

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI



WATERMELON MOSAIC VIRUS (WMV) İZOLATLARINDA
P1 GEN BÖLGESİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU
VE POPULASYON DİNAMİKLERİ

BİTKİ KORUMA YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖMER AYDIN

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ali ÇELİK

BOLU, ARALIK - 2024

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ömer AYDIN tarafından hazırlanan “**WATERMELON MOSAIC VIRUS (WMV) İZOLATLARINDA P1 GEN BÖLGESİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE POPULASYON DİNAMİKLERİ**” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliğiyle kabul edilmiştir. 24/12/2024

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Doç. Dr. Ali ÇELİK
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Göksel ÖZER
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Doç. Dr. Şerife TOPKAYA
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir,

aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin Turnitin adlı programında enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %30'u geçmemektedir.

24.12.2024

ÖMER AYDIN

ÖZET

**WATERMELON MOSAIC VIRUS (WMV) İZOLATLARINDA P1 GEN
BÖLGESİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE
POPULASYON DİNAMİKLERİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÖMER AYDIN
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. ALİ ÇELİK)
BOLU, ARALIK - 2024
X + 39 sayfa**

Watermelon mosaic virus (*Potyvirus citrulli*; WMV), kabakgiller familyasında (Cucurbitaceae) yer alan bitkileri enfekte eden bir virüstür. Bu virüs, özellikle karpuz, kavun, kabak ve salatalık gibi ekonomik olarak önemli bitkilerde ciddi verim kayıplarına neden olabilir. Bu çalışmada Eskişehir, Ankara ve Nevşehir illerinden toplanan ve serolojik olarak WMV ile enfekteli olduğu doğrulanmış 10 adet WMV ile bulaşık kabakgil bitkisinden izole edilen WMV izolatlarının yaklaşık 1317 nükleotidlik P1 bölgesi için 750 ve 849 bp büyüklüğünde iki farklı bölgeyi çoğaltan primer çiftleri üretilmek suretiyle moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Amplifiye edilen ürünler dizilenerek GenBank erişim numaraları alınmıştır. Nükleotid düzeyinde belirlenen benzerlik oranları ve temel düzeyde yapılan filogenetik analiz global WMV izolatlarını P1 bölgesi özelinde 5 filogruba ayırmıştır. Yapılan genetik çeşitlilik ve polimorfizm analizi değerlerine göre diziler arasındaki nükleotid farklılıklarının ortalama sayısı filogrup 3 içerisinde en yüksek olarak hesaplanmıştır. Oluşan 1, 2 ve 4 nolu filogrupların yüksek ω (dN/dS) oranlarında ($\omega > 2$) güçlü seçim baskısı karakteri sergilemediği belirlenirken filogrup 3'te gözlemlenen düşük ω değeri, bu filogrubun yüksek seçim baskısı özelliği taşıdığına işaret etmektedir. Oluşan filogrupların popülasyonlar arası çeşitliliği ölçen F_{ST} değerlerinin sadece filogrup 2'de referans değer olan 0.33'den büyük olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada sonucuna göre P1 bölgesinin popülasyon dinamiklerinin daha net veriler sunabilmesi için daha fazla izolat ile analize ihtiyaç duyulduğu değerlendirilmektedir. Araştırma sonuçlarının WMV P1 bölgesinin popülasyon dinamiklerinin aydınlatılmasına önemli düzeyde katkı sunduğu ve P1 filogenisine yeni bir bakış açısı sunduğu düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELE: Karpuz mozaik virüsü, P1, Moleküler karakterizasyon, Popülasyon dinamiği

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND POPULATION DYNAMICS OF THE P1 GENE REGION IN WATERMELON MOSAIC VIRUS (WMV)

ISOLATES

MSC THESIS

ÖMER AYDIN

BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

PLANT PROTECTION DEPARTMENT

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. ALİ CELİK)

BOLU, DECEMBER 2024

X + 39

Watermelon mosaic virus (*Potyvirus citrulli*; WMV) infects plants in the Cucurbitaceae family. This virus can cause significant yield losses, especially in economically important crops such as watermelon, melon, squash, and cucumber. In this study, WMV isolates were collected from 10 cucurbit plants infected with WMV, confirmed serologically from the provinces of Eskişehir, Ankara, and Nevşehir. Two different primer pairs, amplifying regions of 750 and 849 bp in size, were designed to amplify the approximately 1317-nucleotide-long P1 region of these WMV isolates. The amplified products were sequenced, and GenBank accession numbers were obtained. Nucleotide similarity indexes and basic phylogenetic analysis divided global WMV isolates into five phylogroups based on the P1 region. According to genetic diversity and polymorphism analysis, the average number of nucleotide differences between sequences was found to be highest within phylogroup 3. While phylogroups 1, 2, and 4 did not show strong selection pressure, as indicated by high ω (dN/dS) ratios ($\omega > 2$), the low ω value observed in phylogroup 3 suggested strong selection pressure in this group. F_{ST} values, which measure genetic diversity between populations, were found to exceed the reference value of 0.33 only in phylogroup 2. Based on the results of this study, it is concluded that additional isolates are needed for a more comprehensive analysis of the population dynamics of the P1 region. The findings are believed to contribute significantly to the understanding of the population dynamics of the WMV P1 region and offer a new perspective on P1 phylogeny.

KEYWORDS: Watermelon mosaic virus, P1, Molecular characterization, Population dynamics

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ	viii
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	ix
TEŞEKKÜR	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1 WMV'nin Global Ölçekteki Durumu ve Çeşitli Araştırmalar	5
1.2 WMV'nin Türkiye'deki Durumu ve Çeşitli Araştırmalar	13
2. MATERYAL VE YÖNTEM	16
2.1 Virus İzolatları	16
2.2 DAS-ELISA testi	16
2.3 WMV-P1 Bölgesinin Konsensus Blokları.....	17
2.4 Primer Dizaynı.....	17
2.5 RNA İzolasyonu	18
2.6 DNase I Uygulaması.....	19
2.7 RT-PCR Çalışmaları ve Optimizasyon.....	19
2.8 Agaroze Jel Elektrophorez Çalışmaları.....	20
2.9 Dizileme ve Erişim Numaralarının Alınması	21
2.10 P1 Bölgesinin Populasyon Dinamikleri ve Filogeni	21
2.11 Nötralizasyon Seçilimi ve Genetik Farklılık Analizleri	22
3. BULGULAR	23
3.1 DAS-ELISA testi	23
3.2 PCR Optimizasyonu, Dizileme ve Rekombinant İzolatlar	23
3.3 WMV Filogenisi ve Populasyon Dinamikleri	25
4. TARTIŞMA	29
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	33
KAYNAKLAR	35

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Çalışma kapsamında tasarlanan primerlerin P1 bölgesi üzerinde bağlanma noktaları.	18
Şekil 3.1. Amplifikasyon ürünlerinin jel görüntüleri.....	23
Şekil 3.2. WMV P1 gen bölgesine yönelik oluşturulan nt düzeyindeki benzerlik matrisi.....	24
Şekil 3.3. Maximum-likelihood metoduna göre WMV P1 bölgesinin filogenisi.	26



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1. Türkiye kabakgil üretim verileri.	2
Tablo 1.2. Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan indik特or bitkiler ve WMV enfeksiyonu sonucunda gözlenen simptomlar	4
Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan WMV izolatları ve survey illeri.....	16
Tablo 2.2. P1 bölgesinin çoğaltılması için tasarlanan oligonükleotid dizi bilgileri.	18
Tablo 2.3. Her bir primer çifti için hazırlanan reaksiyon bileşenleri.	20
Tablo 2.4. WMV izolatlarında P1 bölgesinin amplifikasyonu için gradient PCR koşulları.	20
Tablo 3.1. Çalışma kapsamında ele alınan WMV P1 bölgesinin rekombinant izolatları.....	24
Tablo 3.2. WMV P1 gen bölgesinin nt dizilerinin genetik çeşitliliği ve polimorfizm analiz değerleri.	27
Tablo 3.3. WMV P1 gen bölgesine göre tahmin edilen nötralite test değerleri. ..	27
Tablo 3.4. WMV izolatlarının P1 gen bölgesi için genetik farklılaşmanın analiz değerleri.....	28

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

DAS-ELISA	: Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
DNA	: Deoksiribonükleik asid
dNTP	: Deoksinükleotidtrifosfat
FAO	: Food and agriculture organisation
Gr	: Gram
kDA	: Kilo dalton
l	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PRSV	: Papaya ringspot virus
RNA	: Ribonükleik asid
SMV	: Soybean mosaic virus
SqMV	: Squash mosaic virus
TMV	: Tobacco mosaic virus
TÜİK	: Türkiye istatistik kurumu
UTR	: Untranslated Regions
WMV	: Watermelon mosaic virus
ZYMV	: Zucchini yellow mosaic virus
µl	: Mikrolitre

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmanın yürütülmesi esnasında her konuda desteğini gördüğüm ve tecrübeleriyle beni yönlendiren danışman hocam sayın Doç. Dr. Ali ÇELİK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Kontrol izolatlarının temini, PCR optimizasyonu ve dizileme çalışmaları esnasında samimi desteklerini oldukça yakından hissettiğim Ziraat Yüksek Mühendisi sayın Ali Ferhan MORCA ve Ziraat Yüksek Mühendisi sayın Sevgi COŞKAN'a çok teşekkür ederim. Ayrıca filogenetik ağacın görselleştirilmesi sürecinde deneyimlerinden istifade ettiğim Ziraat Yüksek Mühendisi sayın Faruk ÖNCÜ'ye teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını 2023-TYL-6.12.57-0014 no'lu proje kapsamında destekleyerek başarıyla tamamlanmasına maddi katkı sunan Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ayrıca teşekkür ederim.

Bu çalışma esnasında her zaman desteklerini yakından hissettiğim mesai arkadaşlarıma, lisansüstü eğitimimi destekleyen yöneticilerime ve aile fertlerime çok teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Kabakgiller dünya sebze üretiminde üretim alanı ve miktarı olarak önemli bir yere sahiptir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Çin, Hindistan, Rusya ve Türkiye gibi ülkeler, dünya genelinde kabakgil üretiminde ön plana çıkmaktadır. Ancak kabakgiller ağırlıklı olarak Türkiye'nin de dahil olduğu Asya kıtasında yetiştirilmektedir (Food and Agriculture Organisation [FAO], 2018). Kabakgillerin anavatanı olarak bazı bilim insanları Asya kıtasını bir kısım araştırmacılar ise Amerika kıtasını işaret etmektedir (Yanmaz, 2003). Orta Amerika'dan Güney Amerika'ya kadar Arjantin bölgesi yoğunluklu olmak üzere, karpuzun anavatanının Afrika, hıyarın ve kavunun anavatanının Hindistan civarı olduğu düşünülmektedir (Martín-Hernández, 2022). 2018 FAO verilerine göre Çin, kabakgillerin tümünde üretim bakımından 1. sırada yer almaktadır. İkinci sırada Hindistan ve 3. sırada Rusya gelmekte olup, Türkiye ise kabak üretiminde dünyada 10. sırada yer almaktadır. Ülkemizde sebze türleri içerisinde en büyük üretim payı domatesten sonra kabakgillerde olup, kabakgiller arasında ise ülkemizde ilk 5 sırada sırasıyla kabak, karpuz, hıyar ve kavun, 8.7 milyon ton üretim ile yetiştirilmektedir (Duman, 2020). Kabakgiller taze tüketilen meyvelerinin yanı sıra çekirdekleri için de (çerezlik) özellikle Asya kıtasında yetiştirilmektedir. Ülkemizde ise İç Anadolu Bölgesi'nde hemen hemen tüm illerimizde çerezlik kabak üretimi yapılmaktadır. Özellikle Konya, Aksaray, Niğde, Kayseri illerinde yıldan yıla artarak çerezlik kabak üretimi yapılmakta olup, TÜİK verilerine göre ülkemizde 548.000 ton sakız kabağı ve 100.000 tona yakın bal kabağı yanı sıra 58 bin tona yakın çerezlik kabak üretimi gerçekleşmiştir (TÜİK, 2023). TÜİK (2023) verilerine göre ülkemizde üretimi yapılan kabakgillerde üretim alanı ve elde edilen ürün miktarları Tablo 1.1'de verilmiştir.

Tablo 1.1. Türkiye kabakgil üretim verileri (TÜİK, 2023).

Ekilen Bitki	Ekilen alan / Dekar	Üretim / Ton
Sofralık Hıyar	23.934,900	1.562.058,00
Turşuluk Hıyar	11.343,300	30.965,400
Kavun	54.812,300	1.403.214,00
Karpuz	640.700	31.479,21
Kabak (Sakız)	9.881,600	573.61700
Kabak (Çerezlik)	72.711,200	58.546,00

Kabakgiller içerdiği yağ ve yağ asitleri, protein, vitamin ve aminoasitler açısından zengin bir sebze grubudur (Rahman, 2008). Yemelik ve çerezlik tüketim dışında kabakgiller hastalıklara şifa olması amacıyla da insanlık tarihinde ilaç olarak kullanılmıştır (Mukherjee Pulok, 2022). Özellikle bağırsak problemlerinde bağırsak paraziti mücadelesinde çok eski tarihlerden itibaren kullanıldığı bilinmektedir. İçeriğinde ihtiva ettiği tanenler, glikozitler, karatenoidler ve triterpenoidler sebebiyle damar sertleşmeleri, varis tedavisi ve hemoroidler için kullanıldıkları rapor edilmiştir (Mukherjee Pulok, 2022). Kabak çekirdekleri ve yağında bulunan kimyasallar ile idrar yolu problemlerinin tedavisinde ve prostat tedavisi için kullanıldığı, içeriğinde zengin esansiyel yağlar ile saç büyümesini teşvik edici özelliği ve yara iyileştirici etkilerinin olduğu kaydedilmiştir (Yücelşengün vd., 2021). Hıyar bitkisi de cilt problemlerinde, yanık, kaşıntı gibi tahriş sorunlarında, göz ve yüz şişmelerinde rahatlatıcı olarak kullanılmıştır (Ergun, 2019).

Kabakgillerin üretiminde bazı olumsuz çevresel faktörlerin yanı sıra bakteriyel, fungal ve viral etmenler üretimi olumsuz yönde etkilemektedir. Kabakgil üretiminin yapıldığı alanlarda yüksek oranda ürün kayıplarına neden olan birçok viral etmen mevcuttur (Zitter, 1996). Kabakgiller familyası içerisinde sıklıkla rastlanan virüsler arasında Tütün mozaik virüsü (Tobacco mosaic virus; TMV), Kabak sarı mozaik virüsü (Zucchini yellow mosaic virus; ZYMV) Hıyar mozaik virüsü (Cucumber mosaic virus; CMV), Sarılık virüsü (Cucurbit aphid-borne yellows virus; CABYV), Kabak mozaik virüsü (Squash mosaic virus; SqMV), Karpuz mozaik virüsü (Watermelon mosaic virus; WMV), ve Papaya halkalı leke virüsü (Papaya ringspot virus; PRSV) görülmektedir (Lecoq, 2008).

