

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dilan KONUR

**DİYARBAKIR VE CİVARINDA KARPUZ ÜRETİM
ALANLARINDA KARPUZ MOZAİK VİRÜS (*Watermelon
mosaic potyvirus*, WMV)' ÜNÜN SAPTANMASI,
BİYOLOJİK VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA-2021

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DİYARBAKIR VE CİVARINDA KARPUZ ÜRETİM ALANLARINDA
KARPUZ MOZAİK VİRÜS (*Watermelon mosaic potyvirus*, WMV)' ÜNÜN
SAPTANMASI, BİYOLOJİK VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Dilan KONUR

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

Danışman : Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU
Yıl: 2021, Sayfa: 81
Jüri : Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU
: Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ
: Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ

Bu araştırma sebze türleri içerisinde önemli bir yeri olan Karpuzda (*Citrullus lanatus*) hastalığa neden olan Watermelon mosaic virus (WMV)' ünün saptanması, karakterizasyonu ve Diyarbakır yerel karpuz popülasyonunun WMV' üne karşı dayanıklılığının araştırılması amacıyla yürütülmüştür. Diyarbakır ve civarında yürütülen surveyler sırasında karpuz ve kavunlarda mozaik, kloroz, yaprak deformasyonu ve bodurlaşma gibi belirtiler görülmüştür. Belirti gösteren bitki örnekleri kodlanarak toplanmış ve tamamı DAS-ELISA ile WMV, CMV, ZYMV, PRSV, MNSV, CABY ve SqMV virüslerine karşı testlenmiştir. Örnekler içerisinde WMV ile bulaşık olarak bulunan örnekler RT Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile WMV' nün kılıf protein genine spesifik iki farklı primer çifti ile testlenmiştir. WMV için pozitif sonuç veren örnekler ayrıca mekanik inokulasyon ile test bitkilerine taşınmış ve WMV izolatlarının biyolojik ve moleküler özellikleri ortaya konulmuştur. WMV ile infekteli örneklerin RT-PCR ürünlerinden DNA dizileri elde edilmiş, DNA dizilerine dayalı yapılan filogenetik analizler sonucunda Diyarbakır ve civarında saptanan WMV' ünün dünyada bulunan diğer izolatları ile akrabalık dereceleri araştırılmış ve WMV-Suriye izolatı ile yakın olduğu ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Karpuz, Karpuz Mozaik Virüsü, Diyarbakır Karpuzu, Dayanıklılık

ABSTRACT

Msc.THESIS

DETECTION OF WATERMELON MOSAİC VIRUS (*Watermelon mosaic potyvirus*, WMV), BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION IN DİYARBAKIR AND ITS SURROUNDINGS

Dilan KONUR

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION

Danışman : Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU
Year: 2021, Page : 81
Jury : Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU
: Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ
: Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ

This research was carried out with the aim of detecting and characterizing Watermelon mosaic virus (WMV), which causes disease in watermelon (*Citrullus lanatus*), has an important place among vegetable species, and to investigate resistance of Diyarbakır local watermelon population to WMV. During the surveys conducted around Diyarbakır, symptoms as such mosaic, chlorosis, leaf deformation and stunting were observed in watermelons and melons. Symptomatic plant samples were collected coding and tested against WMV, CMV, ZYMV, PRSV, MNSV, CABY and SqMV by DAS-ELISA. The samples found contaminated with WMV in the samples were tested with two different primer pairs specific to WMV by Polymerase Chain Reaction (PCR). Samples giving positive results for WMV were also inoculated into indicator plants by mechanical inoculation and biological and molecular features of WMV isolates were revealed. DNA sequences were obtained from RT-PCR products of WMV-infected samples, as a result of phylogenetic analysis based on DNA sequences, the phylogenetic relation of WMV detected in Diyarbakır and its affinity with other isolates found in the world was investigated and it was revealed that it was close to the WMV-Syria isolate.

Key words: Watermelon, Watermelon Mosaic Virus, Diyarbakır watermelon, Resistance

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Bu araştırma sebze türleri içerisinde önemli bir yeri olan Karpuzda (*Citrullus lanatus*) hastalığa neden olan Karpuz mozaik virüsü' nün (WMV) saptanması, karakterizasyonu ve Diyarbakır yerel karpuz popülasyonunun WMV' üne karşı dayanıklılığının araştırılması amacıyla yürütülmüştür.

Sebze türleri içerisinde önemli yeri olan Karpuz (*Citrullus lanatus*), *Cucurbitaceae* familyasının *Citrullus* cinsine ait, sürünücü ve tırmanıcı, çiçekli bir bitki türü olup tek yıllık, meyvesi için yetiştirilen Batı Afrika kökenli önemli bir kültür bitkisidir. Karpuzlar “watermelons” (*Citrullus lanatus* (Thunb.) var. *lanatus*) ve kavunlar “citron melons” (*Citrullus lanatus* var. *citroides* (L. H. Bailey) Mansf.) olmak üzere iki alt bölüme ayrılmaktadır.

Diyarbakır karpuzu, merkeze bağlı olan ve Dicle nehri kıyısında bulunan Sivritepe (Şeyhelan), Erimli (Sımakı), Tekkaynak (Yuvacık), Feri ve Tepe köylerinde yoğun olarak yetiştirilmektedir. Ülkemiz için çok önemli bir gen kaynağı olmasına rağmen bugüne kadar malesef bilimsel yaklaşımlar ile bu karpuz çeşitleri hakkında yeterli ve detaylı bilimsel araştırmalar yapılmamıştır.

Bitkilerde zarar yapan viral hastalıklara karşı etkili bir mücadele yöntemi bulunmadığından dolayı etmenin tanısı, yaygınlığının ve taşınma yollarının bilinmesi, hastalık kaynaklarının imha edilmesi yanında zarar görmekte olan konukçuların dayanıklılıklarının bilinmesi ve dayanıklı çeşitlerin üretimi önemli mücadele konuları olarak karşımıza çıkmaktadır.

Diyarbakır ve civarında yapılan bir survey çalışmasında Diyarbakır karpuzu, ticari bir hibrit karpuz çeşidi ve kavun bitkilerinin birlikte yetiştirildiği aynı alanda hem kavun hem de ticari karpuz çeşidinde virüs benzeri belirtiler gözlenirken Diyarbakır karpuzunda herhangi bir belirtinin görülmemesi dikati çekmiştir. Yıllardır bu bölgede geleneksel yetiştirilen Diyarbakır karpuzunun söz konusu virüs belirtilerini göstermemesi “acaba bir dayanıklılık mı” söz konusudur? sorusunu gündeme getirmiş ve böyle bir çalışmanın planlanmasına vesile olmuştur.

Öncelikle Diyarbakır ve ilçelerinde Kabakgil (Karpuz, kavun, kabak ve acur) üretimi yapılan alanlarda zararlı ve mevcut virüslerin balirlenmesi yanında Diyarbakır karpuzu ve kavun bitkilerinin birarada olduğu tarlada sadece kavunda semptom görülmüş olması ve testlemeler sonucunda kavunda görülen semptomların Watermelon mosaic virüsünden kaynaklandığı ortaya konulduğu ve diğer virüslerin bu tarlada saptanamamasından dolayı Watermelon mosaic virus (WMV)' inin farklı konukçularında semptomolojik ve biyolojik özelliklerinin ortaya konması, kılıf protein gen bölgesinin gen dizilimini kullanarak WMV' nün daha önce saptanmış olan dünyadaki diğer izolatlarla karşılaştırılması ve akrabalık (Filogenetik) ilişkilerinin ortaya konması çalışmanın amacını oluşturmuş ve çalışmada söz konusu etmen saptanabilirse yerel ve milli olan Diyarbakır

karpuz çeşitlerinin WMV'üne karşı reaksiyonunu ve varsa dayanıklılığının biyolojik ve moleküler yöntemlerle ortaya konulması amaçlanmıştır.

Araştırmalar sırasında kullanılan bitkilerin kaynağını, Diyarbakır ili ve ilçelerinde kabakgil (karpuz, kavun, acur ve kabak) üretimi yapılan alanlarda virüs ve virüs benzeri belirtiler gösteren ve virüsle bulaşık olabileceğinden şüphelenilen bitkilerin belirti gösteren genç yaprakları oluşturmuştur. WMV' nün en önemli konukçuları arasında bulunan karpuz ve kavun daha çok bulunduğu için Diyarbakır ilinde survey alanlarından bitkisel materyal olarak Diyarbakır karpuzu, ticari karpuz, Diyarbakır beyaz kış kavunu ve ticari kavun bitkilerinden örnekler toplanmıştır. WMV' nün hastalık belirtilerine benzer belirtiler gösteren bitkilerden alınan 97 adet karpuz ve 55 adet kavun olmak üzere toplam 152 örnek çalışmaların ana materyalini oluşturmuştur. Toplanan örneklerin belirti gösteren genç yapraklarının önce fotoğrafları çekilmiş toplandıktan sonra numaralandırılıp etiketlenerek buz kutusu içerisinde laboratuara getirilmiştir.

Survey alanlarından toplanan örneklerin tamamı WMV, CMV, ZYMV, PRSV, MNSV, CABY ve SqMV ile ilgili bulaşıklık durumlarını ortaya koymak amacıyla öncelikle serolojik (DAS-ELISA) çalışmalarda materyal olarak kullanılmışlardır. Örnekler DAS-ELISA ile söz konusu virüslerin antiserumları (kitleri) kullanılarak bu virüslere karşı testlenmiştir.

Survey alanlarından toplanan virüs ve benzeri hastalıklardan şüphelenilen örneklerdeki belirtilerin WMV'ünden kaynaklanıp kaynaklanmadığını ortaya koymak, karpuz ve kavunda virüs belirtilerini görüntülemek ve Diyarbakır karpuz çeşidinin WMV'üne karşı biyolojik dayanıklılığı/duyarlılığını ortaya koymak amacıyla karpuz ve kavun bitkilerine özsuyla ile WMV taşınmıştır.

Survey alanlarından toplanan örneklerin DAS-ELISA ile testlenmesi sonucunda WMV için pozitif sonuç alınan ve bu örneklerin mekanik inokulasyon sonucunda belirti gözlenen ve yine DAS-ELISA ile testlenmesi sonucunda virüsle bulaşık olduğu ortaya konulan örnekler total nükleik asit ekstraksiyonu çalışmalarında materyal olarak kullanılmıştır. WMV ile bulaşık olan farklı izolatlara ait nükleik asitler RT-PCR çalışmaları için hedef nükleik asit materyallerinin kaynağını oluşturmuştur.

WMV' ünün farklı izolatlarının kılıf protein geni üzerinde 825 bp molekül ağırlığına sahip bölgeyi çoğaltan WMV-R825/WMV-F825 ve 917 bp molekül ağırlığına sahip bölgeyi çoğaltan WMV-R917/WMV-F917 primer çiftleri kullanılarak RT-PCR çalışmaları yürütülmüştür. DNA dizileme çift taraflı olarak (Forward ve Reverse) yapılmıştır.

Elde edilen Forward ve Reverse dizilimleri MEGA7 (Moleküler Evrim Genetik Analiz) programı kullanılarak birleştirilmiş ve gen dizilimleri ortaya çıkartılmıştır. Saptanan Diyarbakır WMV izolatları, dünyada farklı ülkelerde saptanmış ve gen bankasında kayıtlı olan izolatlar arasındaki evrimsel filogenetik analiz en fazla benzerlik olasılığının ortaya çıkarılması şeklinde bir metod ile yapılmıştır. İlgili grupların bir arada

kümelendiği ağaçların yüzdesi dalların yanında gösterilmiştir. Gruplar arasındaki tahmini mesafe ve benzerlik için Neighbor-Join and BioNJ algoritma kullanılmıştır. Filogenetik analizde 3 adet Diyarbakır izolatu (TR-Db-yenişehir, TR-Db-Sur1, TR-Db-Sur2) ve TURK91 izolatında dâhil olduğu 13 adet dünyadaki farklı ülkelerde tanılanmış izolat olmak üzere toplam 16 WMV izolat kullanılmıştır. Evrimsel filogenetik analiz MEGA X programı üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Yaprak biti ile taşıma denemelerinde yaprak biti olarak Watermelon mosaic virus (WMV)' ünün konukçusu olmayan Turunc ağaçları üzerindeki yaprak bitleri (*Aphis gossypii*) kullanılmıştır. İnokulum kaynağı olarak mekanik inokulasyon ile virüs aktarılmış belirti gösteren Diyarbakır Beyaz Kış Kavunu ve test bitkisi olarak Diyarbakır Beyaz Kış kavunu ile Diyarbakır Karpuz çeşidi tercih edilmiştir. Çalışmanın yürütüldüğü Diyarbakır ili ve civarında kavun karpuz tarlalarının yoğun olduğu Sur (Erimli / Sumağı), Bismil (Darlı Mah., Gundik.), Eğil (Kalkan), Çınar (Kuruyazı, Ekinveren), Silvan (Gürpınar), Ergani ve Yenişehir (Elidolu Mah.) de yapılan survey çalışmalarında karpuz bitkilerinde mozaik, yaprak deformasyonları, kloroz ve bodurlaşma, kavun bitkilerinde mozaik, yaprak deformasyonları ve bodurlaşma gibi belirtiler görülmüştür.

Araştırma kapsamında yapılan surveylerde simptom gözlenen bitkilerden alınan 97 adet karpuz ve 55 adet kavun olmak üzere toplam 152 örneğin WMV, CMV, ZYMV, PRSV, MNSV, CABY ve SqMV virüslerine karşı DAS-ELISA ile testlenmiştir. Testlemeler sonucunda hiç bir örnekte ZYMV, PRSV, MNSV, CABY ve SqMV' leri saptanmamıştır. Ancak Yenişehir (Elidolu Mah.) Dicle nehri kenarından alınan 5 (TR-Db-Ynş kodlu), Sur (Erimli / Sumağı) Çay Önü/Dicle Nehri kenarından alınan 7 (TR-Db-Sur1) ve 8 (Tr-Db-Sur2 kodlu) numaralı örneklerde WMV' ü saptanırken Bismil (Darlı ve Gundik.) Ambar Yolu/Kurçay mevkiinden alınan Bsm-D1 ve Bsm-G kodlu örneklerde CMV saptanmıştır.

WMV' ünün mekanik inokulasyon yöntemi ile Diyarbakır Karpuzu (Standart), Ticari karpuz (MF1) Hibrid ve Ticari karpuz (SF1) Hibrid, Diyarbakır Beyaz Kış Kavunu (Standart), Ticari kavun (BF1) Hibrid, Ticari kavun (SF1) Hibrid, çeşitlerine taşınmıştır. Karpuzlarda kloroz, yaprak deformasyonu, bodurlaşma, sistemik mozaik belirtileri, kavunlarda kloroz, yaprak deformasyonu, bodurlaşma, sistemik mozaik, klorotik lokal lezyon belirtileri görülmüştür.

WMV' nün TR-Db-Ynş, TR-Db-Sur1, TR-Db-Sur2 kodlu izolatların WMV-R825/WMV-F825 ve WMV-R917/WMV-F917 primer çiftleri ile yapılan RT-PCR çalışması sonucunda WMV-R825/WMV-F825 primer çiftinin kullanılması ile beklenen 825 bp, WMV-R917/WMV-F917 primer çiftinin kullanılması ile beklenen 917 bp moleküler ağırlığına sahip DNA bant profilleri agaroz jelde görüntülenmiştir.

WMV' ünün farklı izolatlarının kılıf protein geni üzerinde 825 bp molekül ağırlığına sahip bölgeyi çoğaltan WMV-R825/WMV-F825 ve 917 bp molekül ağırlığına sahip bölgeyi çoğaltan WMV-R917/WMV-F917 primer çiftleri kullanılarak RT-PCR

alışmalar gerçekleştirilmiştir. Yapılan filogenetik akrabalık analizi sonucunda TR-Db-Yenişehir (Ynş), TR-Db-Sur1 ve TR-Db-Sur2 kodlu WMV izolatları kendi içerisinde taranan R825/F825 bakımından % 99, R917/F917 bölgesi bakımındanda ise TR-Db-Yenişehir (Ynş) ve TR-Db-Sur1 izolatları kendi aralarında % 100 bu iki izolat TR-Db-Sur2 izolatı ile % 99 oranında benzerlik göstermiştir. TR-Db-Yenişehir (Ynş), TR-Db-Sur1 ve TR-Db-Sur2 kodlu WMV izolatları taranan R825/F825 bölgesi bakımından SYRIA; MK614761.1 ve CHINA; KM527440.1 izolatları ile yine % 99 oranında benzerlik gösterirken R917/F917 bölgesi bakımından % 100 oranında benzerlik göstermiştir. Diğeryandan TR-Db-Yenişehir (Ynş), TR-Db-Sur1 ve TR-Db-Sur2 kodlu WMV izolatları dahan önceden Gen Bankasında yayınlanan TURK 91 (TURKEY; EU660579.1) izolatı ile de % 99 oranında benzerlik göstermiştir. TR-Db-Yenişehir (Ynş), TR-Db-Sur1 ve TR-Db-Sur2 kodlu WMV izolatlarının SYRIA; MK614761.1 ve CHINA; KM527440.1 izolatları ile çok yakın ilişkide olmasına rağmen Suriyeden rapor edilen SYRIA; MK614761.1 izolatı ile daha yakın akraba olduğu ortaya konulmuştur. Filogenetik analiz sonucu TR-Db-Yenişehir (Ynş), TR-Db-Sur1 ve TR-Db-Sur2 izolatlarının kaynağının Suriye olduğu ya da Suriyeden rapor edilen SYRIA; MK614761.1 izolatının Türkiye olabileceği ve virüsün üretim materyali ya da vektörler aracılığıyla iki ülke arasında yayılmış olabileceği ortaya konulmuştur.

Yaprak biti ile yapılan taşıma denemelerinde yaprak biti olarak *Aphis gossypii*, inokulum kaynağı olarak mekanik inokulasyon ile WMV' TR-Db-Sur1 izolatı aktarılmış, belirti gösteren Diyarbakır Beyaz Kış Kavunu, test bitkisi olarak ta Diyarbakır Beyaz kış kavunu ve Diyarbakır karpuz eşitleri kullanılmıştır. Yapılan taşıma denemelerinden sonra test bitkilerinde WMV' ünün neden olduğu yaprak deformasyonu, mozaik ve bodurlaşma semptomları şeklinde belirtiler görüntülenmiştir. Görüntülenen belirtilerin WMV' nden kaynaklandığının ve virüsün yaprak biti ile taşındığının kanıtlanması için test bitkilerinden alınan yaprak rnekleri WMV-R917/WMV-F917 primer çifti kullanılarak RT-PCR yöntemi ile testlenmiştir. Elde edilen PCR rnlerinin agaroz jelde kontrol edilmesi ile beklenen 917 bp molekül ağırlığına sahip bantlar görüntülenmiştir. Bu sonuçlar, araştırma kapsamında saptanan ve karakterizasyonu yapılan WMV-TR-Db-Sur1 izolatının yaprak biti ile taşınan ırk olduğu ortaya konulmuştur.

WMV'ünün dayanıklı olabileceği düşünülen Diyarbakır Karpuzu çeşidine mekanik inokulasyon ve yaprak biti taşıması ile bulaşabildiği ve WMV' ne karşı Diyarbakır Karpuz eşidinde dayanıklılığın söz konusu olmadığı bu çalışma ile ortaya koyulmuştur. Ayrıca yaprak biti taşıma çalışmalarında Diyarbakır Karpuzu ve Diyarbakır Beyaz Kış Kavununun yanyana olduğu durumlarda yaprak bitlerinin karpuzu değilde kavunu tercih ettiği sonucuna varılmıştır.

Bu araştırma WMV' nin Diyarbakır kabakgil üretim alanlarındaki durumunu, biyolojik, epidemiyolojik ve moleküler özelliklerini tam anlamıyla ortaya koymuştur.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince benden hiçbir yardımını esirgemeyen, gerek çalışmalarla gerekse de hayatla ilgili beni sürekli motive eden tez danışmanım sayın Prof. Dr. Saadettin BALOĞU' na,

Bütün çalışmalarımı yakından takip edip yol gösteren ve çalışmalarım boyunca beni yalnız bırakmayan sayın Doç. Dr. Behçet Kemal ÇAĞLAR, Dr. Gökmen KOÇ, Zir. Yük. Müh. Ali GÜNEŞ, Zir. Müh. Nurullah ÇETİZ' e, ve tüm Subtropik ekibine,

İhtiyaç duyduğum her an değerli bilgilerini benimle paylaşan tüm Bitki Koruma Bölümü hocalarıma,

Beni bugünlere getiren maddi/manevi desteğini esirgemeyen ve hep arkamda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XVI
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Araştırmanın Yürütüldüğü Yer ve Bitkisel Materyaller	25
3.1.2. Serolojik (DAS-ELISA) Çalışmalarda Kullanılan Materyaller	30
3.1.3. Biyolojik Tanı Çalışmalarında (Mekanik inokulasyon) Kullanılan Materyaller	31
3.1.4. Moleküler Çalışmalarda (Total Nükleik Asit İzolasyonu, RT-PCR ve Agaroz jel) Kullanılan Materyaller	31
3.1.5. Filogenetik Analiz Çalışmalarında Kullanılan Materyaller	33
3.1.6. Virüsü Yaprak Bitleri İle Taşıma Çalışmalarında Kullanılan Materyaller	35
3.2. Yöntem.....	36
3.2.1. Simptomolojik Gözlemler ve Örneklem	36
3.2.2. Serolojik (DAS-ELISA) Çalışmaları	37
3.2.3. Test Bitkilerinin Yetiştirilmesi ve Biyolojik Tanı Çalışmaları	38
3.2.4. Total Nükleik Asit (tNA) Ekstraksiyonu Çalışmaları.....	40
3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Çalışmaları	41

3.2.6. Agarose Gel Elektroforez Çalışmaları	43
3.2.7. DNA Dizileme ve Filogenetik Analiz Çalışmaları	44
3.2.8. Virüsü Yaprak Biti İle Taşıma Çalışmaları	45
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	47
4.1. Simptomolojik Gözlemler.....	47
4.2. Serolojik (DAS-ELISA) Sonuçları	50
4.3. Biyolojik İndeksleme Sonuçları.....	51
4.4. Moleküler Çalışma Sonuçları.....	55
4.5. Filogenetik Analiz Çalışma Sonuçları	58
4.6. Virüsü Yaprak Biti İle Taşıma Çalışma Sonuçları.....	60
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	63
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	75
EKLER.....	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. Türkiye ve Diyarbakır ili 2019 Yılı Kabakgil Üretim Alanı ve Miktarları	2
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan bitkisel materyallerin ilçelere göre dağılımı	30
Çizelge 3.2. Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan test bitkileri	32
Çizelge 3.3. RT-PCR çalışmalarında WMV' üne spesifik primer çiftleri	34
Çizelge 4.1. Çalışmada Kullanılan Bitkilerde Görülen Simptomlar	52



Şekil 3.1. Çalışmanı yürütüldüğü Diyarbakır ili ve ilçeleri	26
Şekil 3.2. Surveyler sırasında referans alınan ve arazide aranan Watermelon Mosaic Virus' ünün neden olduğu mozaik, yaprak deformasyonu ve meyvede kabarıklık belirtileri	26
Şekil 3.3. Surveyler sırasında referans alınan ve arazide aranan Cucumber Mosaic Virus' ünün neden olduğu mozaik ve yaprak deformasyonu belirtileri	27
Şekil 3.4. Surveyler sırasında referans alınan ve arazide aranan Zucchini Yellow Mosaic Virus' ünün neden olduğu mozaik ve yaprak deformasyonu belirtileri	27
Şekil 3.5. Surveyler sırasında referans alınan ve arazide aranan Papaya Ring Spot Virus' ünün neden olduğu damar açılması ve meyvede halkalı leke belirtileri	28
Şekil 3.6. Surveyler sırasında referans alınan ve arazide aranan Melon Necrotic Spot Virus' ünün neden olduğu nekrotik lekeler	28
Şekil 3.7. Surveyler sırasında referans alınan ve arazide aranan Squash Mosaic Virus' ünün neden olduğu damar aralarındaki renk açılması, mozaik ve meyvelerde düzensiz renklenme belirtileri	29
Şekil 3.8. Surveyler sırasında referans alınan ve arazide aranan Cucurbit Aphid-Born Yellows Virus' ünün neden olduğu sararma, mozaik ve düzensiz klorotik lekeler	29
Şekil 3.9. Biyolojik tanı çalışmalarında kullanılan kavun ve karpuz bitkileri ve mekanik inokulasyon dönemi	32
Şekil 3.10. Yaprak biti ile virüs taşıma çalışmalarında inokulum kaynağı olarak kullanılan WMV ile bulaşık kavun bitkileri.	35
Şekil 3.11. Yaprak Biti ile WMV' ünün taşıma çalışmalarında kullanılan Diyarbakır karpuzu ve Diyarbakır kış kavunu bitkileri.....	36

