



Hatay ilinde yetişen Cucurbitaceae familyasına ait kültür bitkilerinde bazı virüslerin DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleriyle saptanması ve moleküler karakterizasyonu

Detection and molecular characterization of some viruses on Cucurbitaceae plants growing in Hatay province by DAS-ELISA and RT-PCR methods

Hülya ÜSTÜNKAYA GÜNEŞ¹ , Mona GAZEL¹ , Kadriye ÇAĞLAYAN¹ 

¹Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antakya-Hatay, Türkiye.

MAKALE BİLGİSİ / ARTICLE INFO

Makale tarihçesi / Article history:


DOI: [10.37908/mkutbd.1098781](https://doi.org/10.37908/mkutbd.1098781)

Geliş tarihi/Received:06.04.2022

Kabul tarihi/Accepted:14.06.2022

Keywords:

Boron content, Olive orchard, soil properties, Gaziantep.

 Corresponding author: Mona GAZEL

 mhurigil@mku.edu.tr

Ö Z E T / A B S T R A C T

Aims: In this study, it was aimed to investigate the occurrence of cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV), cucurbit chlorotic yellows virus (CCYV) and beet pseudo-yellows virus (BPYV) in cucumber, zucchini and melon plants grown in Hatay province by Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (DAS-ELISA) and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) methods, to analyse the phylogenetic relationships of identified isolates.

Methods and Results: Totally 90 symptomatic and non-symptomatic cucumber, zucchini and melon samples were collected from Hatay province. DAS-ELISA and RT-PCR methods were used to investigate the presence of CCYV and RT-PCR method was used for CYSDV and BPYV. The most common symptoms observed are leaf shrinkage, deformation, leaf wrinkles, curling and vein clearing. According to the DAS-ELISA results, CCYC was not found in the samples tested. As a result of RT-PCR analysis, BPYV and CCYV could not found in the samples tested, but PCR amplicons of 364 bp amplifying the heat shock protein 70h (HSP70h) gene of CYSDV were obtained from 11 samples (9 zucchini, 2 melons). As a result of bidirectional sequence analysis of 10 CYSDV isolates, it was determined that the obtained nucleotide sequences were highly similar (99%) to that of the CYSDV isolates registered in the GeneBank. In this study, CYSDV was reported for the first time in the zucchini and melon plants growing in Hatay province.

Conclusions: CYSDV was detected for the first time in samples collected from zucchini and melon plants in Hatay province. BPYV and CCYV could not be detected in any of the samples tested. The fact that 12.22% of the tested samples were infected with CYSDV highlights the need of using healthy plant materials.

Significance and Impact of the Study: In this study, the presence of CYSDV was proven by RT-PCR analyses for the first time in zucchini and melon plants in Hatay province.

Atif / Citation: Üstünkaya Güneş H, Gazel M, Çağlayan K (2022) Hatay ilinde yetişen Cucurbitaceae familyasına ait kültür bitkilerinde bazı virüslerin DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleriyle saptanması ve moleküler karakterizasyonu. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 27(3) : 424-433. DOI: 10.37908/mkutbd.1098781

GİRİŞ

Cucurbitaceae familyasına ait türlerin yetiştiriciliği ülkemizin bütün bölgelerinde yapılmaktadır. Özellikle Akdeniz ve Ege bölgelerinde bu türler açık alanda ve örtü altında yaygın olarak yetiştirilmektedir. Dünyada kavun üretimi yapan ülkeler arasında ülkemiz 2. sırada olup, 2021 yılı verilerine göre 1.638.638 ton kavun üretilmektedir. Hıyar üretiminde ülkemiz 1.890.160 ton ile 3.sırada yer almaktadır. Ülkemiz kabak üretiminde ise dünyada 8. sırada olup, 609.622 ton üretim miktarına sahiptir. İstatistiki verilere göre Hatay'da toplam 229.763 dekar alanda sebze yetiştiriciliği yapılmaktadır (TÜİK, 2021).

Kabakgillerde gelişme geriliği, meyve ve çiçek sayısında azalmalara neden olan virüsler (Luis-Arteaga ve ark., 1998) dünyada kabakgil yetiştirilen hemen hemen tüm alanlarda görülmektedir. Son yıllarda Cucurbitaceae familyasına ait bitkilerde saptanan virüslerden kabakgil sarı bodurlaşma bozukluğu virüsünün (cucurbit yellow stunting disorder virus CYSDV), şiddetli sararmaya neden olduğu, meyve ağırlığını önemli ölçüde etkilediği ve %30-50 arasında verim kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Abou Jawdah ve ark., 2000). CYSDV, ilk kez Birleşik Arap Emirliklerinde 1982 yılında tanımlanmış olup (Hassan ve Duffus, 1991) daha sonra İspanya'da (Celix ve ark., 1996), diğer Orta Doğu ve Akdeniz ülkelerinden İspanya, Mısır, İsrail, Ürdün, Türkiye, Lübnan, Portekiz ve Fas'ta rapor edilmiştir (Wisler ve ark., 1998; Rubio ve ark., 1999; Abou Jawdah ve ark., 2000). CYSDV'nin Closteroviridae familyasında Crinivirus cinsine dahil olduğu (Wisler ve ark., 1998; Fauquet ve Mayo, 1999) ve *Bemisia tabaci* (Genn.) ile taşındığı rapor edilmiştir (Berdiales ve ark., 1999; Celix ve ark., 1996). CYSDV İspanya (Berdiales ve ark., 1999), Portekiz (Louro ve ark., 2000), Lübnan (Abou-Jawdah ve ark., 2000), Fas (Desbiez ve Lecoq, 2000), Fransa (Desbiez ve ark., 2003), İran (Keshavarz ve ark., 2013) ve Mısır (El Rahmany ve ark., 2014)'da da rapor edilmiştir.