Özellikle son yıllarda viral enfeksiyonlara karşı dirençli türler geliştirmek için genetik araştırmalar artmış ve bu alanda enfeksiyonlara daha dirençli yeni çeşitler geliştirilmiştir (Martín-Hernández, 2022).

Kabakgilleri hastalandıran viral hastalık etmenleri içerisinde yer alan ve bu tez çalışmasına konu olan WMV (*Potyvirus citrulli*), tüm dünyada yaygın olarak bulunan ve kabakgillerde ciddi seviyelerde ekonomik zarar yapan ipliksi yapıda bir RNA virüsüdür (Shoeibi, 2010). Webb ve Scott (1965) tarafından ilk olarak tanımlanan virüs, başlangıçta WMV-1 ve WMV-2 olarak isimlendirilerek 2 farklı grupta ele alınmış, daha sonra ise 3 farklı virüs (Karpuz mozaik virüsü, Papaya halkalı virüsü ve Fas karpuz mozaik virüsü) olarak tanımlanmıştır (Lecoq, 2008). Karpuz mozaik virüsü dünya genelinde ılıman iklim koşullarında ve Akdeniz havzasında oldukça yaygındır (Sharifi, 2008). Deneysel olarak 170'ten fazla bitki türü ve 27'den fazla bitki familyasında enfeksiyona yol açtığı tespit edilmiştir (Shukla, 1992). Potyviridae familyası içerisinde oldukça geniş bir cins olan *Potyvirus* üyesi olan alan WMV'nin genomu yaklaşık olarak 10 kb büyüklüğünde tek sarmallı ve pozitif duyarlı RNA'dan oluşmaktadır. Bu genom, 3217 amino asitten oluşan bir poliprotein kodlayan açık okuma çerçevesini içerir (Sharifi, 2008). WMV bir protein kılıf ile çevrilidir ve bu kılıf yaklaşık 49 kDa büyüklüğündedir (Purcifull, 1979).

WMV ile enfekteli bitkilerde genel olarak bodurluk, yapraklarda kloroz, mozaik ve deformasyon görülürken, genç sürgünlerde iplikleşme meydana gelmekte ve bunun sonucunda çiçek ve meyve azalması gerçekleşerek önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır (Greber, 1978). WMV, kabakgillerin tamamına yakınında mozaik ve leke belirtilerine neden olan bir hastalık etmeni olup, hastalık şiddeti ve simptomatolojik tablo viral varyantlara/ırklara ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişebilir (Greber, 1978). Yapraklardaki belirtiler arasında yeşilimsi mozaik görüntü, yaprak deformasyonu, yeşil damar bantlaşması, klorotik lekeler ve şekil bozuklukları yer alır (Purcifull, 1984). WMV ile enfekteli kabakgiller bitkilerinde ilerleyen enfeksiyonlar sonucunda gelişme geriliği, kloroz (sararma), mozaik desenler, deformasyon, genç sürgünlerde iplikleşme ve çiçek azalması gibi belirtilerle ortaya çıkmakta ve bu durum ciddi ürün kayıplarına neden olmaktadır (Dukic, 2002). 2000'li yıllara kadar, WMV'nin yayılımının az, belirtilerin ve kültürel alanda etkilerinin düşük olduğu ve bu sebeple önemsiz olduğu düşünülmüş fakat 2000 yılından itibaren farklı ırklar tarafından meydana getirilen çeşitli nekroz

türleri tespit edildiği, bu durumun meyve verimi ve kalitesi üzerinde olumsuz yönde önemli bir etki oluşturduğu iddia edilmiştir (Crescenzi, 2001). WMV, Aphididae takımına ait en az 38 yaprak biti türü ile non-persistent yolla çok etkili ve kolay bir şekilde yayılabilme yeteneğine sahip olup, düşük sayıda yaprak biti popülasyonunda dahi yüksek düzeyde hastalığa neden olabileceği belirtilmiştir (Yamamoto, 1982). WMV'nin kabakgillerde farklı türlerde göstermiş olduğu simptomlar Tablo 1.2'de özetlenmiştir (Keçe, 2016).

Tablo 1.2. Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan indikatör bitkiler ve WMV enfeksiyonu sonucunda gözlenen simptomlar (Keçe, 2016).

İndikatör Bitki Adı	Latince Adı	Gözlenen Simptomlar
Kabak	<i>Cucurbita pepo</i> L.	M, De, K, DB
Kavun	<i>Cucumis melo</i> L.	M, De, K, DB
Hıyar	<i>Cucumis sativus</i> L.	M, De, K, DB
Karpuz	<i>Citrillus lanatus</i> (Thunb.) Matsum. & Nakai	M, De, K, DB
Akkazayağı	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	KLL
Hanım Düğmesi	<i>Gomphrena globosa</i> L.	KLL

M: Mozayik, **De:** Deformasyon, **K:** Kabarcıklaşma, **DB:** Damar bantlaşması 1

Bitki virüsleri yüksek mutasyon kabiliyetine sahip mücadelesi zor organizmalar oldukları için genomik özelliklerinin aydınlatılması çok büyük önem arz etmektedir. Potyvirusler ile ilgili yapılan çeşitli çalışmalar genomda patojenisiteden sorumlu gen bölgelerinin varlığını ve bu gen bölgelerindeki genetik çeşitliliğin patojenisiteyi etkileyebildiğini ortaya koymaktadır. Özellikle potyvirus genomunda P1 bölgesinin patojenisite ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bir potyvirus olan WMV, bu bağlamda tez çalışmasına konu edilerek, Türkiye'nin farklı lokasyonlarından toplanan WMV izolatlarının patojenisiteden sorumlu olduğu değerlendirilen P1 gen bölgelerinin moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilerek popülasyon genetiği dinamikleri yönünden ilk kez araştırılmıştır.

1.1 WMV'nin Global Ölçekteki Durumu ve Çeşitli Araştırmalar

ABD'de yürütülen bir çalışmada Arizona'da kabak tarlalarında tespit edilen virüsler içerisinde yoğunluk bakımından en yoğun CMV ve WMV olarak gözlemlenmiştir (Grafton-Cardwell, 1996).

Yugoslavya'da kabaklarda bulunan virüslerin biyolojik ve serolojik özelliklerini incelemek amacıyla yürütülen ELISA testleri sonucunda ZYMV, CMV ve WMV virüslerine rastlanmıştır (Dukic, 2002).

Desbiez vd. (2004) tarafından yapılan çalışmada WMV'nin Soya fasulyesi mozaik virüsü (Soybean mosaic virus; SMV) ile yüksek dizi benzerliğine sahip olduğu, farklı ve çok daha geniş konukçu aralığına rağmen neredeyse bir SMV izolatu olarak kabul edilebileceğini belirtmişlerdir. Aynı çalışmada WMV'nin P1 bölgesinin Soya fasulyesi mozaik virüsü'nün P1 bölgesinden 135 amino asit daha uzun olduğu, P1'in N-terminal yarısı SMV ile ilişkisi olmadığı ancak Fasulye adi mozaik virüsü (Bean common mosaic virus; BCMV) ile %85 benzerlik gösterdiğini tespit edilmiştir. Bu bulgular sonucunda Karpuz mozaik virüsünün bir rekombinasyon sonucu ortaya çıktığı görüşünü paylaşmaktadır (Desbiez, 2004).

İspanya'da yapılan bir çalışmada kavun bitkisinden alınan örneklerden elde edilen WMV izolatları incelenmiş ve ortak genetik yapının aydınlatılması üzerine araştırmalar yapılmıştır. Konukçu bitki üzerinde yapılan araştırmalarda belirtilerinin çok benzer olduğu ve genetik yapısının da diğer gruplar ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Moreno, 2004).

İran'da 2008 yılında yapılan bir çalışmada 2004-2005 yıllarında, Yazd, Esfahan, Batı Azerbaycan, Hormozgan ve Kerman'da bulunan alanlardan, viral enfeksiyon belirtileri gösteren, kabak ve yabani kabakgil türlerinden toplanan 757 adet örnek WMV varlığı açısından testlenmiştir. Yapılan serolojik çalışmalar 190 örneğin WMV ile bulaşık olduğunu göstermiş ve seçilen izolatlardan 18'inin kılıf proteini (CP) geni PCR ile amplifiye edilmiş, klonlanmış, dizilenmiş ve GenBank'teki dizilerle karşılaştırılmıştır. Kılıf protein bölgesinin 778 nükleotid uzunluğundaki dizileri kullanarak yapılan filogenetik analiz, bu izolatların iki gruba ayrıldığını göstermiştir (Sharifi, 2008).

2009 yılında Polonya'da yürütülen bir çalışmada viral enfeksiyon belirtileri gösteren 15 adet kabak bitkisi örneği 3 ayrı üretim alanından toplanarak incelenmiş ve tüm örnekler, WMV, ZYMV ve PRSV tespiti için ticari antiserumlarla DAS-ELISA yöntemiyle analize tabi tutulmuştur. Her örnekte WMV tespit edilmiş ancak

ZYMV ve PRSV için kullanılan antiserumlarda pozitif reaksiyon gözlenmediği görülmüştür. ELISA ile tespit edilen WMV varlığı, RT-PCR ile doğrulanmış, enfekte kabak yapraklarından fenol-kloroform yöntemiyle toplam RNA ekstraksiyonu yapılarak RNA örnekleri, WMV'nin kılıf protein (CP) geninin belirli bölgesini amplifiye etmek için tasarlanmış özgül primerlerle WMV varlığı açısından test edilmiştir. PCR ürünleri klonlanarak dizi elde edilmiştir. Elde edilen 822 nükleotidlik ampikon Çin ve Kore'den bildirilen WMV dizileriyle (%98) ve Fransa ile Pakistan'dan gelen WMV dizileriyle (%93) benzerlikleri tespit edilmiştir. Bu çalışma sonuçları ile Polonya'da WMV'nin doğal olarak ilk kez rapor edildiği düşünülmektedir (Borodynko, 2009).

Desbiez ve arkadaşlarının 2009 yılında yayınlanan çalışmalarında Güneydoğu Fransa'da kabak bitkilerinde görülen şiddetli WMV belirtileri incelenmiş ve WMV izolatlarının kökeninin araştırılması amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalarda kabak bitkisindeki belirtilerin "klasik" (CL) izolatlardan farklı olarak yeni "emergen" (EM) izolatlarındaki kaynaklı olduğu anlaşılmıştır. WMV izolatları, polimeraz ve kılıf protein kodlayan bölgelerin bir kısmının dizilenmesiyle karakterize edilmiştir. Bu analiz sonucunda, EM izolatlarının sadece Güneydoğu Fransa'da bulunduğu, CL izolatlarının ise ülke genelinde yaygın olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar, EM izolatlarının uzak coğrafi bölgelere yayılmadığını, ancak hızla önceki klasik (CL) izolatlarını değiştirdiğini ortaya koymuştur (Desbiez, 2009).

2011 yılında yapılan bir çalışmada Slovakya ve İran'dan elde edilen toplam 36 adet WMV izolatının genetik çeşitliliği belirlenerek iki farklı genomik bölgesi dizi analizi ile incelenmiş (P1 ve N1b-VP) ve slovak WMV izolatlarının daha fazla çeşitliliğe sahip olduğu tespit edilmiştir (Glaser, 2011).

2012 yılında Sırbistan'da yapılan bir çalışmada 2007 yılından itibaren 5 yıllık süreçte viral belirtiler gösteren bitkilerden toplanan 700 den fazla örnek serolojik yöntemler ile incelenmiş çıkan sonuçta %79.2 oranında ZYMV, %32.2 oranında WMV, %12.8 oranında ise CMV'e rastlanmıştır (Ana ve Aleksandra, 2012).

Yapılan bir çalışmada WMV-Le olarak tanımladıkları WMV-2 izolatının biyolojik ve moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu izolatın tüm genomunun 10.045 nükleotid içerdiğini ve WMV-C05-270 kodlu Fransız izolatı ile %99.1 benzerliği olduğunu saptamışlardır. Yapılan sera denemelerinde karpuz

bitkilerinde arazi simptomunun zayıf gözlenmesine rağmen, hıyar, kavun, yazlık ve kışlık kabakta şiddetli belirtiler verdiğini rapor etmişlerdir (Finetti Sialer, 2012).

İran'da 2012 yılında yapılan bir çalışmada, İran'ın iki bölgesinden toplanan kabakgillerde WMV tespiti universal *potyvirus* primerleri (NIb2F/NIb3R) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İncelenen 55 örneğin 21'inde virüsün genomunun 350 bp büyüklüğündeki bir bölgesi çoğaltılmıştır. Nükleotid dizilerinin belirlenmesinden sonra, WMV'nin kabakgillerde enfeksiyona neden olan virüs olarak tanımlandığı tespit edilmiştir. Dizilen genomik bölge, dünya çapında 36 izolatanın dizileriyle karşılaştırılmış ve filogenetik analizler, Ahr-sq205, Gogsq41 ve Ahr-sq206 izolatlarının bir küme oluşturduğunu, Zyn-sq167 ve Khl-ct180 izolatlarının ise Amerika ve Şili izolatlarıyla birlikte başka bir küme oluşturduğunu göstermiştir. Daha önce dizilen İran izolatu ise Fransa ve İtalya izolatlarıyla aynı kümede yer almıştır. Bu bulgular, farklı coğrafi bölgelerden WMV izolatları arasındaki genetik ilişkileri ortaya koymaktadır (Ghasemzadeh, 2012).

Akhtar Ali ve arkadaşlarının 2012 yılında güney Amerika'da yaptıkları bir çalışmada kabakgilleri enfekte eden virüslerin oransal dağılımını tespit etmek amacıyla 10 eyaletten toplamda 715 viral enfeksiyon belirtisi gösteren bitkilerden yaprak örnekleri toplamışlardır. RT-PCR ile test edilen bitkiler üzerinde Yonca mozaik virüsü (Alfalfa mosaic virus; AMV), Fasulye bakla leke virüsü (BPMV), Kabaklarda yaprak sararması virüsü (CABYV), Kabak sarı çökertme hastalığı virüsü (CYSDV), Salatalık yeşil mozaik virüsü (CGMMV), Salatalık mozaik virüsü (CMV), Kavun nekrotik leke virüsü (MNSV), Papaya halkalı leke virüsü-W (PRSV-W), Kabak yaprak kıvrılma virüsü (SLCuV), Soybean mozaik virüsü (SMV), Kabak mozaik virüsü (SqMV), Kabak damarsarıklık virüsü (SqVYV), Tütün halkalı leke virüsü (TRSV), Karpuz mozaik virüsü (WMV), Kavun gümüşü leke virüsü (WSMoV), Kabak sarı mozaik virüsü (ZYMV) ve Kabak yeşil mozaik virüsü (ZGMMV) tespit edilmiştir. Tespit edilen virüslerin oransal dağılımı WMV (%30,6), ardından PRSV-W (%24,7), ZYMV (%13,9), TRSV (%5,7), SqMV (%3,5) ve MNSV (%2,6) olarak belirlenmiştir (Akhtar Ali, 2012).