Şekil 3.12. Mekanik inokulasyon aşamaları. a; Karborandum uygulaması, b; mekanik inokulasyon, c; bitkilerin su ile yıkanması.	39
Şekil 3.13. Yaprak Biti ile virüs taşıma çalışmaları	46
Şekil.4.1. Surveyler sırasında Diyarbakır ili karpuz bitkilerinde Bsm; Bismil (Darlı Mah., Gundik.), Eğil; Eğil (Kalkan), Çnr; Çınar (Kuruyazı, Ekinveren), Slv; Silvan (Gürpınar), Erg; Ergani, Ynş; Yenişehir (Elidolu Mah.) de yapılan surveylerde karpuz bitkileride gözlenen sararma, beyazlaşma, mozaik ve renk açılması belirtilen simptomları.	48
Şekil.4.2. Surveyler sırasında Diyarbakır ili Sur1-2-3; Sur (Erimli / Sumaşi), BsmD1-D2; Bismil (Darlı) ve Bsm-G; Bismil (Gundik) de yapılan surveylerde kavun bitkileride gözlenen mozaik, yaprak deformasyonu, klorotik lokal lezyon belirtilen simptomları.....	49
Şekil.4.3. Surveyler sırasında Diyarbakır ili Sur1-2-3; Sur (Erimli / Sumaşi) da Diyarbakır karpuzu ve Beyaz kış kavunu bitkilerinin her ikisinin de bir arada bulunduğu tarlalarda mozaik ve yaprak deformasyonu belirtilen simptomları ve Sur4-5-6; Sur (Erimli / Sumaşi) da aynı tarlada Diyarbakır karpuzu.....	50
Şekil.4.4. WMV- TR-Db-Sur1 izolatu ile yapılan mekanik inokulasyon sonucu Diyarbakır Karpuzu çeşidinde mozaik ve yaprak deformasyonu belirtilen simptomları. a; sağlıklı kontrol, b; erken dönemdeki mozaik simptomu, c-d; geç dönemdeki yaprak deformasyonu simptomu.	52
Şekil.4.5. WMV- TR-Db-Sur1 izolatu ile yapılan mekanik inokulasyon sonucu Ticari karpuz (MF1) çeşidinde mozaik ve yaprak deformasyonu belirtilen simptomları. a; sağlıklı kontrol, b; erken dönemdeki mozaik simptomu, c-d; geç dönemdeki yaprak deformasyonu simptomu.	53

Şekil.4.6.	WMV- TR-Db-Sur1 izolatu ile yapılan mekanik inokulasyon sonucu Ticari karpuz (SF1) çeşidinde mozaik ve yaprak deformasyonu simptomları. a; sağlıklı kontrol, b; erken dönemdeki mozaik simptomu, c-d; geç dönemdeki yaprak deformasyonu simptomu	53
Şekil.4.7.	WMV- TR-Db-Sur1 izolatu ile yapılan mekanik inokulasyon sonucu Diyarbakır Kış Kavunu çeşidinde damar açılması, mozaik ve yaprak deformasyonu simptomları. a; sağlıklı kontrol, b; erken dönemdeki damar açılması simptomu, c; geç dönemdeki yaprak deformasyonu simptomları	54
Şekil.4.8.	WMV- TR-Db-Sur1 izolatu ile yapılan mekanik inokulasyon sonucu Ticari kavun (BF1) çeşidinde damar açılması, mozaik ve yaprak deformasyonu simptomları. a; sağlıklı kontrol, b; erken dönemdeki damar açılması simptomu, c; geç dönemdeki yaprak deformasyonu simptomları	54
Şekil.4.9.	WMV- TR-Db-Sur1 izolatu ile yapılan mekanik inokulasyon sonucu Ticari kavun (SF1) çeşidinde damar açılması, mozaik ve yaprak deformasyonu simptomları. a; sağlıklı kontrol, b; erken dönemdeki damar açılması simptomu, c; geç dönemdeki yaprak deformasyonu simptomları	55
Şekil.4.10.	Mekanik inokulasyonda pozitif bulunan örneklerin WMV-R825/WMV-F825 primeri ile RT-PCR sonuçlarının agaroz jel görüntüleri. M: 1 kb Marker, a-b-c ; TR-Db-Ynş, d-e-f ; TR-Db-Sur1, g-h-ı ; TR-Db-Sur2 kodlu izolatlar, j-k ; negatif kontrol	56
Şekil.4.11.	Mekanik inokulasyonda pozitif bulunan örneklerin WMV-R917/WMV-F917 primeri ile RT-PCR sonuçlarının agaroz gel görüntüleri. M: 1 kb Marker, a-b-c ; TR-Db-Ynş, d-e-f ; TR-Db-Sur1, g-h-ı ; TR-Db-Sur2 kodlu izolatlar, j-k ; negatif kontrol	57

Şekil.4.12. Mekanik inokulasyonda simptom veren örneklerle ait WMV-R917/WMV-F917 primer çifti ile yapılan RT-PCR ürünlerinin 917 bp moleküler ağırlığına sahip bantların % 1 lik agaroz jeldeki görüntüsü. a; Diyarbakır Karpuzu (Standart), b; Ticari karpuz (MF1) Hibrid, c; Ticari karpuz (SF1) Hibrid, d; Diyarbakır Beyaz Kış Kavunu (Standart), e; Ticari kavun (BF1) Hibrid, f; Ticari kavun (SF1) Hibrid, g; pozitif kontrol, h; negatif kontrol.	57
Şekil.4.13. WMV-R825/WMV-F825 primer çifti ile yapılan RT-PCR ürünlerinin DNA dizilerine göre yapılan filogenetik analiz.	59
Şekil.4.14. WMV-R917/WMV-F917 primer çifti ile yapılan RT-PCR ürünlerinin DNA dizilerine göre yapılan filogenetik analiz.	60
Şekil.4.15. WMV TR-Db-Sur1 izolatının Diyarbakır Karpuzu ve Diyarbakır Beyaz Kış Kavunu çeşitlerindeki yaprak biti ile taşıma deneme sonuçları. Yapraklarda mozaik, yaprak deformasyonu ve yapraklarda küçülme belirtileri.	61
Şekil.4.16. Yaprak biti taşıma denemesi sonucunda simptom veren bitkilerden alınan örneklerle ait WMV-R917/WMV-F917 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR ürünlerinin 917 bp moleküler ağırlığına sahip bantların % 1 lik agaroz jeldeki görüntüsü. a-b-c-d-e; Diyarbakır Karpuzu (Standart), f; pozitif kontrol, g; negatif kontrol, h-ı-j-k-l; Diyarbakır Beyaz Kış Kavunu (Standart), m; pozitif kontrol, n; negatif kontrol.	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMV	: Alfalfa Mosaic Virus
BCMV	: Blackeye Cowpea Mosaic Virus
BPMV	: Bean Pod Mottle Virus
BYMV	: Bean Yellow Mosaic Virus
CABYV	: Cucurbit Aphid-Born Yellow Virus
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik asit
CGMMV	: Cucumber Green Mottle Mosaic Virus
CMV	: Cucumber Mosaic Virus
CP	: Coat Protein (Kılıf protein)
CYSDV	: Cucurbit Yellow Stunting Disorder Virus
CYVV	: Clover Yellow Vein Virus
dNTP	: Deoksiribonükleotidtrifosfat
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	: Enzim-Linked Immunosorbent Assay
Hc-pro	: Yardımcı komponent proteinaz
M-MLV	: Moloney Murine Leukemia Virus
MNSV	: Melon Necrotic Spot Virus
ORF	: Okunabilir açık alanlar
PAGE	: Polyacrylamide Gel Elektroforezi
PBS	: Potasyum fosfat-tuz tamponu
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PeaMV	: Petunia Asteroid Mosaic Virus
PeMV	: Pea Mosaic Virus
Pmol	: Pikomol
PVP	: Polyvinylpyrrolidone

PVY	: Patates Y Virüsü
PRSV	: Papaya Ring Spot Virus
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNasein	: RNase inhibitörü
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RT	: Reverse Transcriptase
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SLCuV	: Squash Leaf Curl Virus
SMV	: Soybean Mosaic Virus
SqMV	: Squash Mosaic Virus
SqVYV	: Squash Vein Yellowing Virus
ssRNA	: Single Stranded RNA
TAE	: Tris Asetik Asit EDTA
Taq	: Termostabil polimeraz enzimi
TEV	: Tobaacco Etch Virus
Tm	: Thermal melting
tNA	: total Nükleik Asit
ToMV	: Tomato Mosaic Virus
ToRSV	: Tomato Ringspot Virus
TRSV	: Tobacco ringspot virus
tRNA	: Transfer RNA
VLP	: Virüs benzeri partikül
WMV	: Watermelon Mosaic Virus
WSMoV	: Watermelon Silver Mottle Virus
ZGMMV	: Zucchini Green Mottle Mosaic Virus
ZYMV	: Zucchini Yellow Mosaic Virus

1. GİRİŞ

Sebze türleri içerisinde önemli yeri olan Karpuz (*Citrullus lanatus*), *Cucurbitaceae* familyasının *Citrullus* cinsine ait, sürünücü ve tırmanıcı, çiçekli bir bitki türü olup tek yıllık, meyvesi için yetiştirilen Batı Afrika kökenli önemli bir kültür bitkisidir. Karpuzlar “watermelons” (*Citrullus lanatus* (Thunb.) var. *lanatus*) ve kavunlar “citron melons” (*Citrullus lanatus* var. *citroides* (L. H. Bailey) Mansf.) olarak iki alt bölüme ayrılmaktadır (Anonim, 2020).

Tropikal veya subtropikal bir bitki olan karpuzun gelişmesi için 25 °C' den yüksek sıcaklıklara gereksinim duyulmaktadır. Tohumları genellikle örtü altındaki yastıklara ve pH 5.5-7 arasında olan, orta düzeyde azot içeren iyi drene edilmiş kumlu toprağa ekilmekle beraber son zamanlarda ticari fide yetiştiricisi şirketler kurulmuş olup tamamen topraksız özel ortamlar içinde fide yetiştiriciliği yapılmakta ve üreticiler bu imkândan yararlanmaktadırlar. Bu durumda karpuz üretiminde tohum ya da hazır fide kullanılmaktadır. Genel ifade ile dünyada 1200'den fazla karpuz çeşidinin varlığı bilinmekte olup meyvelerin ağırlığı 1 ile 90 kg arasında değişmekte ve meyve iç renkleri de kırmızı, pembe, turuncu, sarı veya beyaz olabilmektedir (Anonim, 2020).

Ülkemizde başta Adana olmak üzere Diyarbakır dâhil birçok ilinde karpuz üretimi yapılmakta ve üretilen karpuzlar sofralık olarak taze tüketilmektedir. Karpuz yetiştiriciliğinde üretim materyali olarak tohum ya da son zamanlarda hazır temin edilen fideler kullanılmakta, ülkemizde en fazla karpuz üretim Adana ve civarında yapılırken Diyarbakır ve civarında bölgeye özel çok iri meyve veren karpuzları ile dikkat çekmekte ve sınırlı da olsa üretilmektedir.

Türkiye’de karpuz, kavun, hıyar, acur ve kabaktan oluşan kabakgiller üretim miktarları 2019 rakamları incelendiğinde, 2.781.897 da üretim alanında 8.197.837 ton kabakgil üretiminin gerçekleştiği görülmektedir. Aynı dönem için Diyarbakır ili incelendiğinde ise 62.691 da üretim alanında 215.745 ton kabakgil üretimi gerçekleştiği rapor edilmiştir. Türkiye ve Diyarbakır ili karpuz üretimi

odaklı incelendiğinde ülkemizde 833.657 da alanda 3.870.515 ton karpuz üretimi, Diyarbakır ilinde ise 35.220 da alanda 142.818 ton üretim yapılmıştır. Bu veriler değerlendirildiğinde Diyarbakır ili kabakgil üretiminde Türkiye'nin toplam kabakgil üretim alanının % 2,253 ve ülke üretiminin de % 2,632' ine sahiptir. Karpuz üretimi bakımından ise Diyarbakır ili Türkiye'nin toplam karpuz üretim alanının % 4.224' ünde ülke üretiminin % 3,690' ünü üretmiştir (Çizelge 1.1.). Ancak Diyarbakır karpuzu üretim miktarlarından ziyade yerel ve özel çeşitler olması açısından önem taşımaktadır (Anonim, 2019a).

Çizelge 1.1. Türkiye ve Diyarbakır ili 2019 Yılı Kabakgil Üretim Alanı ve Miktarları

ÜRÜN	TÜRKİYE		DİYARBAKIR		DİYARBAKIR' ın TÜRKİYE Üretim Miktarı İçindeki Payı (%)
	EKİLEN Alan (Dekar)	ÜRETİM Miktarı (Ton)	EKİLEN Alan (Dekar)	ÜRETİM Miktarı (Ton)	
KARPUZ	833.657	3.870.515	35.220	142.818	3,690
KAVUN	721.758	1.777.059	17.851	48.219	2,713
HIYAR	360.182	1.916.645	8.703	23.528	1,227
ACUR	25.740	43.204	736	910	2,106
KABAK	840.560	590.414	181	270	0,045
TOPLAM	2.781.897	8.197.837	62.691	215.745	2,632

Sebze tarımı, dikiminden hasat döneminin sonuna kadar bütün aşamalarında karşılaşılan sayısız problemler yüzünden ekim alanlarıyla elde edilen sebze ürün miktarları arasında her zaman paralellik görülmemektedir. Ekilebilir alanların çoğu kullanıma açık olduğu halde dünya nüfusunun hızlı artışı nedeniyle artan nüfusun gereksinimlerini karşılamak mümkün olmamaktadır. Bunun için birim alandan alınacak ürün miktarının artırılmasına yönelik araştırmaların veya hastalık yada zararlılardan oluşacak kayıpların azaltılması ile ilgili

çalışmalara/araştırmalara yoğunluk verilmesinin zorunlu hale geldiği açıkça bilinmektedir.

Diyarbakır ili ve ilçelerinde ticari olarak çeşit isimleri belli olan ve farklı özel firmaların çeşitlerinin yanında çok büyük alanlarda olmasa da üretilen “Diyarbakır yerel karpuz” çeşitleri aynı zamanda festival ve yarışmalara katılmak amacıyla da küçük alanlar olarak bölgede üretimi yapılmaktadır. Bu karpuz çeşidi çok büyük boyutlara kadar büyümekte ve 30 kg’ın altında hala sofralarda tüketilemeyecek kadar ham kalmaktadır. 40 kg olduğunda yenilebilecek olgunluğa gelmektedir. Bu büyüklükteki meyvelerde ticari olarak market ya da pazarlarda yer bulamadığı için yaygın ticari üretimi yapılmamaktadır. Ancak endüstriyel amaçlı tüketim amacıyla üretiminin teşvik edilmesi ve gen kaynağının korunması son derece önemlidir (Anonim, 2018).

Diyarbakır karpuzu dünyaca ünlü tarım ürünlerimizden birisidir. Dicle nehri kenarında çakıllı, kumlu arazilerde yetiştirilen bu karpuz çeşidinin Diyarbakır’ın ekonomik, sosyal ve folklorik yaşantısında değerli bir yeri bulunmaktadır. Diyarbakır karpuzunu meşhur eden en önemli özellikleri, irilik ve tabii ki lezzetidir. Her üründe olduğu gibi Diyarbakır karpuzunun da kendine özgü özellikleri söz konusudur. İlk göze çarpan özelliği aşırı iriliğe sahip olması ve ikinci özelliği de aroması, yani lezzetli oluşudur (Anonim, 2018). Diyarbakır’da, Sürme, Pembe, Beyaz Kış, Kara Kış ve Ferik adları ile tanınan tiplerin eskiden yaygın olarak yetiştirildiği bilinmektedir. Ancak günümüzde bu çeşitlerden sadece Sürme yetiştirilmektedir (Anonim, 2019b).

Sürme çeşidi, Diyarbakır karpuzları arasında en iri olan çeşit olup kabuk rengi koyu yeşil ve üzerinde uzunlamasına geniş dilimler halinde çizgilidir. Kırmızı renkte olan eti oldukça tatlıdır. Fakat özellikle biraz fazla olgunluk halinde tamamen lifli bir hal almaktadır. Kabuğu kalın ve dayanıklı olduğundan hem taşıma ve hem de uzun süreli muhafazaya oldukça uygundur. Tipik yetiştirme sistemi ile yetiştirildiğinde 50 - 60 kilo, hatta 75 kilo kadar iri meyveler elde edilebilmektedir. Bütün meyve olarak yenmesi hemen hemen imkânsız olduğundan

çoğunlukla dilimler halinde satılmaktadır. Çekirdekleri yörede yetiştirilen diğer yerli çeşitlere nazaran iri ve siyahtır. Sürme çeşidi "Sürme hırsızı" adıyla da anılmaktadır.

Pembe çeşidin kabuğu parlak yeşil, üzerine koyu yeşil renkli çizgilerle uzunlamasına çizgilidir. Kabuğu 1.5 cm. kalınlığında olup meyve eti pembeye yakın açık kırmızı renktedir. Bundan dolayı "pembe karpuz" adını almıştır. Eti hafifçe lifli olmasına rağmen oldukça tatlıdır. Çekirdekleri küçük ve siyah renktedir. Meyvelerde ortalama ağırlık 23 - 30 kilo arasında değişmektedir (Anonim, 2019)..

Ferik çeşidi, şekil ve kabuk özellikleri itibari ile sürme çeşidine benzemekle beraber meyveleri daha küçüktür. Ortalama meyve iriliği 8 - 15 kg arasında olup eti daha kırmızı renklidir. Çekirdekleri siyah bazen de sarı olabilmektedir (Anonim, 2019b).

Siyah (Kara Kış) karpuzunun ağırlığı 5 - 20 kg arasında değişmekte olup çekirdekleri siyah renktedir. Yörede "siyah kışlık karpuz" adıyla anılan bu çeşidin özelliği hasattan sonra kış aylarından bahara kadar adi depo koşullarında bile saklanabilmesidir. Ancak değişen piyasa koşulları ve üretim sistemi gereği bu çeşit malesef artık bölge üreticileri tarafından yetiştirilmemektedir. Bu durum beyaz kabuklu kışlık karpuz için de geçerlidir. Bu sonuç da gösteriyor ki korunmaya alınmadığında ıslah materyali olabilecek birçok çeşidimiz kaybolmaya mahkûmdur (Anonim, 2019b)..

Beyaz (Beyaz kış) karpuzda Kara karpuz gibi kış ayları sonuna kadar saklanabilmekte olup kabuk rengi hariç tüm özellikleri benzerlik göstermektedir. Beyaz karpuzunda siyah karpuzda olduğu gibi bölgede yetiştirilmesinden vaz geçilmiştir (Anonim, 2019b).

Diyarbakır karpuzu, merkeze bağlı olan ve Dicle nehri kıyısında bulunan Sivritepe (Şeyhelan), Erimli (Sımakı), Tekkaynak (Yuvacık), Feri ve Tepe köylerinde yoğun olarak yetiştirilmektedir. Ülkemiz için çok önemli bir gen

kaynağı olmasına rağmen bu güne kadar malesef bilimsel yaklaşımlar ile bu karpuz çeşitleri hakkında yeterli ve detaylı bilimsel araştırmalar yapılmamıştır.

Diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi kabakgil üretimini, dolayısıyla karpuz üretimini sınırlayan ve ürünün pazar değerini düşüren birçok biyotik ve abiyotik faktör söz konusudur. Biyotik faktörler içinde zararlılar (Böcek, akar, nematod) ve farklı hastalık etmenleri vardır. Bitkilerde zararlı fungus ve bakteri hastalıkları dışında virüs hastalıkları özellikleri, yayılmaları ve mücadeleleri ile farklılık gösteren önemli bir hastalık grubu olarak dikkate alınmaktadır. Özellikle de bitki virüs hastalıklarının mücadele yöntemlerinin kısıtlı olması, örneğin kısa zamanda ve etkili sonuç alınan bir kimyasal tarım ilacın kullanılamaması gibi etkili bir kontrol yönteminin yokluğu nedeniyle özel öneme sahiptirler (Yılmaz ve Davis, 1984, Yılmaz ve ark., 1992 ve 1993).

Kabakgil yetiştiriciliğinde verim ve kalite kaybına neden olan çok sayıda faktörün olduğu, bu faktörlerin içerisinde önemlilerden birinin virüs hastalıkları olduğu bilinmektedir. Bu güne kadar 60 tan fazla virüsün kabakgillerde enfeksiyona neden olduğu, bu virüsler içerisinde de Cucumber Mosaic Virus (CMV), Squash Mosaic Virus (SqMV), Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV), Papaya Ringspot Virus (PRSV) ve Watermelon Mosaic Virus (WMV) gibi virüslerin önemli ve ekonomik öneme sahip virüsler oldukları hakkında bir çok bilgi, yayın ve raporun varlığı bilinmektedir.

WMV, *potyviridae* familyasının *potyvirus* cinsi içinde yer alan bir virüs olup birçok sinonimi vardır. Bunların içinde Marrow mosaic virus, Melon mosaic virus ve ilk defa 1965 yılında karpuzda (*Citrullus lanatus*) saptanmış olan WMV-2 sinonimlerindenidir. WMV'ü bitkilerde patojenik bir virüs olup birçok farklı bitki türünde enfeksiyona neden olmaktadır ve karpuz mozaik hastalığı olarak bilinmektedir. WMV' ünün ırkları WMV-1 ve WMV-2 olarak iki ana gruba ayrılmaktadır, ancak, son zamanlarda WMV-1 Papaya Ringspot Virus olarak ve WMV-2 de genel bir isim altında WMV olarak isimlendirilmektedir (Guner ve Wehner, 2008).

WMV, karpuz, kavun, kabak, balkabağı ve hıyarda kloroz, yaprak deformasyonu ve bodurlaşma; bakla (*Vicia faba*) ve börülcede (*Vigna sinensis*) kloroz ve beneklenme belirtilerine neden olmakta, kabak (*Cucurbita pepo*), kavun (*Cucumis melo*), hıyar (*C. sativus*), karpuz (*Citrullus lanatus*) ve bezelye (*Pisum sativum*) gibi bazı baklagiller WMV-2' ünün doğal konukçusu olup mozaik, beneklenme ve yapraklarda şekil bozukluğu gibi belirtiler meydana getirmektedir.

WMV *Aphididae* familyasına ait böceklerle; *Myzus persica*, *Aphis gossypii*, *Aphis craccivora* başta olmak üzere en az 29 yaprak biti türü ile non-persistent olarak ve ayrıca mekanik yolla taşınırken tohumla taşınması söz konusu değildir.

23 familyaya ait 160 dikotiledon bitki türünde infeksiyona neden olan ve dünyanın her tarafında yaygın olduğu bilinen WMV nin varlığı Amerika, Avrupa ve Güney Afrika, Japonya, Havai ve Küba' dan rapor edilmiş ve 23 familyaya ait 160 dikotiledon bitki türünün WMV' ne karşı duyarlı olduğu rapor edilmiştir (Molnar & Schmelzer, 1964; Edwardson, 1974; Horváth ve ark., 1975; Greber, 1978; Hampton ve ark.,1978; Horváth, 1979; Lecoq ve ark.,1981; Edwardson and Christie,1986).

Bitkilerde zarar yapan viral hastalıklara karşı etkili bir mücadele yöntemi bulunmamasından dolayı etmenin tanısı, yaygınlığının ve taşınma yollarının bilinmesi, hastalık kaynaklarının imha edilmesi yanında zarar görmekte olan konukçuların dayanıklılıklarının bilinmesi ve dayanıklı çeşitlerin üretimi önemli mücadele konuları olarak karşımıza çıkmaktadır.

Diyarbakır ve civarında yapılan bir survey çalışmasında Diyarbakır karpuzu, ticari bir hibrit karpuz çeşidi ve kavun bitkilerinin birlikte yetiştirildiği aynı alanda hem kavun hem de ticari karpuz çeşidinde virüs benzeri belirtiler gözlenirken Diyarbakır karpuzunda herhangi bir belirtinin görülmemesi dikkati çekmiştir. Yıllardır bu bölgede geleneksel yetiştirilen Diyarbakır karpuzunun söz konusu virüs belirtilerini göstermemesi ‘acaba bir dayanıklılık mı’ söz

konusudur? sorusunu gündeme getirmiş ve böyle bir çalışmanın planlanmasına vesile olmuştur.