Cucurbit klorotik sarılık virüsü (Cucurbit chlorotic yellows virüs, CCYV) ilk kez Japonya'da 2004 yılında kavun bitkilerinde saptanmış (Gyoutoku ve ark., 2008) ve daha sonra virüs diğer ülkelerde de rapor edilmiştir. CCYV'nin hıyar, kavun ve karpuz bitkilerinin yapraklarında klorotik lekeler ve yaprağın tümünün sararmasına, hıyarlarda önemli verim kaybına neden olduğu, kavunların market değerini düşürdüğü ve şeker içeriğini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Gyoutoku ve ark., 2009). CCYV Closteroviridae familyasında Crinivirus cinsi içine dahil edilmiştir. Etmen Japonya (Gyotoku ve ark., 2008), Tayvan (Huang ve ark., 2010), Sudan (Hamed ve ark., 2011), Çin (Zeng ve ark., 2011; Gu ve ark., 2011), Lübnan

(Abrahamian ve ark., 2012), İran (Bananej ve ark., 2013), Yunanistan (Orfanidou ve ark., 2014), Mısır (Amer, 2015), Suudi Arabistan (Shakeel ve ark., 2018)'da saptanmıştır.

Şekerpancarı yalancı sarılık virüsü (beet pseudo-yellows virus, BPYV) ilk kez beyaz sinekle taşınan Closterovirus olarak 1965 yılında Kaliforniya'da seralarda tanımlanmış bir virüsdür (Duffus, 1965). Etmenin süs bitkileri ve yabancı otları içeren geniş bir konukçu dizisi olduğu rapor edilmiş olup BPYV enfekteli hıyar ve kavun bitkilerindeki semptomların CCYV ve CYSDV tarafından neden olunanlara oldukça benzer olduğu gözlemlenmiştir (Wisler ve ark., 1998). Etmen İspanya (Berdiales ve ark., 1999), İtalya (Tomassolli ve ark., 2003) ve Yunanistan (Boubourakas ve ark., 2006)'da rapor edilmiştir.

Cucurbitaceae familyasına ait bitkilerde CYSDV, CYSDV ile CVYV (hıyar damar sarıllık virüsü)'lerinin beraber enfeksiyonun sinerjik etki oluşturduğu (Fidan ve ark., 2012, Gil-Salas ve ark., 2012 ve Abrahamian ve ark., 2015) bildirilmiştir. CYSDV'nin subtropik ve tropik bölgelerde serada ve açıkta yetiştirilen Cucurbitaceae familyasına ait bitkileri etkileyen en önemli patojenlerden biri olduğu bildirilmiştir (Orfanidou ve ark., 2014; Amer, 2015; Wintermantel ve ark., 2016). CYSDV, CCYV ve diğer Crinivirusler tarafından neden olunan semptomların çok benzediği ve bu etmenlerin ayrımının laboratuvara dayalı teşhis yöntemlerinin uygulanmasıyla yapıldığı rapor edilmiştir (Wintermantel ve Wisler, 2006).

Antalya'da Kasım 2015 ve Şubat 2016'da üç farklı serada sararma semptomlarının gözlemlendiği hıyar bitkilerinden alınan 30 örnek CYSDV ve CCYV'nin varlığı açısından RT-PCR yöntemiyle analiz edilmiştir. Toplanan örneklerden 15 tanesinin CYSDV, 21 örneğin CCYV ile enfekteli olduğu bu örneklerin 6 tanesinin hem CYSDV hemde CCYV ile karışık enfekteli olduğu tespit edilmiştir. CCYV'nin 2 izolatının kısmi RdRp bölgesi sekans edilmiş ve elde edilen nükleotid dizilerinin BLAST analizi sonucunda izolatların Japonya izolatı ile %99 benzerlik gösterdiği ortaya koyulmuştur. Bu rapor ile CCYV Türkiye'de hıyar bitkilerinde ilk kez rapor edilmiştir (Orfanidou ve ark., 2017).