Bosna Hersek Laktas bölgesinde 2014 yılında WMV varlığını tespit etmek için yapılan bir araştırmada, kavun ve karpuz tarlasında mozaikleşme, buruşukluk yeşil damar bandı ve sıklaşan küçülmüş yapraklar ile yaprak kıvrılmaları gösteren bitkilerden örnekler alınmış ve kavun ve karpuz bitkilerinin %10'unda WMV tespit edilmiştir. ELISA testleri ve moleküler analizlerle virüsün varlığı doğrulanmıştır.

Serolojik tespit RT-PCR kullanılarak WMV5 ve WMV3 primerleriyle doğrulanmış iki WMV izolatı arasında %91,5 nükleotid benzerliği (aa %94,6) bulunmuş olup bu bulgular, Bosna Hersek'te WMV nin yeni konukçulara yayıldığını ve bazı kabak türlerinde ise daha şiddetli simptomlara neden olabileceğini göstermiştir (Trkulja, 2014).

Suudi Arabistan'da yürütülen bir çalışmada WMV ile mücadelede Mazı (*Thuja orientalis*) bitkisi ekstraktının 6g/l oranında kullanımının WMV'nin bitki üzerindeki olumsuz etkilerinin azaltılması açısından başarılı sonuçlar verdiği iddia edilmiştir (Esam ve Elbeshehy, 2015).

Çin'de 2017 yılında yapılan bir çalışmada WMV izolatlarının biyolojik özelliklerinin araştırılması konu edinmiş ve Xinjiang bölgesinde farklı coğrafi kökenlere ait ve kavunları enfekte eden 11 WMV izolatı deneysel konukçular üzerinde denemeler yapılarak araştırılmıştır. Yapılan inokülasyon sonrası sonuçlar diğer ülke izolatları ile karşılaştırıldığında farklılıklar gözlemlenmiştir. Buradan hareketle farklı bölgelerdeki izolatlar ile bitki tepkilerinin farklı olduğu ve araların da ilişki olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu çalışma da JS-1 izolatı *Cucurbita moschata* (Bal kabağı) üzerinde hafif mozaik belirtiler gösterirken diğer 10 izolatın bitki üzerinde bir simptom göstermediği gözlemlenmiştir. 11 izolatın tümü *Cucurbita pepo* (Kabak) ve *Cucumis melo* (Kavun) bitkilerinin sistemik olarak enfekte etmiş ve şiddetli simptomlar görülmüştür. Tüm izolatlar *Nicotiana tabacum* (Tütün) bitkisini sistemik olarak enfekte etmiş ve hafif mozaik görüntü ile belirti göstermiştir. *Chenopodium amaranticolor* (Sirken) ve *Chenopodium quinoa* (Kinoa) bitkilerinde ise klorotik lokal lezyonlara sebep olmuş ve yapraklardan inoküle edilen örnekler RT-PCR ile test edilerek tespit edilmiştir. Bu sonuçlar WMV'nin biyolojik farklılıklarını anlamak için yürütülmüş ve çalışma sonucu tespitleri ile izolatların diğer bitki türleri üzerindeki simptomları açısından aydınlatıcı olmuştur (Dong, 2017).

Güney Kore'de yapılan bir başka çalışmada, viral hastalıkların incelenmesi sırasında, WMV spesifik primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR ile ginseng, küme ebegümeci (*Malva verticillata*) ve balkabağı (*Cucurbita moschata*) dahil olmak üzere toplanan örneklerin çoğunda WMV tespit edilmiştir. Küme ebegümeci bitkisinden elde edilen enfekte dokular, *Cucurbita pepo* (Kabak) ve *C. moschata* gibi bitkilerde sistemik belirtilere neden olduğu iddia edilmiştir. WMV'nin genetik özelliklerini belirlemek için tam genomik RNA amplifikasyonu ve dizi analizi

yapılmış, elde edilen WMV izolatının, Kore'deki diğer WMV izolatlarıyla yüksek benzerlik gösterdiği ve salatalık, karpuz ve kabak gibi bitkilerde ciddi hastalık riski oluşturduğu belirlenmiştir. Bu çalışma, WMV'nin ginseng bitkilerindeki doğal yayılımını ve potansiyel risklerini anlamak için önemli bilgiler sağlamıştır (Kim, 2018).

Hindistanın Rajathsan bölgesinde karpuz yetiştirilen bölgelerde yapılan bir çalışmada WMV varlığı bitkilerden alınan doku örneklerinin incelenmesi sonucu tespit edilmiş ve gen bölgeleri incelenmiş, genomik segmentleri arasında farklılıklar tespit edilmiştir. Bunun virüslerin evrimsel değişiminin bir sonucu olduğu idda edilmiştir. Araştırma bulguları ile WMV izolatlarının 3 kümeye ayrıldığı ve Hint WMV izolatlarının Fransız izolatları ile birlikte kümelendiği tespit edilmiştir (Verma vd., 2020).

Mısır'da yürütülen bir çalışmada viral enfeksiyon belirtileri gösteren bitkilerden alınan örnekler laboratuvarında araştırılarak WMV tespiti yapılmış, WMV'nin kılıf protein geni için özel olarak tasarlanmış primerler kullanılarak RT-PCR yöntemi ile kullanılarak kılıf protein geninin 825 bp'lik bölgesi çoğaltılmıştır. Dizilenen izolatın gen bankasında bulunan diğer izolatlar ile %95 ila %99 arasında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Gehan ve Mohamed, 2020).

İtalya'da 2002 ile 2009 arasında toplanan WMV izolatlarının çoğunun klasik olarak bilinen WMV izolatlarıyla aynı olduğu ancak 2012 yılından itibaren araştırmalarda farklı izolat türlerinin tespit edildiği ve bununda genetik çeşitlilik ile ilişkilendirildiği ancak çalışmaların artarak izolatların pozitif seçim yada haplotip coğrafi yapısı tespitleri yapılması gerektiği rapor edilmiştir. Yine aynı çalışmada Fransada 1970'lerden beri "klasik izolat" olarak tanımlanan izolatın 1999'lardan itibaren emerging "çıkış yapan" olarak adlandırılmaya başlanmıştır. N terminal kısmını kodlayan bölgede aminoasit dizilimde farklılıklar rapor edilmiş, genetik çeşitlilik gözlemlenmiş ve bunun Asya kökenli izolatlar ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Bertin vd., 2020).

2011 – 2018 yılları arasında Arjantin'de WMV izolatlarının moleküler farklılıklarını kısmi dizilere dayanarak değerlendirilen ve dünyanın diğer bölgelerinden elde edilen izolatlar ile karşılaştırmaları yapılan bir çalışmada 10 eyaletten toplanan ve doğal olarak enfekteli materyallerden elde edilen WMV izolatları 3 farklı filogenetik gruba ayrılarak incelenmiş, genetik farklılığın yani

evrimsel baskının negatif olduğu, değişimin çok yavaş olabileceği sonucuna varılmıştır (Pozzi, 2020).

Amerika’da güney bölgelerde bulunan 9 eyalette kabak bitkilerinden elde edilen 57 izolat ile yapılan bir çalışmada WMV izolatlarının genleri kopyalanıp dizinlenmiş ve farklı bölgelerden bildirilen 89 WMV izolatı ile karşılaştırıldığında %88.9 ile %99 ve %91.5 ile %100 aralıklarında farklılık/çeşitlilik gözlemlenmiştir. Buradan sonuçla ABD özelinde WMV’nin coğrafi kökenlerine ve konukçularından bağımsız 3. gruba ait oldukları tespit edilmiştir. Bu çalışmada Seçilen 37 tam genom dizisinin filogenetik analizi, çalışmada belirtilen ana gruplamayı desteklemektedir. CP genindeki rekombinasyon analizi, ABD'deki WMV izolatlarının evrimi için iki baskın kuvvet olan koruyucu seçim ve rekombinasyonun meydana geldiğini doğrulamıştır (Abdalla ve Ali, 2021).

2021 yılında İran’da yürütülen bir çalışmada İran ve Irak’tan toplanan 9 farklı izolatın yayılımı, genetik çeşitliliği ve filogenetik analizin araştırılmış ve gen bankasında bulunan diğer WMV izolatları ile karşılaştırılmıştır. 4 Irak izolatı arasındaki kısmi CI geninin dizi benzerliği, nükleik asit düzeyinde %92,11 ile %99,71 arasında değişirken, amino asit düzeyinde ise %97,41 ile %99,14 arasında değişmekte olduğu gözlemlenmiştir. Öte yandan, İran izolatları arasındaki benzerlik nükleotid düzeyinde %94,55 ile %99,14 arasında ve amino asit düzeyinde %98,71 ile %100 arasında değiştiği saptanmıştır. İran ve Irak izolatları arasındaki benzerlik ise nükleotid düzeyinde %91,54 ile %99,71 arasında, amino asit düzeyinde ise %96,98 ile %100 arasında değişme görülmüştür. Bu sonuçların, kısmi CI geninin nükleotid düzeyinde yüksek bir değişkenliğe işaret ettiği, ancak çoğu mutasyon sessiz olduğundan, amino asit korunumu için yüksek bir seçimin olduğunu göstermiştir. Araştırılan izolatların GenBank'taki diğer WMV referanslarıyla karşılaştırıldığında, en yüksek (%99,71) nükleotid benzerliğini İran (wMV6) ve bir Fransız izolatı (JF273460) arasında bulunduğu gözlemlenmiş. En düşük nükleotid (%89,48) benzerliği ise İran (wMV8) ve başka bir Fransız izolatı (JF273467) arasında bulunmuştur. Fransa JF273460 ve İspanya (MH469650 ve MH469651) gibi izolatlar, İran wMV1, wMV3 ve wMV5 izolatları ile amino asit düzeyinde %100'lük en yüksek benzerliği sergilemiştir. En düşük amino asit benzerliği (%96,81) ise wMV5 ve Güney Kore'den KT992077 izolatları arasında gözlemlenmiştir (Hayder ve Alinizi, 2021).

2021 yılına ait bir çalışmada WMV ile birlikte kabak türlerinde sıkça Cucurbit yellow stunting disorder virus (Kabak sarı bodurluk virüsü) virüsünün birlikte bulunduğu ve bu iki türün birbirlerini etkiledikleri tespit edilmiştir (Domingo-Calap, 2021).

İran'da yürütülen bir başka çalışmada iki farklı bölgeyi hedefleyen primer çifti (CI, NIb) ile yapılan RT-PCR amplifikasyonunun sonuçları, MN464243-MN464256 erişim numaralarıyla GenBank veritabanında depolanan WMV'ye ait 10 örneğin 5'inde (%50) enfeksiyon olduğunu doğrulamıştır. Diğer virüslerle enfeksiyon oranı, sırasıyla ZYMV için %30 ve CMV için %20 olarak tespit edilmiştir. . Bu çalışma da İranda tespit edilen WMV1,WMV2,WMV3,WMV4 VE WMV5 izolatlarının gen bankasında diğer WMV izolatları ile karşılaştırılmaları sonucu ise WMV2 izolatı ile bir Fransız izolatının (JF273460) %99,71 ile en yüksek nt benzerliğine sahip olduğu, WMV4 izolatının ise %89,48 ile en düşük nt benzerliğinin yine bir Fransız izolatı (JF273467) arasında olduğu tespit edilmiş. WMV1,WMV3 ve WMV5 izolatları ise Fransa ve İspanya izolatları ile aa düzeyin de %100 lük bir benzerlik göstermiştir (Hayder ve Alinizi, 2021).

Farklı virüslerin birbirleri ile etkileşimlerinin gözlemlendiği bir çalışmada WMV ile CYSDV arasındaki etkileşimin incelenmesi sonucu sinerjik etki gösterdiği sonucu gözlemlenmiştir. Bu virüsler arasındaki etkileşimi daha iyi anlamak için tütün *Nicotiana benthamiana* bitkisinin yapraklarında farklı virüs proteinlerinin bir arada kullanılmasıyla RNA baskılayıcılarının (RSS'ler) aktivitesi incelenmiştir. WMV'nin güçlü RSS etkisi olan Helper Component Proteinase (HCPro) proteininin etkilenmediği, ancak daha zayıf RSS etkisine sahip CYSDV Cucurbit yellow stunting disorder virus P25 proteininin HCPro ile birlikte olduğunda belirgin bir etkileşim gözlenmiştir. Bununla birlikte, WMV P1 proteininin P25'in RSS aktivitesi üzerinde beklenmedik bir olumsuz etkisi olduğu görülmüş, P1'in P25 miktarını azaltmadığı tespit edilmiştir. P1'in P25 üzerindeki zararlı etkisinin doza bağlı olduğu ve P1 ile P25'in geçici olarak birlikte olduğunda, bu proteinlerin hücresel yerleşimi hem çekirdekte hem de sitoplazmada örtüştüğü görülmüştür. Ayrıca, immunopresipitasyon deneyleri, bu iki proteinin etiketlenmiş versiyonları arasında etkileşim olduğunu göstermiştir. Bu potyvirusler ve criniviruslerin diğer kombinasyonlarında daha önce belirtilmemiş olan bu yeni etkileşim, duyarlı bitkilerde birden fazla viral enfeksiyona yanıtın karmaşıklığını

düzenlemeye yardımcı olabilir sonucunu ortaya çıkarmıştır (Domingo Calap, 2021).

Çin’de WMV’e karşı dayanıklı kabak türlerinin araştırılmasına yönelik yapılan bir çalışmada örtü altı serada fidanlık aşamasında 20 adet *Cucumis metuliferus* (Boynuzlu kavun) materyali WMV’nin mekanik inokulasyon yoluyla enfekte edilmiştir. Çalışma, *C. metuliferus*’un WMV için bir konukçu olduğunu ve çeşitleri içinde zengin dirençli genotipleri sergilediğini ortaya koymuştur. Özellikle, PI292190 WMV’ye karşı bağışıklık göstermiş, PI202681, Hm4-1-1, Hm1-4-1 ise yüksek dirence sahip olduğunu göstermiştir. Bu çalışma, *C. metuliferus*’ta direnç mekanizması ve antiviral genlerin transformasyonu için zengin dirençli materyaller sağlayabilir (Qiang, 2021).