Öncelikle Diyarbakır ve ilçelerinde karpuz ve kavun üretimi yapılan alanlarda zararlı ve mevcut virüslerin belirlenmesi yanında Watermelon mosaic virus (WMV)' ünün varlığının ortaya çıkartılması, farklı konukçularında simptomolojik ve biyolojik özelliklerinin ortaya konması, kılıf protein geninin RT-PCR ile çoğaltılan bölgesinin DNA dizilimi kullanılarak WMV' nün daha önce saptanmış olan dünyadaki diğer izolatlarla karşılaştırılması ve akrabalık (Filogenetik) ilişkilerinin ortaya konması çalışmanın amacını oluşturmuş ve çalışmada söz konusu etmen saptanabilirse yerel ve milli olan Diyarbakır karpuz çeşitlerinin WMV'üne karşı reaksiyonunu ve varsa dayanıklılığının biyolojik ve moleküler yöntemlerle ortaya konulması amaçlanmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kabakgilleri etkileyen hastalıklar içinde en önemli patojenlerden biri de virüslerdir. Bu hastalıklar, bitki gelişmesinde gerilemeler, verimde azalmalar ve meyve kalitesinde deformasyon ve beneklenmeler nedeniyle kalite kaybına ve sonuçta pazarlanamaz meyve elde edilmesine neden olmaktadır. Hıyar, kavun, kabak, balkabağı ve karpuzlardan oluşan kabakgiller bitki grubunda majör, yani ekonomik olarak önemli olan virus hastalıkları arasında Cucumber Mosaic virus (CMV), Squash Mosaic Virus (SqMV), Watermelon mosaic virus 1 (WMV-1), Watermelon mosaic virüs 2 (WMV-2) ve Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV) sayılabilir. Bu önemli virüsler içinde kavunda hem tohum hem de böceklerle taşınan SqMV haricinde diğerleri yaprak bitleri ile non-persistent (kalıcı olmayan) şekilde taşınıp yayılmaktadır. Bu önemli virüsler yanında ayrıca minör ya da daha az önemli ve çok yaygın olmayan virüslerde kabakgillerde değişen oranlarda ve zaman zaman zarar yapmaktadır. Bunlar arasında da tohum ve nematodlar ile (*Xiphinema americanum*) taşınan Tobacco ringspot virus (TRSV), yine nematodlar ile taşınan Tomato ringspot virus (ToRSV), yaprak bitleri ile taşınan Clover yellow vein virus (CYVV)'nden de kabakgillerde saptandığı ve zarar yaptığından söz edilmektedir (Zitter v e Banik, 1984).

Watermelon mosaic virus, *potyviriidae* familyasının *potyvirus* cinsine ait olan bir virüstür. *Potyvirus* cinsi içerisinde 158 virüs türü bulunmakta olup tip türü Potato virus Y'dir (ICTVdb, "Virus Taxonomy: 2014 Release, Retrieved 15 June 2015). *Begomovirus*ler gibi bu cinsin üyeleri olan virüsler de tarımsal üretimde, yabani bitkiler ile bahçe-tarla ve süs bitkileri olarak birçok kültür bitkisinde ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Virüs çoğu *Aphididae* (Cins; *Macrosiphum* ve *Myzus*) familyasında olmak üzere 200'den fazla yaprak biti türü ile yayılmaktadır. *Potyvirus*lerin 6600 veya 7250 yıl önce evrimleşmiş oldukları bildirilmekte ve güneybatı Avrasya ya da kuzey Afrika'da evrimleşerek ortaya

çıkmiş oldukları öne sürülmektedir (Gibbs, ve Ohshima, 2010; Gibbs, ve ark., 2008). Mutasyon oranı yaklaşık olarak 1.15×10^{-4} nükleotid partiküllü olup virionu zarf içermeyen esnek, ipliksi yapıda olup nükleokapsid 680-900 nm uzunluğunda ve 11–20 nm çapındadır. Nükleokapsid yaklaşık 2000 kapsid protein kopyası içermekte olup nükleokapsidin simetrisi 3,4 nm genişliğinde yelpazeli sarmal şekildedir. Genomu ipliksi pozitive sense, 9000-12000 bazlı tek iplikli ssRNA’ dan oluşmaktadır. Sadece bir türü bipartit olmasına rağmen, *potyvirus*lerin çoğu segmentli değildir. Kabakgillerde özellikle Akdeniz bölgesinde 28 farklı virüs hastalığının var olduğu, bunlardan bazılarının yaygın ve büyük zararlar verdiği ve bazılarının da belli alanlarda sınırlı kaldığı rapor edilmiştir. Karpuzlarda zararlı olan WMV’nin konukçusu olmadığı dönemleri veya kışı birçok yabancı ot (*Capsella bursa-pastoris*, *Senecio vulgaris*, *Lamium amplexicaule*) üzerinde geçirmekte olduğu ve karpuz dışında ıspanakları da infekte ettiği bildirilmiştir (Lecoq, 1992).

WMV, *potyvirus*lerin en önemli üyelerinden bir tanesidir. Virüs, sinonim olarak Marrow mosaic virus (Raychaudhuri ve Varma, 1975; Varma, 1988), Melon mosaic virus (Iwaki et al., 1984; Komuro, 1962) ve ilk defa Webb ve Scott (1965) tarafından karpuzda (*Citrullus lanatus*) da bulunmuş olan Watermelon mosaic virus 2 (WMV-2) olarak ta bilinmektedir. WMV’ü bitkilerde patojenik bir virüs olup birçok farklı bitki türünde infeksiyona neden olmakta ve karpuz mozaik virüs hastalığı olarak isimlendirilmektedir.

WMV, aynı zamanda Potato Y Virus’ü (PVY) grubunun bir üyesi olup. Papaya Ring Spot Virüsü (WMV-1), Soybean mosaic virus (SMV) ve Blackeye cowpea mosaic virus (BCMV) leri ile serolojik olarak çok yakın ilişkili iken Potato Y virus’ü ve Bean Yellow Mosaic virus (BYMV) ile serolojik olarak daha uzak bir ilişkiye sahiptir (Van Regenmortel ve ark., 1962; Milne & Grogan, 1969; Frenkel ve ark., 1989; Yu ve ark., 1989).

WMV, karpuz, kavun, kabak, balkabağı ve hıyarda kloroz, yaprak deformasyonları ve bodurlaşma; bakla ve börülcede kloroz ve beneklenme belirtilerine neden olmaktadır. Kabak (*Cucurbita pepo*), kavun (*Cucumis melo*), hıyar (*C. Sativus*), karpuz (*Citrullus lanatus*) ve bezelye (*Pisum sativum*) gibi bazı baklagiller WMV-2' ünün doğal konukçusu olup mozaik, beneklenme ve yapraklarda şekil bozukluğu gibi belirtilerin oluşumuna neden olmaktadır (Inouye, 1964).

Bitkilerde hastalıklara neden olan WMV'ünün simptomolojik olarak tanımlanmasında kullanılan konukçularına özel belirtiler sergilediği görülmektedir. Bunlar Kazayağı (*Chenopodium amaranticolor*) bitkisinde klorotik lokal lezyonlar, kabak (*Cucurbita pepo*) da sistemik mozaik ve nadiren yaprak deformasyonu, bezelye (*Pisum sativum* cv. Alaska) de nekrotik lokal lezyon, sistemik beneklenme ve nekrozlar, tütün (*Nicotiana benthamiana*) da sistemik mozaik gibi belirtilerdir. Virüsün canlı olarak tutulmasında ve çoğaltılmasında *Cucurbita pepo* cvs Small Sugar, Zucchini kabağı, *Nicotiana benthamiana* gibi test bitkileri en ideal bitkiler olarak bildirilmektedir (Edwardson ve Christie, 1986; Edwardson, 1974).

WMV *Aphididae* familyasına ait böceklerle; *Myzus persica*, *Aphis craccivora* başta olmak üzere en az 29 yaprak biti türü ile non-persistent olarak taşınabilmektedir. Mekanik inokulasyon yoluyla test bitkilerine taşınabilen virüsün tohumla taşındığına dair herhangi bir kayıt bulunmamaktadır (Edwardson ve Christie, 1986; Anderson, 1954).

WMV Dünyanın hemen hemen her bölgesinde bulunmakta olup Amerika (Lindberg, ve ark., 1956), Avrupa (Schmelzer ve Milicic, 1966) ve Güney Afrika (Van Regenmortel, 1961), Japonya'da (Komuro, 1957), Havai'de (Toba, 1962) ve Küba'da (Schmelzer, 1966) tarafından rapor edilmiştir.

Bu güne kadar bir çok araştırmacı WMV' ünün yaklaşık olarak 23 familyaya ait 160 dikotiledon bitki türünde enfeksiyonlara neden olduğunu ve bu bitki türlerinin virüse karşı duyarlı olduklarını belirlemişler ve rapor etmişlerdir (Molnar ve Schmelzer, 1964; Edwardson, 1974; Horváth ve ark., 1975; Greber, 1978;

Hampton ve ark., 1978; Horváth, 1979; Lecoq ve ark., 1981; Edwardson and Christie, 1986).

Purcifull ve ark., (1984) WMV' nin termal inaktivasyon noktasının 55-65 °C ve in-vitro'da canlı kalma süresinin 10-50 gün arasında olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar partiküllerinin zarf şeklinde olmadığını, genellikle kıvrımlı ve 730-765 nm uzunluğunda olduğunu, virionun % 5 nükleik asit ve % 95 protein içerdiğini, virüsün genomunun tek iplikli, doğrusal tek parçalı RNA dan oluştuğunu ve bitkinin mezofil ve epidermisinde bulunduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca WMV' nün saptanması, tanılanması ve karakterizasyonu ile ilgili olarak dünyada yapılan araştırmaların da birbirini doğrular nitelikte olduğu da bilinmektedir.

Quemada ve ark., (1990) yaptıkları bir çalışmada WMV-2 ve Zucchini yellow mosaic virusünün Florida izolatının (ZYMV-F) 3' terminal genomik bölgesini klonlamış ve bu bölgeye ait cDNA' nın sekans analizini yapmışlardır. Sekanslar, WMV-2 nin 3' terminal genomik bölgesinde geniş bir nükleer inclusion body geni, kılıf protein geni ve 3' ucunda protein sentezlenemeyen bölgenin olduğunu; ZYMV-F ' in 3 ' terminal genomik bölgesinde kılıf protein geninin ve 3' ucunda protein sentezlenemeyen bölgenin olduğunu ortaya koymuşlardır. Klonların nükleotid ve aminoasit baz dizilimlerinin diğer *potyvirusler* ile karşılaştırılması sonucunda WMV 2' nin Soybean mosaic virusü N ırkı ile çok yakın ilişkide olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu sonuçlar aynı virüsün farklı bir ırkı olduğunu desteklemektedir. Araştırma sonucunda Quemada ve ark., (1990) *potyvirus* grubunun belirgin bir tip üyesi olan ZYMV-F virüsünün WMV-2 ile en yakın ilişkili olan virüs olduğunu ve ayrıca "Parsimony branching" ile yapılan filogenetik analizde *potyviruslerin* iki ana gruba ayrıldığını rapor etmişlerdir.

Kabakgillerde zararlı *potyviruslerin* vektörler ile taşınma durumları üzerine Antignus ve ark., (1989) İsrail'de yaptıkları çalışmada araziden kabakgillerden *potyvirusleri* toplamışlar ve serada test bitiklerine (kabakgil, bezelye ve *Chenopodium spp.*) taşımışlardır. Bu bitkilerde oluşan belirtilere göre

kabakgil *potyvirus*lerinin konukçu reaksiyonuna dayalı olarak kısmi karakterizasyonunu yapmışlar ve daha ileri sınıflandırma için de ELISA ve serolojik spesifik elektron mikroskobu (SEM) yöntemlerini kullanmışlardır. Bu yöntemlerle, 4 izolattan 3'ünün ZYMV olduğunu, 4. sünün WMV-2 olduğunu ortaya koymuşlardır. Üç ZYMV izolatının iki tanesi yaprak bitleri ile taşınmayan ırk olarak belirlenmiş ve bu iki ırkta virüsün taşınmasını yöneten veya virüsün taşınmasına yardımcı olan yardımcı protein partiküllerinin (Helper component) varlığını bildirmişlerdir. Yaprak bitleri ile taşınan ırklarda helper komponentlerinin virüsün taşınmasını düzenlemediği veya vektör taşınması ile ilgili olmadığı, buna karşılık yaprak bitleri ile taşınmayan ZYMV ve WMV virüs ırklarında helper komponentlerin virüsün taşınmasını düzenlediği Antignus ve ark., (1989) tarafından rapor edilmiştir.

İran'da yapılan bir çalışmada WMV' nün çok büyük ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir. WMV izolatlarının moleküler farklılıklarını ve yaygınlığını ortaya koymak için seralarda yetiştirilen kabakgil bitkilerinden tesadüfî olarak 620 örnek toplanmış ve monoklonal antiserum kullanılarak DAS-ELISA ile testlenmiş, test sonucunda 303 (% 48,8 oranında) örneğin WMV ile bulaşık olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada Shafiri ve ark., (2008)' nin daha önce kullandıkları virüsün kılıf protein gen bölgesine spesifik Forward 5'-GAATCAGTGTCTCTGCA ATCAG-3' ve Reverse 5'-ATTCACGTCCCTTGCAGTGTG-3' primer çiftini kullanarak yaptıkları RT-PCR çalışması ile beklenen 825 bp büyüklüğünde tek bant olarak PCR ürünü de elde edilmiştir. Daha sonra bütün örnek ve bölgeleri temsil edecek şekilde 15 örneğin PCR ürünlerinin DNA dizileri çıkarılmış, DNA dizileri Gen Bankası verileri ile karşılaştırılmış ve sonuçta 15 İran izolatının %95,8 - %99,2 oranında diğer izolatlarla benzerlik gösterdiği, bu sonuçlara göre İran izolatlarının da değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Sonuç olarak araştırmacı farklı bölgelerden toplanan izolatların filogenetik sınıflandırmada farklı gruplarda olduğunu ortaya çıkarmıştır (Zohreh Moradi, 2011)

Wang ve Li (2017)'nin yayınladıkları araştırma sonuçlarına göre 2013-2014 yıllarında Çin' in Xinjiang (Sincan Uygur Özerk Bölgesi) bölgesinde 11 farklı kavun üretim alanından topladıkları WMV örneklerini *C. melo* 'Queen', *Cucumis sativus* 'Xintai Mici', *Cucurbita moschata* 'Wuman-I', *C. pepo* 'Changqi-I', *Luffa cylindrica* 'Changxiang Sigua', *Datura stramonium*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Vigna unguiculata* 'Techang Lütiao Jiangdou', *Phaseolus vulgaris* 'Fengshou-I', *Vicia faba* 'Liangfeng Candou', *Pisum sativum* 'XianshiWandou' ve *Nicotiana tabacum* test bitkilerindeki belirti reaksiyonlarına göre karakterize etmişlerdir. Ayrıca, Liu ve Xiang (2008)'nin tanımladıkları, virüsün kılıf protein geni üzerindeki 917 bp büyüklüğündeki bölgesel spesifik WMV-F (5-GGTTGCTG YGARTCAGTGTC-3) ve WMV-R (5-CGACCCGAAA TGCTAACT-3) primer çiftlerini kullanarak RT-PCR yöntemi ile bu 11 izolatin karakterizasyonunu yapmışlar ve izolatlara ait DNA dizileri ile izolatların filogenetik ilişkilerini ortaya koymuşlardır.

Abdalla ve Ali (2013) Florida'daki bazı arazilerden mozaik ve beneklenme belirtileri gösteren kavun, hıyar, balkabağı, kabak ve karpuzdan oluşan 9 örnek toplamışlar, DIBA ve RT-PCR ile testlenmesi sonucunda dokuz örnekten sekizinin Watermelon mosaic virus (WMV) ve Papaya Ringspot Virüsü (PRSV-W) ile tek veya her iki virüsle karışık infekteli olduklarını bulmuşlardır. Tipik klorotik leke, sararma, beneklenme, damar açılması ve hafif mozaik belirtileri gösteren bir kabak örneği RT-PCR ile testlenmiş ve PRSV-W, SqVYV, WMV ve ZYMV ye karşı negatif olarak bulunmuştur. Belirti gösteren kabak yapraklarından virüs benzeri partiküllerin (VLP) varlığına bakıldığında, VLP preparatlarından elde edilen elektron mikroskobu ile yaklaşık 700 nm uzunluğunda ve 12-14 nm genişliğinde tipik potyvirus benzeri partiküller görüntülemişlerdir. SDS-PAGE ile yapılan VLP analizleri sonucunda 37 kDA boyutunda olan PRSV-WB'den (35 kDA) biraz daha büyük kılıf protein (CP)'e sahip olduğunu saptamışlardır. Belirti gösteren kabak örneklerinden mekanik inokulasyon yöntemi ile 10 kabak fidesine aşılama yapılmış ve 7 gün sonra test bitkilerinde klorotik lekeler ve beneklenmeler

gözlenmiştir. Bunu takiben, son inokulasyondan 2-3 hafta sonra belirtiler daha da şiddetli olmuş ve sistemik olarak infekteli yapraklar örneklerin araziden toplandığı dönemdeki kloroz ve beneklenme görünümüne benzer belirtiler göstermiştir. Araştırmacılar bulaşık test bitkilerinden saflaştırdıkları VLP' leri SDS-PAGE yöntemiyle testlemişler ve kılıf protein (CP) moleküler ağırlıklarını ölçmüşler ve önceki çalışmalarla aynı sonuçları elde etmişlerdir. Ayrıca VLP'lerden total nükleik asit (tNA) ekstraksiyonu yapılmış ve örnekleri universal potyviriidae primerleri F-5'-CACGGATCCCGGG (T)₁₇AGC-3' ve R-5'-GGBAAYAAAYAGYGGDCARCC-3' kullanılarak genomun 3' bölgesinde bulunan kılıf protein gen bölgesini çoğaltarak % 1 lik agaroz jelde 1.2 kb' lik PCR ürünü görüntülemişlerdir. PCR ürünlerinden yaptıkları DNA dizilerini GenBank' a girmişlerdir (KC522968). Abdalla ve Ali (2013) yaptıkları BLAST analizi sonucunda Kabak *potyvirus*ünün GenBank'ta diğerleri ile yaptıkları karşılaştırmalarda %64,8 amino asit miktarı üzerinden en yüksek %72,0 oranında PRSV-W ile %70,0 oranında WMV (NC-006262) ve SqVYV (NC-010521) benzer olduğunu bulmuşlardır.

Perotto ve ark., (2016) Arjantin'de kabakgil virüslerinin önemli verim kayıplarına neden olduğunu belirtmişler, en yaygın virüsün bir *potyvirus* olan WMV olduğunu ve Arjantin'de yüksek oranda bulunduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları araştırmada önemli kabakgil üretim bölgelerindeki survey çalışmaları sonucunda doğal olarak bulaşık kavun ve kabak bitkilerinde şiddetli epidemiyeye neden olan WMV' ünün WMV-1 SDE FF izolatını elde etmişlerdir. Söz konusu izolatın 10,027 nükleotidden oluşan tüm genomunun WMV' ünün 3. grubundaki JF273464.1|C07-014 ve EU660581.1|FMF00-LL1 Fransız izolatları ile % 96 oranında nükleotid, % 98 oranında da amino asit benzerliği gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Ali ve ark., (2012) ABD' nin güneyinde karpuz ve diğer kabakgil üretim alanlarında yaptıkları survey çalışmalarında 10 eyaletten belirti gösteren 715 bitkiden yaprak örnekleri toplamışlardır. Bu örnekleri DIBA ve RT-PCR ile Alfalfa

mosaic virus (AMV), Bean pod mottle virus (BPMV), Cucurbit aphid born yellows virus (CABYV), Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV), Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV), Cucumber mosaic virus (CMV), Melon necrotic spot virus (MNSV), Papaya ringspot virus-W (PRSV-W), Squash leaf curl virus (SLCuV), Soybean mosaic virus (SMV), Squash mosaic virus (SqMV), Squash vein yellowing virus (SqVYV), Tobacco ringspot virus (TRSV), Watermelon mosaic virus (WMV), Watermelon silver mottle virus (WSMoV), Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) ve Zucchini green mottle mosaic virus (ZGMMV) ten oluşan 17 virüse karşı testlemişler ve bu 17 virüsten 13 tanesini belirlemişlerdir. Bu virüslerin bulunma oranlarını en yüksekte düşüğe doğru sıralamışlar, en yüksek olarak % 30.6 oranında WMV' nü, ve sırasıyla %24.7 oranında PRSV-W, % 13.9 oranında ZYMV, % 5.7 oranında TRSV, % 3.5 oranında SqMV ve % 2.6 oranında MNSV saptamışlardır. AMV, BPMV, CMV, SqMV, TRSV, PRSV-W ve ZYMV' den oluşan 7 virüsü aynı zamanda etraftaki diğer ürün ve yabancı otlarda da saptarken en yaygın olan *potyvirus*leri karışık enfeksiyon olarak ta belirlemişlerdir. Ali ve ark., (2012) sonuçta PRSV-W, WMV ve ZYMV' nin ABD' nin güney bölgelerinde karpuz ve diğer kabakgıl üretim alanlarında yaygın olarak bulunduğunu rapor etmişlerdir.

Virüsle bulaşık olduğu düşünülen bitkilerden toplanan örneklerle yapılan bir çalışmada WMV-1 (WMV-1 FL) ve WMV 2 (WMV-2 FL) Florida izolatlarını SDS-Immunodifüzyon yöntemi ile testlenmiş ve serada inokulasyondan 2-6 ay sonra toplanan örnekler ile çift taraflı testlerde bu izolatlar cross reaksiyon vermemiştir. Başka bir bölgeden toplanan 13 WMV izolatı içerisinde tanısı yapılan 3 tip izolat WMV-1 FL' ne ile yakın bulunmuş, fakat WMV-2 FL ile reaksiyon vermemiştir. Çalışmada değişik eyaletlerden alınan örnekler ile karşılaştırmalar yapılmış ve yöntem olarak kullanılan SDS-immunodiffusion yönteminin WMV-1 ya da WMV-2 nin infekteli bitkilerde saptanması için güvenilir bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Ayrıca çalışmada Papaya Ringspot Virüs' ünün serolojik olarak

WMV-1 FL ile yakın ilişkili olduğu, fakat WMV-2 FL ile reaksiyon vermediği de rapor edilmiştir (Purcifull ve Hiebert, 1979).

Mısır'da 2007 yılında yapılan bir çalışmada Giza-1 karpuz çeşidinin yapraklarından ZYMV olarak bilinen *potyvirus* izole edilmiş ve örnekler ZYMV'ye spesifik poliklonal antibody serumu kullanılarak DAS-ELISA ile testlenmiştir. Aynı zamanda ZYMV' nin KR-PA ırkının DNA dizisine dayalı olarak spesifik primerler kullanılarak yardımcı komponent proteinaz (Hc-pro) gen bölgesi RT-PCR ile çoğaltılmış, çoğaltılan ve dizisi çıkarılan bölgeye BLAST yapılmıştır. Hc-pro komponent genine ait DNA dizisi Fransa, Çin ve Pakistan izolatlarının Hc-pro geni ile karşılaştırılmış ve yeni Mısır izolatının Fransa ve Çin izolatlarından ziyade Pakistan izolatına daha yakın olduğu ortaya konulmuştur. Çalışmayı yürüten araştırmacılar tek bir gene ait DNA dizisinin izolatların filogenetik sınıflandırılmasında yeterli olmadığını rapor etmişlerdir (Salem ve ark., 2007).

Thomas, (1980) Cook adalarında kabak, karpuz ve hıyar bitkilerinde virüs hastalıklarının varlığını rapor etmiş ve hastalığı yabani balkabağı (*Cucurbita foetidissima*) ve kudret narında (*Momordica charantia*) da saptamıştır. Hastalığın kabak ve karpuz alanlarda bol miktarda bulunan yaprak bitleri (*Myzus persicae*) ile non-persistent olarak taşındığını ve ayrıca virüsün serolojik ve fiziksel özelliklerine dayalı olarak Watermelon mosaic virus-1 (WMV-1) olduğunu ortaya koymuştur.

Joannon ve ark., (2010) Fransa'da yaptıkları bir araştırmada Watermelon mosaic virus popülasyonlarının coğrafik dağılımını ortaya çıkarmak için virüs genomunun P1 bölgesine spesifik (subgroup-specific primerler W-EM1-930-5' (5TACATTGGAACAACACTGCTGC), W-EM2-540-5' (TGGTATTGCCAATGGCACAC), W-EM3-190-5' (CTGAAACACAGCACAGTAACA), W-EM4-550-5' (GGTTCTACCAGTGGTGGGT), ve spesifik olmayan reverse primer WMV-1090-3' (TATTTGCCTTCTTCATGTGG) kullanarak RT-PCR ile

yapmışlardır. İzolatların DNA dizilimlerinin benzerlik ve farklılık analizlerini ortaya koymuşlar, ancak virüsün bölgedeki coğrafik dağılımının WMV-EM' nün genomik yapısı ile açıklanamayacağını bildirmişlerdir.

