYS2	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
AYS3	Sakız kabağı	+	+	-	-	-	-
AYS4	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
AYS5	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
AYS6	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
AYS7 *	Sakız kabağı	+	-	-	-	-	-
ANTALYA							
K1	Sakız kabağı	+	+	+	-	-	-
K2	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
K3 (m) *	Sakız kabağı	+	+	-	-	-	-
K4	Sakız kabağı	+	+	-	-	-	-
K5	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
K6	Sakız kabağı	-	+	+	-	-	-
K7	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
K8	Sakız kabağı	+	+	-	-	-	-
K9	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
K10	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
K11	Sakız kabağı	+	-	-	-	-	-
K12	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
K13 *	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
K14	Sakız kabağı	+	+	-	-	-	-
K15	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
K16	Sakız kabağı	+	+	-	-	-	-
K17 *	Sakız kabağı	+	+	-	-	-	-
K18	Sakız kabağı	+	+	-	-	-	-
AS1 *	Sakız kabağı	-	/	*	*	-	-
AS2	Sakız kabağı	-	/	*	*	-	-
AS3 (m)	Sakız kabağı	-	/	*	*	-	-
AS4(m)	Sakız kabağı	-	/	*	*	-	-
AS5 *	Sakız kabağı	-	/	*	*	-	-
AS6(m) *	Sakız kabağı	-	/	*	*	-	-
AS7	Sakız kabağı	-	/	*	*	-	-

EK 2 DAS-ELISA sonuçları (Devam)

AS8 (m) *	Sakız kabağı	-	/	*	*	-	-
AS9	Sakız kabağı	-	/	*	*	-	-
AS10	Sakız kabağı	-	/	/	*	-	-
AS11 *	Sakız kabağı	-	/	/	*	-	-
D1	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
D2	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
D3	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
D4	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
D5	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
D6	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
D7	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
D8	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
D9	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
D10 (m)	Sakız kabağı	-	-	+	-	-	-
D11	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
D12	Sakız kabağı	-	-	+	-	-	-
H1(m) *	Hıyar	+	-	-	-	-	-
Demre-13 *	Hıyar	+	-	-	-	-	-
D14 (m) *	Hıyar	+	-	-	-	-	-
Se1	Sakız kabağı	-	-	+	-	-	-
Se2	Sakız kabağı	-	-	+	-	-	-
Se3	Sakız kabağı	-	-	+	-	-	-
Se4	Karpuz	-	-	-	-	-	-
Se5	Karpuz	-	-	-	-	-	-
Se6	Karpuz	-	-	-	-	-	-
Se7	Karpuz	-	-	-	-	-	-
Se8	Kavun	-	-	+	-	-	-
Se9	Kavun	-	-		-	-	-
Se10	Kavun	-	-	+	-	-	-
Se11(m)	Kavun	-	-	+	-	-	-
S1	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
S2	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
S3	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
S4	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
S5	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
S6	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
S7	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
S8	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
S9	Sakız kabağı	-	-	-	-	-	-
BK1	Kavun	+	-	+	-	-	-

EK 2 DAS-ELISA sonuçları (Devam)

BK2	Kavun	-	+	+	-	-	-
BK3	Kavun	-	-	+	-	-	-
BK4	Kavun	+	+	+	-	-	-
BK5	Kavun	-	+	-	-	-	-
E-1	Bal kabağı	-	+	-	-	-	-
E-2	Kavun	-	+	-	-	-	-
E-3	Kavun	-	+	-	-	-	-
E-4	Sakız kabağı	+	+	+	-	-	+
E-5	Sakız kabağı	-	-	+	-	-	+
E-6	Bal kabağı	-	-	+	-	-	-
E-7 *	Kavun	+	-	-	-	-	-
E-8	Kavun	-	+	-	-	-	-
E-9	Kavun	-	+	-	-	-	-
E-10	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
E-11	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
E-12	Kavun	-	+	-	-	-	-
E-13	Kavun	-	+	-	-	-	-
E-14	Kavun	-	+	-	-	-	-
E-15	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
E-16	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
E-17	S.kabak(meyve)	-	+	-	-	-	-
E-18	S.kabak(meyve)	-	+	-	-	-	-
E-19	S.kabak(Meyve)	-	+	-	-	-	-
E-20	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
E-21	Kavun	-	+	-	-	-	-
E-22	Sakız kabağı	+	+	-	-	-	-
E-23	Sakız kabağı	+	+	-	-	-	-
Y1	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
Y2	Sakız kabağı	+	+	-	-	-	-
Y3	Sakız kabağı	-	+	-	-	-	-
Y4 *	Kavun	+	-	-	-	-	-
Y21 *	S. kabağı (m)	+	-	-	-	-	-
Y22	Sakız kabağı	+	-	-	-	-	-
Y23 *	Sakız kabağı(m)	+	-	-	-	-	-
Y24	Sakız kabağı	+	-	-	-	-	-
Brd1 *	Bal kabağı	-	-	+	+	-	-
Brd2 *	Bal kabağı	+	-	-	-	-	-
Brd3	Bal kabağı	-	-	-	+	-	-
Brd4 *	Bal kabağı	+	+	-	+	-	-
Brd5	Bal kabağı	-	+	-	-	-	-