İran’da 2021 yılında yapılan bir çalışmada 2016 yılında viral enfeksiyon belirtileri gösteren 305 ayrı bitkiden toplanan örnekler laboratuvarında analiz edilerek 80 tanesinin WMV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Bulunan WMV izolatlarının CP geni 780 bp, P1 geni ise 545 bp uzunluğun da RNA parçaları amplifiye edilerek filogenetik ağaçları CP geni için dN/dS oranları < 1 çıkmış olup WMV popülasyonları negatif seçim altında bulunmuştur (Nematollahi, 2021).

Suriye’nin Latakia ve Tartus bölgesinde viral enfeksiyon belirtileri gösteren Kabakgil bitkilerinden alınan toplam 293 adet örnek laboratuvarında DAS-ELİSA testleri ile analiz edilmiş ve çalışma sonucunda karpuz bitkisi üzerinde %36,95 kabak bitkisi üzerinde %26,31 balkabağı üzerinde %29,27 ve salatalık bitkisi üzerinde %37,70 oranında WMV tespit edilmiştir. Biber üzerinde Suriye’de ilk kez WMV virüsü %2,94 oranı ile kayıtlara geçmiş, patates ve fasulyede ise beklendiği üzere WMV tespit edilmemiştir (Muhanna, 2021).

2023 yılında Çek Cumhuriyeti’nde yürütülen bir çalışmada 5 WMV Çek izolatının genetik yapısını belirlemek için yüksek verimli dizileme yöntemleri kullanılarak tüm genom analizi yapılmıştır. Sonuçlar, WMV izolatlarının çoğunun Avrupa kökenli olduğunu, ancak şaşırtıcı bir şekilde genomların büyük bir kısmının rekombinant olduğu belirlenmiştir. Rekombinasyon analizi, WMV’nin genetik çeşitliliğinin altında yatan önemli bir faktör olduğunu ortaya koymuştur. Bulgular, WMV’nin kökeninin binlerce yıl öncesine dayandığını ve karpuzun ticari bir ürün olarak yetiştirilmeye başlamasından sonra patojenik hale geldiğini göstermektedir. Bu çalışma, WMV’nin evrimi ve yayılımı hakkında daha derin bir anlayış sağlamaktadır (Karima Ben Mansour, 2023).

1.2 WMV'nin Türkiye'deki Durumu ve Çeşitli Araştırmalar

Trakya bölgesi'nde 2005 yılında yürütülen bir surveyde Tekirdağ, Edirne ve Kırklareli illerinde 17 adet kavun tarlası ve 19 adet karpuz tarlasından toplanan örnekler CGMMV, ZYMV ve WMV, CMV, papaya halka leke virüsü-W (PRSV-W), kabak mozaik virüsü (SqMV), kavun nekrotik leke virüsü (MNSV) varlığı araştırılmış ve toplanan toplam 502 örnek içerisinde 333 tanesinde viral enfeksiyon tespit edilmiştir. Tekirdağ'daki 235 bitki örneğinin 167'si, Edirne'deki 187 örneğin 103'ü ve Kırklareli'ndeki 80 örneğin 63'ü pozitif sonuçlanmıştır. Karpuz tarlalarında ZYMV (%45,5), WMV-2 (%34,2), CMV (%19,9), PRSV-W (%2,1), SqMV (%1,8) ve MNSV (%0,4), kavunda ise ZYMV (%40,3), WMV-2 (%31,2), CMV (%7,2), PRSV-W (%2,3), SqMV (%0,5) ve MNSV (%1,8) oranında enfeksiyon varlığı belirlenmiştir (Köklü, 2006).

Adana'da yapılan bir çalışmada, kabakgil yetiştirilen bölgelerde mozaikleşme, meşe yaprağı görüntüsü, yapraklarda deformasyon belirtileri olan ve doğal enfeksiyon halindeki bitkilerden alınan örnekler ile DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemi ile karakterize edilmiş ve elde edilen izolatlar incelendiğinde asya izolatları ile benzer oldukları tespit edilmiştir (Kamberoğlu, 2016).

2019 yılında Türkiye Adana ve Mersin illerinde karpuz yetiştirilen bölgelerden toplanan örneklerden WMV'ye özgü WMV-3 (CCCA YCAACTGT YGGAAG) ve WMV-5 (GGCTTCTGAGCAAAGATG) primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR çalışmaları sonucunda 408 bp büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir. RT-PCR çalışmaları sonucunda Tarsus (WMV-6, kavun), Tuzla (WMV-7, kavun), Silifke (WMV-13, karpuz), Kozan (WMV-19, karpuz) izolatları alındıkları bölge ve bitki türü dikkate alınarak seçilmiş ve dizi analizi ve filogenetik sınıflandırma çalışmalarında kullanılmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen WMV izolatları, Türkiye (EU660579), Kore (AB369278), Fransa (JF273463 ve JF273462), İtalya (FJ823122) ve Japonya (AB353119) gibi WMV izolatlarına % 86,8 ile % 97,7 arasında benzerlik göstermiştir ve filogenetik ağaç üzerinde WMV'nin şiddetli ırkının dahil olduğu G3 grubunun EM3 alt grubunda yer almıştır (Özçınar, 2020).

Örs vd. 2021'nin yaptıkları bir çalışmada Malatya'daki kabak yetiştirme bölgelerinde 2016-2017 yılları arasında, Arapgir, Arguvan ve Battalgazi ilçelerinden 110 kavun, 25 balkabağı ve 27 karpuz örneği olacak şekilde toplam 162 yaprak örneği toplanmış, RT-PCR testleri sonucunda Arapgir ve Arguvan'dan

toplanan örneklerde herhangi bir virüse rastlanmamıştır. Ancak, Battalgazi ilçesinde 1 salatalıkta CMV, 5 balkabağında ZYMV ve 6 karpuzda WMV enfeksiyonları tespit edilmiş. ZYMV-Malatya ve WMV-Malatya izolatlarının nükleotid dizileri incelendiğinde, ZYMV izolatının dünya çapındaki diğer izolatlara yüksek benzerlik gösterdiği (CP geninde mutasyon olmadan), WMV izolatının benzersiz bir mutasyon yeri içerdiği belirlenerek bu izolatların GenBankasına kaydedilmek suretiyle erişim numaraları alınmıştır (Örs, 2021).

2021 yılında yapılan bir çalışmada, 2017-2019 yılları arasında kabak bitkilerinden üzerinde viral etmen semptomları taşıyan 625 örnek toplanmış ve WMV %56,96 oranında, ZYMV %56 oranında ve CABYV %20,16 oranında tespit edilmiştir. CMV (2), WMV (12), ZYMV (6) ve CABYV (4) olmak üzere seçilen 24 izolatın dizilenmesi yapılmış ve GenBank veritabanına kaydedilmiştir. Filogenetik analiz, bu virüslerin Türk izolatlarının filogenetik ağaçlarda aynı kümeleri oluşturduğunu ve genellikle komşu ülkelerin izolatlarıyla yüksek benzerlikler gösterdiğini ortaya koymuştur (Yeşil, 2021).

2024 yılında Iğdır'da CMV ve WMV tespiti için yapılan çalışmada, Iğdır'ın farklı ilçelerinden 23 adet kavun bitkisi, 28 adet karpuz bitkisi yaprakları karışık şekilde toplanmış (Viral enfeksiyon semptomları gösteren ve göstermeyen) ve bu örnekler CP genine özgü primerler kullanılarak RT-PCR ile test yapılmış ve CMV ile WMV için istenilen boyutlarda gen bölgeleri çoğaltılmıştır. Bu bölgelerin GenBank erişim numaraları alınmıştır. Bu çalışmada yapılan dizi analizleri, CMV için 593 baz çifti ve WMV için 822 baz çifti içerdiğini ve kısmi CP genine karşılık geldiğini göstermiş olup, her iki virüs için de farklı coğrafi bölgelerden ve bitki materyallerinden elde edilen izolatlarla filogenetik ilişkiler incelenmiştir. Oluşturulan filogenetik ağaç, CMV-Iğdır izolatının Grup I ve alt grubu B'de yer aldığını ve WMV-Iğdır izolatlarının farklı gruplarda bulunduğu sonucunu göstermiştir. Bu çalışma, Iğdır ilinde karpuz ve kavunda CMV ve WMV'nin ilk kez tespit edildiğini ve CMV'nin grup/alt grup atamalarının ortaya çıkarıldığını göstermiştir (Güller, 2024).

Antalya ve Denizli'de yürütülen bir çalışmada bazı kabakgil bitkilerinde 53 adet yaprak örneği alınmış ve yapılan RT-PCR sonucunda CP'e spesifik primer setleri ile 820 bp'lik bir gen bölgesi çoğaltılmıştır. Alınan örneklerin içerisinde kavun bitkisinde 11, karpuzda 8, yılan kavunu bitkisinde 7, kabak bitkisinde ise 5 ile toplam 53 örneğin 31'inde WMV izolatı tespit edilmiştir. Virüs izolatlarının

moleküler özelliklerini daha iyi anlamak için çoğaltılan amplikonlar uygun prokaryotik plazmidlere klonlanılarak dizilenmiş ve GenBank'a kaydedilmiştir. Biyoinformatik analizler, tanımlanan CP geni dizilerinin önemli nükleotid homojenliğini ortaya koymuş ve dünya çapındaki izolatlarla yüksek benzerlik gösterdiğini ortaya çıkarmış (Güller, 2024).



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Virus İzolatları

Bu çalışmada Eskişehir, Ankara ve Nevşehir illerinden toplanan ve serolojik olarak WMV ile enfekteli olduğu doğrulanmış 10 adet WMV ile bulaşık kabakgil bitkisi virus kaynağı olarak kullanılmıştır. Yapılan arazi çalışmalarında toplanan hastalıklı bitki kısımları 2020 yılından bu yana -80 °C'lik derin dondurucularda muhafaza edilmektedir. Örneklerin toplandığı alanlar ve konukçularına yönelik detaylı bilgi Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan WMV izolatları ve survey illeri.

No	Konukçu	İzolat Numarası	Toplandığı İl
1	<i>Cucumis melo</i> L.	AY-4	Eskişehir
2	<i>Cucurbita moschata</i> Duch.	AY-5	Eskişehir
3	<i>Cucurbita moschata</i> Duch.	AY-6	Eskişehir
4	<i>Cucurbita moschata</i> Duch.	AY-8	Nevşehir
5	<i>Cucurbita moschata</i> Duch.	AA-2	Ankara
6	<i>Cucurbita moschata</i> Duch.	AA-3	Ankara
7	<i>Cucurbita pepo</i> L.	AE-7	Eskişehir
8	<i>Cucurbita pepo</i> L.	AE-9	Eskişehir
9	<i>Cucurbita pepo</i> L.	AE-22	Eskişehir
10	<i>Cucurbita pepo</i> L.	AE-24	Eskişehir

2.2 DAS-ELISA testi

WMV ile enfekteli örneklerin DAS-ELISA testi yardımıyla yeniden doğrulanması için AGDIA (Elkhart IN, ABD) firmasından temin edilen SRA 54001/0096 kodlu kit kullanılmıştır. DAS-ELISA testi ilgili üretici firmanın talimatları çerçevesinde gerçekleştirilmiştir.

DAS-ELISA yönteminde, WMV'e özgü IgG antikorları, 1/200 oranında kaplama tamponu ile çözülerek her bir ELISA plakasının kuyucuğuna 100 µl olarak yerleştirilmiştir. Plakalar 37 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında plakalar, yıkama tamponu ile üç kez yıkanmıştır. Ezilen örnekler, ekstraksiyon tamponunda hazırlanan çözelti ile her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde yüklenmiş ve plakalar bir gece +4 °C'de inkübe edilmiştir. Süre sonunda yıkama işlemleri tekrarlanmıştır. Alkalın fosfataz ile işaretlenmiş konjugat, konjugat tamponu içerisinde 1/200 oranında çözülerek her kuyucuğa 100 µl eklenmiştir. Plakalar 37 °C'de 4 saat inkübe edildikten sonra yıkama işlemleri yeniden yapılmıştır.

Yıkamanın ardından, 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan 4-para-nitrofenil fosfat çözeltisinden 100 µl eklenmiş ve karanlık ortamda 1,5 saat bekletilmiştir. Tüm bu işlemlerden sonra plakaların renk değişimleri gözlemlenmiş ve ELISA plak okuyucusu (Thermo Scientific Multiscan FC Microplate Photometer, Amerika) ile absorbans değerleri okunmuştur. Testte, negatif kontrolün absorbans değerinin iki katı ve üzerindeki değerler WMV ile bulaşık olarak değerlendirilmiştir.

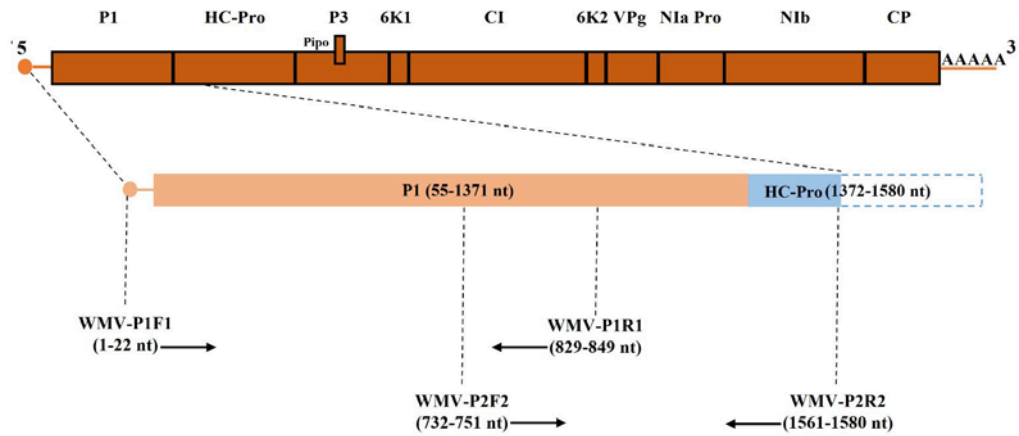
2.3 WMV-P1 Bölgesinin Konsensus Blokları

GenBank veri tabanında 14.03.2024 tarihinde yapılan “WMV” ve “P1” anahtar kelimeleri ile yapılan taramada 52 adet alakalı dizi bilgisine erişilmiştir. Veriler indirilerek düzenlenmiş ve P1 bölgesinin nükleotid dizisinden oluşturulan konsensus blokları hizalanarak hazırlanan konsensustan OM948814 erişim numaralı izolat primer dizaynı amacıyla varsayılan parametreler çerçevesinde giriş verisi olarak gerekli yazılımlarda kullanılmıştır.