WMV' nün alt gruplarının moleküler yöntemlerle belirlenmesi ile ilgili bir araştırmanın sonuçları incelendiğinde WMV' nün I ve II olarak alt gruplara ayrıldığı, alt grup I inde kendi içinde IA-IB-IC olarak üçe ayrıldığı rapor edilmiştir (Sharifi ve ark., 2008). Araştırmacılar İran'da WMV' nün hangi alt gruba dahil olduklarını ortaya koymak için yoğun olarak kabakgil üretimi yapılan bölgelerde 2004-2005 yıllarında yaptıkları surveyler süresince belirti gösteren 757 kabakgil ve 31 adette yabancı ot örneği almışlar ve ELISA testi sonucunda 788 örneğin 190 tanesinin WMV ile bulaşık olduğunu bulmuşlardır. Yabancı otlar içerisinde ise sadece “acı hıyar” ya da “ebucehil karpuzu” olarak bilinen *Citrullus colocynthis* bitkisinde WMV'yi saptamışlardır. Araştırmacılar bölge ve örnekleri temsil edecek şekilde 18 izolatu RT-PCR ile kılıf protein geni üzerinden testlemişler ve klonlayarak DNA dizisini ortaya koymuşlardır. 778 bp uzunluğundaki diziyi kullanarak yaptıkları filogenetik analiz sonucunda 17 izolat grup I ve II ile, sadece 1 izolat ta grup II ile benzerlik göstermiştir. Grup II ye dahil olan izolatu diğerlerine göre daha geniş konukçu dizisine sahip olduğunu ve *Nicotiana debneyii* ve *Datura metel* bitkilerini de hastalandırdığını bildirmişlerdir. Diğer yandan 17 izolatu bu iki bitki türünü infekte edemediğini rapor etmişlerdir. İran izolatuının grup I içerisinde de alt grup IB ye dahil olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırma ile İran'da WMV' nün her iki grubunun da var olduğunu ortaya koymuşlardır. Aynı araştırma sonucunda alt grup IA' nın özellikle İspanyada kavunlarda ve İran'da kabakgil üretim alanlarında daha yaygın olduğunu bildirmişlerdir (Sharifi ve ark., 2008).

Desbiez ve Lecoq 2008 yılında yaptıkları bir araştırma ile kılıf protein genine dayalı olarak tanımlanan üç ana moleküler gruba ait 13 Watermelon mosaic virus izolatuının tüm genom sekanslarını elde etmiş ve veri tabanlarında bulunan 4

sekans ile karşılaştırmışlardır. Birçok izolatin, özellikle moleküler grup 1 ve 2 arasında, intraspesifik rekombinasyon açısından ayırıcı kanıt sunmuş olduğunu bildirmişlerdir. Çoğu izolatin, çoklu bağımsız rekombinasyon olaylarını düşündüren farklı rekombinasyon kırılma noktalarına sahip olduğunu bulmuşlardır. Kesme noktalarının çoğunlukla HC-Pro kodlama bölgesinin C-terminal yarısı ile CI kodlama bölgesinin N-terminal kısmı arasında yer aldığını belirlemişlerdir. WMV genomunda pozitif farklılık olduğuna dair hiçbir kanıt bulamamışlardır. Yaptıkları grublandırmada Türkiyeden izole ettikleri Turk91 izolatinı (TURKEY; EU660579.1) Grup 1 içerisine dahil etmişlerdir.

Yine benzer bir çalışma Perotto ve arkadaşları tarafından 2016 yılında yapılmış ve Turk91 izolatinında dahil olduğu 35 farklı WMV izolatu ile Arjantinden izole ettikleri WMV1 SDE FF Arg izolatinı tüm genom sekanslarına dayalı olarak gruplandırmışlardır. Yaptıkları analiz sonucunda A (G1, G2 ve G3 (EM)) ve B (EM) olmak üzere iki istatistiksel olarak önemli rekombinasyon tespit etmişlerdir. Grublandırmada Turk91 (TURKEY; EU660579.1) izolatinı A grubu içerisinde G1 altgrubuna dahil etmişlerdir.

Farklı ülkelerde saptanan WMV izolatlarının diğer ülkelerdeki *potyvirus*ler ile olan akrabalık ilişkileri üzerine yapılan bir araştırmada Sudan'da şiddetli mozaik ve yaprak deformasyon simptomsu gösteren acur (*Cucumis melo* var. *flexuosus*) bitkisinden *potyvirus* Su-94-54 izolatu elde edilmiş, saptanan izolatin konukçu dizisi kabakgillerle sınırlı olup FAS WMV (MWMV) izolatu ve Papaya Ringspot Virusü (PRSV) ile serolojik olarak uzak bir akrabalık göstermiştir. Su-94-54 izolatinın kılıf protein gen dizisini MWMV ile karşılaştırılması sonucunda Su-94-54' ün diğer *potyvirus*lerden daha çok MWMV ile yakın (%86) olduğu ortaya konulmuştur (Lecog ve ark., 2001).

WMV' üne karşı dayanıklılık üzerine dünyanın farklı ülkelerinde araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırma sonuçları incelendiğinde Diyarbakır karpuzunda WMV 'ne karşı dayanıklılığın moleküler yöntemlerle de araştırılması ve moleküler markörlerin ortaya konulması gerektiği olgusu ortaya

çıkılmaktadır. *C. lanatus* ve *C. colocynthis* türleri içerisinde WMV ne karşı dayanıklı çeşitlerin olduğu daha önceden rapor edilmiş ve ayrıca karpuzun WMV ne karşı dayanıklılığının virüsün ırkına bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir. Hindistan'da yapılan bir araştırmada Bhargava ve Bhargava (1976) 59 karpuz çeşidinin WMV' ne karşı dayanıklı olduğunu bildirmişler. Fakat daha önceden Sowell ve Demski (1969) aynı 59 karpuz çeşidinin tamamını testlemiş ve hepsinin duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir.

Greber (1978) da Watermelon mosaic virus-1' in daha önce Avustralya'da bildirilmediğini, sadece 1970'den beri Queensland da yaygın olduğunu belirtmiştir. Watermelon mosaic virus-2'nin sakız kabağında ve bal kabağında yüksek oranda bulunduğunu ve karpuzda nadiren izole edildiğini, WMV-1' in ciddi verim kayıplarına neden olduğu WMV-2'nin ise az etkilemesine rağmen bal kabağının Queensland Blue çeşidinde çarpık meyve oluşumlarının görüldüğünü bildirmiştir. Bu çalışmada WMV izolatlarının fiziksel özellikleri ve virüs partiküllerinin elektron mikroskopik incelenmesi ve ilişkili hücre içi cisimciklerin başka yerlerde bildirilenlerle benzer oldukları saptanmış, ancak WMV-2 izolatları için bazı farklı konukçu reaksiyonlarının varlığı rapor edilmiştir. Ticari olarak satılan sakız kabağı, bal kabağı ve karpuzlarda WMV-1 veya WMV-2' ye karşı dayanıklılığın bulunmadığı, boynuzlu kavununun (Eşek hıyarı, *Ecballium elaterium*) ise Avustralya WMV-1 izolatına karşı dayanıklı olduğu açıklanmıştır.

Farklı ülkelerden temin edilen 670 *Citrullus* türü WMV' ne karşı dayanıklılık testine tabi tutulmuş, deneme serada fidelere mekanik inokulasyon ve inokule edilmiş fidelerin araziye dikilmesi şeklinde yürütülmüştür. Seradaki bitkiler son aşılama 10-14 gün sonra, araziye dağıtılan bitkiler ise aşılama 4-6 hafta sonra değerlendirilmeye alınmıştır. Seçilen 10 adet P1 189316, P1 189317 ve P1 189318 (Zaire); P1 244018, P1 244019 ve P1 255137 (Güney Afrika); P1 164708 (Hindistan) ve P1 494529 ve Egun (Egusi-types) ve P1 306782 (Nijerya) kodlu *C. lanatus* hatları hem arazide hem de serada dayanıklı bulunmuştur. Beş *C. colocynthis* P1 386016, P1 386024, P1 386025 ve P1 386026 (İran) ve P1 388770

(Fas) hatları testlemeler sonucunda arazi ve seralarda orta derecede dayanıklı bulunmuştur (Gillaspie ve ark, 1993).

Namba ve ark., (1992) bitkilerin virüslere karşı dayanıklı hale getirilmesi için gen transferi yöntemini kullanmışlardır. WMV 2 ve ZYMV kılıf protein gen bölgesini gen mühendisliği ile *Agrobacterium tumefaciens* kullanarak *Nicotiana benthamina* bitkisine aktararak bu bitkide aktarılan genin ekspresyonunu kontrol etmişlerdir. Daha sonra gen transferi yapılan bitkiye WMV 2 ve BYMV, PVY, PeaMV, CYVV, PeMV ve TEV den ibaret 6 potyvirus aşılandığında *N. Benthamiana* bitkisinin WMV-2 yada ZYMV ye karşı simptomatik olarak dayanıklılık gösterdiğini, yani aktarılan genin çalıştığını ortaya koymuşlardır.

Benzer bir araştırmada Ching ve ark., (2012) Tayvan'da yaptıkları çalışmada karpuz bitkilerini Watermelon Silver Mottle Virus (WSMoV), Cucumber Mosaic Virus (CMV), Cucumis Green Mottle Mosaic Virus (CGMMV) ve WMV' lerine karşı dayanıklı hale getirmek amacıyla gen transferi yapmışlar ve çalışma sonucunda karpuz bitkilerinden söz konusu virüslere karşı dayanıklı hatlar geliştirebildiklerini rapor etmişlerdir.

Türkiyede kabakgil virüsleri ile ilgili yapılmış ve yayınlanmış bir çok çalışma olmasına rağmen WMV ile ilgili yapılmış fazla bir araştırmaya bulunmamaktadır.

Çağlar ve ark., (2004) kavunlarda kabakgil virüsleri hakkında yaptıkları araştırma sonucunda kavun bitkilerinde SqMV' saptamışlar ve moleküler çalışmalarda RT-PCR ile virüse ait kılıf protein gen bölgesinden 579 bp lik bölgeyi çoğaltmışlar, saptadıkları SqMV' ünün Kimble ırkı olduğunu rapor etmişler ve karakterizasyonunu yapmışlardır.

Diyarbakır ve Mardin illerinde kabakgil üretim alanlarında yapılan bir araştırmada kavun, karpuz, kabak ve hıyar bitkilerinde virüs hastalıklarının yaygınlık ve oranları belirlenmiştir. Survey çalışmaları; fide ve yetişkin bitki dönemlerinde toplam 194 tarlada yapılmış ve yapraklarda mozaik, iplikleşme, kabarıklık ve şekil bozukluğu; meyvede renk açılması ve şekil bozukluğu;

bitkinin genelinde bodurlaşma, uç sürgünlerde rozetleşme, gelişme geriliği ve renk açılması gibi virüs belirtileri gösteren hastalıklı bitkilerden örnekler toplanmıştır. Her iki ilin ortalama hastalık yaygınlık ve bulunma oranları sırasıyla birinci dönemde % 38.01 ve % 4.57, ikinci dönemde ise % 52.26 ve % 21.59 olarak belirlenmiştir. Belirlenen tarlalardan toplanan 160 örnek DAS-ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Virüs türlerinin örneklerdeki dağılımı büyük farklılık göstermiş, birçok örnekte birden fazla virüsün karışık enfeksiyon halinde bulunduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; örneklerde virus hastalıklarının dağılımı WMV 96 (% 60.00), ZYMV 63 (% 39.38), CMV 69 (% 43.13), CABYV 26 (% 16.25) ve PRSV 34 (% 21.25) olarak belirlenmiştir. Bunlardan 11'i CMV, 24'ü WMV ve 3'ü ZYMV ile tek enfeksiyonlu olup, geriye kalan örneklerin ise birden çok virüsle bulaşık bildirilirken testlenen örneklerin hiçbirinde SqMV bulunmadığı rapor edilmiştir (Kızmaz ve ark., 2016)

Kameroğlu ve ark., (2016) Adana ilinde yetiştirilen kabakgillerde mozaik, meşe yaprağı ve yaprak deformasyonu belirtileri gösteren ve doğal olarak bulaşık bir karpuzdan DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri kullanılarak Watermelon mosaic virus izolatını elde etmişler ve WMV-Tr olarak kodlamışlardır. WMV-Tr biyolojik olarak ve RT-PCR yöntemi kullanılarak karakterize edilmiş ve bulunan izolatın dünyanın farklı yerlerindeki izolatlara benzer biyolojik özelliklere sahip olduğu, Avrupa ve dünyanın farklı yerlerinde var olan ve Asya izolatının da içinde olduğu WMV' nün 3. grubuna ait olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar WMV-2'yi Adana ili dışında Osmaniye ve Mersin illerinde de saptamışlardır. Yapılan literatür çalışmaları sonucunda dünyada WMV' üne karşı dayanıklılık çalışmaları ile ilgili moleküler düzeyde fazla araştırmaya rastlanılmamıştır. Karpuzun dayanıklılığı konusunda henüz moleküler markörler tam olarak ortaya çıkartılamadığından dolayı karpuzlarda WMV' ne karşı dayanıklılık çalışmalarının daha çok biyolojik yöntemler kullanılarak yapıldığını bildirmişlerdir. Çalışmalarda, dünyanın farklı ülkelerinde karpuz genotiplerine

mekanik inokulasyon yöntemi ile WMV'ü aşıl原因arak bitkilerin reaksiyonları ve gösterdikleri belirtiler dikkate alınarak değerdendirmeler yapıldığı not edilmiştir (Kamberoğlu ve ark., (2016)).

WMV' üne karşı dayanıklılıkla ilgili daha önce yapılan araştırmalar ve sonuçları dikkate alındığında karpuz bitkisinde dayanıklılık çalışmaları daha çok biyolojik, yani mekanik inokulasyon denemeleri şeklinde yapıldığı görölmektedir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar belirtilere bağılı değerdendirmeler olup karpuzda dayanıklılık genleri üzerine çalışmalar henüz sonuçlanmamış olup ölkemizde de hem bu virüsün belirlenmesi, karakterizasyonu ve benzeri çalışmalar ile hem de dayanıklılık konularında daha fazla çalışmaya rastlanmamıştır.



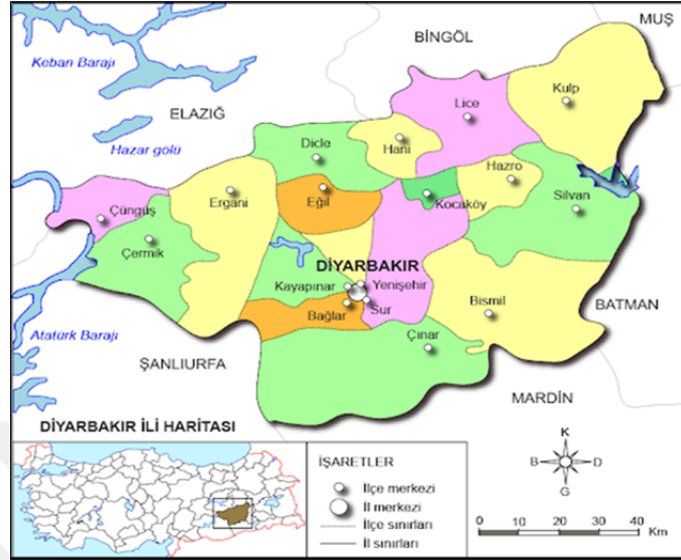
3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmanın Yürütüldüğü Yer ve Bitkisel Materyaller

Araştırma Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarı ile Ç.Ü. Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezinin laboratuvarlarında, iklimlendirme odalarında ve virüs araştırma seralarında yürütülmüştür.

Araştırmalar sırasında kullanılan bitkilerin kaynağını, Diyarbakır ili ve ilçelerinde (Şekil 3.1.) karpuz, kavun üretimi yapılan alanlarda virüs ve virüs benzeri belirtiler gösteren ve virüsle bulaşık olabileceğinden şüphelenilen bitkilerin belirti gösteren genç yaprakları oluşturmuştur. Bu amaçla Şekil 3.2. – 3.8.' de verilen değişik virüslerin belirtilerine benzer görüntüler sergileyen bitkilerden örnekler uygun şekilde alınmıştır. WMV' nün en önemli konukçuları arasında bulunan karpuz ve kavun daha çok bulunduğu için Diyarbakır ilinde survey alanlarından bitkisel materyal olarak Diyarbakır karpuzu, ticari karpuz, Diyarbakır beyaz kış kavunu ve ticari kavun bitkilerinden örnekler toplanmıştır. WMV' nün hastalık belirtilerine benzer belirtiler gösteren bitkilerden alınan 97 adet karpuz ve 55 adet kavun olmak üzere toplam 152 örnek toplanmış ve çalışmaların ana materyalini oluşturmuştur (Çizelge 3.1.). Toplanan örneklerin belirti gösteren genç yapraklarının önce fotoğrafları çekilmiş toplandıktan sonra numaralandırılıp etiketlenerek buz kutusu içerisinde laboratuara getirilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmanı yürütüldüğü Diyarbakir ili ve ilçeleri



Şekil 3.2. Surveyler sırasında referans alınan ve arazide aranan Watermelon Mosaic Virus' ünün neden olduğu mozaik, yaprak deformasyonu ve meyvede kabarıklık belirtileri



Şekil 3.3. Surveyler sırasında referans alınan ve arazide aranan Cucumber Mosaic Virus' ünün neden olduğu mozaik ve yaprak deformasyonu belirtileri



Şekil 3.4. Surveyler sırasında referans alınan ve arazide aranan Zucchini Yellow Mosaic Virus' ünün neden olduğu mozaik ve yaprak deformasyonu belirtileri



Şekil 3.5. Surveyler sırasında referans alınan ve arazide aranan Papaya Ring Spot Virus' ünün neden olduğu damar açılması ve meyvede halkalı leke belirtileri



Şekil 3.6. Surveyler sırasında referans alınan ve arazide aranan Melon Necrotic Spot Virus' ünün neden olduğu nekrotik lekeler



Şekil 3.7. Surveyler sırasında referans alınan ve arazide aranan Squash Mosaic Virus' ünün neden olduğu damar aralarındaki renk açılması, mozaik ve meyvelerde düzensiz renklenme belirtileri



Şekil 3.8. Surveyler sırasında referans alınan ve arazide aranan Cucurbit Aphid-Born Yellows Virus' ünün neden olduğu sararma, mozaik ve düzensiz klorotik lekeler

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan bitkisel materyallerin ilçelere göre dağılımı

SURVEY ALANI	ÜRÜN		TOPLAM
	KARPUZ	KAVUN	
Sur (Erimli / Sumaği)	20	6	26
Bismil (Darlı Mah., Gundik.)	25	10	35
Eğil (Kalkan)	10	10	20
Çınar (Kuruyazı, Ekinveren)	12	8	20
Silvan (Gürpınar)	8	4	12
Ergani	2	2	4
Yenişehir (Elidolu Mah.)	20	15	35
TOPLAM	97	55	152

3.1.2. Serolojik (DAS-ELISA) Çalışmalarda Kullanılan Materyaller

Survey alanlarından toplanan örneklerin tamamı mevcut virüsler ile ilgili bulaşıklık durumlarının ortaya koymak amacıyla öncelikle serolojik (DAS-ELISA) çalışmalarda materyal olarak kullanılmışlardır. Söz konusu örnekler DAS-ELISA ile Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarında BİOREBA firmasından satın alınan WMV, CMV, ZYMV, PRSV, MNSV, CABY ve SqMV virüslerinin antiserumları (kitleri) kullanılarak bu virüslere karşı testlenmiştir. Testlemeler sırasında kullanılan ELISA plateleri, örnek ekstraksiyon tamponu (Sample Extraction Buffer), kaplama tamponu (Coating buffer), konjugat tamponu (Enzyme Conjugate Buffer) Phosphate Buffered Saline tampon (PBS), yıkama tamponu (Washing Buffer) ve substrat tamponu (Substrat Buffer) için gerekli olan kimyasalların kaynakları ve tampon çözeltilerin hazırlanışı EK 1’ de verilmiştir.

3.1.3. Biyolojik Tanı Çalışmalarında (Mekanik inokulasyon) Kullanılan Materyaller

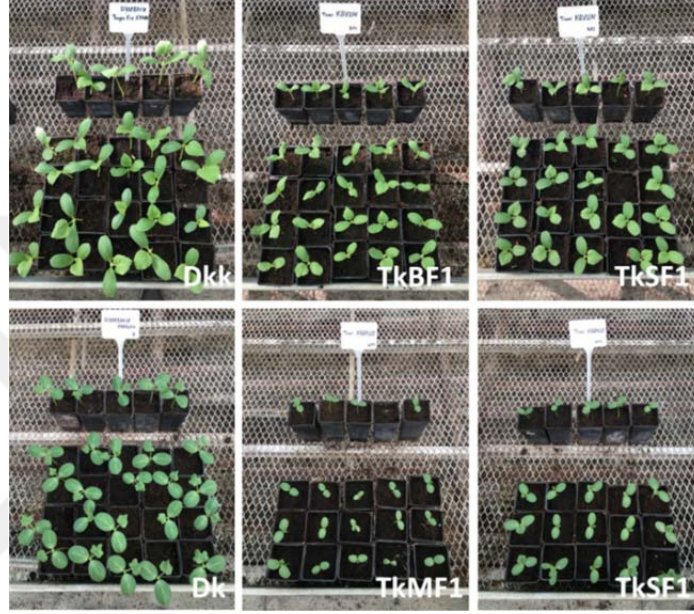
Survey alanlarından toplanan virus ve benzeri hastalıklardan şüphelenilen örneklerdeki belirtilerin WMV'ünden kaynaklanıp kaynaklanmadığını ortaya koymak, karpuz ve kavunda virüs belirtilerini görüntülemek ve Diyarbakır karpuz çeşidinin WMV'üne karşı biyolojik dayanıklılığı/duyarlılığını ortaya koymak amacıyla test bitkilerine (Şekil.3.9.) mekanik inokulasyon yapılmıştır. Biyolojik indekisleme çalışmalarında inokulum kaynağı olarak Diyarbakır ili ve ilçelerinde yapılan surveylerde toplanan örneklerin DAS-ELISA ile testleri sonucunda WMV ile bulaşık örnekler kullanılmıştır. Test bitkileri olarak Diyarbakır Beyaz Kış Kavunu, BF1 kodlu ticari kavun ve SF1 kodlu ticari kavun ve karpuz olarak ise Diyarbakır Karpuzu, MF1 kodlu ticari karpuz, SF1 kodlu ticari karpuz, çeşitleri kullanılmıştır (Çizelge 3.2.).

Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan karpuz ve kavun çeşitlerine ait bitkilerin yetiştirilmesinde kullanılan tohumlar Diyarbakır ilinde değişik amaçlar ile üretim yapan çiftçilerden, ticari karpuz ve kavunlar bazı tohum firmalarından temin edilmiştir. Tohumların ekilmesi ve yetiştirilmesinde kullanılan yetiştirme ortamları Çukurova Üniversitesi Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezinde hazırlanmıştır. Tohumların ekilmesinde 14-14-17 lik plastik saksılar kullanılmıştır (Şekil 3.9.). Ayrıca mekanik inokulasyon çalışmasında porselen havan ve havaneli, fosfat tamponu için gerekli olan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ve mercaptoethanol Viroloji laboratuvarından temin edilmiştir.

3.1.4. Moleküler Çalışmalarda (Total Nükleik Asit İzolasyonu, RT-PCR ve Agaroz jel) Kullanılan Materyaller

Survey alanlarından toplanan örneklerin DAS-ELISA ile testlenmesi sonucunda WMV için pozitif sonuç alınan ve bu örneklerin mekanik inokulasyon sonucunda belirti gözlenen ve yine DAS-ELISA ile testlenmesi sonucunda virüsle bulaşık olduğu ortaya konulan örnekler Total nükleik asit ekstraksiyonu

çalışmalarında materyal olarak kullanılmıştır. WMV ile bulaşık olan farklı izolatlara ait nükleik asitler RT-PCR çalışmaları için hedef nükleik asit materyallerinin kaynağını oluşturmuştur.



Şekil 3.9. Biyolojik tanı çalışmalarında kullanılan kavun ve karpuz bitkileri ve mekanik inokulasyon dönemi

Çizelge 3.2. Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan test bitkileri

Adı	Latince Adı	Çeşit	Beklenen Belirtiler
Karpuz	<i>Citrullus lanatus</i>	Diyarbakır karpuzu (Standart)	K, Yd, Bd, SM
Karpuz	<i>C. lanatus</i>	Ticari karpuz (MF1) Hibrid	K, Yd, Bd, SM
Karpuz	<i>C. lanatus</i>	Ticari karpuz (SF1) Hibrid	K, Yd, Bd, SM
Kavun	<i>Cucumis melo L.</i>	Diyarbakır Beyaz Kış kavunu	K, Yd, Bd, SM, KLL
Kavun	<i>C. melo L.</i>	Ticari kavun (BF1) Hibrid	K, Yd, Bd, SM, KLL
Kavun	<i>C. melo L.</i>	Ticari kavun (SF1) Hibrid	K, Yd, Bd, SM, KLL

K: Kloroz, Yd: Yaprak Deformasyonu, Bd: Bodurlaşma, SM: Sistemik Mozaik, KLL: Klorotik Lokal Lezyon, SB: Sistemik Bodurluk

RT-PCR çalışmaları 200 µl'lik PCR eppendorf tüpleri, izolatlara ait tNA'lerin çoğaltılması amacıyla komplementer DNA (cDNA)'e dönüştürülmesi için kullanılan "Reverse Transcriptase" enzimi (M-MLV, 200u/µl), "Reverse Transcriptase buffer" (M-MLV buffer 5X), RNase inhibitörü (40/µl), dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP (100mM)), RNA'nin hedef bölgesine spesifik tek iplikli oligonükleotid reverse primeri (Microsynth marka) (Çizelge 3.3.) ve ayrıca cDNA'nın çoğaltılması amacıyla gerekli yüksek ısıya dayanıklı (Termostabil) DNA polimeraz enzimi (Dream Taq polimeraz, 5u/µl), "Dream Taq Green PCR buffer" (10X), ve RNA'nin hedef bölgesine spesifik tek iplikli "oligonükleotid forward primer" (Microsynth marka) (Çizelge 3.3.) farklı firmalardan satın alınmıştır. RT-PCR çalışmalarında moleküler kimyasal olarak THERMO markası kullanılmıştır. RT-PCR çalışmalarında nükleik asitlerin çoğaltım işlemleri TECHN marka termocycle aleti kullanılarak viroloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Agaroz jel elektroforez çalışmalarında kontrol edilen material olarak WMV izolatlarına ait PCR ürünleri kullanılmış, diğer kimyasallar viroloji laboratuvarından ve 1 kb DNA marker firmalardan satın alınmıştır.