Adana, Mersin ve Antalya illerinde örtüaltı kavun ve hıyar bitkilerinde sararma ve damar açılmasına neden olan ve *Bemisia tabaci* ile taşınan etmenleri belirlemek amacıyla 2010-2011 yıllarında yapılan bir çalışmada toplanan bitki örnekleri CYSDV ve CVYV açısından test edilmiştir. CYSDV, DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile CVYV ise RT-PCR yöntemi ile testlenmiştir. Yapılan RT-PCR çalışmaları sonucu belirtilere neden olan etmenlerin CVYV ve CYSDV olduğu saptanmıştır. 134 kavun

örneğin 63 adedi CYSDV ve 24 adedi CVYV ile bulaşık olarak bulunmuştur. 110 hıyar örneğinin 82 adedi CYSDV, 12 adedi CVYV ile enfekteli bulunmuştur. Vektörler PCR ile testlendiğinde *B. tabaci* biyotip B (%92)'nin etkin bir şekilde virüsü taşıdığı, Q biyotipinin ise (%8) virüsü daha az etkin taşıdığı belirlenmiştir. Her iki virüse ait izolatlar sekanslanarak elde edilen nükleotid dizilimleri İsrail, Amerika ve İspanya izolatları ile kıyaslanmıştır. CYSDV'ün %96, CVYV'ün %95 oranında İsrail, Amerika ve İspanya izolatları ile kılıf protein genlerinin benzerlik gösterdiği sonucuna varılmıştır (Fidan ve ark., 2012). Hatay ili genelinde kabakgiller dışında yetişen biber, marul, ispanak gibi sebzelerde sorun olan viral hastalıkların yaygınlığının yanısıra etmenlerin DAS-ELISA ve biyolojik indeksleme yöntemleriyle tanılanması üzerine yakın zamanlarda yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Sertkaya, 2015; Sertkaya ve Özdağ, 2017)

Kabakgiller, Hatay ilinde yaygın biçimde üretilmesine rağmen, üretim alanlarındaki CYSDV, BPYV ve CCYV'nin varlığı konusunda bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile Hatay ilinde Cucurbitaceae familyasına ait bitkilerde CYSDV, BPYV ve CCYV'nin varlığı serolojik ve moleküler yöntemler ile araştırılmış ve tespit edilen virüs izolatlarının moleküler karakterizasyonları yapılmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Sürvey çalışmaları, 2018 yılı Nisan-Mayıs aylarında hıyar, kabak ve kavun yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Hatay ili ve ilçelerinde yürütülmüştür. Bitki numuneleri sistematik örnek alma yöntemine göre toplanmıştır (Bora ve Karaca 1970). Tesadüfi olarak seçilen tarlalardan en az bir, en çok üç adet olmak üzere, virüs simptomsu gösteren ve göstermeyen hıyar, kabak ve kavun bitkilerinden alınan örnekler polietilen torbalara konularak soğuk zincirde laboratuvara getirilmiş ve PCR testlerinde kullanılmak üzere 4°C'de muhafaza edilmiştir.

DAS-ELISA testleri

Toplanan bitki materyali Clark ve Adams (1977)'e göre DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) testine tabi tutulmuştur. Sadece CCYV için üretilmiş ticari antiserum olduğundan dolayı, örnekler sadece CCYV'üne karşı DAS-ELISA yöntemiyle firmanın talimatları doğrultusunda testlenmiştir. Test sonucunda plakalarda meydana gelen renk değişimleri gözlenmiş ve absorbans değerleri SEAC SIRIO S ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Okumalar sonucunda absorbans değerleri, negatif örneklerin iki katı ya da daha fazla olan örnekler

pozitif yani virüs infekteli olarak kabul edilmiştir (Clark, 1981; Gazel ve ark., 2018; Akgül ve ark., 2021).

RNA izolasyonu

Sürvey çalışmalarında toplanan hıyar, kabak ve kavun örneklerinde CYSDV, BPYV ve CCYV enfeksiyonlarının araştırılması için toplam RNA izolasyonu Qiagen RNeasy Plant Mini Kit (Almanya) kullanılarak MacKenzie ve ark (1997)'nin önerdiği modifiye yöntemine göre yapılmıştır. Virüslere ait cDNA'lar (complementer DNA) Aristoteles Üniversitesi (Selanik-Yunanistan)'den temin edilmiş ve pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Toplanan bitkilerden ekstrakte edilen RNA'lardan cDNA eldesinde, her bir örnek için 1 µl random hexamer primer, 6,5 µl d2H2O ve 5 µl RNA eklenerek PCR tüplerine konulmuştur. Tüpler PCR cihazında 94 °C'de 5 dakika ve buzda 5 dakika bekletildikten sonra her bir tüp içine 4 µl 5X RT tamponu (Fermentas), 2 µl d2H2O, 0.5 µl dNTP (10 mM) ve 1 µl RT (MMLV) enzimi eklenmiştir. Tüpler PCR cihazında 42°C'de 1 saat 72°C'de 10 dakika tutularak cDNA aşaması tamamlanmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