2.4 Primer Dizaynı

WMV-P1 bölgesinin çoğaltılması amacıyla primerler, NCBI Primer-BLAST aracı kullanılarak tasarlanmıştır (NIH, t.y.). Seçim kriterleri arasında ampikon boyutu, erime sıcaklığı, bağlanma pozisyon, GC içeriği ve bağlanma sıcaklıkları dikkatle ele alınmıştır. Program hedeflenen yaklaşık 1317 nükleotidlik P1 bölgesi için 750 ve 849 bp büyüklüğünde P1 üzerinde iki farklı bölgeyi çoğaltan iki çift primer çifti üretmiştir. Üretilen primerler, Beacon Designer (Primer, t.y.) ve mFold (Integrated DNA Technologies, 2024) platformları kullanılarak doğrulanmıştır. P1 bölgesine özgü tasarlanan yeni primerlerin sentezi, Oligomer Biyoteknoloji (Ankara, Türkiye) tarafından tuz saflaştırma yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Primer özgüllüğü, GenBank veritabanında Temel Yerel Hizalama Aracı (BlastN) ile tekrar kontrol edilerek doğrulanmıştır.

P1 genomu üzerinde tasarlanan primer bağlantı noktalarına yönelik şematik diyagram Şekil 2.1’de sunulmuştur. Tasarlanan oligonükleotidler ile ilgili ayrıntılı bilgiler Tablo 2.2’de sunulmuştur.



Şekil 2.1. Çalışma kapsamında tasarlanan primerlerin P1 bölgesi üzerinde bağlanma noktaları.

Tablo 2.2. P1 bölgesinin çoğaltılması için tasarlanan oligonükleotid dizi bilgileri.

Adı	Dizi (5'-3')	Baz boyutu (bp)
WMV-P1F1	TTGCATCTTCACCATTCAACAAG	750
WMV-P1R1	TGCACGCTTCTTTGCTTGTTTC	
WMV-P1F2	GATGATCCTGCGCTTCAAC	849
WMV-P1R2	ATTGCTGCTGCCAATTCACC	

2.5 RNA İzolasyonu

Toplam RNA izolasyonu, enfekteli bitki örneklerinden, NucleoZOL (Macherey-Nagel™, Dueren-Germany) RNA izolasyon solüsyonu kullanılmıştır. Ticari solüsyon dışında etanol (%70) ve izopropanol (%100), farklı boyutlarda mikro pipet, ısıtıcı blok, santrifüj, vorteks, çalkalayıcı, Nanodrop spektrofotometre (Nano Drop 2000, Thermo, Massachusetts, ABD), ezme poşeti çalışmanın diğer malzemelerini oluşturmuştur. RNA izolasyonu ilgili firmanın tavsiye notları üzerine, bazı minör modifikasyonlar uygulanarak aşağıdaki sıra ile gerçekleştirilmiştir:

1. Hastalıklı kabakgil bitki kısımlarından yaklaşık 100 mg alınarak sıvı azot yardımıyla havan ve havan eli kullanılarak ezilmesi sağlanmıştır.
2. Sıvı azotla ezilen örneklerin üzerine 500 µl NucleoZOL RNA izolasyon solüsyonu eklenmiş ve örnekler oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir.
3. Karışıma 200 µl nükleaz arı su eklenmiş, ters çevrilip kuvvetlice elle 15 saniye çalkalanarak oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir.

4. İnkübasyon sonrası örnekler 12.000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı (500 µl) yeni bir tüpe alınmış, aynı hacimde soğuk izopropanol eklenmiş ve tüpler oda sıcaklığında nazikçe ters çevrilerek çökelti görünür hale getirilmiştir.
5. Örnekler oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiş, ardından 12.000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek üst faz dökülmüştür.
6. Pellet, %70 etanol eklenerek 8.000 g'de 3 dakika santrifüj edilip yıkanmıştır (Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır).

2.6 DNase I Uygulaması

RNA izolasyonu sonucunda elde edilen toplam RNA'lar final konsantrasyonu 2 µg/µl olacak şekilde DNase I (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, U.S.A) uygulamasına tabi tutularak genomik DNA'dan arındırılmıştır. DNA'dan yoksun RNA örnekleri konsantrasyonları 20 ng/µl son konsantrasyon olacak şekilde ayarlanarak -20 °C'de sonraki çalışmalar için muhafaza edilmiştir.

2.7 RT-PCR Çalışmaları ve Optimizasyon

İki aşamalı RT-PCR çalışmalarında cDNA sentezi "RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, U.S.A)" kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA polimeraz enzimi olarak GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase seti (Promega, Wisconsin, USA) [Taq DNA Polymerase, 25mM MgCl₂, 5X PCR Buffer] ve RNase Inhibitörü olarak TheraPure™ GMP RNase Inhibitor, 40 U/µL (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, U.S.A) kullanılmıştır. PCR cihazı (Applied Biosystems Veriti™ 96, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, U.S.A) çalışmanın diğer materyallerini oluşturmuştur.

WMV P1 bölgesinin (1317 nt) büyük bir bölge olması nedeniyle ilgili protein birbirini kapsayan iki çift primer ile amplifiye edilmiştir. İzolasyon aşamasında elde edilen total RNA'lar oligo dT primerleri ile RevertAid First Strand cDNA Synthesis ticari kitinde belirtildiği şekilde cDNA elde edilmiştir. cDNA eldesinden sonra WMV-P1F1/R1 ve WMV-P1F2/R2 primerleri için gradient PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Gradient PCR işlemi için Tablo 2.3'te verilen bileşenler her iki primer çifti için ayrı ayrı olacak şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 2.3. Her bir primer çifti için hazırlanan reaksiyon bileşenleri.

Kullanılan Reaktif	1 X (µl)
dH ₂ O	13.15
GoTaq Flexi 5X.	6
25 mM MgCl ₂	1
10 mM dNTPs	0.6
10 µM F primeri	1
10 µM R primeri	1
Taq Polymerase (5u/µl)	0.25
cDNA (50 ng/µl)	2
Toplam Hacim	25 µl

Optimal PCR reaksiyon koşullarının belirlenebilmesi amacıyla her bir primer çifti için gradient-PCR reaksiyonu (50-60 °C aralığında) kurulmuştur. Gradient PCR koşulları için cihaza sunulan program detay komutları Tablo 2.4'te sunulmuştur.

Tablo 2.4. WMV izolatlarında P1 bölgesinin amplifikasyonu için gradient PCR koşulları.

Primer F1/R1			Primer F2/R2		
Sıcaklık	Süre	Döngü	Sıcaklık	Süre	Döngü
95°C	15 dk	1	95°C	5 dk	1
95°C	45 s		94°C	30 s	
50-53-56-59-61°C	45 s	35	51-54-57-60-63°C	45 s	35
72°C	1 dk		72°C	1 dk	
72°C	10 dk	1	72°C	10 dk	1
10 °C	∞		10 °C	∞	

2.8 Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları

Elektroforez ve jel görüntüleme çalışmalarında, CBS Scientific yatay mini elektroforez sistemi ve güç kaynağı, Biomax (Prona, Spain) agaroz ve G:F3 (Syngene, İngiltere) jel görüntüleme sistemi kullanılmıştır. P1 bölgesine özgü primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen ampliconlar, %1,5 agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuştur. Bu işlem için, Gallitelli ve Minafra'nın (1994) yöntemine göre, 100 ml TAE içinde 1,5 gr agaroz mikrodalga fırında tamamen

    lene kadar ısıtılmıştır. Karışım homojen hale geldikten sonra 55-60  C'ye soğutulmuş ve tarak yerleştirilmiş tanka düşülmüştür. Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarılmış ve jel yüzeyini 3 mm kaplayacak şekilde 1X TAE tamponu eklenmiştir. PCR   r  nleri, 2  l loading dye (NEB Blue 6x, İngiltere) eklenmiş 8  l hacminde kuyucuklara yüklenmiştir. Ayrıca, ampikon boyutlarını belirlemek için ilk kuyucuğa 100 bp DNA marker (Hibrogen, Türkiye) yüklenmiştir. Elektroforez 90 V'da 60 dakika boyunca ger  kleştirilmiş, ardından jeller ethidium bromide   z  ltisinde 10 dakika bekletilip saf su ile yıkanmıştır. Sonuçlar jel görüntüleme sistemi kullanılarak fotoğraflanmıştır.

2.9 Dizileme ve Erişim Numaralarının Alınması

PCR ile elde edilen beklenen bant boyutlarındaki ürünler, sekanslama çalışmaları için ilgili firmaya gönderilmiştir. Dizileme işlemi, BmLabosis (Ankara, Türkiye) firması tarafından ger  kleştirilmiştir. Dizileme sonuçları, BlastN analizi ve benzerlik matrisleri ile değerlendirilmiş ve benzerlik oranları belirlenmiştir. P1 bölgesine yönelik elde edilen diziler Genbank veritabanına kaydedilerek erişim numaraları alınmıştır.

2.10 P1 Bölgesinin Populasyon Dinamikleri ve Filogeni

P1 bölgesine ait konsensus bloklarının rekombinasyon sinyalleri RDP, Chimaera, MaxChi, Bootscan, Siscan, GENECONV ve 3Seq yöntemleri ile incelenmiştir. Bu yöntemler, Recombination Detection Program 5 (RDP5 v5.30) ile varsayılan ayarlarla kullanılmıştır (Martin vd., 2021). Beşten az yöntemle onaylanan sinyaller güvenilir bulunmamıştır (Bonferroni düzeltilmiş kesme noktası <0,05). Rekombinant izolatlar, filogenetik ve popülasyon analizlerinin doğruluğunu sağlamak için hizalamalardan çıkarılmıştır. Ancak yeni dizilenmiş izolatlarda rekombinasyon sinyali var ise, analizlerde kullanılmaya devam edilmiştir.

P1 bölgesinin filogenetik ağacı, MEGA11 yazılımında Maksimum-Olasılık yöntemleri kullanılarak hesaplanmıştır. Filogenetik ağaçların topolojileri için istatistiksel destek, Kimura 2-parametre modeli (Kimura, 1980) ile 1000 bootstrap tekrarında tahmin edilmiştir. Filogenetik ağaçların görselleştirilmesi R yazılımı ile ger  kleştirilmiştir. P1 bölgesi test edilen WMV izolatlarının nükleotid (nt)

yüzdesel benzerlikleri, Sequence Demarcation Tool (SDT) v1.2 yazılımı ile belirlenmiştir (Muhire vd., 2014).

2.11 Nötralizasyon Seçilimi ve Genetik Farklılık Analizleri

Genetik çeşitliliği ölçmek için DnaSP v.6.12.03 (Rozas vd., 2017) programı kullanılmıştır. WMV popülasyonları arasındaki genetik çeşitlilik, ortalama çiftler arası nükleotid çeşitliliği (π), toplam mutasyon sayısı (η), diziler arasındaki ortalama nükleotid farkı (k), haplotipler (h), haplotip çeşitliliği (H_d) ve değişken bölgelerin sayısı (S) kritiklerine göre hesaplanmıştır. Ayrıca, evrimsel baskıyı göstermek için ortalama eşanlı (dS) ve eşanlı olmayan (dN) yer değiştirmeler ile dN/dS oranları (ω) hesaplanmıştır. ω değerlerine göre, genlerin pozitif, nötr veya negatif seleksiyon altında olduğu belirlenmiştir; ($\omega > 1$ pozitif seleksiyon, $\omega = 1$ nötr seleksiyon, $\omega < 1$ ise negatif seleksiyon gösterdiği var sayılmıştır (Rozas vd., 2017).

Tajima D, Fu ve Li D* ve F* (Thornton, 2005) testleri, nötr evrim varsayımını değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. Negatif Tajima D değerine sahip popülasyonların, yakın zamanda meydana gelen bir daralma sonrası birçok polimorfizm veya genişleme yaşadığı öne sürülürken, pozitif değerler nadir polimorfizm eksikliği veya popülasyonda daralma yaşadığını gösterdiği varsayılarak analizler yapılmıştır (Hudson vd., 1992).

Genetik farklılık ve gen akışı, P1 bölgesine dayalı olarak K_S^* , K_{ST}^* , Z^* , S_{nn} ve F_{ST} (fixasyon indeksi) metrikleri kullanılarak tahmin edilmiştir. F_{ST} değeri 0 (tamamen aynı popülasyonlar) ile 1 (kesinlikle farklı popülasyonlar) arasında değişebilmektedir (Hudson vd., 1992). F_{ST} değeri > 0.33 , nadir gen akışını ve test edilen popülasyonlar arasında artan genetik ayrımı gösterdiği kabul edilmiştir (Santosa vd., 2022).

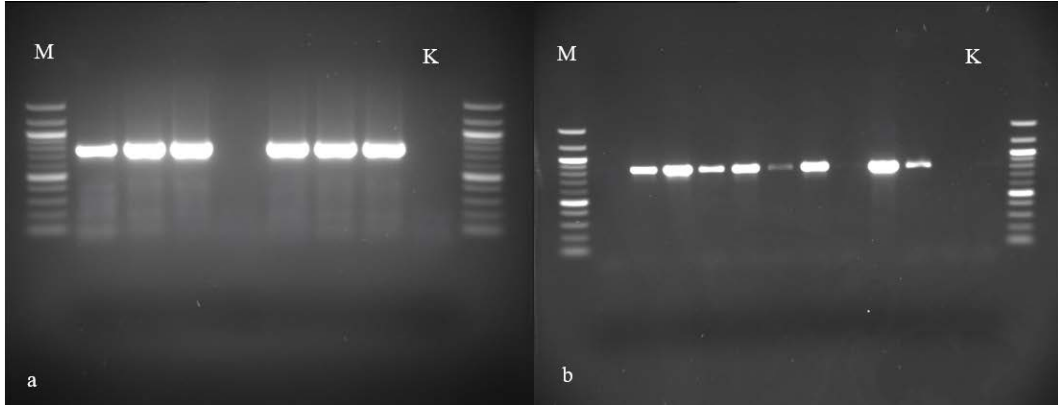
3. BULGULAR

3.1 DAS-ELISA testi

İlgili firmadan temin edilen negatif ve pozitif kontrollerin kullanıldığı DAS-ELISA testinde negatif kontrolün absorbans değerinin 2 katı ve üzeri değerlerde absorbans değeri görülen örnekler virüsle bulaşık olarak değerlendirilmiş ve P1 bölgesinin moleküler karakterizasyonu amacıyla sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Eskişehir, Ankara ve Nevşehir illerinden toplanan ve serolojik olarak WMV varlığı doğrulanan örneklerden yapılan DAS-ELISA testi ile 10 örneğin tamamı pozitif olarak tespit edilmiş ve WMV enfeksiyonu tekrar doğrulanmıştır.