3.1.5. Filogentik Analiz Çalışmalarında Kullanılan Materyaller

Diyarbakır ili ve ilçelerinde kabakgil üretim alanlarında saptanmış olan Watermelon mosaic virus izolatlarının hem kendi aralarında hem de Dünyadaki saptanmış ve tanımlanması yapılmış olan izolatların DNA dizilerinin karşılaştırılması ile akrabalık ve evrimsel gelişim analizi yapılmıştır. Analiz çalışmalarında WMV-R825/WMV-F825 ve WMV-R917/WMV-F917 primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR ürünlerinden elde edilen diziler ve dünyadaki izolatların Gen Bankasındaki dizileri (FRANCE; JF273461.1, FRANCE; EU660586.1, IRAN; EU660584.1, TURKEY; EU660579.1, POLAND; MH992141.1, USA; JX028594.1, SPAIN; MN814388.1, SOUTH KOREA; MN854651.1, BELGIUM; KP980651.1, KOREA; MN854646.1, CHINA; KM527440.1, SYRIA; MK614761.1, CHINA; KM527480.1) kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. RT-PCR çalışmalarında WMV' üne spesifik primer çiftleri

Virüs	Primer	Primer sequence 5' - 3'	bp	Referans
WMV	WMV-R825	5'-ATTACAGTCCCTTGCAGTGTG - 3'	825	Shafiri ve ark., (2008)
	WMV-F825	5'-GAATCAGTGTCTCTGCAATCAGG - 3'		
WMV	WMV-R917	5'-CGACCCGAAATGCTAACT - 3'	917	Liu ve Xiang, (2008)
	WMV-F917	5'-GGTTGCTGYGARTCAGTGTC - 3'		

3.1.6. Virüsü Yaprak Bitleri İle Taşıma Çalışmalarında Kullanılan Materyaller

Taşıma denemelerinde yaprak biti olarak WMV' nin konukçusu olmayan Çukurova Üniversitesi Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezi koleksiyon bahçelerinde bulunan Turunç ağaçları üzerindeki yaprak bitleri (*Aphis gossypii*), inokulum kaynağı olarak mekanik inokulasyon ile virüs aktarılmış belirti gösteren Diyarbakır Beyaz Kış Kavununu (Şekil 3.10.), test bitkisi olarak Diyarbakır Beyaz Kış kavunu ve Diyarbakır Karpuz çeşidi (Şekil 3.11.) kullanılmıştır. Yaprak bitlerinin tanılanması Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümündeki Nedim UYGUN Biyolojik Mücadele Laboratuvarında Doç. Dr. Asime Filiz Çalışkan KEÇE tarafından preparat yapılarak gerçekleştirilmiştir. Yaprak bitlerinin hastalıklı bitkilerden sağlıklı test bitkilerine aktarılmasında alın lupu ve kıl fırça ile, ayrıca karınca popülasyonu kullanılmıştır.



Şekil 3.10. Yaprak biti ile virüs taşıma çalışmalarında inokulum kaynağı olarak kullanılan WMV ile bulaşık kavun bitkileri.



Şekil 3.11. Yaprak Biti ile WMV’ ünün taşıma çalışmalarında kullanılan Diyarbakır karpuzu ve Diyarbakır kış kavunu bitkileri

3.2. Yöntem

3.2.1. Simptomolojik Gözlemler ve Örneklem

Diyarbakır ili ve ilçelerinde karpuz ve kavun üretimi yapılan alanlarında Şekil 3.2 – 3.8.’ de verilen belirtilere benzer görüntüler sergileyen bitkilerin veya virüsle bulaşık olduğundan şüphelenilen bitkilerin aranması şeklinde surveyler yapılmıştır. Sonuç olarak diğer virüs belirtileri yanında WMV’ ünün tipik belirtileri de aranmış ve virüsle bulaşık olduğundan şüphelenilen bitkilerin belirti gösteren genç yapraklarından ve belirti göstermeyen bitkilerden örnekler toplanmıştır. Şekil 3.2.- 3.8.’ de verilen belirtilere benzer belirtiler gösteren bitkiler örnek olarak alınmıştır. Örnek alma sırasında plastik torbalar üzerine; örneğin alındığı yer, bitki çeşidi ve tarih yazılarak numaralandırılmış ve örnek toplama sırasında verilen numaralı bitkilerinde numaralı olarak fotoğrafları çekilmiştir. Daha sonra örnekler buz kutusu içerisinde soğuk ortamda laboratuvara getirilerek bir gün boyunca +4 °C de muhafaza edilmiş ve daha sonra çalışmalar başlatılmıştır. Laboratuvara getirilen örnekler 1 gr total Nükleik Asit (tNA) izolasyonu için, 1gr DAS-ELISA için ve geriye kalan ise mekanik inokulasyon için tartılıp etiketlenerek buzdolabına konmuştur. Toplanan ve laboratuvara getirilen örnekler WMV, CMV, ZYMV,

PRSV, MNSV, CABY ve SqMV'lerine karşı DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiştir.

3.2.2. Serolojik (DAS-ELISA) Çalışmaları

Toplanan karpuz ve kavun bitkilerinden alınan örneklerin tamamı öncelikle tarama yapmak amacıyla WMV, CMV, ZYMV, PRSV, MNSV, CABY ve SqMV virüslerine karşı DAS-ELISA ile testlenmiştir. Testleme Clarck ve Adams, (1977)'a ve ELISA kitinin temin edildiği firmanın (BİOREBA AG-Germany) önerilerine göre yürütülmüştür. DAS-ELISA testinde kullanılan tampon çözeltiler EK 1.'de verilmiştir. ELISA testi uygulamasında izlenen basamaklar sırasıyla;

- a- Kaplama tamponu ile kullanılan optimum konsantrasyona göre sulandırılmış γ -globulinden ELISA plate'nin her bir çukuruna 200 μ l konacak ve plate üzeri kapatılarak 37 °C de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- b- İnkübasyondan sonra yıkama tamponu ile tüm çukurlar üç kez yıkanmıştır. Yıkama tamponu üç dakika süreyle çukurlarda bekletildikten sonra ters çevrilerek plate boşaltılmış ve kağıt havlu üzerine vurarak kuruması sağlanmıştır.
- c- Alt alta gelecek şekilde her çift çukura 200'er μ l örnek tamponu ile hazırlanmış örnekler düzenlenmiş plana göre konmuş ve plate'in üzeri kapatılıp +4 °C de bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- d- İnkübasyondan sonra plateler yıkama tamponu ile tüm çukurlar üç kez yıkanmıştır. Yıkama tamponu üç dakika süreyle çukurlarda bekletilip plate ters çevrilerek boşaltılmış ve kağıt havlu üzerine vurarak kuruması sağlanmıştır.
- e- Konjugate tamponu ile optimum kullanılan konsantrasyona göre sulandırılmış konjugat'dan her bir çukura 200 μ l konulup plate 37 °C de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır.

- f- İnkübasyondan sonra yıkama tamponu ile tüm çukurlar üç kez yıkanmıştır. Yıkama tamponu üç dakika süreyle çukurlarda bekletildikten sonra plate ters çevrilerek boşaltılmış ve kağıt havlu üzerine vurarak kuruması sağlanmıştır.
- g- Substrat tamponundan taze olarak hazırlanmış substrattan (1mg/ml p-nitrophenyl phosphate) her bir çukura 200 µl konup ve 30-60 dk veya gerekli görüldüğünde daha uzun süre oda sıcaklığında karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır.
- h- Daha sonra ELISA plateleri 405 nm de ELISA-Reader (ELISA Okuyucusu) kontrol edilmiştir. Eğer hemne okuma imkanı olmaz veya plateleri saklamak gerekli görülürse 3 M NaOH ile reaksiyonun durdurulması sağlanmıştır

ELISA testi yapım aşamasında her plate de pozitif ve negatif kontroller kullanılmıştır. Negatif kontrolün bulunduğu çukurun absorbans değeri dikkate alınarak ortalama en az iki veya üç katı fazla değer veren çukurlardaki örnekler pozitif kabul edilmiştir.

3.2.3. Test Bitkilerinin Yetiştirilmesi ve Biyolojik Tanı Çalışmaları

DAS-ELISA testi sonucunda sadece WMV'ü ile bulaşık olarak saptanan örneklerin mekanik inokulasyon çalışmalarında inokulum olarak kullanılmıştır. Biyolojik indeksleme, hem Diyarbakır karpuz çeşidinin WMV' ne karşı simptomolojik olarak dayanıklı/duyarlılık durumunun ortaya konulması, hem de virüsün diğer ticari karpuz ve kavun çeşitlerindeki belirtilerinin saptanması ve survey alanlarından toplanan ve DAS-ELISA ile bulaşık olarak saptanan örneklerde WMV' nün varlığının biyolojik olarak ortaya konulması amacıyla yürütülmüştür. Test bitkilerinin yetiştirilmesi için kullanılan fide toprağı (1.1.1) oranında, elenmiş 0-30 torf, toprak ve bazaltik tüf (0-3) karıştırılarak 14-14-17 büyüklüğündeki saksılara doldurulmuş ve tohum ekimleri yapılmıştır. Tohumlar

her çeşitten 25'er adet olacak şekilde ekilmiştir. Bu saksılar, tohumlar çimlendirilinceye kadar 24-25 °C sıcaklık ve % 70-80 nem içeren özel sera bölmesinde muhafaza edilmiştir. Tohumlar yaklaşık olarak 15 gün sonra çimlenmiş olup periyodik olarak sulanmıştır. Bitkiler kotiledon yaprak döneminde veya ilk gerçek yaprağın belirmesini müteakip aynı sıcaklık ve nem koşullarında yaklaşık 10.000. lux Daylight ışık koşullarında 16/8 (aydınlık/karanlık) periyodunda tutulmuştur. Kotiledon yapraklarının çıkmasıyla birlikte gerekli gübreleme işlemleri yapılmıştır (15-15-15 (Azot-Fosfor-Potasyum)). Kotiledon yaprakların çıkmasının ardından birinci yaprağın çıkmasıyla birlikte bu fidelere (Tablo 3.12.) virüs taşınmıştır. Ayrıca ileri ki dönemlerde diğer yaprakların çıkmasıyla birlikte külemeye karşı %50 Trifloxystrobin etken maddeli fungusit ile gerekli durumlarda ilaçlama yapılmıştır.

İnfekteli bitkilerin yaprakları % 0.1'lik 2-mercaptoethanol içeren 0.02 M Fosfat tampon (pH: 7.0) (EK 2.) çözeltisi karışımı ile 1:5 (w/v) oranında porselen havanda ezilmiştir. Elde edilen ekstrakt 2 katlı tülbent ile süzülükten sonra önceden karborandum tozu serpilerek hazırlanan test bitkilerinin yapraklarına parmak ucu ile fazla aşındırmadan dikkatlice taşınmıştır. İnokulasyondan sonra karborandum tozu ve bitki özsuyu artıklarını uzaklaştırmak için bitkiler çeşme suyu ile yıkanmıştır (Şekil 3.12.).



Şekil 3.12. Mekanik inokulasyon aşamaları. a; Karborandum uygulaması, b; mekanik inokulasyon, c; bitkilerin su ile yıkanması.

Aşılama yapılan bitkiler 22-24 °C de kontrollü klima odası koşullarında bir gün karanlıkta tutulduktan sonra seraya aktarılmış ve bitkilerde belirti oluşumu periyodik olarak gözlenmiş, gerekli kayıtlar not edilmiştir.

3.2.4. Total Nükleik Asit (tNA) Ekstraksiyonu Çalışmaları

Hem DAS-ELISA testlemeleri sonucunda WMV ile bulaşık bulunan hem de mekanik inokulasyon ile aşılamanın test bitkilerinin belirti oluşturan yapraklarından total NA ekstraksiyonu yapılmıştır. TNA izolasyonu Astruc ve ark., (1996)'nın önerdiği yöntemle göre yapılmıştır. TNA çalışmalarında kullanılan kimyasallar EK 3. de verilmiş olup işlemler aşamalar halinde aşağıda özetlenmiştir.

- a- Örnekler ekstraksiyon bufferi (100mM Tris-HCl pH.8.0, 50mM EDTA pH. 7.0, 500 NaCl, 10 mM 2. mercapto-ethanol 1/1000) ile 1:2 (w/v) oranında sulandırılarak porselen havan içerisinde havaneli yardımı ile ezilen bitki özsu steril tülbentten süzümüştür. Bitki öz suyundan 1 ml alınarak eppendorf tüpleri içerisine yerleştirilmiştir.
- b- Örnekler 3 dakika 4.000 rpm de santrifüj edilmiştir.
- c- Pelete 50 µl Sodium Dodecylsulfat (SDS, %20) ilave edilerek vorteks te karıştırılmış ve tüpler 65 °C de 30 dakika su banyosunda bekletilmiştir.
- d- Tüplere 250 µl potasium asetat (5M) ilave edilerek 20 dakika buz içerisinde bekletilmiştir.
- e- Tüpler 15 dakika 13.000 rpm de santrifüj edilmiştir.
- f- Süpernatant ikiye bölünerek ve 500 µl si yeni hazırlanmış eppendorf tüplerine konarak -70 °C te saklanmıştır. Geriye kalan 500 µl süpernatant yeni hazırlanan eppendorf tüplerine konulup üzerine % 100'lük Ethanolden 500 µl ilave edilerek 1,0 ml ye tamamlanmıştır. Daha sonra tüpler vortekste karıştırılmıştır.

- g- Sonra tüplere 50µl sodium asetat (3M) ilave edilmiş ve örnekler tekrar karıştırılarak -70 °C de bir gece bekletilmiştir.
- h- Örnekler 15 dakika 14.000 rpm de santrifüj edilerek süpernatant ortamdan uzaklaştırılmış ve eppendorf tüpleri ters çevrilerek filtre kağıdı üzerinde 5 dakika kurutulup daha sonra pellet üzerine 1ml ethanol (% 70) ilave edilmiştir.
- i- Örnekler RNA ların çökmesi için 5 dakika 13.000 rpm de santrifüj edilerek tüp içerisindeki ethanol atılarak eppendorf tüpleri kurutma kağıtları ile dikkatlice kurutulmuştur.
- k- Elde edilen total RNA lar 50 µl RNase free distile su ile sulandırılmıştır. Örnekler 15µl ve 35 µl olmak üzere ikiye bölünerek eppendorf tüpleri içerisinde -20 °C de muhafaza edilmiştir.

3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Çalışmaları

İn vitroda spesifik bir DNA parçasının kopyalarının kısa zincirli oligonükleotid primerler yardımı ile yönlendirilerek enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanabilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)'ın temeli hedef DNA'nın (saptanması istenen genetik materyalin) spesifik deoksiribonükleotid primerleri ve ısıya dayanıklı DNA polimerase (Taq veya Tht) enzimi yardımıyla *in vitro* koşullarında çoğaltılması ve tanınması şeklinde özetlenmektedir (Mullis K.B., Faloona F.A., 1987).

Çalışma sırasında WMV RNA'larının kılıf protein geni üzerinde 825 bp ve 917 bp molekül ağırlığına sahip farklı bölgelerini çoğaltmak için PCR çalışması yapılırken ilk işlem reverse transcriptase enzimi kullanılarak viral RNA dan komplementer DNA (cDNA) elde etmek olmuştur. Daha sonra *in vitro* koşullarda tek iplikli viral cDNA kopyalarına ikinci bir cDNA sentezletilerek çoğaltım yapılmıştır. PCR uygulamalarında her bir döngü (yukarıda verilen üç aşamanın tamamı) yeterli sayıda DNA miktarına ulaşabilmesi için 30-35 kez tekrarlanmıştır

(Shafiri ve ark., 2008 ; Liu ve Xiang, 2008). RT-PCR çalışmaları, daha önce WMV-R825/WMV-F825 ve WMV-R917/WMV-F917 primer çiftleri kullanarak WMV' ünün karakterizasyonunu gerçekleştirmiş olan Shafiri ve ark., (2008) ve Liu ve Xiang, (2008)' ye göre yürütülmüştür.

Öncelikle komplementer DNA (cDNA) sentezlemek için RT aşaması gerçekleştirilmiştir. 1 µl total NA (200 ng/µl), 1 µl Reverse (R) ve 13 µl H₂O ile karıştırılıp 95 °C de 3 dakika inkube edip sonrada 5 dakika buzda bekletilmiştir. Daha sonra bu karışım üzerine 10 µl RT karışımından (5 µl M-MLV RT buffer, 1 µl dNTPs (10 mM), 0,5 µl MMLV (200 unit), 0,5 µl RNasin ve 3 µl H₂O) eklenmiş ve örnekler termocycle da 42°C 1 saat bekletilerek cDNA lar elde edilmiştir.

Daha sonra PCR çalışması için 1 µl cDNA, 5 µl Dream Taq Green Buffer (10X), 1 µl dNTP karışımı (10 mM), 1 µl WMV-F (10 pmol/µl,) primer, 1 µl WMV-R (10 pmol/µl,) primer, 0,25 µl Dream Taq polimeraz enzimi (5u/µl) ve 40,75 µl ddH₂O ile 50 µl' lik son hacim oluşturulmuştur.

PCR tüpleri, kullanılan primer çiftlerinin denaturasyon sıcaklığı (Thermal melting, T_m) değerleri ve primer çiftlerinin kullanılması ile beklenen PCR ürünlerinin molekül ağırlıklarına göre programlanmış olan termocycle aletine yerleştirilmiştir. Örnekler uygulanan termocycle programında 35 döngü içerisinde bulunan bağlanma sıcaklığı, primerlerin T_m değeri dikkate alınarak ve T_m değerinden 3°C eksilterek uygulanmıştır. Programın uygulanmasında aynı primerleri ilk defa kullanan araştırmacılar referans alınmıştır. Uygulanan termocycle programı;

95 °C de 3 dakika1 döngü

bağlı

95 °C de 1 dakika	} 35 döngü
57 °C (825F/R), 50 °C (917F/R) de 1 dakika	
72 °C de 1 dakika	

bağlı

72 °C de 10 dakika 1 döngü

Çalışma sonucunda çoğaltılan PCR ürünleri 1X lik TAE (pH 8.3) de hazırlanmış %1' lik agarose jelde aşağıda özetlendiği şekilde uygulanarak kontrol edilmiştir.

3.2.6. Agarose Gel Elektroforez Çalışmaları

Agarose jel elektroforez çalışmalarında PCR çalışması sonucunda viral RNA'dan sentezlenip çoğaltılarak DNA'lar kontrol edilmiştir. Agarose Jel Elektroforez çalışması Galitelli ve Minafra, (1994) 'ya göre yapılmıştır. İşlemler sırasıyla:

- a- Agarose 300 mg olacak şekilde 30 ml 1x TAE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acide, 2 mM EDTA) içerisine konulmuştur.
- b- Bu agarose-TAE buffer karışımı kaynayınca ve agarose eriyinceye kadar mikrodalgalı bir fırın içerisinde ısıtıldıktan sonra volum 30 ml'ye ayarlanmıştır.
- c- Karışım tekrar 60 °C ye kadar soğumaya bırakılarak ve tarak geçirilmiş olan tank içerisine boşaltılmıştır.
- d- Jel donduktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çekilip jel'in üzerini 1-2mm kadar kaplayınca kadar tank içerisine TAE buffer ilave edilmiştir.
- e- 10 µl örnek jel deki çukurlara dikkatli bir şekilde yerleştirilmiştir. İlk çukura 10µl 1 kb marker konulmuştur. Loading buffer daki turuncu renk

(orange G) jel' in sonuna gelene kadar jel tankına elektrik akımı verilmiştir.

- f- Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel, oda sıcaklığında 10 dakika 100 ml H₂O + 30 µl ethidium bromide (10 mg/ml distilte su) karışımı içerisinde boyanmıştır. Jeldeki fazla ethidium bromide uzaklaştırıncaya kadar 5 dakika distile su içerisinde tutulmuştur. Sonuçlar transilluminatör de kontrol edilmiştir.

3.2.7. DNA Dizileme ve Filogenetik Analiz Çalışmaları

WMV' ünün farklı izolatlarının kılıf protein geni üzerinde 825 bp moleküler ağırlığına sahip bölgeyi çoğaltan WMV-R825/WMV-F825 ve 917 bp moleküler ağırlığına sahip bölgeyi çoğaltan WMV-R917/WMV-F917 primer çiftleri kullanılarak RT-PCR çalışmaları yürütülmüştür. Agaroz jelde görüntülenen ve farklı izolatlara ait 825 bp ve 917 bp PCR ürünleri DNA dizileme için REFGEN Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji şirketine gönderilmiştir. DNA dizileme çift taraflı olarak (Forward ve Reverse) yapılmıştır.

Elde edilen Forward ve Reverse dizilimleri MEGA7 (Moleküler Evrim Genetik Analiz) programı kullanılarak birleştirilmiş ve gen dizilimleri ortaya çıkartılmıştır. Saptanan Diyarbakır WMV izolatları, dünyada farklı ülkelerde saptanmış ve gen bankasında kayıtlı olan izolatlar arasındaki evrimsel filogenetik analiz en fazla benzerlik olasılığının ortaya çıkarılması şeklinde bir metod Tamura ve Nei (1993)' nin kullandıkları model ile yapılmıştır. İlgili grupların bir arada kümelendiği ağaçların yüzdesi dalların yanında gösterilmiştir. Gruplar arasındaki tahmini mesafe ve benzerlik için Neighbor-Join and BioNJ algoritma kullanılmıştır (Tamura ve Nei, 1993). Filogenetik analizde 3 adet Diyarbakır izolatı (TR-Db-yenişehir, TR-Db-Sur1, TR- Db-Sur2) ve TURK91 izolatının dahil olduğu 13 adet dünyadaki farklı ülkelerde tanımlanmış izolat olmak üzere toplam 16 WMV izolat kullanılmıştır. Evrimsel filogenetik analiz MEGA X (Kumar ve ark., 2018) programı üzerinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.8. Virüsü Yaprak Biti İle Taşıma Çalışmaları

Arazi surveyleri sırasında Diyarbakır “Beyaz Kış Kavunu” ile “Diyarbakır Karpuz” çeşidinin bir arada bulunduğu üretim alanlarında virüs belirtileri sadece Diyarbakır Beyaz Kış Kavunu çeşidinde görülmüş olup Diyarbakır Karpuzu çeşidinde ise herhangi bir virüs belirtisi gözlenememiştir. Ayrıca Diyarbakır Beyaz Kış kavununda yaprak bitleride gözlenmiştir. Bu gözlemler sonucunda virüsün yaprak biti ile taşınmadığı ya da yaprak bitinin sadece Diyarbakır Beyaz Kış Kavununu tercih ettiği şüphesi doğmuştur. Bu belirsizliğin açıklığa kavuşturulması ve virüsün yaprak biti ile taşınıp taşınmayan ırkı olduğunun ortaya çıkartılması için taşıma denemesi yapılmıştır.

Diyarbakır ili ve ilçelerinde üretim alanlarında saptanan WMV’nin yaprak biti ile taşınan/taşınmayan ırkı olduğunun ortaya çıkartılması amacıyla yapılan taşıma denemelerinde yaprak biti olarak *Aphis gossypii*, inokulum kaynağı olarak mekanik inokulasyon ile WMV’ü TR-Db-Surl izolatu aktarılmış, belirti gösteren Diyarbakır Beyaz Kış Kavunu, test bitkisi olarak ta Diyarbakır Beyaz kış kavunu ve Diyarbakır karpuz çeşitleri kullanılmıştır.

Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezi bünyesinden bulunan turunçgil bahçelerinden toplanan yaprak bitleri öncelikle virüsle bulaşık olmayan kavun bitkileri üzerine bırakılmış ve beslenerek çoğaltılmıştır. Çoğaltılan yaprak bitlerinin virüsten ari olduğu RT-PCR yöntemi ile WMV’ye karşı testlenmiş ve negatif sonuç alındıktan sonra aynı kavun bitkilerinden toplanan yaprak bitleri yine virüsle bulaşık kavun bitkileri üzerine bırakılmıştır. Yaprak bitleri bulaşık kavun bitkileri üzerinde bir hafta beslendikten ve yeni bireyler oluştuğundan sonra bu bitkiler arasına temiz Diyarbakır kış kavunu ve Diyarbakır karpuz fideleri yerleştirilmiştir (Şekil 3.13.). Karınca ve yaprak biti simbiyotik yaşam döngüsü dikkate alınarak ortama bırakılan karıncalar aracılığı ile ve doğal şekilde yaprak bitleri temiz bitkilere aktarılmıştır. Virüsün bu şekilde sağlıklı bitkilere aktarılmasında karıncalar ile yaprak bittleri arasındaki simbiyotik yaşam ilişkisi dikkate alınmıştır (Rathcke ve ark.,1967). Karıncaların yaprak bitlerini bulaşık

bitkilerden sağlıklı bitkilere aktardığı gözlenmiştir. Yaprak bitlerinin aktarılmasından 2 gün sonra temiz bitkiler ortamdaki uzaklaştırılmış ve insektisit (Acetamypriid veya Chlorpyrifos-methyl etken maddeli) ile ilaçlanarak yaprak bitleri öldürülmüştür. Daha sonra bitkiler üzerinde 15 gün süre ile belirti gelişimi gözlenmiştir.

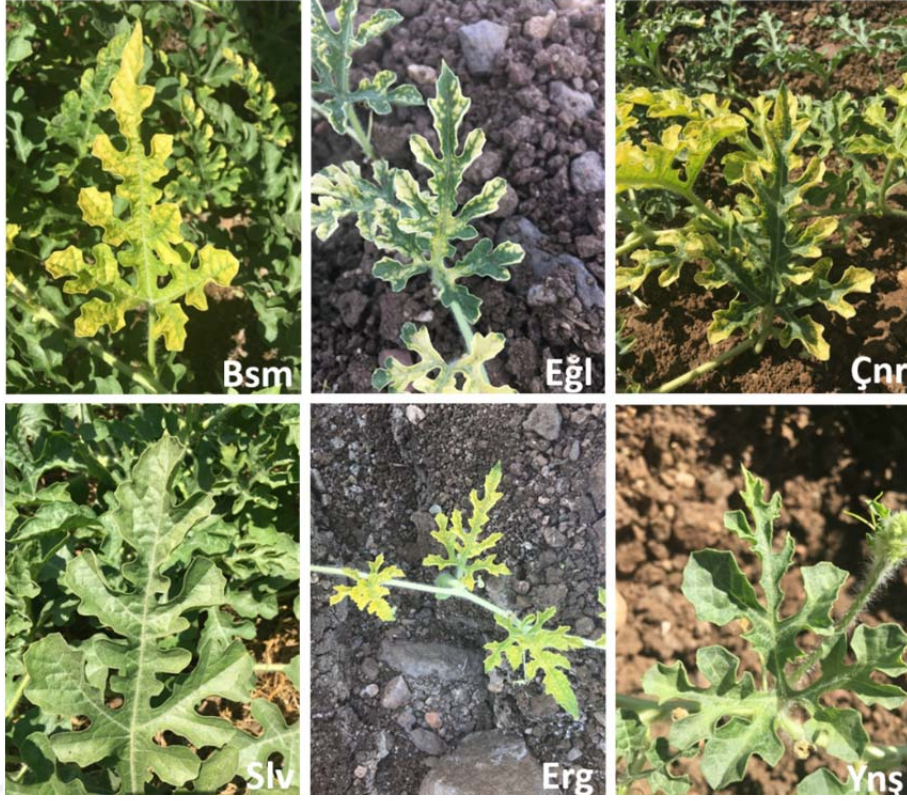


Şekil 3.13. Yaprak Biti ile virüs taşıma çalışmaları

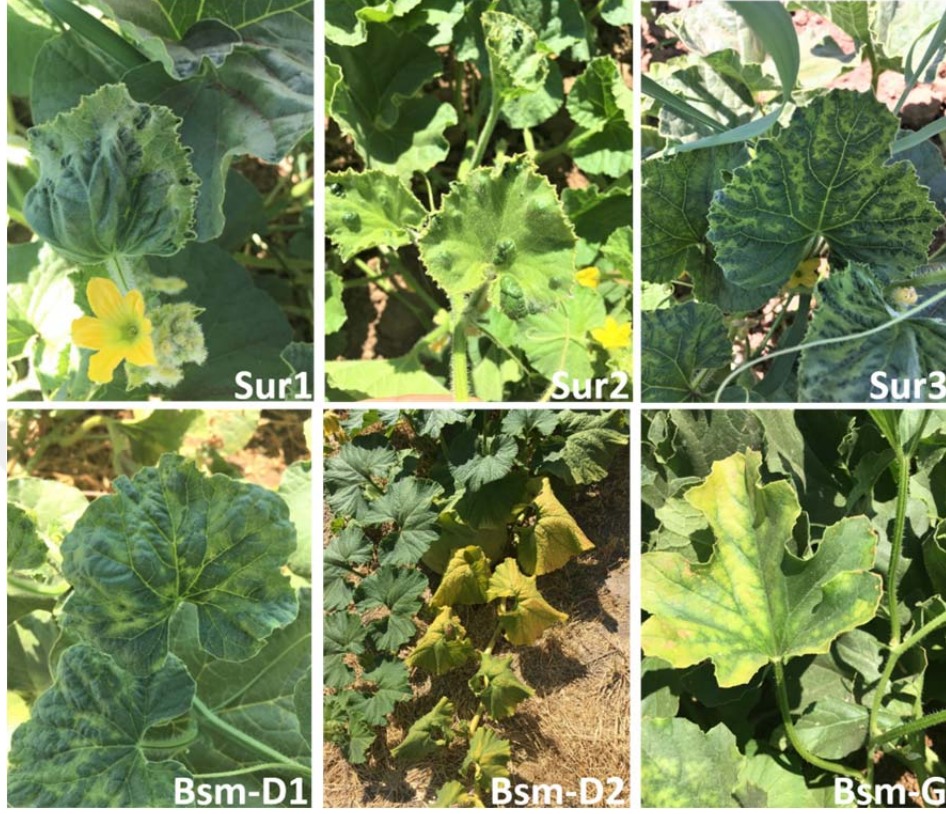
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Simptomolojik Gözlemler

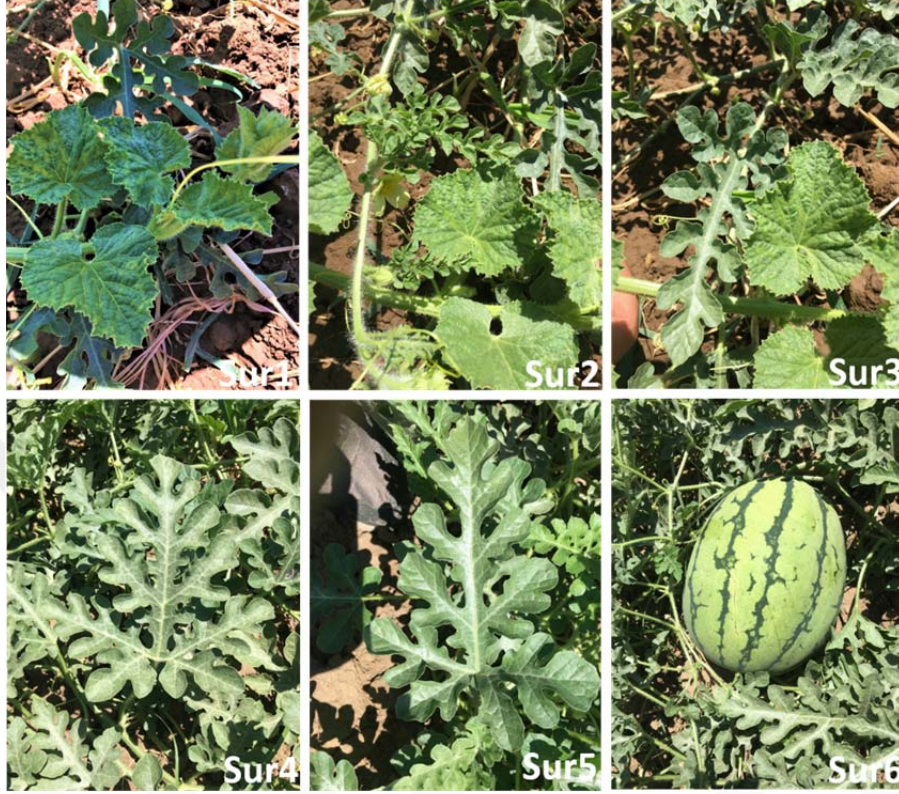
Çalışmanın yürütüldüğü Diyarbakır ili ve civarında kavun karpuz tarlalarının yoğun olduğu Sur (Erimli / Sumağı), Bismil (Darlı Mah., Gundik.), Eğil (Kalkan), Çınar (Kuruyazı, Ekinveren), Silvan (Gürpınar), Ergani ve Yenişehir (Elidolu Mah.) de yapılan survey çalışmalarında karpuz bitkilerinde mozaik, yaprak deformasyonları, kloroz ve bodurlaşma (Şekil 4.1.), kavun bitkilerinde mozaik, yaprak deformasyonları ve bodurlaşma gibi belirtiler görülmüştür (Şekil 4.2.). Sur (Erimli / Sumağı) da Diyarbakır Karpuzu ve Beyaz Kış Kavunu bitkilerinin her ikisinde bir arada bulunduğu tarlalarda virüs belirtileri sadece Beyaz kış Kavunlarında görülmüş olup Diyarbakır Karpuzunda hiçbir belirti gözlenememiştir (Şekil 4.3.). Bu nedenle survey alanlarındaki bu simptomolojik saptama, Diyarbakır karpuzunun WMV' üne ya da kabakgillerdeki virüslere karşı dayanıklı olabileceği düşüncesini doğurmuş ve araştırmalar bu doğrultuda yürütülmüştür. Bu durum, aynı tarladaki kavun ve karpuz bitkilerinin vegetasyon dönemi ve virüsü taşıyan yaprak bitinin beslenme alışkanlığı ya da tercihi ile alakalı olma olasılığını doğurmuş ve sözkonusu durumun açıklığa kavuşturulması gereği ortaya çıkmıştır.



Şekil.4.1. Surveyler sırasında Diyarbakır ili karpuz bitkilerinde Bsm; Bismil (Darlı Mah., Gundik.), Eğl; Eğil (Kalkan), Çnr; Çınar (Kuruyazı, Ekinveren), Slv; Silvan (Gürpınar), Erg; Ergani, Ynş; Yenişehir (Elidolu Mah.) de yapılan surveylerde karpuz bitkileride gözlenen sararma, beyazlaşma, mozaik ve renk açılması belirtileri.



şekil.4.2. Surveyler sırasında Diyarbakır ili Sur1-2-3; Sur (Erimli / Sumaği), BsmD1-D2; Bismil (Darlı) ve Bsm-G; Bismil (Gundik) de yapılan surveylerde kavun bitkileride gözlenen mozaik, yaprak deformasyonu, klorotik lokal lezyon belirtileri



Şekil.4.3. Surveyler sırasında Diyarbakır ili Sur1-2-3; Sur (Erimli / Sumağı) da Diyarbakır karpuzu ve Beyaz kış kavunu bitkilerinin her ikisinde bir arada bulunduğu tarlalarda mozaik ve yaprak deformasyonu belirtileri ve Sur4-5-6; Sur (Erimli / Sumağı) da aynı tarlada Diyarbakır karpuzu

4.2. Serolojik (DAS-ELISA) Sonuçları

Araştırma kapsamında yapılan surveylerde simptom gözelenen bitkilerden alınan 97 adet karpuz ve 55 adet kavun olmak üzere toplam 152 (Çizelge 3.1.) örneklerin WMV, CMV, ZYMV, PRSV, MNSV, CABY ve SqMV virüslerine karşı DAS-ELISA ile testlenmiştir. Testlemeler sonucunda hiç bir örnekte ZYMV, PRSV, MNSV, CABY ve SqMV' leri saptanmamıştır. Ancak Yenişehir (Elidolu Mah.) Dicle nehri kenarından alınan 5 (TR-Db-Ynş kodlu) (Şekil 4.1.), Sur (Erimli / Sumağı) Çay Önü/Dicle Nehri kenarından alınan 7 (TR-Db-Sur1) ve 8 (Tr-Db-

Sur2 kodlu) (Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.) numaralı örneklerde WMV' ü saptanırken Bismil (Darlı ve Gundik.) Ambar Yolu/Kurçay mevkiinden alınan Bsm-D1 ve Bsm-G kodlu (Şekil 4.2.) örneklerde CMV saptanmıştır. Araştırma kapsamında yapılan surveyler sırasında örnek toplama güdümlü örneklemeye göre yapıldığı için yani simptom odaklı örnek toplandığı için toplanan örneklerdeki bulaşıklık oranı düşük olmuştur. Tesadüfi örnekleme yapılsaydı toplanan örneklerdeki bulaşıklık oranı mevcut sonuçlardan daha fazla olabilirdi.

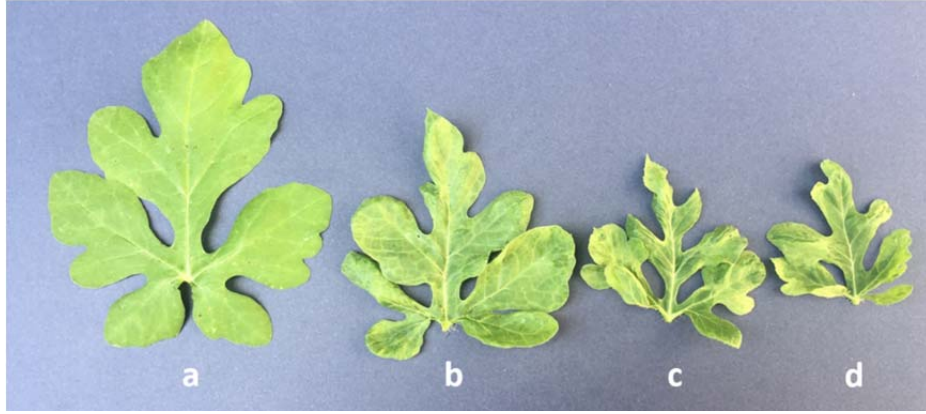
4.3. Biyolojik İndeksleme Sonuçları

Araştırmanın yürütüldüğü Diyarbakır ili ve ilçelerindeki surveylerde virüs belirtileri gözlenen bitkilerin DAS-ELISA ile testlenmesi sonucunda WMV ile bulaşık olduğu saptanan örneklerin mekanik inokulasyon yöntemi ile Diyarbakır Karpuzu (Standart), Ticari karpuz (MF1) Hibrid ve Ticari karpuz (SF1) Hibrid, Diyarbakır Beyaz Kış Kavunu (Standart), Ticari kavun (BF1) Hibrid, Ticari kavun (SF1) Hibrid, çeşitlerine inokule edilmiştir. Karpuzlarda kloroz, yaprak deformasyonu, bodurlaşma, sistemik mozaik belirtileri (Şekil.4.4., Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.), kavunlarda kloroz, yaprak deformasyonu, bodurlaşma, sistemik mozaik, klorotik lokal lezyon belirtileri (Şekil.4.7., Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.) görülmüştür (Çizelge 4.1.). Biyolojik indeksleme sonuçları Inouye, (1964)' ün bildirdiği gibi WMV' ünün karpuz, kavun, kabak, balkabağı ve hıyarda kloroz, yaprak deformasyonları ve bodurlaşma belirtilerine neden olur raporuyla paralellikgöstermekte ve aynı sonuçlar ortaya konulmuştur.

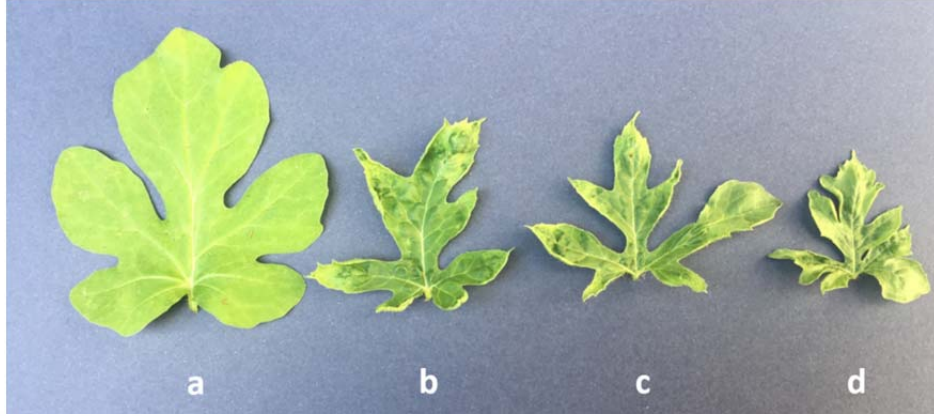
Çizelge 4.1. Çalışmada Kullanılan Bitkilerde Görülen Simptomlar

	K	Yd	Bd	SM	KLL
Diyarbakır Karpuzu	+	+	+	+	+
Ticari Karpuz (MF1)	+	+	+	+	+
Ticari Karpuz (SF1)	+	+	+	+	+
Diyarbakır Beyaz Kış Kavunu	+	+	+	+	+
Ticari Kavun (BF1)	+	+	+	+	+
Ticari Kavun (SF1)	+	+	+	+	+

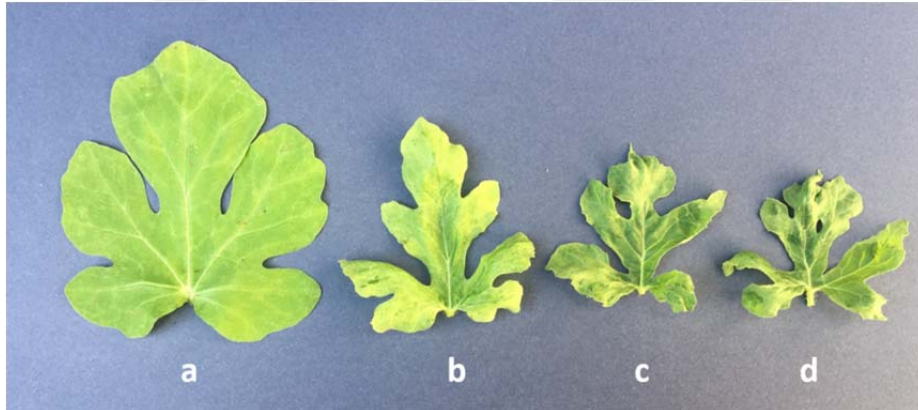
K: Kloroz, Yd: Yaprak Deformasyonu, Bd: Bodurlaşma, SM: Sistemik Mozaik, KLL: Klorotik Lokal Lezyon, SB: Sistemik Bodurluk



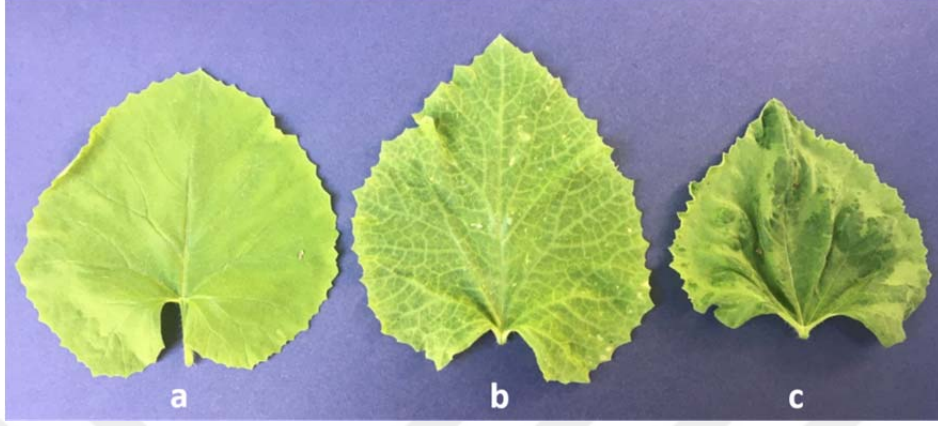
Şekil.4.4. WMV- TR-Db-Surl1 izolatu ile yapılan mekanik inokulasyon sonucu Diyarbakır Karpuzu çeşidinde mozaik ve yaprak deformasyonu belirtileri. a; sağlıklı kontrol, b; erken dönemdeki mozaik belirtileri, c-d; geç dönemdeki yaprak deformasyonu belirtileri.



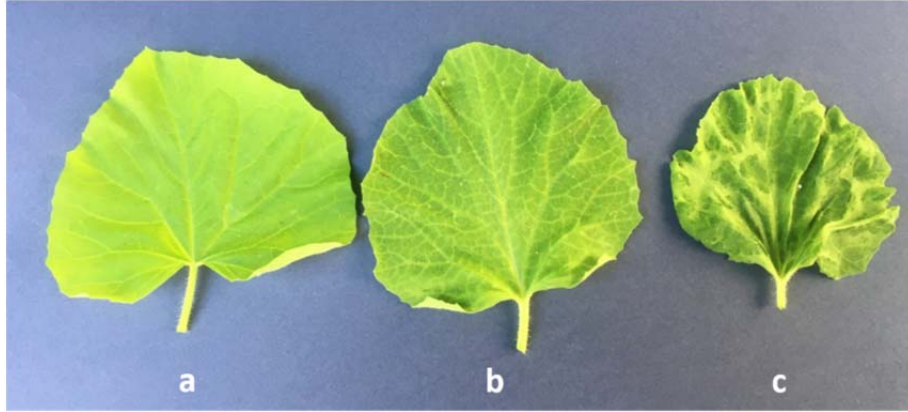
Şekil.4.5. WMV- TR-Db-Sur1 izolatu ile yapılan mekanik inokulasyon sonucu Ticari karpuz (MF1) çeşidinde mozaik ve yaprak deformasyonu belirtileri. a; sağlıklı kontrol, b; erken dönemdeki mozaik belirtisi, c-d; geç dönemdeki yaprak deformasyonu belirtisi.



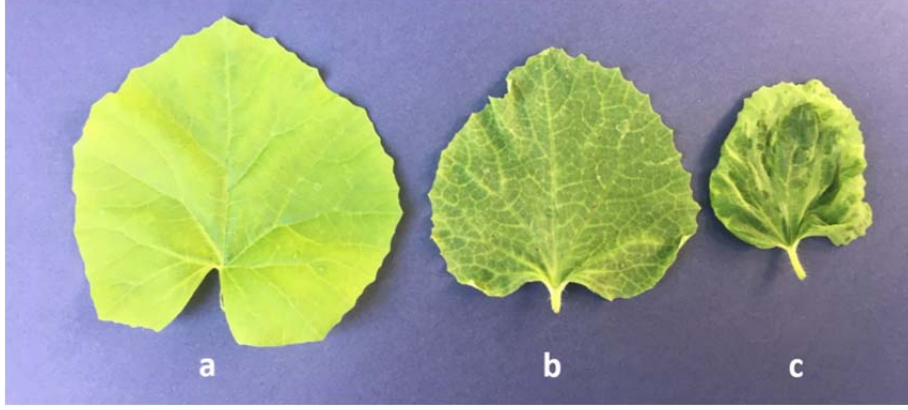
Şekil.4.6. WMV- TR-Db-Sur1 izolatu ile yapılan mekanik inokulasyon sonucu Ticari karpuz (SF1) çeşidinde mozaik ve yaprak deformasyonu belirtileri. a; sağlıklı kontrol, b; erken dönemdeki mozaik belirtisi, c-d; geç dönemdeki yaprak deformasyonu belirtisi



Şekil.4.7. WMV- TR-Db-Sur1 izolatu ile yapılan mekanik inokulasyon sonucu Diyarbakır Kış Kavunu çeşidinde damar açılması, mozaik ve yaprak deformasyonu belirtileri. a; sağlıklı kontrol, b; erken dönemdeki damar açılması belirtisi, c; geç dönemdeki yaprak deformasyonu belirtileri



Şekil.4.8. WMV- TR-Db-Sur1 izolatu ile yapılan mekanik inokulasyon sonucu Ticari kavun (BF1) çeşidinde damar açılması, mozaik ve yaprak deformasyonu belirtileri. a; sağlıklı kontrol, b; erken dönemdeki damar açılması belirtisi, c; geç dönemdeki yaprak deformasyonu belirtileri



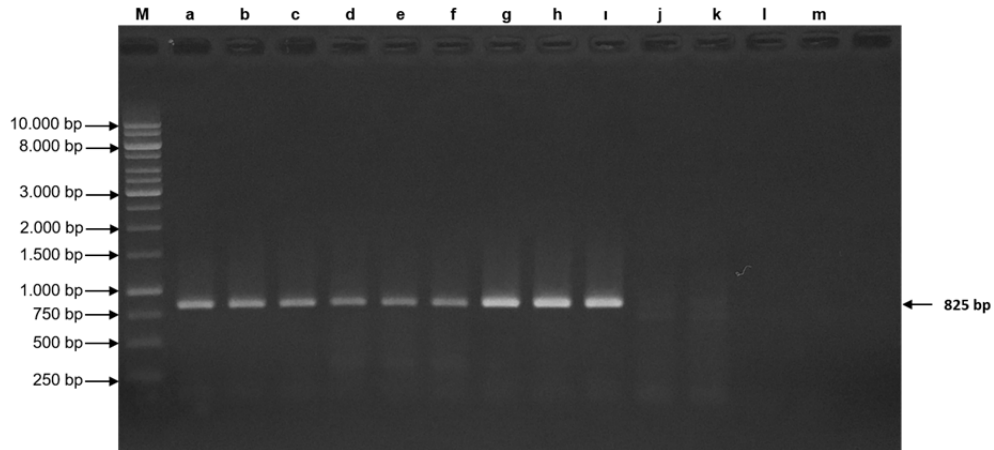
Şekil.4.9. WMV- TR-Db-Sur1 izolatu ile yapılan mekanik inokulasyon sonucu Ticari kavun (SF1) çeşidinde damar açılması, mozaik ve yaprak deformasyonu belirtileri. a; sağlıklı kontrol, b; erken dönemdeki damar açılması belirtisi, c; geç dönemdeki yaprak deformasyonu belirtileri.