Sekans için kullanılan izolatlar * işareti ile gösterilmiştir.

EK 3 Total RNA Analizlerinde Kullanılan Solüsyonlar

Ekstraksiyon Buffer (100mM Tris-HCl pH.8.0, 50mM EDTA pH. 7, 0, 5mM NaCl, 10mM 2. mercapto-ethanol (1/1000)

Tris-HCl 2.4228 gr

EDTA 3.7224 gr

NaCl 5.844 gr

Yukardaki miktarlar 150 ml distile su içerisinde sırasıyla çözölmüşpH ayarlamasıyapılmışve toplam hacim 200 ml'ye tamamlamıştır. Çalışma esnasında içerisine 1/1000 oranında 2-Mercaptoethanol ilave edilmiştir.

% 20 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

20 gr sodium dodecyl sulfat 80 ml distile su içerisinde çözölmüşve hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Potassium asetat (CH₃COOK) (5M)

49.075 gr potassium asetat 60 ml su içerisinde çözölmüşve hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Sodium asetat CH₃COONa(3M)

40.824 gr sodium asetat 60 ml su içerisinde çözölmüşve hacim 100 ml ye tamamlanmıştır.

% 70 lik Ethanol

70 ml %99'luk ethanol ile 29 ml su karıştırılarak % 70 lik ethanol hazırlanmıştır.

EK 4 Gen Bankasında Depolanan İzolatlar ve Aksesyon Numaraları

	İZOLAT İSMİ	CP GENİ	CI	P1	HC-PRO	P3	NIB
Seq1	KZN1	KP872538	KP828388				
Seq2	KZ1	KP872539	KP828423				
Seq3	AKS2-5	KP872540	KP828389				
Seq4	AKS5-7	KP872541	KP828390				
Seq5	AKS6-2	KP872542	KP828391				
Seq6	ER6-8	KP872543	KP828414				
Seq7	YUN8-4	KP872544	KP828427				
Seq8	A3-1	KP872545	-				
Seq9	KAR12-4	KP872546	KP828421				
Seq10	KAR15-1	KP872547	KP828422				
Seq11	AS1	KP872548	KP828393				
Seq12	AS5	KP872549	KP828394				
Seq13	AS6	KP872550	-				
Seq14	AS8	KP872551	-				
Seq15	AS11	KP872552	KP828392				
Seq16	BE5	KP872553	KP828401				
Seq17	BE6	KP872554	KP828402				
Seq18	BE7	KP872555	KP828403				
Seq19	BE10	KP872556	KP828395				
Seq20	BE13	KP872557	KP828396				
Seq21	BE15	KP872558	KP828397				
Seq22	BE18	KP872559	KP828398				
Seq23	BE22	KP872560	KP828399				
Seq24	BE26	KP872561	KP828400				
Seq25	BE27	KP872562	-				
Seq26	BRD1	KP872563	KP828404				
Seq27	BRD2	KP872564	KP828405				
Seq28	BRD4	KP872565	KP828406				
Seq29	C5	KP872566	KP828410				

EK 4 Gen Bankasında Depolanan İzolatlar ve Aksesyon Numaraları (Devam)