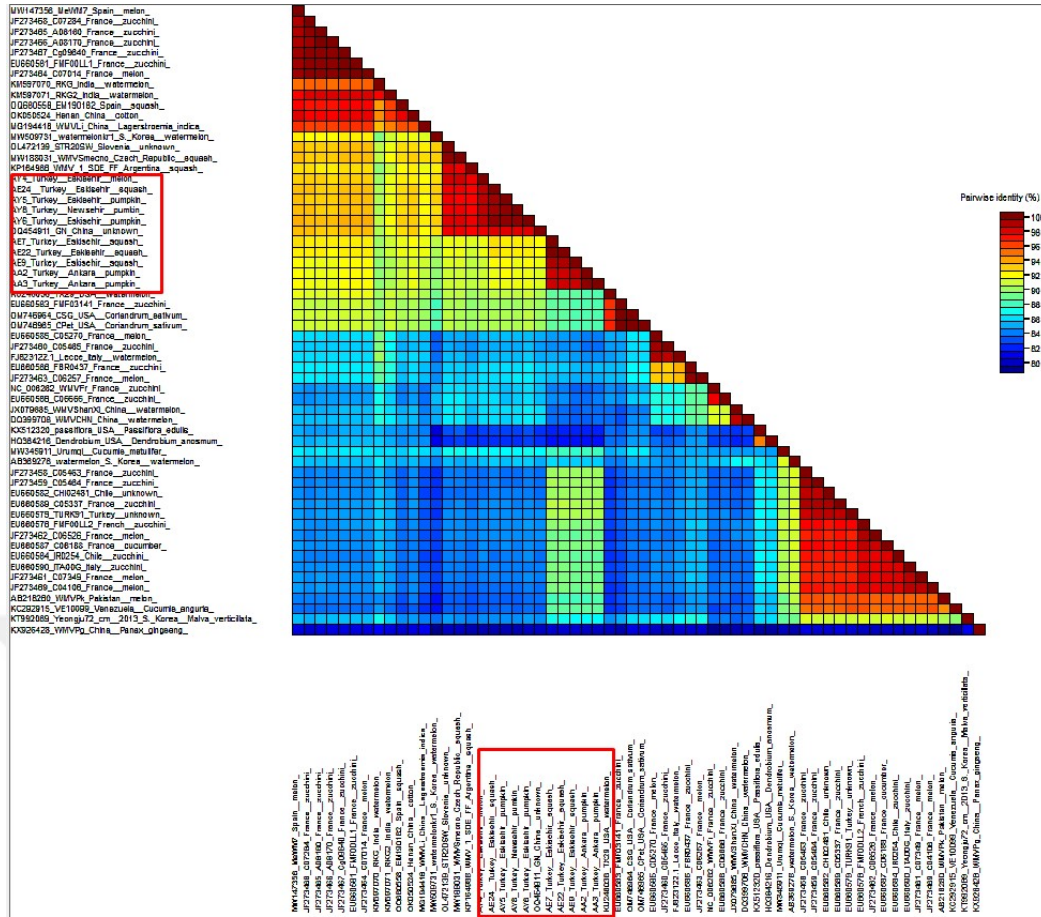
3.2 PCR Optimizasyonu, Dizileme ve Rekombinant İzolatlar

Yapılan gradient PCR çalışmaları sonucunda Primer F1/R1 ve Primer F2/R2 için optimal bağlanma sıcaklık değeri sırasıyla 56 ve 60 °C olarak tespit edilmiştir. Beklenen bant büyüklüklerine (750 ve 849 bp) yönelik olarak elde edilen örnek agaroz jel elektroforezi sonuçları Şekil 3.1’de sunulmuştur. Dizilenen izolatlar NCBI GenBank’a PQ412640- PQ412649 numaraları altında kaydedilmiştir.



Şekil 3.1. Amplifikasyon ürünlerinin jel görüntüleri.

Çalışma kapsamında analiz edilen izolatların nt düzeyinde yapılan benzerlik matrisi Şekil 3.2’de sunulmuştur. Dizilenen izolatların yapılan BlastN analizi sonucunda nt düzeyinde % 88-99 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 3.2. WMV P1 gen bölgesine yönelik oluşturulan nt düzeyindeki benzerlik matrisi.

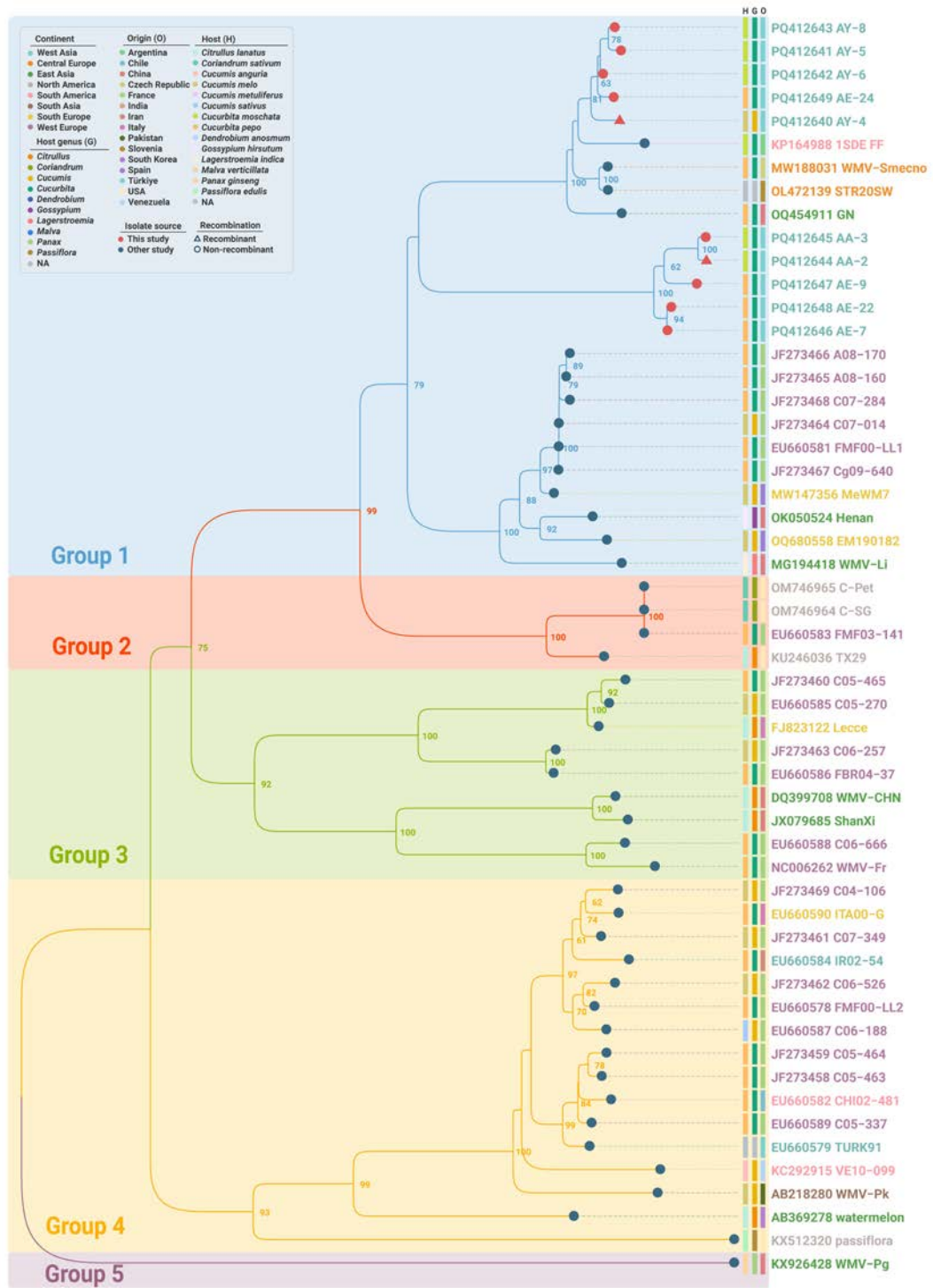
RPD programı ile P1 bölgesine yönelik yapılan rekombinasyon analizlerinde toplamda 9 izolattın rekombinant karakter sergilediği görülmüştür. Ayrıca bu tez çalışması kapsamında Ankara'dan toplanan AA-2 ve Eskişehirden toplanan AY-4 kodlu izolatlarda rekombinasyon sinyalleri tespit edilmiştir. Ancak bu çalışma kapsamında P1 bölgelerinin dizileri elde edilen izolatlar sonraki analizlerde kullanılmaya devam edilmiştir, sadece daha önceki çalışmalarda rapor edilen izolatlar DNASP analizlerinden çıkarılmıştır. Rekombinant izolatların büyük bir kısmında araştırma bulgularına göre MG194418 accession numaralı Çin izolatı “parent” özelliği sergilemiştir.

Tablo 3.1. Çalışma kapsamında ele alınan WMV P1 bölgesinin rekombinant izolatları.

No.	İzolat kodu	Major/minor parents
1.	AA-2	AY-5/EU660579
2.	KM597070	Unkonwn/MW147356
3.	HQ384216	Unknown/MG194418
4.	MW509731	MG194418/NC_006262
5.	AY-4	MG194418/NC_006262
6.	MW345911	AB369278/EU660583
7.	KM597070	JF273460/JF273466
8.	KT992089	KX512320/MG194418
9.	KM597071	KP164988/MG194418

3.3 WMV Filogenisi ve Populasyon Dinamikleri

Filogenetik analizler sonucunda WMV populasyonlarına yönelik P1 bölgesinin dizileri kullanılarak elde edilen filogenetik ağacın 5 gruptan oluştuğu görülmektedir (Şekil 3.3). Filogrup 1 içerisinde kümelenen izolatların Fransa, Hindistan, İspanya, Çin, Slovenya ve Çek Cumhuriyeti'nden elde edilen izolatlardan oluştuğu görülürken, bu çalışma kapsamında dizilenen izolatların da filogrup 1 içerisinde kümelendiği tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen bulgulara filogrup 2 içerisinde Amerika ve Fransa'dan dizilenen izolatlar yer alırken, filogrup 3 içerisinde Fransa, Çin ve Amerika'dan farklı konukçulardan izole edilen izolatların kümelendiği görülmektedir. Filogrup 4 Amerika, Fransa, Güney Kore, Venezuela, Pakistan, Şili ve İtalya izolatlarına ev sahipliği yaparken, filogrup 5'in ise tek bir Çin izolatından oluştuğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu bulgular sonucunda izolatların kümelenmesinde coğrafik orijinin ya da konukçu tipinin etkin olmadığı sonucu ortaya çıkmaktadır.



Şekil 3.3. Maximum-likelihood metoduna göre WMV P1 bölgesinin filogenisi.

Yapılan genetik çeşitlilik ve polimorfizm analizi değerlerine göre diziler arasındaki nükleotid farklılıklarının ortalama sayısı (k) filogrup 3 içerisinde en yüksek (123.361) olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.2). Filogrup 3'ü sırasıyla 76.783 ile filogrup 1 ve 68.800 ile filogrup 4 izlemiştir. En düşük k değeri ise filogrup 2'de gözlenmiştir (20.500). En yüksek S (değişken bölgelerin sayısı) ve η (toplam

mutasyon sayısı) değerleri ise sırasıyla filogrup 4-3-1-2 olacak şekilde tespit edilmiştir. Oluşan 1, 2 ve 4 nolu filogrupların yüksek ω (dN/dS) oranlarında ($\omega > 2$) güçlü seçilim baskısı karakteri sergilemediği belirlenirken filogrup 3'te gözlemlenen düşük ω değeri, bu filogrubun yüksek seçilim baskısı özelliği taşıdığına işaret etmektedir (Tablo 3.3). Filogrupların genetik çeşitliliği ve polimorfizm analiz değerlerinin hesaplanabilmesi için en az iki izolat gerekliliği sebebiyle filogrup 5 için ilgili parametreler açısından analiz gerçekleştirilememiştir.

Tablo 3.2. WMV P1 gen bölgesinin nt dizilerinin genetik çeşitliliği ve polimorfizm analiz değerleri.

Filogruplar	N	h	Hd	S	η	k	π	dS	dN	ω
Tümü	54	50	0.996	628	753	150.920	0.119	0.309	0.062	0.201
Filogrup 1	24	22	0.989	265	277	76.783	0.058	0.141	0.033	0.234
Filogrup 2	4	2	0.500	41	41	20.500	0.016	0.041	0.009	0.219
Filogrup 3	9	9	1.000	285	294	123.361	0.093	0.248	0.046	0.185
Filogrup 4	16	16	1.000	363	385	68.800	0.052	0.126	0.029	0.231
Filogrup 5	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

N: İzolat sayısı, h: haplotype sayısı, Hd: haplotype çeşitliliği, S: değişken bölgelerin sayısı, η : toplam mutasyon sayısı k: diziler arasındaki nükleotid farklılıklarının ortalama sayısı, π : nükleotid çeşitliliği, dN: non-synonymous nükleotid çeşitliliği, dS: synonymous nükleotid çeşitliliği, ω : dN/dS
*0.01 < P value > 0.05; ** 0.001 < P value > 0.01

nd = not determined, en az iki izolat gerekir

Tablo 3.3. WMV P1 gen bölgesine göre tahmin edilen nötralite test değerleri.

Filogruplar	Fu and Li's D^*	Fu and Li's F^*	Tajima's D
Tümü	-0.61083 ns	-0.59358 ns	-0.31377 ns
Grup 1	-0.92159 ns	-0.91251 ns	0,14145 ns
Grup 2	-0.86540 ns	-0.91555 ns	-0.86540 ns
Grup 3	1.05374 ns	1.09672 ns	0.73107 ns
Grup 4	-2.08833 ns	-2.31453 ns	-1.78095 ns
Grup 5	nd	nd	nd

*P value > 0.10

ns = not significant

nd = not determined, en az 4 izolat gerekir.

WMV izolatlarının P1 bölgesine yönelik 3 farklı yöntemle uygulanan nötralizasyon testleri sonucunda sadece filogrup 3 ün pozitif değere sahip olduğu görülmektedir (Tablo 3.3). Ancak elde edilen bulguların istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığı işaret etmemesi filogrupların nötralite bulguları için yeterli olmamıştır. Anlamlı bulguların daha fazla izolat sayısı ile elde edilebileceği değerlendirilmektedir.

WMV izolatlarının P1 gen bölgesi için genetik farklılaşmanın ve gen akışının analiz değerleri tablo 3.4’de görülmektedir. 4 filogrubun popülasyonlar arası çeşitliliği ölçen F_{ST} değerlerinin sadece filogrup 2’de referans değer olan 0.33’den büyük olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.4). Filogrup 5 içerisinde yeterli sayıda izolat bulunmadığı için popülasyonlar arası çeşitliliği ölçen gen farklılaşma katsayısı hesaplanamamıştır.

Tablo 3.4. WMV izolatlarının P1 gen bölgesi için genetik farklılaşmanın analiz değerleri.