BPYV, CCYV, CYSDV'nin RT-PCR yöntemi ile araştırılmasında, steril bir PCR tüpüne toplam 25 µl hacimde olacak biçimde 2,5 µl 10XB, 2µl dNTP (2,5 mM), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl virüse özgü forward primer (10 pmol), 1 µl virüse özgü reverse primer (10 pmol), 0,2 µl *Taq* DNA polymerase, 2 µl cDNA ve 16.8 µl RNase'dan arı su konularak reaksiyon gerçekleştirilmiştir. PCR döngüleri üç virüs için aynı olup, 95 °C'de 3 dakika; 35 döngü 95 °C'de 1 dakika, 60°C'de 1 dakika, 72 °C'de 1 dakika ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika olacak şekilde programlanmıştır. RT-PCR çalışmalarında kullanılan primerlere ait bilgiler Çizelge 1'de verilmiştir.

DNA dizilemesi ve filogenetik analiz

PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezi sonucunda beklenen büyüklükte elde edilen PCR ürünleri DNA dizileme yapan firmaya (Medsantek, İstanbul) gönderilmiş, PCR'da kullanılan primerler ile çift yönlü olarak dizilenmiş ve sonuçlar on-line olarak alınmıştır. Elde edilen nükleotid dizileri, NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)'in Basic alignment search (BLAST) fonksiyonu ile diğer dünya izolatları ile benzerlikleri kontrol edilmiştir. Filogenetik analizler Neighbour-Joining metodu ile (Saitou ve Nei, 1987) MEGA X programı (Kumar ve ark., 2018) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 1. Hıyar, kabak ve kavun örneklerinin testlendiği virüsler ve PCR analizlerinde kullanılan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri, çoğaltıldığı bölge ve baz büyüklükleri

Table 1. Viruses for which cucumber, zucchini and melon samples are tested, nucleotide sequences of primer pairs used in PCR analysis, the base sizes and the region in which they are amplified

Virüs	Primer adı	Primer dizilimleri (5'-3')	Hedef gen bölgesi	Amplikon büyüklüğü	Referans
BPYV	BPYV I	TCGAAAGTCCAACAAGACGT	HSP70h	251	Boubourakas ve ark., 2006
	BPYV II	CTGATGGTGCGGAGTG			
CCYV	RdRpF	CCTAATATTGGAGCTTATGAGTACA	RdRp	709	Orfanidou ve ark.,2014
	RdRpR	CATACACTTTAAACACAACCCC			
CYSDV	F	ATGGACATGCCTAACTGTTACTT	HSP70h	364	Boubourakas ve ark., 2006
	R	ATAGCTGCTGCAGATGGTTC			

BULGULAR ve TARTIŞMA

Hatay ilinde Kırıkhan ve Reyhanlı ilçelerinde Nisan-Mayıs aylarında survey çalışması yürütülmüş ve 13 hıyar, 37 kabak ve 40 kavun olmak üzere toplam 90 örnek

toplanmıştır. Survey gerçekleştirilen alanlarda gözlenen en yaygın semptomlar yapraklarda küçülme, deformasyonlar, yaprak kırışıklıkları, kıvrılma ve damar açılmaları olmuştur (Şekil 1, 2, 3).



Şekil 1. Kabak bitkilerinin yapraklarında gözlenen küçülme, deformasyon, yaprak kırışıklıkları, kıvrılma ve damar açılma semptomları

Figure 1. Leaf shrinkage, deformations, leaf wrinkles, curling and vein clearing symptoms observed in zucchini leaves



Şekil 2. Hıyar bitkilerinde gözlenen yapraklarda küçülme, deformasyon, renk değişikliği semptomları

Figure 2. Leaf shrinkage, deformation and leaf discoloration symptoms observed in cucumber plants



Şekil 1. Kavun yapraklarında gözlenen sararma ve mozaik belirtileri
Figure 3. Yellowing and mosaic symptoms observed on melon leaves