4.4. Moleküler Çalışma Sonuçları

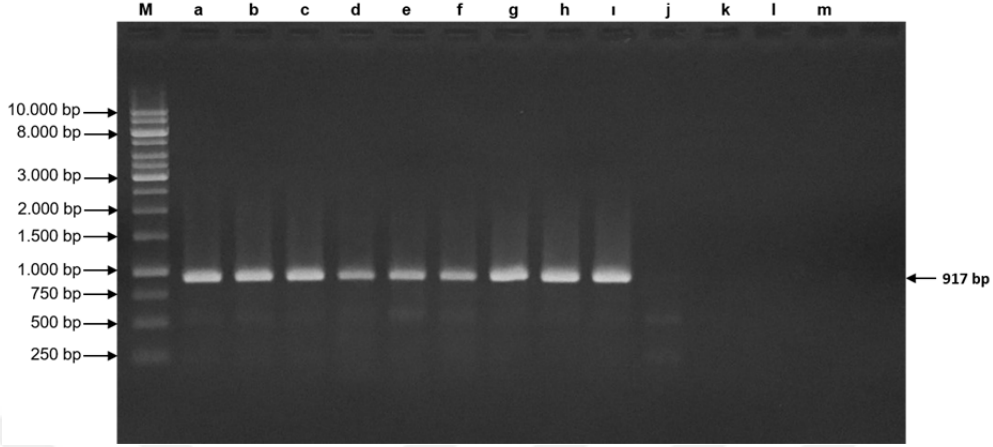
WMV' nün TR-Db-Ynş, TR-Db-Sur1, TR-Db-Sur2 kodlu izolatların WMV-R825/WMV-F825 ve WMV-R917/WMV-F917 primer çiftleri ile yapılan RT-PCR çalışması sonucunda WMV-R825/WMV-F825 primer çiftinin kullanılması ile beklenen 825 bp, WMV-R917/WMV-F917 primer çiftinin kullanılması ile beklenen 917 bp molekül ağırlığına sahip DNA bant profilleri agaroz jelde kontrol edilmiştir. WMV'üne spesifik primer çiftlerinden her ikisinin RT-PCR ürünleri kontrol edildiğinde R825/F825 primer çiftinden beklendiği gibi TR-Db-Ynş, TR-Db-Sur1, TR-Db-Sur2 kodlu izolatlara ait üçer tane olmak üzere toplam 9 örnekten 825 bp molekül ağırlığına sahip bantlar elde edilmiştir (Şekil.4.10.). Aynı kodlu izolatların RT-PCR ile testlenmesi ile R917/F917 primer çiftinden beklenen 917 bp molekül ağırlığına sahip bantlar görüntülenmiştir (Şekil.4.11.). Bu testlemeler sonucunda DAS-ELISA ile WMV' ne pozitif reaksiyon veren örneklerde virüsün varlığı RT-PCR ile doğrulanmıştır.

WMV ile bulaşık olduğu DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile saptanan örnekler mekanik inokulasyon yöntemi ile Diyarbakır Karpuzu (Standart), Ticari

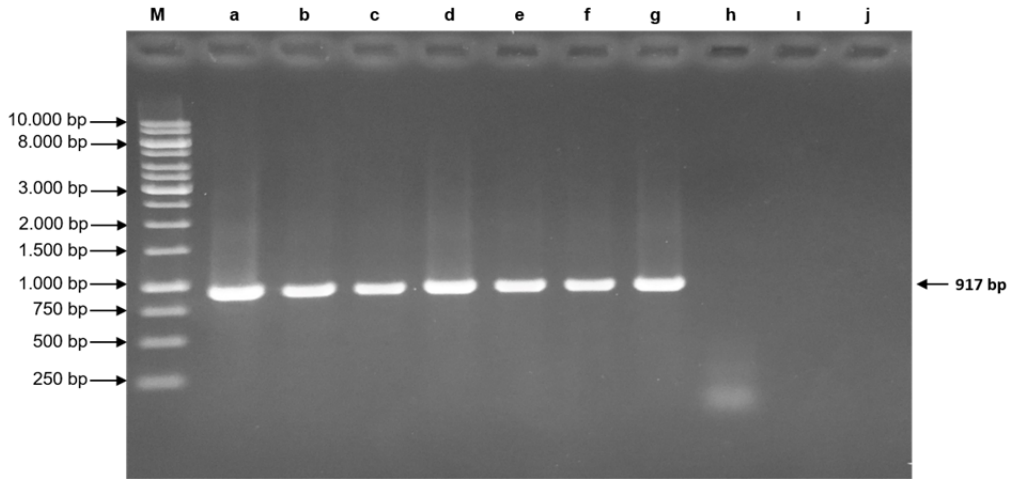
karpuz (MF1) Hibrid ve Ticari karpuz (SF1) Hibrid, Diyarbakır Beyaz Kış Kavunu (Standart), Ticari kavun (BF1) Hibrid, Ticari kavun (SF1) Hibrid çeşitlerine taşınmıştır. Mekanik inokulasyon çalışması sonucunda simptom veren bitkilerden alınan örnekler WMV-R917/WMV-F917 primer çifti kullanılarak RT-PCR yöntemi ile testlenmiştir. Diyarbakır Karpuzu (Standart), Ticari karpuz (MF1) Hibrid, Ticari karpuz (SF1) Hibrid, Diyarbakır Beyaz Kış Kavunu (Standart), Ticari kavun (BF1) Hibrid ve Ticari kavun (SF1) Hibrid den oluşan test bitkilerinin tamamı RT-PCR sonucu % 1 lik agaroz jelde 917 bp büyüklükte bant görüntüsü vermiştir (Şekil.4.12.). Bu sonuçlar ile araştırmada saptanan WMV izolatının mekanik inokulasyon ile taşındığı moleküler yöntemlerle ortaya konulmuştur.



Şekil.4.10. Mekanik inokulasyonda pozitif bulunan örneklerin WMV-R825/WMV-F825 primeri ile RT-PCR sonuçlarının agaroz jel görüntüleri. M: 1 kb Marker, a-b-c ; TR-Db-Ynş, d-e-f ; TR-Db-Sur1, g-h-i ; TR-Db-Sur2 kodlu izolatlar, j-k ; negatif kontrol



Şekil.4.11. Mekanik inokulasyonda pozitif bulunan örneklerin WMV-R917/WMV-F917 primeri ile RT-PCR sonuçlarının agaroz gel görüntüleri. M: 1 kb Marker, a-b-c ; TR-Db-Ynş, d-e-f ; TR-Db-Sur1, g-h-i ; TR-Db-Sur2 kodlu izolatlar, j-k ; negatif kontrol.

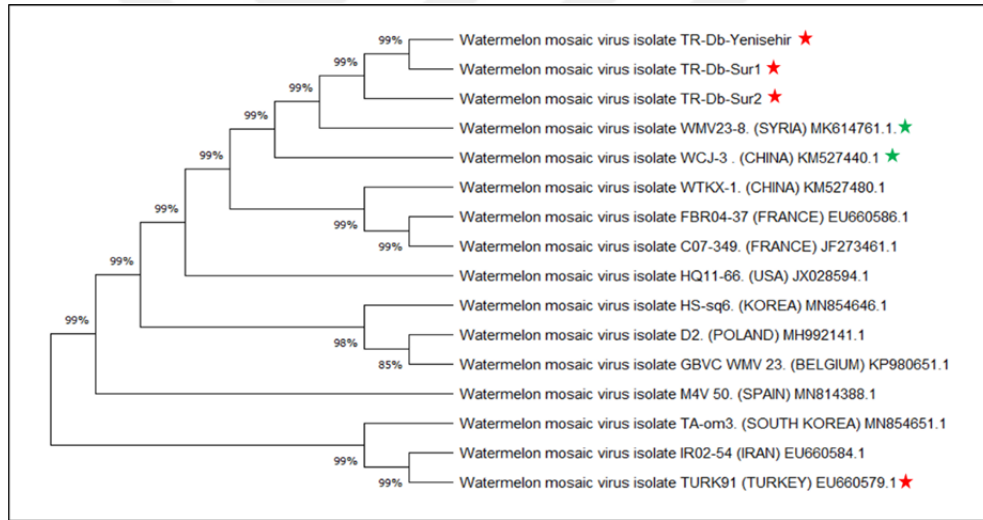


Şekil.4.12. Mekanik inokulasyonda simptome veren örneklerle ait WMV-R917/WMV-F917 primer çifti ile yapılan RT-PCR ürünlerinin 917 bp moleküler ağırlığına sahip bantların % 1 lik agaroz jeldeki görüntüsü. a; Diyarbakır Karpuzu (Standart), b; Ticari karpuz (MF1) Hibrid, c; Ticari karpuz (SF1) Hibrid, d; Diyarbakır Beyaz Kış Kavunu (Standart), e; Ticari kavun (BF1) Hibrid, f; Ticari kavun (SF1) Hibrid, g; pozitif kontrol, h; negatif kontrol.

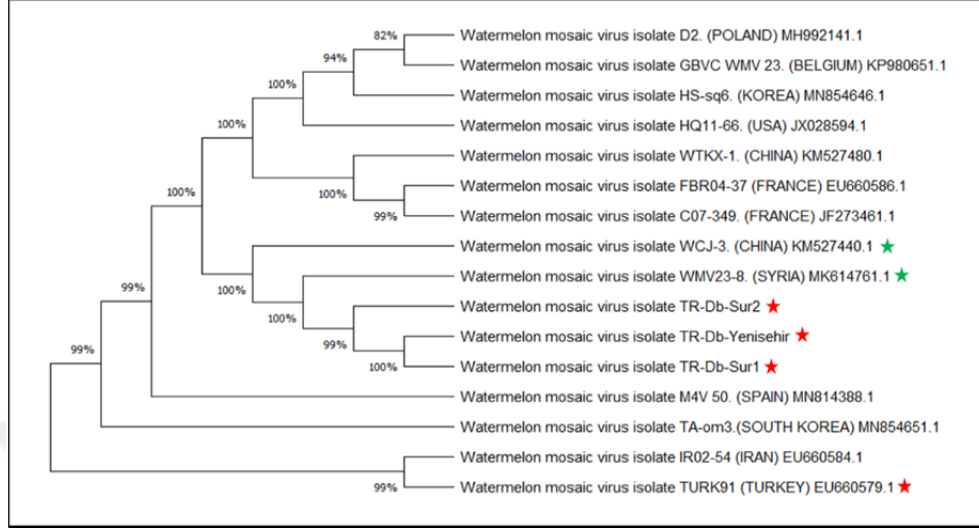
4.5. Filogenetik Analiz Çalışma Sonuçları

RT-PCR testlerinde pozitif sonuç alınan TR-Db-Yenişehir (Ynş), TR-Db-Sur1 ve TR-Db-Sur2 izolatlarına ait 825 bp ve 917 bp PCR ürünlerinin DNA dizileri ile hem kendi içerisinde hemde Gen bankasında yayınlanan FRANCE; JF273461.1, FRANCE; EU660586.1, IRAN; EU660584.1, TURKEY; EU660579.1, POLAND; MH992141.1, USA; JX028594.1, SPAIN; MN814388.1, SOUTH KOREA; MN854651.1, BELGIUM; KP980651.1, KOREA; MN854646.1, CHINA; KM527440.1, SYRIA; MK614761.1, CHINA; KM527480.1 WMV izolatları ile filogenetik analiz yöntemine tabi tutulmuştur. Yapılan filogenetik akrabalık analizi sonucunda TR-Db-Yenişehir (Ynş), TR-Db-Sur1 ve TR-Db-Sur2 kodlu WMV izolatları kendi içerisinde taranan R825/F825 bakımından % 99, R917/F917 bölgesi bakımından ise TR-Db-Yenişehir (Ynş) ve TR-Db-Sur1 izolatları kendi aralarında % 100 bu iki izolat TR-Db-Sur2 izolatı ile % 99 oranında benzerlik göstermiştir. TR-Db-Yenişehir (Ynş), TR-Db-Sur1 ve TR-Db-Sur2 kodlu WMV izolatları taranan R825/F825 bölgesi bakımından SYRIA; MK614761.1 ve CHINA; KM527440.1 izolatları ile yine % 99 oranında benzerlik gösterirken R917/F917 bölgesi bakımından % 100 oranında benzerlik göstermiştir. Diğer yandan TR-Db-Yenişehir (Ynş), TR-Db-Sur1 ve TR-Db-Sur2 kodlu WMV izolatları daha önceden Gen Bankasında yayınlanan TURK 91 (TURKEY; EU660579.1) izolatı ile de % 99 oranında benzerlik göstermiştir (Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.). TR-Db-Yenişehir (Ynş), TR-Db-Sur1 ve TR-Db-Sur2 kodlu WMV izolatlarının Desbiez ve Lecoq' un 2008 de rapor etmiş olduğu ve Grup 1'e dahil ettiği TURK 91 izolatı ile % 99 benzerlik göstermesi bu izolatlarında aynı grup'a dahil olduğu sonucu ortaya çıkmakta ve Türkiyeden rapor edilen ve Gen Bankasındaki izolatların hepsinin aynı grupta olduğu ortaya konulmuştur. Diğer yandan Perotto ve arkadaşları tarafından 2016 yılında yapılan araştırma sonuçları ile karşılaştırıldığında

Yenişehir (Ynş), TR-Db-Sur1 ve TR-Db-Sur2 kodlu WMV izolatlarının yine Turk91 izolatu ile aynı benzer bir şekilde A grubu içerisinde G1 altgurubuna dahil olduğu ortaya çıkmıştır. TR-Db-Yenişehir (Ynş), TR-Db-Sur1 ve TR-Db-Sur2 kodlu WMV izolatlarının SYRIA; MK614761.1 ve CHINA; KM527440.1 izolatları ile çok yakın ilişkide olmasına rağmen Suriyeden rapor edilen SYRIA; MK614761.1 izolatu ile daha yakın akraba olduğu ortaya konulmuştur. Filogenetik analiz sonucu TR-Db-Yenişehir (Ynş), TR-Db-Sur1 ve TR-Db-Sur2 izolatlarının kaynağının Suriye olduğu ya da Suriyeden rapor edilen SYRIA; MK614761.1 izolatının Türkiye olabileceği ve virüsün üretim materyali ya da vektörler aracılığıyla iki ülke arasında yayılmış olabileceği ortaya konulmuştur.



Şekil.4.13. WMV-R825/WMV-F825 primer çifti ile yapılan RT-PCR ürünlerinin DNA dizilerine göre yapılan filogenetik analiz.

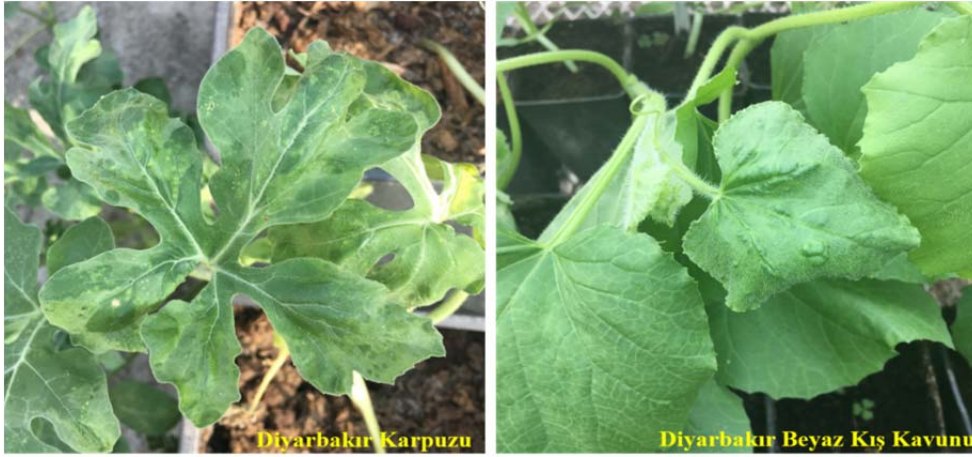


Şekil.4.14. WMV-R917/WMV-F917 primer çifti ile yapılan RT-PCR ürünlerinin DNA dizilerine göre yapılan filogenetik analiz.

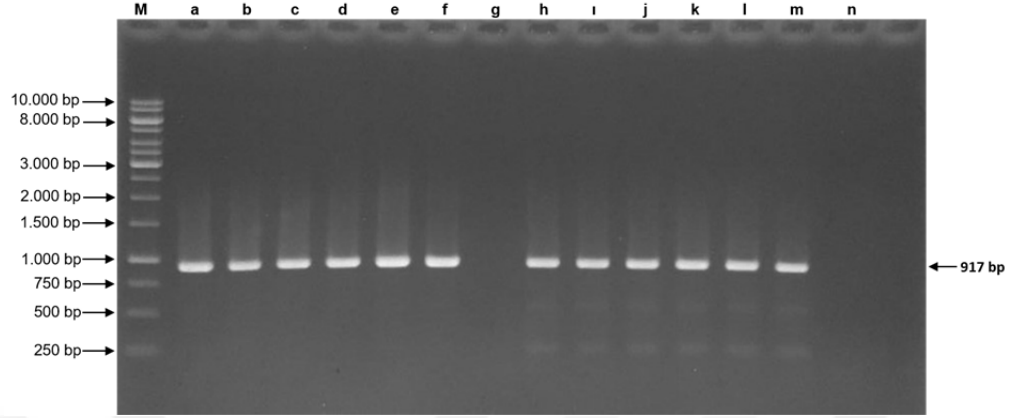
4.6. Virüsü Yaprak Biti İle Taşıma Çalışma Sonuçları

Diyarbakır ili ve ilçelerinde üretim alanlarında saptanan WMV'nin yaprak biti ile taşınan/taşınmayan ırkı olduğunun ortaya çıkartılması amacıyla yapılan taşıma denemelerinde yaprak biti olarak *Aphis gossypii*, inokulum kaynağı olarak mekanik inokulasyon ile WMV'ü TR-Db-Sur1 izolatu aktarılmış, belirti gösteren Diyarbakır Beyaz Kış Kavunu, test bitkisi olarak ta Diyarbakır Beyaz kış kavunu ve Diyarbakır karpuz çeşitleri kullanılmıştır. Yapılan taşıma denemelerinden sonra test bitkilerinde WMV' ünün neden olduğu yaprak deformasyonu, mozaik ve bodurlaşma belirtileri şeklinde belirtiler görüntülenmiştir (Şekil. 4.15.). Görüntülenen belirtilerin WMV' ünden kaynaklandığının ve virüsün yaprak biti ile taşındığının kanıtlanması için test bitkilerinden alınan yaprak örnekleri WMV-R917/WMV-F917 primer çifti kullanılarak RT-PCR yöntemi ile testlenmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jelde kontrol edilmesi ile

beklenen 917 bp molekül ağırlığına sahip bantlar görüntülenmiştir (Şekil. 4.16.). Bu sonuçlar, araştırma kapsamında saptanan ve karakterizasyonu yapılan WMV-TR-Db-Sur1 izolatının yaprak biti ile taşındığı bir kez daha ortaya konulmuştur. Yaprak biti ile taşıma sonuçları Edwardson ve Christie, (1986) ve Anderson, (1954)' un WMV *Aphididae* familyasına ait böceklerle; *Myzus persica*, *Aphis craccivora* başta olmak üzere en az 29 yaprak biti türü ile non-persistent olarak taşınabildiği sonuçları ile karşılaştırıldığında araştırma kapsamında saptanan WMV-TR-Db-Sur1 izolatının yaprak biti ile taşındığı ve sonuçların paralellik gösterdiği ortaya konulmuştur.



Şekil.4.15. WMV TR-Db-Sur1 izolatının Diyarbakır Karpuzu ve Diyarbakır Beyaz Kış Kavunu çeşitlerindeki yaprak biti ile taşıma deneme sonuçları. Yapraklarda mozaik, yaprak deformasyonu ve yapraklarda küçülme belirtileri.



Şekil.4.16. Yaprak biti taşıma denemesi sonucunda simptom veren bitkilerden alınan örneklerle ait WMV-R917/WMV-F917 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR ürünlerinin 917 bp moleküler ağırlığına sahip bantların % 1 lik agaroz jeldeki görüntüsü. a-b-c-d-e; Diyarbakır Karpuzu (Standart), f; pozitif kontrol, g; negatif kontrol, h-i-j-k-l; Diyarbakır Beyaz Kış Kavunu (Standart), m; pozitif kontrol, n; negatif kontrol.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bir çok bitki familyasında olduğu gibi Dünyada ve ülkemizde kabakgillerde çok sayıda viral etmen değişik seviyelerde hastalıklara ve sonuçta verim kayıplarına neden olmaktadır.

Karpuz, kavun, hıyar, acur ve kabaktan oluşan kabakgiller ülkemiz tarımında önemli bir yere sahiptir. Kabakgillerde bir çok hastalık söz konusudur. Ancak gerek kimyasal mücadelesinin olmayışı gerekse de diğer mücadele yöntemlerinin pek etkili olmayışı virüs vb. hastalıkları önemli kılmıştır. Virüsler ile mücadele de en etkili yöntem dayanıklı çeşit ve hastalıktan arı fidan, fide ve tohum kullanımıdır. Bunlarının yanı sıra vektörlük yapan böcekler (yaprak bitleri, thripsler, nematodlar vb.) ve yabancı otlar ile mücadele de önemlidir.

Araştırmanın yürütüldüğü Diyarbakır ili kabakgil yetiştiriciliğinde Türkiye üretiminde % 2,632 oranında, ekonomik öneme sahip kabakgil olan karpuz yetiştiriciliği açısından Türkiye üretiminde % 3,690 gibi önemli bir paya sahiptir.

Diyarbakır Karpuzu kalitesinden ziyade büyüklüğü ile anılmaktadır. Ticari çeşitlerinde yoğun olarak üretildiği bölgede virüs hastalıkları ve diğer hastalıklarla mücadele oldukça önemlidir. Araştırmanın yapıldığı süre içerisinde yapılan surveylerde Diyarbakır karpuz çeşidi ile aynı tarlalarda ekili kavun bitkilerinde virüs benzeri belirtilere rastlanmış ancak Diyarbakır karpuz çeşidinde herhangi bir semptom görülmemiş olması Diyarbakır karpuz çeşidinin virüs hastalıklarına karşı dayanıklı olabileceği fikrini ortaya koymuştur. Bu nedenler virüsler ile mücadelede etkili bir rol oynayan dayanıklılığın araştırılması bu tezin amacını oluşturmakta ve Diyarbakır karpuzunda WMV'üne karşı bir dayanıklılık söz konusu ise bu geni ticari karpuz çeşitlerine aktararak söz konusu virüsün mücadelesinde önemli bir aşama kaydetmek hedeflenmiştir.