Populasyon	$^aK_S^*$	$^aK_{ST}^*$	P value	$^aZ^*$	P value	Snn	P value	$^bF_{ST}$
Tüm(n=54) x Grup 1 (n=24)	4.5907	0.0127	0.0030**	6.9339	0.0010**	0.4089	0.9980 ns	0.1385
Tüm(n=54) x Grup 2 (n=4)	4.7267	0.0195	0.0000***	6.3204	0.0000***	0.9035	0.1170 ns	0.4375
Tüm(n=54) x Grup 3 (n=9)	4.7956	0.0164	0.0000***	6.4563	0.0000***	0.7143	0.8010 ns	0.2259
Tüm(n=54) x Grup 4 (n=16)	4.6424	0.0277	0.0000***	6.6135	0.0000***	0.5429	0.9740 ns	0.3001
Tüm(n=54) x Grup 5 (n=1)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

* $0.01 < P \text{ value} > 0.05$; ** $0.001 < P \text{ value} > 0.01$; *** $P \text{ value} < 0.001$

$^aK_S^*$, K_{ST}^* , Z^* ve Snn genetik farklılaşmanın test istatistikleridir

$^bF_{ST}$, popülasyonlar arası çeşitliliği ölçen gen farklılaşma katsayısı

nd = not determined, en az iki izolat gerekir.

4. TARTIŞMA

WMV'nin erken tespiti, kontrolü ve populasyon yapısının iyi bilinmesi tarımsal üretimdeki verim kayıplarını önlemek için kritik öneme sahiptir. WMV kabakgillerde ciddi ekonomik kayıplara neden olan bir virüstür. Özellikle kavun, karpuz, kabak ve salatalık gibi bitkilerde yaygın olarak görülür. WMV, bitkilerde mozaik desenli yaprak deformasyonlarına, bodur büyümeye ve ürün kalitesinde azalmaya yol açar. Vektör böcekler, özellikle yaprak bitleri aracılığıyla hızlı bir şekilde yayılabilir. Ülkemizde WMV tespiti ile ilgili çalışmaların ilk olarak 2006 yılında Tekirdağ'da yapılan kapsamlı bir survey sonucunda rapor edildiği görülmektedir (Köklü, 2006). Sonrasında Kamberoğlu (2016), Özçınar (2020), Örs vd. (2021), Yeşil (2021), Güller (2024a) ve Güller (2024b) ile çalışmaların devam ettiği bilinmektedir. Ülkemizde WMV özelinde yürütülen nükleik asit temelli araştırmaların hemen hemen tamamına yakınının sadece moleküler karakterizasyona yönelik olarak yürütüldüğü ve yaygınlık-tespit aşaması ile sınırlı kaldığı dikkat çekmektedir. Bu çalışmada ise ülkemiz WMV çeşitliliğine ve populasyon yapısına yönelik bilgi birikimine katkı sunmak amacıyla ülkemizde varlığı ve ekonomik önemi çeşitli araştırmalar ile bildirilen WMV'nin P1 bölgesinin moleküler karakterizasyonuna ilaveten populasyon dimaniklerine yönelik bulgular da elde edilmiştir.

Bitki virüslerinin serolojik yöntemler ile tanısı oldukça uzun yıllardır yapılmaktadır. Nitekim günümüzde sıklıkla kullanılan DAS-ELISA testinin hala Clark ve Adams (1977) geliştirilen yöntemler ile başarılı bir şekilde göre uygulandığı bilinmektedir. WMV'nin DAS-ELISA ile tanısına yönelik dünyanın farklı ülkelerinde çeşitli araştırmalara rastlamak mümkündür (Desbiez vd., 2007; Kumar vd., 2015; Sharifi vd., 2008). Ayrıca Türkiye'de yapılan WMV surveyi ile alakalı çalışmaların DAS-ELISA testi ve PCR ile kombine edilerek uyarlandığı görülmektedir (Karabıyık ve Yeşil, 2021; Korkmaz vd., 2015; Şevik ve Sökmen, 2003; Yeşil, 2021). Bu çalışmada literatürde yer alan WMV tanısında yer verilen serolojik yöntemler ile paralellik gösteren DAS-ELISA testi bulguları elde edilmiştir.

Şüphesiz RNA ve DNA amplifikasyonuna dayalı tüm tekniklerin etkinliği ve kalitesini etkileyebilecek en önemli unsurlardan biri, primer ve/veya problemlerin tasarımıdır (Abd-Elsalam, 2003). Bu çalışmada WMV izolatlarının P1 bölgesinin

amplifikasyonuna olanak tanıyan iki çift primer seti geliştirilerek WMV tanısının başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesi mümkün kılınmıştır. WMV'e yönelik ülkesel ölçekte yapılan RNA'a dayalı çalışmaların büyük bir çoğunluğunun kılıf protein bölgesinin amplifikasyonuna dayalı olduğu bilinmektedir (Güller, 2024a, 2024b; Yeşil, 2021). Bu çalışma kapsamında tasarlanan primer çiftleri ile P1 bölgesi karakterize edilmiş ve elde edilen ampikon dizilerinin WMV'nin P1 bölgesinin dizilenmesi sonucu elde edilen Desbiez vd. (2007), Glasa vd. (2021) ve Nematollahi vd. (2021) de elde edilen bulgular ile bir uyum içerisinde olduğu görülmüştür. Tasarlanan yeni primer çiftleri ile ülkemizde ilk kez WMV tanısı için kılıf protein bölgesine alternatif olarak, P1 bölgesinin hedef alınarak dizilenmiş olması bu çalışma ve ülkemiz WMV surveyi için önemli bir kazanım niteliğindedir.

Bilindiği üzere graident PCR, farklı sıcaklık aralıklarında amplifikasyon yapılmasını sağlayan bir PCR yöntemi olup, özellikle primer bağlanma sıcaklığının optimize edilmesi gerektiğinde tercih edilir (Hadidi vd., 2017). Literatürde bitki virüslerinin graident PCR yaklaşımı ile teşhis yöntemlerinin optimizasyonuna yönelik çeşitli araştırmalar bulunmaktadır (Ali vd., 2014; Huang vd., 2023; Roy vd., 2005; Wei vd., 2009). Bu tez çalışması kapsamında WMV'e ait P1 bölgesinin çoğaltılması için tasarlanan primerler için yapılan graident PCR sonucunda amplifikasyon için gerekli olan uygun bağlanma sıcaklıkları belirlenmek suretiyle optimize edilerek literatür ile uyumlu bulgulara erişilmiştir.

WMV populasyonlarında rekombinasyon analizi ve filogeni ile alakalı literatürde farklı bulgular barındıran araştırmalara rastlamak mümkündür. Nitekim ilk kapsamlı populasyon analizi niteliğindeki çalışmada WMV izolatlarının populasyon farklılaşma düzeylerinin oldukça düşük olduğu tespit edilmiş ve populasyonun 6 rekombinant izolat içerdiği belirlenmiştir (Moreno vd., 2004). Sharifi vd. (2008) ise WMV İran populasyonları ile global populasyonu araştırırken 3 farklı kümelenmeden söz etmektedir. Yukarıda bahsedilen her iki çalışma da virüsün kılıf protein bölgesinin nt dizilerinin populasyon dinamiklerini araştırmaktadır. Fakat ilerleyen dönemlerde genom üzerinde farklı bölgelerin dizilenmesi ya da full genom eldesi ile alakalı yürütülen çalışmalarda yeni rekombinant izolatların varlığı ve yeni filogruplanmalar ortaya çıkmıştır (Abdalla ve Ali, 2021; Nematollahi vd., 2021; Verma vd., 2020). Bu çalışma kapsamında dizilenen WMV Türkiye izolatları ile oluşturulan P1 bölgesi filoogenetik ağacı 5

farklı kümelenme göstererek ve önceki çalışmalarda verilen sonuçlar ile paralellik sergilemiştir.

54 adet WMV izolatından oluşan popülasyonun demografik yapısının araştırılması ile elde ettiğimiz araştırma bulguları göre filogrup 3 içerisinde yer alan izolatların yüksek nt farklılığı karakteri sergilediğini işaret etmektedir. Söz konusu filogrubun analiz sonucunda sahip olduğu düşük ω değeri ise, bu filogrubun yüksek seçilim baskısı özelliği taşıdığını göstermektedir. Bu durum diğer bazı bitki virüslerinin popülasyon çeşitliliği analiz bulgularında elde edilen gruplar ve sahip olunan ω değerleri ile benzerlik göstermektedir (Morca vd., 2024; Santosa vd., 2023). Ancak yüksek seçilim baskısı ile kesin kanaatin oluşabilmesi için çok daha fazla sayıda GenBank izolatına ve P1 dizisine ihtiyaç olduğu değerlendirilmektedir.

WMV izolatlarının P1 bölgesine yönelik 3 farklı yöntemle uygulanan nötralizasyon testleri istatistiki olarak anlamlı olmamakla beraber sadece filogrup 3 için pozitif değer üretmiştir. Nötralizasyon analizi için yeterli izolata sahip olmayan filogrup 5 haricindeki gruplarda ise nötralizasyon testleri negatif değer üretmiştir. Negatif Tajima D değerine sahip popülasyonların, yakın zamanda meydana gelen bir daralma sonrası birçok polimorfizm veya genişleme yaşadığı öne sürülürken, pozitif değerler nadir polimorfizm eksikliği veya popülasyonda daralma yaşadığını gösterdiği varsayılmaktadır (Hudson, 1992). Araştırma bulgularına göre filogrup 3 negatif seçilim baskısı yaşayan bir popülasyon özelliğindedir. Bu durum filogrup 3 içerisinde az sayıda olan izolat sayısından kaynaklanabilir. WMV'nin P1 bölgesi popülasyon genetiği üzerine yapılan tek çalışmada nötralite test sonuçların izolat sayısına göre değişkenlik gösterdiği sadece "CL" olarak ifade edilen bir grupta pozitif sonuç verdiği görülmektedir (Nematollahi vd., 2021). Bahsi geçen çalışmada kılıf proteine yönelik popülasyon analiz çalışmaları yapılarak evrensel bir sınıflandırma planlaması yapılmıştır. Ancak bu tez çalışmasında kılıf proteinine yönelik analizler gerçekleştirilmediği için bahsi geçen sınıflandırma kullanılamamıştır. Bulguların paralellik gösterdiğini iddia etmek için GenBank'ta P1 bölgesine yönelik daha çok dizi bilgisine ihtiyaç duyduğu değerlendirilmektedir. Nötralizasyon test bulguları popülasyonların genetik çeşitliliklerinin yakın olduklarına işaret etmektedir.

WMV izolatlarının P1 gen bölgesi için genetik farklılaşmanın ve gen akışının analizi sonucunda 4 filogrubun popülasyonlar arası çeşitliliği ölçen F_{ST} değerlerinin sadece filogrup 2'de referans değer olan 0.33'den büyük olduğu tespit

edilmiştir. F_{ST} değeri 0 (tamamen aynı popülasyonlar) ile 1 (kesinlikle farklı popülasyonlar) arasında değişebilmektedir (Hudson vd., 1992). F_{ST} değeri >0.33 , nadir gen akışını ve test edilen popülasyonlar arasında artan genetik ayrımı göstermektedir (Santosa vd., 2022). Bitki virüslerinin genetik farklılaşma ve gen akışı analizlerinde referans aldığı F_{ST} değeri filogruplar arasındaki farklılaşmanın önemli belirteçlerinden biridir (Morca vd., 2024; Santosa vd., 2022; Santosa vd., 2023). Bu araştırmanın bulgularına göre filogrup 2'nin diğer gruplara göre daha izole olduğu ve diğer gruplardan gen akış düzeyinin oldukça düşük olduğunu söylemek mümkündür. Benzer şekilde Nematollahi vd. (2021) tarafından yürütülen WMV genetik farklılaşma çalışmalarında sadece İran popülasyonlarının izole olduğu, diğer popülasyonlar arasında ise gen akışının yüksek olduğu bildirilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Eskişehir, Ankara ve Nevşehir illerinden toplanan ve serolojik olarak WMV ile enfekteli olduğu doğrulanan 10 kabakgil bitkisinden izole edilen WMV izolatlarının yeni geliştirilen primer çiftleri ile P1 bölgesinin moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. P1 bölgesine yönelik yapılan filogenetik analizler, global WMV izolatlarını 5 farklı filogruba ayırmış, bu gruplar arasındaki genetik çeşitlilik ve polimorfizm incelenmiştir. Özellikle filogrup 3 içerisinde en yüksek nükleotid farklılıkları gözlenmiş ve bu filogrubun diğer filogruplara kıyasla daha yüksek seçilim baskısı altında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, filogrup 2'nin popülasyonlar arası farklılıklarını gösteren F_{ST} değerinin 0.33'ün üzerinde olması, bu grubun diğer filogruplara göre daha izole bir popülasyon yapısına sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Çalışmanın en önemli bulguları arasında, WMV P1 bölgesine ait popülasyon dinamiklerinin daha net anlaşılabilmesi için daha fazla izolatın analiz edilmesi gerektiği vurgulanmıştır. Özellikle filogrup 3'ün düşük ω değeri, bu grubun yüksek seçilim baskısı altında olduğunu göstermekte, bu durum da gelecekte yapılacak çalışmalar için önemli bir ipucu sunmaktadır. Ayrıca, elde edilen bulgular WMV P1 bölgesinin filogenisinin daha geniş bir perspektiften incelenmesine olanak sağlamıştır. Araştırma bulgularına yönelik olarak bazı öneriler aşağıda sunulmuştur:

1. P1 bölgesinin popülasyon dinamiklerinin daha net ve doğru bir şekilde ortaya konulabilmesi için daha fazla WMV izolatının moleküler karakterizasyonunun yapılması gerekmektedir. Bu, özellikle filogrup 3'te gözlemlenen yüksek seçilim baskısının detaylandırılması için önem arz etmektedir.
2. Çalışma kapsamında incelenen izolatlar belirli coğrafi bölgelerden toplanmıştır. Diğer bölgelerden toplanacak izolatlarla yapılacak karşılaştırmalar, WMV'nin yayılım dinamiklerinin ve popülasyonlar arası farklılıkların daha geniş bir şekilde anlaşılmasına katkı sağlayabilir.
3. Özellikle yüksek F_{ST} değerine sahip filogrup 2 gibi izole popülasyonların genetik çeşitliliği, uzun vadeli izleme çalışmaları ile incelenmelidir. Bu, virüsün gelecekteki evrimsel eğilimlerini ve popülasyon yapısını daha iyi anlamaya yardımcı olacaktır.

4. P1 bölgesinin virüsün enfektivitesi ve konukçu etkileşimlerine olan etkileri hakkında daha fazla fonksiyonel çalışma yapılması, WMV'nin biyolojisinin daha iyi anlaşılmasına ve olası kontrol stratejilerinin geliştirilmesine katkı sunabilir.