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

DAS-ELISA testleri

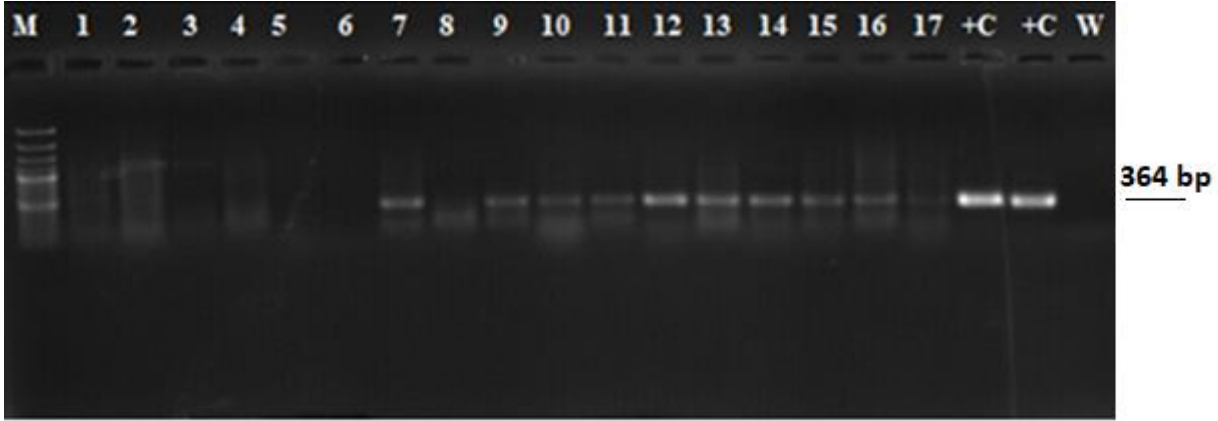
Hatay ilinden toplanan toplam 90 adet hıyar, kabak ve kavun bitkisi DAS-ELISA yöntemiyle CCYV açısından testlenmiş olup testlenen örneklerde CCYV saptanamamıştır.

RT-PCR analizleri

Hatay ili hıyar, kabak ve kavun alanlarından toplanan örneklerde CYSDV, BPYV ve CCYV'nin varlığını tespit etmek amacı ile yapılan RT-PCR analizlerinde testlenen örneklerinin hiçbirinde BPYV ve CCYV saptanamamıştır. Testlerde BPYV ve CCYV'lerinin pozitif kontrolleri sırası ile 251 bp ve 709 bp büyüklüğünde DNA bandı oluştururken su kontrolde herhangi bir bant elde edilmemiştir. CYSDV'nin HSP70h bölgesinin bir kısmını

çoğaltan F/R primeriyle yapılan RT-PCR analizlerinde Hatay'dan toplanan 37 kabak bitkisinden 9 tanesinde, 40 kavun bitkisinden 2 tanesinde pozitif kontrole aynı seviyede ve 364 bp düzeyinde bant elde edilmiştir (Şekil 4). Hatay ilinde yetiştirilen hıyar, kabak ve kavun bitkilerinden toplanan toplam 90 örnekte CYSDV bulunma oranı %12.22 olarak bulunmuştur. Bu çalışma sonucunda CYSDV Hatay ili kabak ve kavun üretim alanlarında ilk defa rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışmada araziden bitki örneği toplanırken etmenlerin vektörü olabilecek beyaz sinekler de gözlenmeye çalışılmış ancak bitkilerden beyaz sinek bireyleri toplanamamıştır.

CYSDV Lübnan (Abou-Jawdah, 2000), İspanya (Celix ve ark., 1996), Fransa (Desbiez ve ark., 2003), Portekiz (Louro ve ark., 2000), Fas (Desbiez ve Lecoq, 2000) Texas-Amerika (Kao ve ark., 2000), Arizona ve Kaliforniya'da (Kuo ve ark., 2007) Cucurbitaceae familyasına ait türlerde rapor edilmiştir. Suudi Arabistan'da Riyad'da hıyar sararma hastalığının etiolojisinde rol oynayan Crinivirüslerin moleküler karakterizasyonunun yapıldığı bir çalışmada hıyarlarda CCYV %61.1, CYSDV'nin ise %19.4 oranında bulunduğu ve testlenen bitkilerin %9'unun her iki virüsle enfekteli olduğu belirlenmiştir (Shakeel ve ark., 2018). CCYV ve CYSDV'nin *Bemisia tabaci* ile taşındığı (Celix ve ark., 1996; Berdiales ve ark., 1999; Okuda ve ark., 2010), tohumla taşınmadığı, yabancı otların her iki etmenin epidemiyolojisinde rol oynadıkları ortaya koyulmuştur (Boubourakas ve ark., 2006). Hıyar yapraklarında klorotik beneklenme ve damarlar arası alanda kloroza neden olan BPYV'nin birçok ülkede saptandığı ve etmenin vektörünün *Trialeurodes vaporariorum* (sera beyaz sineği) olduğu bildirilmiştir (Clover ve ark., 2001).



Şekil 4. Hatay ilinden toplanan hıyar, kabak ve kavun örneklerinde cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV)'e spesifik F/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizinin agaroz jel elektroforez sonucu. M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 1-3: Hıyar, 4-9: Kavun, 10-17: Kabak örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol

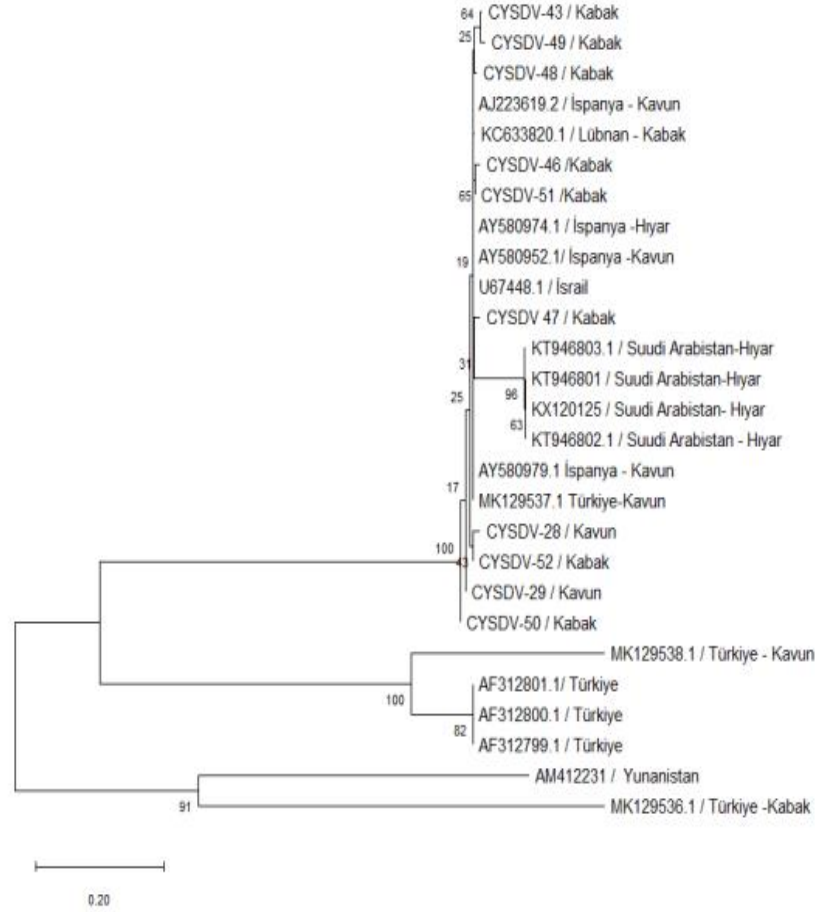
Figure 4. Agarose gel electrophoresis result of RT-PCR analyses using F/R primer pair specific to cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) in cucumber, zucchini and melon samples collected from Hatay province. M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 1-3: Cucumber, 4-9: Melon, 10-17: Zucchini samples, +C: Positive control, W: Water control

DNA dizilemesi ve filogenetik analiz

Bu çalışma kapsamında CYSDV'ünün HSP70h bölgesinin bir kısmını çoğaltan primerler kullanılarak yapılan PCR analizlerinde pozitif kontrolle aynı seviyede bant veren (364 bp) 11 örneğin 10 tanesinin sekans analizi yapılmıştır. Elde edilen CYSDV Türkiye izolatlarının filogenetik analizlerde aynı grup içerisinde yer aldığı ve birbirleriyle %91-99 oranında benzer oldukları ortaya koyulmuştur. CYSDV izolatlarından CYSDV-48 kabak izolatının GenBankasında kayıtlı AY580974.1 İspanya hıyar izolatıyla %99 oranında benzer olduğu belirlenmiştir (Şekil 5).

Sonuç olarak, Hatay ili hıyar, kabak ve kavun alanlarındaki önemli virüs hastalık etmenlerinin belirlenmesini ve moleküler özelliklerinin saptanmasını hedefleyen bu çalışma ile CYSDV, CCYV ve BPYV etmenleri 2018 yılında yürütülen survey çalışmaları ile araştırılmış, bu amaçla toplanan 90 yaprak örneği serolojik ve moleküler testlere tabi tutulmuştur. Toplanan 90 adet hıyar, kabak ve kavun bitkileri DAS-ELISA yöntemiyle CCYV açısından testlenmiş olup testlenen örneklerde CCYV saptanamamıştır. Yapılan moleküler testlemelerde hıyar, kabak ve kavun örneklerinde CYSDV'nin bulunma oranının %12.22 olduğu belirlenmiştir. CYSDV, testlenen kavunlarda %5, kabaklarda %24.32 oranında saptanırken hıyar bitkilerinde tespit edilememiştir. Bununla beraber testlenen örneklerin hiçbirinde CCYV ve BPYV tespit edilememiştir. Hatay ilinde tespit edilen CYSDV izolatlarının dünyadaki diğer izolatlar ile nükleik asit düzeyinde %99.0-98.7 arasında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Dünya'da ve ülkemizde hıyar, kabak ve kavun üretim alanlarında verim ve kalite kayıplarına neden olan virüs hastalıkları ile mücadelenin zamanında ve uygun biçimde yürütülmesi gerekmektedir. CSYDV'nin doğal konukçularının hıyar, kavun, karpuz ve kabak gibi Curcurbitaceae familyası üyeleri olduğu, virüsün neden olduğu şiddetli sararmanın, meyve ağırlığını önemli ölçüde etkilediği ve %30-50 arasında verim kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Abou Jawdah ve ark., 2000). CYSDV'nin yaşlı yapraklarda damarlararası alanda klorotik benekler oluşturduğu, zaman geçtikçe damarlar hariç tüm yaprağın sararmasına neden olduğu belirlenmiştir (Celix ve ark., 1996; Wisler ve ark., 1998). CYSDV'nin hıyar, kavun ve karpuz bitkilerinin yapraklarında sararma, damarlar arası alanda kloroz belirtileri olduğu belirlenmiştir (Ghanem ve ark., 2016).