Seq30	C11	KP872567	KP828407				
Seq31	C13	KP872568	KP828408				
Seq32	C17	KP872569	KP828409				
Seq33	H1M	KP872570	KP828418				
Seq34	D14	KP872571	KP828411				
Seq35	AYS7	KP872572	KP828412				
Seq36	G1	KP872573	KP828415				
Seq37	G2	KP872574	KP828416				
Seq38	G3	KP872575	KP828417				
Seq39	K3	KP872576	KP828420				
Seq40	K17	KP872577	KP828419				
Seq41	E-7	KP872578	KP828413				
Seq42	Y23	KP872579	KP828425				
Seq43	Y4	KP872580	KP828426				
Seq44	S5	KP872581	-				
Seq45	S3	--	KP828424				

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Şerife TOPKAYA

Doğum Yeri : Kaş-ANTALYA

Doğum Tarihi : 15/08/1984

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lisans : Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü
(2005)

Yüksek Lisans : Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma
Anabilim Dalı (09/2005 – 08/2008)

Doktora : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü (Eylül
2009- Haziran 2015)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü (2007-2009)

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü (2009-2015)

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü (2015- devam
ediyor)

Yayınlar (SCI)

Filiz Ertunc, Didem Canik Orel, Serife Bayram, Samanta Paltrinieri, Assunta Bertaccini , Serife Topkaya, Gökhan Söylemezoğlu, 2015. Occurrence and identification of grapevine phytoplasmas in main viticultural regions of Turkey. Phytoparasitica. DOI 10.1007/s12600-014-0449-7

Hakemli dergiler

Ertunc F., Cakir,A., Soylemezoglu,G., Canik,D., Topkaya,S., Bayram, S (2015). Reactions of some grapevine cultivars to “bois noir” phytoplasma. *Phytopathogenic mollicutes*, 5(1), 109-110.

Filiz Ertunc, Serife Topkaya, Arzu Sezer, 2014. Distribution and molecular detection of apple mosaic virus in apple and hazelnut in Turkey. *African Journal of Biotechnology*. Vol.13(31), pp.3144-3149

Calis, Ö., Topkaya, Ş., 2011. Genetic analysis of resistance to early blight disease in tomato. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10 (79), pp. 18071-18077

Canik, D., S. Topkaya, S Bayram, G. Söylemezoğlu & F. Ertunç, 2011. Occurence and Distribution of Bois Noir Phytoplasma in Turkey. 2nd Bois Noir Workshop, Cison di Valmarino Castelbrando, Italy. 27.02-01.03.2011. (*Petria* 21 (2/3) 85-190, p.118-119)

Uluslar arası kongre

F. Ertunç, D. Canik, A. Sezer, Ş. Topkaya, Ç. Ulubaş-Serçe, 2012. Genomic conformation of Apple mosaic virus Turkish isolates coat protein gene regions. 22nd “International Conference on Virus and Other Transmissible Diseases of Fruit Crops” (ICVF), Rome, June 3-8, 2012, p22

Topkaya, Ş., Ertunç , F., 2012. Current Status of Virus Infections in Cucurbit Plantations in Ankara and Antalya Provinces. Xth EUCARPIA International Meeting on Cucurbitaceae 2012. Antalya.

Ulusal kongre

Ertunç, F.,Canik, D., Topkaya,Ş., Söylemezoğlu,G. ve Bayram, Ş. 2011. Türkiye Bağlarında Bağ Sarılığı Fitoplazmalarının Varlığı ve Saptanması IV. Bitki Koruma Kongresi. s.90, 28-30 Haziran, Kahramanmaraş

Çalış, Ö., Topkaya, Ş. (2008).Domateste Erken Yanıklık Hastalığına Karşı Dayanıklılık Genlerinin Belirlenmesi. VII. Sebze Tarımı Sempozyumu. 26-29 Ağustos 2008, Yalova(SÖZLÜ SUNU) .

Çalış, Ö., Çekiç, Ç., Topkaya, Ş. (2006).Hastalıklara dayanıklılık kaynağı olarak yabani çilek. II. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu, 14-16 Eylül 2006, Tokat.(SÖZLÜ SUNU).