Diyarbakır ili ve ilçelerinde yapılan kabakgil (karpuz ve kavun) surveylerinde semptomlar gözlenmiştir. Bu semptomların virüs ve virüs benzeri hastalık etmenleri olabileceğinden şüphelenilerek bu çalışma planlanmıştır. Bu

çalışma kapsamında yapılan surveyler sırasında kavunlarda ve diğer ticari karpuz çeşitlerinde virüs belirtileri (Kloroz, Yaprak Deformasyonu, Bodurlaşma, Sistemik Mozaik, Klorotik Lokal Lezyon, Sistemik Bodurluk) görülmüştür. Ancak kavunlarla aynı tarlada Karpuz festivalinde yarışmaya katılmak amacıyla yetiştirilen Diyarbakır Karpuzunda hiç semptom görülmemesi nedeniyle Diyarbakır Karpuzunun dayanıklılık çalışmaları henüz moleküler markörleri olmayışı sebebiyle biyolojik yöntemler (mekanik inokulasyon) ile gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada öncelikle survey yapılan üretim alanlarında var olan virüsler tespit edilmiştir. Yoğun olarak WMV'nin varlığı ortaya konduktan sonra söz konusu Diyarbakır karpuzunun dayanıklı olabileceği eğer dayanıklı değilse neden semptom göstermediği araştırılmak üzere surveyler yapılmış ve örnekler toplanmıştır. Diyarbakır ili ve ilçelerindeki kabakgil (karpuz, kavun) üretim alanlarında yürütülen surveylerde karpuzdan 97 ve kavundan 55 olmak üzere toplamda 152 bitkiden örnek alınmıştır. Öncelikle WMV, CMV, ZYMV, PRSV, MNSV, CABY ve SqMV virüslerine karşı serolojik olarak testlenmiş ve pozitif sonuç veren CMV ve WMV'leri göz önüne alınarak ve WMV'ü üzerinden yola çıkılarak moleküler tanımlama ve biyolojik indeksleme yöntemleri ile testlenmiştir. Moleküler (RT-PCR) yöntemle testlenen ve pozitif sonuç veren örnekler mekanik inokulasyon yoluyla Diyarbakır Karpuzu, Ticari Karpuz (MF1), Ticari Karpuz (SF1), Diyarbakır Beyaz Kış Kavunu, Ticari Kavun (BF1, Ticari Kavun (SF1) bitkilerine aktarılmıştır. Bu çalışma üç defa tekrar edilmiştir. Mekanik inokulasyon çalışmalarından sonra aşılama bitkilerde görülen belirtilerin WMV' ne ait olmadıklarını kontrol etmek amacıyla test bitkileri yine RT-PCR ile testlenmiş ve pozitif sonuçlar alınmıştır. Araştırmada kullanılan WMV izolatının yaprak bitleri ile taşıma ırk olduğunu kontrol etmek amacıyla aşılama kavun ve karpuzlarda belirtiler görüldükten sonra hastalıklı bitkilerden WMV'ü virüsün konukçusu olmayan turunçgillerden toplanan *Aphis gossypii* ile Diyarbakır Karpuzu ve Diyarbakır Beyaz Kış Kavununa taşınmıştır. Vektör taşıması çalışmalarından sonra virüsün taşındığı bitkiler daha sonra RT-PCR ile WMV ne testlenmiş ve

bütün bitkiler pozitif sonuç vermiştir. Bu sonuçlar Araştırmada kullanılan WMV izolatının yaprak biti ile taşıma ırk olduğunu ortaya koymuştur.

WMV'ünün dayanıklı olabileceği düşünülen Diyarbakır Karpuzu çeşidine mekanik inokulasyon ve yaprak biti taşıması ile bulaşabildiği ve WMV' üne karşı Diyarbakır Karpuz çeşidinde dayanıklılığın söz konusu olmadığı bu çalışma ile ortaya koyulmuştur. Ayrıca yaprak biti taşıma çalışmalarında Diyarbakır Karpuzu ve Diyarbakır Beyaz Kış Kavununun yanyana olduğu durumlarda yaprak bitlerinin karpuzu değil kavunu tercih ettiği kanısına varılmıştır.

Yapılan moleküler çalışma sonunda pozitif sonuç veren örneklerden elde edilen RT-PCR ürünlerinden WMV' ünün DNA dizilemesi çıkartılmıştır. DNA dizileri dünyadaki Gen Bankasında yayınlanmış olan diğer WMV izolatlarının DNA dizileri ile filogenetik analize tabi tutulmuştur. Filogenetik analiz sonucunda elde edilen akrabalık soyağacına göre WMV'ünün Diyarbakırda ki SUR izolatları ve YENİŞEHİR (Ynş) izolatı farklı ülkelerde bulunan izolatları karşılaştırıldığında WMV'ünün SUR izolatları dünyadaki Suriye ve Çin izolatlarına yakın olduğu bu iki izolat içerisinde Suriye izolatı ile daha yakın akraba olduğu ortaya koyulmuştur.

Sonuç olarak araştırma süresince elde edilen bulgular neticesinde Diyarbakır karpuz çeşidinin WMV' üne karşı dayanıklı olmadığı, Diyarbakır kabakgil üretim alanlarında saptanan WMV izolatlarının yaprak biti ile taşınan ırk olduğu, izolatların dünyadaki diğer WMV izolatları ile % 99 oranında benzerlik gösterdiği ve en çok Suriye izolatı ile yakın akraba olduğu ve ülkemizde Suriyeye ya da Suriyeden ülkemize üretim materyali veya vektörler aracılığı ile taşınmış olabileceği ortaya konulmuştur. Bu sonuçlar neticesinde diğer virus hastalıklarında olduğu gibi WMV ile mücadelede virüsten arı üretim materyallerinin tarımsal üretimde kullanılması ve özellikle karantina tedbirlerine uyulması gerekliliği bir kez daha ortaya çıkmıştır. Ülkemizde bulunan WMV izolatlarının yaprak bitleri ile taşınan ırk olması vektörler ile mücadelenin ne kadar önemli olduğunu bir kez daha önümüze koymuştur. Üretim sezonu dışında virüslere ara konukçuluk yapan

yabancı otlarlada yeterince mücadele edilerek inokulum kaynaklarının ortadan kaldırılması diğer önemli bir husus olarak önem kazanmıştır.

Bu araştırma WMV' ünün Diyarbakır kabakgil üretim alanlarındaki durumunu, biyolojik, epidemiyolojik ve moleküler özelliklerini ortaya koymuştur.



KAYNAKLAR

- Abdalla, A.O ve Ali, A., 2013. First Report of a Novel *Potyvirus* from Florida Causing Chlorotic ottling in Squash (*Cucurbita pepo*). Plant Dis. 2013 Sep;97(9):1259. doi: 10.1094/PDIS-01-13-0099-PDN.
- Ali, A., Abdalla, O., Bruton, B., Fish, W., Sikora, E., Zhang, S., and Taylor, M. 2012. Occurrence of viruses infecting watermelon, other cucurbits, and weeds in the parts of southern United States. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2012-0824-01-RS.
- Anderson, C. W. 1954. Two watermelon mosaic virus strains from central Florida. Phytopathology 44:198-202.
- Antignus, Y., Raccach, B., Gallon, A. and Cohen, S. (1989). Biological and serological characterization of Zucchhini Yellow Mosaic ve Watermelon Mosaic Virüs-2 isolates in israel Phytoparasitica 17(4):289-298.
- Anonim, 2018. <http://www.diyarbakir.com/karpuz.htm> (Erişim tarihi)
- Anonim, 2019a. Anonim, 2019a. <http://www.tuik.gov.tr>. Bitkisel Üretim İstatistikleri.
- Anonim, 2019b. <https://www.kulturportali.gov.tr/portal/diyarbakirkarpuzu>
- Anonim, 2020. <https://en.wikipedia.org/wiki/Watermelon>
- Astruck, N., Marcus, J.F., Macquarie, G., Candresse, G.T. and Vicent Pallas, 1996. Studies on the Diagnosis of hop Stunt Viroid in Fruit Trees: İdentification of New Host and Application of a Nucleic Acid Extraction Procedure Based on Non-Organik Solvents. European Journal of Plant Pathology, 102, 837-846.
- Bhargava, B. and Bhargava, K.S., 1976. Reaction of some cucurbit cultivars to seven strains of Watermelon mosaic virus. Indian Phytopathology 29:446-447.

- Ching-Yi Lin, Hsin-Mei Ku, Yi-Hua Chiang, Hsiu-Yin Ho, Tsong-Ann Yu ve Fuh-Jyh Jan, 2012. Development of transgenic watermelon resistant to Cucumber mosaic virus and Watermelon mosaic virus by using a single chimeric transgene construct. *Transgenic Res* (2012) 21:983–993. DOI 10.1007/s11248-011-9585-8.
- Clark, M.F., and Adams, A.N., 1977. Characteristic of Microplate method of Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses, *J. Gen. Virol.*, 34: 475-483.
- Çağlar, B. K., 2002. Çukurova Bölgesinde Kabakgillerde Zararlı SqMV Virüsünün Biyolojik ve Serolojik Yöntemlerle Tanılanması Ve Tohumla Taşınması. Yüksek Lisans Tezi, S: 66.
- Çağlar, B. K., Güldür, M. E. and Yılmaz M. A., 2004. First Report of Squash Mosaic Virus in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 86 (2), 179. (Disease Note). ISSN: 1125-4653 22 June 2004.
- Desbiez, C. and Lecoq, H., 2008. Evidence for multiple intraspecific recombinants in natural populations of Watermelon mosaic virus (WMV, *Potyvirus*). *Arch Virol* (2008) 153:1749–1754. DOI 10.1007/s00705-008-0170-2
- Edwardson, J.R. (1974). *Fla Agric. Exp. Stn Monog. No. 5*, p. 131.
- Edwardson, J.R. and R.G. Christie, 1986. Viruses infecting forage legumes. *Fla Agric. Exp. Stn Monog. No. 14*, p: 454.
- Frenkel, M.J., Ward, C.W. and Shukla, D.D. (1989). The Use of 3' Non-coding Nucleotide Sequences in the Taxonomy of *Potyvirus*s: Application to Watermelon Mosaic Virus 2 and Soybean Mosaic Virus-N. *J. gen. Virol.* (1989), 70, 2775-2783.
- Galitelli, D., and Minafra, A., 1994. Electrophoresis. Course on Plant Virus Diagnosis, 15-30 October 1994. Adana-Turkey. Page: 89-99
- Greber, 1978, R. S., 1978. Watermelon mosaic virus 1 ve 2 in Queensland cucurbit crops. *Australian Journal of Agricultural Research* 29(6) 1235 – 1245.

- Gibbs, AJ; Ohshima, K; Phillips, MJ; Gibbs, MJ (2008). "The Prehistory of *potyviruses*: Their initial radiation was during the dawn of agriculture". PLoS ONE. 3 (6): e2523. Bibcode:2008PLoSO...3.2523G. doi:10.1371/journal.pone.0002523. PMC 2429970. PMID 18575612.
- Gibbs, A; Ohshima, K. (2010). "*Potyviruses* and the digital revolution". Annu Rev Phytopathol. 48: 205–23. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114404. PMID 20438367.
- Gillaspie, A. G., JR., and Wright, J. M., 1993. Evaluation of Citrullus sp. Germ plasma for resistance to watermelon mosaic virus 2. Plant Dis. 77: 352-354.
- Guner, N. and Wehner, T. C., 2008. Overview of *Potyvirus* resistance in watermelon1. Cucurbitaceae 2008, Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae (Pitrat M, ed), INRA, Avignon (France), May 21-24th, 2008.
- Hampton, R., Beczner, L., Hagedorn, D., Bos, L., Inouye, T., Barnett, O. W., Musil, M. and Meiners, J., 1978. Host reactions of mechanically transmissible legume viruses of the northern temperate zone. Phytopathology 68: 989-997.
- Horváth J, Juretic N, Besada WH and Kuroli G, Two viruses isolated from patisson (*Cucurbita pepo* L var patissonina) a new vegetable natural host in Hungary I. Watermelon mosaic virus (general). Acta Phytopathol 10:93–111 (1975).
- Horváth J. (1979a): New artificial hosts and non-hosts of plant viruses and their role in the identification and separation of viruses. IX. *Potyvirus* group (Subdivision- III): Potato virus Y, turnip mosaic virus and watermelon mosaic virus (strain 2 or general strain). Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung. 14:157-173.
- <https://www.kulturportali.gov.tr/portal/diyarbakirkarpuzu>
- Inouye, T., A., 1964. Virus disease of pea caused by watermelon mosaic virus, Ber. Ohara Inst. Landw. Biol., 12 (2), 133, 1964

- Iwaki, M., Y. Honda, K. Hanada, H. Tochihara, T. Yonaha, K. Hokama and T. Yokoyama (1984) Silver mottle disease of watermelon caused by tomato spotted wilt virus. *Plant Dis.* 68: 1006–1008.
- Joannon, B., Lavigne, C., Lecoq, H., and Desbiez, C. 2010. Barriers to gene flow between emerging populations of Watermelon mosaic virus in southeastern France. *Phytopathology* 100:1373-1379.
- Kamberoglu, M.A., C. Desbiez and A.F. Caliskan, 2015. Characterization of an emerging isolate of watermelon mosaic virus in Turkey. *Int. J. Agric. Biol.*, 17: 211_215.
- Kamberoğlu, M. A., Keçe, M.A., (2016). Doğu Akdeniz Bölgesinde Karpuz Yetiştirilen alanlarda Karpuz Mozaik Virüsü (WMV-2)' nün Biyolojik, Serolojik ve Moleküler olarak belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*. 13(3), 0-0.
- Kızmaz, M. Z., Sağır, A. ve Baloğlu, S., 2016. Diyarbakır ve Mardin İlleri Kabakgil Üretim Alanlarında Görülen Viral Hastalıkların Yaygınlıklarının ve Etmenlerinin Belirlenmesi. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 2016, 53 (4):397-406 ISSN 1018 – 8851
- Komuro. Y., 1957. Studies on a mosaic disease of squash in japan. II. physical properties and identification of its causal virus with special reference to the relationship to the virus from mosaic plants of white gourd oriental pickling melon and watermelon. *Ann. Phytopath. Soc. japan* 22: 220-224.
- Komuro, Y., 1962. Virus diseases of cucumber and watermelon caused by melon mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. japan* 27: 31-36.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- Lecoq, H., Pitrat, M. and Clement, M. (1981)—Identification et caracterisation d'un *potyvirus* provoquant la maladie du rabougrissement jaune du melon. *Agronomie* 1: 827–834.

- Lecoq, H., 1992. Viruses of Cucurbit Crops in the Mediterranean Region: An Ever-Changing Picture, Advances in Virus Research, Volume 84, 2012, Pages 67-126.
- Lecoq, H., Dafalla, G., Desbiez, C., Wipf-Scheibel, C., Delécolle, B., Lanina, T., Ullah, Z., and Grumet, R., 2001. Biological and molecular characterization of Moroccan watermelon mosaic virus and a *potyvirus* isolate from Eastern Sudan. *Plant Dis.* 85:547-552.
- Lecoq, H. and C. Desbiez, 2012. Viruses of cucurbit crops in the mediterranean region: an ever-changing picture. *Adv. Virus Res.*, 84: 67-126.
- Lindberg, G. D., D. H. Hall and J. C. Walker, 1956 A study of melon and squash mosaic viruses. *Phytopathology* 46:489-495.
- Liu, W.R., Xiang, B.C., 2008. Nucleotide sequence analysis of coat protein gene of *Watermelon mosaic virus 2* Xinjiang Changji isolates. *Acta Phytopathol Sin*, 38: 576-581.
- Milne, K. S., and R. G. Grogan. 1969. Characterization of watermelon mosaic virus strains by serology and other properties. *Phytopatholog* 59:809-818.
- Molnár, Annamária, K. Schmelzer: Beiträge zur Kenntnis des Wassermelonen - mosaik -Virus. - *Phytopath. Z.* 51, 361-384, 1964. (Forschungsinstitut für Pflanzenschutz, Budapest, Ungarn, und Institut für Phytopathologie, Aschers-leben).
- Mullis K.B., Faloona F.A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods of Enzimology*, 155, 335-3).
- Namba, S., Ling, K., Gonsalves, C., Slightom, J.L., and Gonsalves, D. 1992. Protection of transgenic plants expressing the coat protein gene of watermelon mosaic virus II or zucchini yellow mosaic virus against six *potyviruses*. *Phytopathology* 82:940-946.

- Perotto, M. C. ve Celli, M. G. ve Pozzi, E. A. ve Luciani, C. E. ve Conci, V. C. 2016. Occurrence and characterization of a severe isolate of Watermelon mosaic virus from Argentina. *Eur J Plant Pathol.* DOI 10.1007/s10658-016-0904-z.
- Provvidenti, R., 1996. Diseases caused by viruses. In: *Compendium of Cucurbit Diseases*. pp: 37_45. T.A. Zitter, D.L. Hopkins and C.E. Thomas (eds.). American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Purcifull, D., Hiebert, E., 1979. Serological distinction of watermelon mosaic virus isolates. *Phytopathology* 69:112-116
- Purcifull, D., Hiebert, E., Edwardson, J. 1984. Watermelon Mosaic Virus 2. CMI/AAB Descriptions of plant viruses. No. 293. 7pp. (No 63 Revised).
- Quemada, H., Sieu, L. C., Siemieniak, D. R., Gonsalves, D., & Slightom, J. L. J. *Gen. Vir.* 71, 1451–1460 (1990). Watermelon mosaic virus II and zucchini yellow mosaic virus: Cloning of 3'-terminal regions, nucleotide sequences, and phylogenetic comparisons.
- Rathcke B, Hamrum CL, Glass AW (1967) Observations of the interrelationships among ants and aphid predators. *MichEntomol* 1:169–173
- Raychaudhuri, M. and Varma, A. (1975). *Indian J. Ent.* 37: 247.
- Romay, G., H. Lecoq and C. Desbiez, 2014. Zucchini tigré mosaic virus is a distinct species into the papaya ringspot virus cluster: Molecular and biological insights. *Arch. Virol.*, 159: 277-289
- Salem T.Z., El-Gamal S.M. ve Sadik A.S. (2007) Use of Helper Component Proteinase Gene to Identify a New Egyptian Isolate of Watermelon Mosaic *Potyvirus*. *International Journal of Virology*, 3: 107-116.
- Schmelzer, K., (1966) Nachweis des spezifischen Wassermelonen-Mosaik-Virus in Kuba. *Naturwissenschaften* 53: 619
- Schmelzer, K. & Miličić, D., 1966. Zur Kenntnis der Verbreitung des Wassermelonen-Mosaik-Virus in Europa und seiner Fähigkeit zur Bildung von Zelleinschlusskörpern. *Phytopath. Z.* 57: 8–16.

- Sharifi, M., H. Massumi, J. Heydarnejad, A.H. Pour, M. Shaabani and H. Rahimian, 2008. Analysis of the biological and molecular variability of *Watermelon mosaic virus* isolates from Iran. *Virus Genes*, 37: 304-313.
- Tamura K. and Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.
- Toba, H. H. 1962. Studies on the Host Range of Watermelon Mosaic Virus in Hawaii. *Plant Dis.* 46: 409-410.
- Thomas W., 1980. Watermelon mosaic virus, the cause of a serious disease of cucurbits in the Cook Islands, *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 8:3-4, 309-312,
- Van Regenmortel, M.H.V., 1961. Purification of a Watermelon mosaic virus. *S. Afr. J. agric. Sci.* 4: 405.
- Van Regenmortel, M.H.W., J. Brandes and R. Bercks. 1962. Investigations on the properties of watermelon mosaic virus. *Phytopath. Z.* 45: 205-216.
- Varma, A. (1988). In: *The Plant Viruses Vol. 4, The Filamentous Plant Viruses*, p. 371; ed. R.G. Milne. Plenum Press, New York.
- Viral Zone. ExPASy. Retrieved 15 June 2015.
- Wang Dong, and Li Guan, 2017. Host Reaction of *Watermelon mosaic virus* Isolates Infecting Melon from Different Geographical Origins in Xinjiang of China. *Horticultural Plant Journal*, 3 (1): 23–28.
- Xaxiri, E. (Présentateur), Desbiez, C., Maliogka, V., Tachopoulos, K., Xanthis, C. K., Lecoq, H., Millot, P., Wipf-Scheibel, C., Katis, N. (2016). Phylogenetic analysis of watermelon mosaic virus isolates in Greece. In: “Building bridges between disciplines for sustainable management of plant virus diseases”. IPVE 2016. Programme and abstracts (p. 156). Presented at 13. International plant virus epidemiology symposium, Avignon, FRA (2016-06-06 - 2016-06-10). 165 p.

- Yılmaz, M.A., and Davis, R.F., 1984. Purification and Particle Morphology of TMV, CMV, and ZYMV Isolated from Various Cultivated Crops Grown along the Mediterranean Coast of Turkey. J. Turkish Phytopathology 13(1), 29-38.
- Yılmaz, M.A., Lecoq, H., Abak, K., Baloğlu, S., ve Sarı, N., 1992. Türkiye I. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bornova, İzmir, 439-442.
- Yılmaz, M.A., and Davis, R.F., and Varney, E.H., 1993. Viruses on Vegetable Crops along the Mediterranean Coast of Turkey. Phytopathology, 73, 378.
- Yu, M. H., Frenkel, M. J., McKern, N. M., Shukla, D. D., Strike, P. M. & Ward, C. W. (1989). Coat protein of potyviruses. 6. Amino acid sequences suggest watermelon mosaic virus 2 and soybean mosaic virus-N are strains of the same *potyvirus*. Archives of Virology 105, 55-64.
- Zohreh Moradi, 2011. Diagnosis and Molecular Variability of Watermelon mosaic virus Isolates from North, East, North-east and North-west Regions of Iran. Asian Journal of Plant Pathology, 5: 115-125.
- Zitter, T. A. and Banik, M. T., 1984. Vegetable crops, Virus Diseases of Cucurbits. Dept. of Plant Pathology, Cornell University, and R. Provvidenti, Dept. of Plant Pathology, New York State Agricultural Experiment Station, Geneva.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Diyarbakır'da doğdu. İlköğretim ve ortaöğretimi Diyarbakır'da tamamladı. 2012 yılında Dicle Üniversitesi Bismil Meslek Yüksekokulu'nda Organik Tarım bölümünü kazanıp 2014 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl içerisinde Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde başladı ve 2018 yılında mezun oldu. 2018 yılında Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Lisans ve yüksek lisans eğitimi süresince çeşitli çalışmalarda bulundu.

1. **B. K. Çağlar**, A. Güneş, D. Konur, S. Baloglu, 2016. Akçaağacında Yaprak Beyazlaşması Simptomuna Neden Olan Etmen / Etmenlerin Saptanması ve Karakterizasyonu. Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri (5-8 Eylül, 2016) Konya, Türkiye. S:654 (Poster).
2. **Behçet Kemal Çağlar**, Ali Güneş, Dilan Konur, 2018. Badem Ağaçlarında Yaprak Sararması ve Kızarıklık, Boğum Arası Kısılması ve Bodurlaşma'ya neden olan Etmenin Saptanması ve Karakterizasyonu. Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi. (26-28 Ekim, 2018) Aydın / Türkiye. Sözlü Sunum.



EKLER



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 ₂ PO ₄
2.9 gr	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O veya
	2.3 gr Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O
	1.44. gr Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O
	1.15 gr Na ₂ HPO ₄ (anhdrous)
0.2 gr	KCl
0.2 gr	NaN ₃

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH sı 0.1 N NaOH veya 0.1 N HCl ile ayarlanmış ve 4 0C de saklanmıştır.

2. Coating buffer pH 9.6 (Kaplama tampon çözeltisi)

1.59 gr	Na ₂ CO ₃
2.93 gr	NaHCO ₃
0.2 gr	NaN ₃

Yukarıda miktarı verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH sı ayarlanmış ve 4 0C de saklanmıştır.

3. Washing Buffer (Yıkama tampon çözeltisi)

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

4. Sample Extraction Buffer (Örnek tampon çözeltisi)

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

5. Enzyme Conjugate Buffer (Konjugat tampon çözeltisi)

Bir litre örnek tampon çözeltisine 2 gr ovalbumin (egg albumin) ilave edilerek hazırlanmıştır.

6. Substrat Buffer pH 9.8 (Substrat tampon çözeltisi)

97 ml Diethanolamine 800 ml saf su içine ilave edildikten sonra 0.2 gr NaN₃ konmuş ve HCl ile pH 9.8'e ayarlanarak 1 litreye tamamlanmıştır.

Ek 2. Mekanik İnokulasyon Çalışmalarında Kullanılan Solüsyonlar
Fosfat Buffer Hazırlama

A. 0,2 Molar Na_2HPO_4 (M.wt. 178,05) hazırlamak için;

1000 ml dd H_2O içerisinde 35,61 g Na_2HPO_4 eritilir.

B. 0,2 Molar NaH_2PO_4 (M.wt. 156,03) hazırlamak için;

1000 ml dd H_2O içerisinde 31,21 g NaH_2PO_4 eritilir.

Daha sonra A solüsyonundan 61 ml, B solüsyonundan 39 ml alınır ve pH 7.0 ayarlanıp toplam hacim 200 ml ye tamamlanır ve 0,1 M Fosfat Buffer elde edilir. Kullanım sırasında 0,1 M buffer 1/5 oranında H_2O ile sulandırılır.

Ek 3.

Total RNA Analizlerinde Kullanılan Solüsyonlar

Ekstraksiyon bufferı (100mM Tris-HCl pH.8.0, 50mM EDTA pH. 7.0, 500 NaCl, 10mM 2. mercapto-ethanol (1/1000))

Tris-HCl	2.4228 gr
ADTA	3.7224 gr
NaCl	5.844 gr

Yukardaki miktarlar 150 ml distile su içerisinde sırasıyla çözülmüş pH ayarlaması yapılmış ve toplam hacim 200 ml ye tamamlamıştır. Daha sonra 1/1000 oranında 2-Mercaptoethanol ilave edilmiştir.

% 20 Sodium Dodecyl Sülfate (SDS)

20 gr sodium dodecyl sülfate 80 ml distile su içerisinde çözülmüş ve volum 100 ml ye tamamlanmıştır.

Potassium asetat (CH₃COOK) (5M)

49.075 gr potassium asetat 60 ml su içerisinde çözülmüş ve volum 100 ml ye tamamlanmıştır.

Sodium asetat CH₃COONa(3M)

40.824 gr sodium asetat 60 ml su içerisinde çözülmüş ve volum 100 ml ye tamamlanmıştır.

% 70 lik Ethanol

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