Şekil 5. Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV)'ünün farklı izolatlarının sekans analizleri sonucunda elde edilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, MEGA X yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendrogramda bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiş ve %50'nin altındaki değerler ağaçta yer almamıştır.

Figure 5. Phylogenetic tree obtained as a result of sequence analysis of different isolates of Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV). Neighbor-joining (NJ) method included in MEGA X software was used in phylogenetic analysis. In the dendrogram, bootstrap (select-link estimation test) values are shown as percentages in branches, and values below 50% are not included in the tree

CYSDV'nin tohumla taşınmadığı dikkate alındığında, virüsün etkili biçimde taşınmasında beyaz sineklerin önemli role sahip olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle hastalık etmeni ile mücadelede beyaz sinekle mücadele büyük öneme sahiptir. Vektör ve virüsün konucusu olabilecek yabancı otlarla mücadele edilmesi ve dayanıklı çeşitlerin kullanılması, CYSDV'den kaynaklı verim ve kalite kayıplarını önlemede etkili olacaktır.

Ülkemizde kabakgillerde sağlıklı olmayan üretim materyallerinin kullanılması, sertifikasyon programlarına yeterli önemin verilmemesi ve kontrolsüz tohum ithal

edilmesi virüslerin hızla yayılmasına neden olmaktadır. Bu yüzden ülkemizde sanitasyon ve sertifikasyon programlarının üzerinde önemle durulması gerekmektedir. Moleküler yöntemler kullanılarak Hatay ile kabak ve kavun ekiliş alanlarında yürütülen bu çalışma ile CYSDV'nin varlığı ilk defa rapor edilmiştir.

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, Hatay ilinde yetiştirilen hiyar, kabak ve kavun bitkilerinde cucurbit yellow stunting disorder

virus (CYSDV), cucurbit chlorotic yellows virus (CCYV) ve beet pseudo-yellows virus (BPYV)'lerinin Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (DAS-ELISA) ve Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) yöntemleriyle belirlenmesi, elde edilen virüs izolatlarının filogenetik ilişkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Yöntem ve Bulgular: Hatay ilinden simptomlu ve simptomsuz 90 adet hıyar, kabak ve kavun örneği toplanmıştır. CCYV'nin varlığını araştırmak için DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri, CYSDV ve BPYV'lerinin varlığını araştırmak için ise RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Gözlenen en yaygın simptomlar yapraklarda küçülme, deformasyon, yaprak kırışıklıkları, kıvrılmalar ve damar açılmalarıdır. DAS-ELISA testi sonuçlarına göre testlenen örneklerde CCYV bulunamamıştır. RT-PCR analizleri sonucunda testlenen örneklerde BPYV ve CCYV bulunamamış ancak CYSDV'nin heat shock protein 70h (HSP70h) genini çoğaltan 364 bp büyüklüğünde PCR ampliconları 11 örnekte (9 kabak, 2 kavun) elde edilmiştir. Bu ürünlerden 10 tanesinin doğrudan iki yönlü sekans analizi sonucunda, elde edilen nükleotid dizilerinin gen bankasında kayıtlı CYSDV izolatları ile yüksek oranda (%99) benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışma ile CYSDV ilk defa Hatay ilinde kabak ve kavun bitkilerinde rapor edilmiştir.

Genel Yorum: Hatay ili kabak ve kavun alanlarından toplanan örneklerde CYSDV ilk kez tespit edilmiştir. Testlenen örneklerinin hiçbirinde BPYV ve CCYV belirlenmemiştir. Testlenen örneklerin %12.22 oranında CYSDV ile enfekteli bulunması, sağlıklı bitki materyallerinin kullanılmasının önemini göstermektedir.

Çalışmanın Önemi ve Etkisi: Hatay ilinde ilk kez bu çalışma ile kabak ve kavun bitkilerinde CYSDV'nin varlığı, RT-PCR analizleri ile kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Cucurbitaceae, virüs, RT-PCR, DAS-ELISA, sekans analizleri.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma verilerinin tamamı Mustafa Kemal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı'na yüksek lisans tezi olarak sunulmuştur. Bu çalışmayı destekleyen Mustafa Kemal Üniversitesi BAP Birimine (Proje No: 18.YL.042) teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMA BEYANI

Yazar(lar) çalışma konusunda çıkar çatışmasının olmadığını beyan eder.