KAYNAKLAR

- Abdalla, O. A. ve Ali, A. (2021). Genetic variability and evidence of a new subgroup in Watermelon mosaic virus Isolates. *Pathogens*, 10(10), 1245.
- Abd-Elsalam, K. A. (2003). Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology*, 2(5), 91-95.
- Akhtar Ali, O. A. (2012). Occurrence of viruses infecting watermelon, other cucurbits, and weeds in the parts of southern United States. *Plant Health Progress*, 13(1).
- Ali, R. N., Dann, A. L., Cross, P. A. ve Wilson, C. R. (2014). Multiplex RT-PCR detection of three common viruses infecting orchids. *Archives of Virology*, 159, 3095-3099.
- Bertin S, Manglli A, McLeish M, Tomassoli L. Genetic variability of watermelon mosaic virus isolates infecting cucurbit crops in Italy. *Arch Virol*. 2020 Apr;165(4):937-946. doi: 10.1007/s00705-020-04584-9. Epub 2020 Mar 17. PMID: 32185511.
- Borodynko, B. H. J. (2009). Watermelon mosaic virus reported for the first time in Poland. *Plant Pathology*, 58(4), 783.
- Clark, M. F. ve Adams, A. N. (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475-483. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-34-3-475>
- Crescenzi, A. F. (2001). Preliminary characterisation of a watermelon mosaic virus isolate inducing necrosis on watermelon. *Congress of Sociedade Portuguesa de Fitopatologia*, 321-323.
- Desbiez, C. (2004). The nucleotide sequence of Watermelon mosaic virus (WMV, Potyvirus) reveals interspecific recombination between two related potyviruses in the 59 part of the genome. *Arch Virol*, 149, 1619-1632.
- Desbiez, C. B. J. S. (2009). Emergence of new strains of watermelon mosaic virus in South-eastern France: Evidence for limited spread but rapid local population shift. *Virus Research*, 141(2), 201-208.
- Desbiez, C., Costa, C., Wipf-Scheibel, C., Girard, M. ve Lecoq, H. (2007). Serological and molecular variability of watermelon mosaic virus (Genus Potyvirus). *Archives of Virology*, 152, 775-781.
- Domingo Calap, M. L. O. C. M. (2021). The P1 protein of watermelon mosaic virus compromises the activity as RNA silencing suppressor of the P25 protein of cucurbit yellow stunting disorder virus. *Front Microbiol*, 12, 1-3.
- Dukic, N. K. (2002). Biological and serological characterization of viruses of summer squash. crops in Yugoslavia. *Journal of Agricultural Sciences*, 47, 149-160.
- Duman, Y. T. (2020). Türkiye’de sebze üretiminde tür ve çeşit tercihleri. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 169-178.
- Ergun, M. Z. S. (2019). Evaluating cucumber fruit as a health-giving vegetable. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 8, 13-16.
- Esam, K. F. ve Elbeshehy, E. M. (2015). Antiviral activity of thuja orientalis extracts against watermelon mosaic virus (WMV) on citrullus lanatus. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(2), 211-219.
- FAO (2018). Food and agricultural organization of the United Nations. *Food and Agricultural Organization of the United Nations*.

- Finetti Sialer, M. M. (2012). Biological and molecular characterization of a recombinant isolate of Watermelon mosaic virus associated with a watermelon necrotic disease in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 132, 317-322.
- Gallitelli, D. ve Minafra, A. (1994). Electroforesis. *Course on Plant Virus Diagnosis*, 89-99.
- Gao Qiang, R. H. (2021). Screening of cucumis metuliferus germplasm materials with resistance to watermelon mosaic virus. *Journal of Agriculture*, 11(8), 60-63.
- Gassan Köklü, Ö. Y. (2006). Occurrence of cucurbit viruses on field-grown melon and watermelon in the Thrace region of Turkey. *Phytoprotection*, 87(3), 123-130.
- Gehan, Z. ve Mohamed, A. M. (2020). Biological and molecular characterization of watermelon mosaic virus affecting squash plants yield and quality in Egypt. *Journal of Plant Production*, 11(4), 341-348.
- Ghasemzadeh, A. N. S. (2012). Sequencing part of watermelon mosaic virus genome and phylogenetical comparison of 5 isolates with other isolates from world. *Journal of Agriculture and Food Technology*, 93-101.
- Glasa, M., Bananej, K., Predajňa, L. ve Vahdat, A. (2011). Genetic diversity of watermelon mosaic virus in Slovakia and Iran shows distinct pattern. *Plant Disease*, 95(1), 38-42.
- Grafton-Cardwell, E. E. (1996). Oc-currence of mosaic viruses in melons in the Central Yalley of California. *The American Phytopathological Society*, 80, 1092-1097.
- Greber, R. (1978). Watermelon mosaic virus-1 and 2 in Queensland cucurbit crops. *Aust. J. Agric. Res*, 29, 1235-1245.
- Güller, M. U. (2024a). First report of natural infection of Watermelon Mosaic Virus (WMV) Infecting bottle gourd and snake melon. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 21(1).
- Güller, M. U. (2024b). In silico and molecular analysis of some mosaic diseases on cucurbit plants in Iğdır province, Türkiye. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 11(1), 90-103.
- Hadidi, A., Levy, L. ve Podleckis, E. V. (2017). Polymerase chain reaction technology in plant pathology. *Molecular methods in plant pathology* (s. 167-187) içinde. CRC Press.
- Hayder, R. ve Alinizi, M. M. (2021). Genetic diversity and biological characterization of watermelon mosaic virus isolates from Iran and Iraq. *Acta Virologica*, 64, 506-508.
- Hayder, R. ve Alinizi, M. M. (2021). Genetic diversity and biological characterization of watermelon mosaic virus isolates from Iran. *Plant Archives*, 21, 1195-1203.
- Huang, A., Gu, P., Wang, Y., Li, J., Yang, Z. ve Yi, L. (2023). Simultaneous detection and differentiation of four viruses in passion fruit plants by a multiplex RT-PCR. *Tropical Plant Pathology*, 48(1), 23-29.
- Hudson, R. R., Slatkin, M. ve Maddison, W. P. (1992). Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data genetics. 132(2), 583-589. <https://doi.org/0.1093/genetics/132.2.583>
- Kameroğlu, M. A. (2016). Doğu Akdeniz bölgesinde karpuz yetiştirilen alanlarda karpuz mozaik virüsü (WMV-2)' nün biyolojik, serolojik ve moleküler olarak berlirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 13(3).
- Karabıyık, M. ve Yeşil, S. (2021). Detection of virus diseases in cucurbit growing areas in Eskişehir province.
- Karima Ben Mansour, A. J. (2023). Watermelon mosaic virus in the Czech Republic, its recent and historical origins. *Plant Pathology*, 72(8), 1528-1538.
- Keçe, M. A. (2016). Doğu Akdeniz Bölgesi'nde karpuz yetiştirilen alanlarda karpuz mozayik virüsü. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 13(03), 162.

- Kim, K. S. (2018). First report of watermelon mosaic virus on *Malva verticillata* in Korea. *Plant Disease*, 103(2).
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.*, 16(2), 111-120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Korkmaz, F., Karaca, K., Özasan, C., Yanar, Y. ve Önen, H. (2015). First report of watermelon mosaic virus (WMV-2) on *Sicyos angulatus* in Turkey. *Turkish Journal of Weed Science*, 18(3), 17-18.
- Kumar, A., Thakur, P. D. ve Handa, A. (2015). Serological detection of watermelon mosaic virus-2 (WMV-2) infecting cucumber in himachal pradesh. *International Journal of Farm Sciences*, 5(1), 104-109.
- Lecoq, H. C. D. (2008). Watermelon mosaic virus and zucchini yellow mosaic virus. *Institut National de la Recherche Agronomique*, 433-440.
- Martin, D. P., Varsani, A., Roumagnac, P., Botha, G., Maslamone, S., Schwab, T., Kelz, Z., Kumar, V. ve Murrell, B. (2021). RDP5: A computer program for analyzing recombination in, and removing signals of recombination from, nucleotide sequence datasets. *Virus Evolution*, 7(1), veaa087. <https://doi.org/10.1093/ve/veaa087>
- Martín-Hernández, A. M. B. P. (2022). Natural resistances to viruses in cucurbits. *Agronomy*, 11, 23.
- Morca, A. F., Akbaş, B., Santosa, A. I., Topkaya, Ş. ve Çelik, A. (2024). Turkish isolates of alfalfa mosaic virus belong to a distinct lineage among global population. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 131, 102263.
- Moreno, I. M., Malpica, J. M., Diaz-Pendón, J. A., Moriones, E., Fraile, A. ve Garcia-Arenal, F. (2004). Variability and genetic structure of the population of watermelon mosaic virus infecting melon in Spain. *Virology*, 318(1), 451-460.
- Muhanna, A. M. (2021). Discovery and plant characterization of WMV mosaic virus spreading in cucurbits along the Syrian coast. *Arab Journal of Plant Protection*, 39(1), 47.
- Muhire, B. M., Varsani, A. ve Martin, D. P. (2014). SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PloS One*, 9(9), e108277.
- Nematollahi, S. N. P. (2021). Molecular characterization and population evolution analysis of watermelon mosaic virus isolates on cucurbits of Northwest Iran. *3 Biotech*, 11, 43.
- Nematollahi, S., Panahborhani, N. ve Koolivand, D. (2021). Molecular characterization and population evolution analysis of Watermelon mosaic virus isolates on cucurbits of Northwest Iran. *3 Biotech*, 11, 1-10.
- Örs, F. O. H. (2021). Occurrence and molecular characterization of some economically relevant cucurbit viruses in Malatya, Turkey. *Alinteri Journal of Agriculture Sciences*, 36(1), 14.
- Özçınar, S. (2020). Adana ve Mersin illeri karpuz ve kavun alanlarında mevcut karpuz mozaik virüsü (Watermelon mosaic virus, WMV)'nün karakterizasyonu. *Çukurova Üniversitesi*, 28-35.
- Pozzi, E. M. C. (2020). Molecular variability of watermelon mosaic virus isolates from Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 156, 1091–1099.
- Pulok, M. K. S. S. (2022). Therapeutic importance of cucurbitaceae: A medicinally important family. *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 114599.
- Purcifull, D. E. (1979). Serological distinction of watermelon mosaic virus isolates. *Phytopathology*, 69, 112-116.

- Purcifull, D. E. (1984). Watermelon mosaic virus 2. CMI/AAB descriptions of plant viruses. *Mycological Institute and Association of Applied Biologists*, 193.
- Rahman, A. H. M. M. (2008). Study of nutritive value and medicinal uses of cultivated cucurbits. *Journal of Applied Sciences Research*, 555-558.
- Rakesh Kumar Verma, M. M. (2020). Identification, genetic diversity and recombination analysis of Watermelon Mosaic Virus isolates. *3 Biotech*, 10, article number 257.
- Roy, A., Fayad, A., Barthe, G. ve Brlansky, R. H. (2005). A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees. *Journal of Virological Methods*, 129(1), 47-55.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E. ve Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299-3302.
- Santosa, A. I., Çelik, A., Glasa, M., Ulubaş Serçe, Ç. ve Ertunç, F. (2023). Molecular analysis of prune dwarf virus reveals divergence within non-Turkish and Turkish viral populations. *Journal of Plant Pathology*, 105(3), 943-954.
- Say, A. D. Ç. (2022). *Karadeniz 11th international conference on applied sciences*. Bilimsel Kongre / Sempozyum Organizasyonu, Rize.
- Sevik, M. A. ve Arli-Sokmen, M. (2003). Viruses infecting cucurbits in Samsun, Turkey. *Plant Disease*, 87(4), 341-344.
- Sharifi, M. H. (2008). Analysis of the biological and molecular variability of watermelon mosaic virus isolates from Iran. *Virus Genes*, 37, 304-313.
- Sharifi, M., Massumi, H., Heydarnejad, J., Hosseini Pour, A., Shaabani, M. ve Rahimian, H. (2008). Analysis of the biological and molecular variability of watermelon mosaic virus isolates from Iran. *Virus Genes*, 37, 304-313.
- Shoeibi, S. M. (2010). Sequencing of six Iranian isolates of watermelon mosaic virus and phylogenetic comparison of Iranian isolates with other isolates of the world. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 157-170.
- Shukla, D. D. L. R. (1992). Serology of potyviruses: Current problems and some solutions. *Archives of Virology*, 5, 57-69.
- Thornton, K. (2005). Recombination and the properties of Tajima's D in the context of approximate-likelihood calculation genetics. *171(4)*, 2143-2148.
- Trkulja, J. V. (2014). First report of watermelon mosaic virus infecting melon and watermelon in Bosnia and Herzegovina. *Plant Disease*, 98(12), 1749-1749.
- Tüik. (2023). Bitkisel üretim. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> adresinden 15 Ocak 2024 tarihinde alınmıştır.
- Verma, R. K., Mishra, M., Marwal, A. ve Gaur, R. K. (2020). Identification, genetic diversity and recombination analysis of watermelon mosaic virus isolates. *3 Biotech*, 10(6), 257.
- Vučurović, A. ve Bulajić, A. I. S. (2012). Non-persistently aphid-borne viruses infecting pumpkin and squash in Serbia and partial characterization of Zucchini yellow mosaic virus isolates. *European Journal of Plant Pathology*, 133, 935-947.
- Wang, D. L. G. (2017). Host reaction of watermelon mosaic virus isolates infecting melon from different geographical origins in xinjiang of China. *Horticultural Plant Journal*, 3, 23-28.
- Webb, H. A. (1965). Isolation and identification of watermelon mosaic viruses 1 and 2. *Phytopathology*, 55(8), 895-900.

- Wei, T., Lu, G. ve Clover, G. R. G. (2009). A multiplex RT-PCR for the detection of Potato yellow vein virus, Tobacco rattle virus and Tomato infectious chlorosis virus in potato with a plant internal amplification control. *Plant Pathology*, 58(2), 203-209.
- Yamamoto, T. M. (1982). Transmission of watermelon mosaic virus by aphid. *Journal of Virology*, 45(3), 123-129.
- Yanmaz, R. (2003). Çekirdek kabağı yetiştiriciliği. *Ekin Dergisi*, 7(6), 22-24.
- Yeşil, S. (2021). Detection and molecular characterization of viruses infecting edible seed squash in Turkey. *Journal of Plant Diseases and Protection*.
- Yücelşengün, İ., Yücel, E., Kılıç, G., Öztürk, B. (2021). Kabak ve Kayısı çekirdeği yağlarının yağ asidi kompozisyonu, biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi. *Gıda*, 46(3), 608-620. <https://doi.org/10.15237/gida.GD21024>
- Zitter, T. D. (1996). *Compendium of cucurbit diseases*. APS.