ARAŞTIRMACILARIN KATKI ORANI BEYANI

Yazarlar çalışmaya eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Abou-Jawdah Y, Sobh H, El-Zammar S, Fayyad A, Lecoq H (2000) Incidence and management of virus diseases of cucurbits in Lebanon. *J. Crop Prot.* 19(4): 217-224.
- Abrahamian PE, Sobh H, Seblani R, Abou-Jawdah Y (2012) First report of Cucurbit chlorotic yellows virus on cucumber in Lebanon. *Plant Dis.* 96: 1704-1704.
- Abrahamian PE, Sobh H, Seblani R, Abou-Jawdah Y (2015) Co-infection of two criniviruses and a begomovirus enhances the disease severity in cucumber. *Eur. J. Plant Pathol.* 142(3): 521-530.
- Akgül S, Gazel M, Tunç B, Caglayan K (2021) Adıyaman ili badem ağaçlarında önemli Prunus virüslerinin DAS-ELISA ve RT-PCR analizleri ile saptanması ve karakterizasyonu. *MKU Tar. Bil. Derg.* 26(3): 576-585.
- Amer MA (2015) Serological and molecular characterization of cucurbit chlorotic yellows virus affecting cucumber plants in Egypt. *Int. J. Virol.* 11(1): 1-11.
- Bananej K, Menzel W, Kianfar N, Vahdat A, Winter S (2013) First report of cucurbit chlorotic yellows virus infecting cucumber, melon and squash in Iran. *Plant Dis.* 97: 1005.
- Berdiales B, Bernal JJ, Saez E, Woudt B, Beitia F, Rodriguez-Cerezo E (1999) Occurrence of cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) and beet pseudo-yellows virus in cucurbit crops in Spain and transmission of CYSDV by two biotypes of *Bemisia tabaci*. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 211-215.
- Bora T, Karaca G (1970) Bitki hastalıkları surveyi, kültür bitkilerinde hastalığın ve zararın ölçülmesi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yardımcı Ders Kitabı, Yayın No: 167, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova, İzmir, 43 s.
- Boubourakas IN, Avgelis AD, Kyriakopoulou PE, Katis NI (2006) Occurrence of yellowing viruses (beet pseudo-yellows virus, cucurbit yellow stunting disorder virus and cucurbit aphid-borne yellows virus) affecting cucurbits in Greece. *Plant Pathol.* 55: 276-283.
- Celix A, Lopez-Sese A, Almarza N, Gomez-Guillamon ML, Rodriguez C (1996) Characterization of cucurbit yellow stunting disorder virus, a *Bemisia tabaci* transmitted closterovirus. *Phytopathol.* 86: 1370-1376.
- Clark MF (1981) Immunosorbent assay plant pathology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 19: 83-106.

- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- Clover GRG, Elliott DR, Tang Z, Alexander BJR (2001) Occurrence of beet pseudo-yellows virus in cucumber in New Zealand. *New Dis. Rep.* 4: 8.
- Desbiez C, Lecoq H (2000) First report of cucurbit yellow stunting disorder virus in Morocco. *Plant Dis.* 84(5): 596.
- Desbiez C, Lecoq H, Girard M (2003) First report of cucurbit yellow stunting disorder virus in commercial cucumber greenhouses in France *Plant Dis.* 87(5): 600.
- Duffus JE (1965) Beet pseudo-yellows virus, transmitted by the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). *Phytopathol.* 55: 450-453.
- El Rahmany RG, El Attar AK, Zein HS, Abdallah NA, Mazyad HM (2014) Characterization of an Egyptian isolate of the cucurbit yellow stunting disorder virus. *Arab J. Biotechnol.* 17(1): 29-42.
- Fauquet MC, Mayo MA (1999) Abbreviations for plant virus names. *Arch. Virol.* 144: 1249-1273.
- Fidan H, Unlu M, Unlu A, Yilmaz MA (2012) Cucurbit yellow stunting disorders (CYSDV) and cucumber vein yellowing virus (CVVY) diseases on melon and cucumber in Turkey. *Proceedings of the Xth EUCARPIA International Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae October 15-18th, Antalya, Turkey.* pp. 755-762.
- Gazel M, Tunç B, Çağlayan K (2018) Hatay ve Tekirdağ illeri bağ alanlarında odun dokusunda deformasyona (rugose wood) neden olan virüslerin serolojik ve moleküler yöntemlerle saptanması ve karakterizasyonu. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 23:181-187.
- Ghanem GAM, Noura-Hassan M, Kheder AA, Mazyad HM, Abdel-Alim AI (2016) Antiserum production, biological and serological detection of cucurbit yellow stunting disorder crinivirus (CYSDV) in Egypt. *Int. J. Adv. Res.* 4(4): 1116-1128.
- Gil-Salas FM, Peters J, Boonham N, Cuadrado IM, Janssen D (2012) Co-infection with cucumber vein yellowing virus and cucurbit yellow stunting disorder virus leading to synergism in cucumber. *Plant Pathol.* 61: 468-478.
- Gu QS, Liu YH, Wang YH, Huangfu WG, Gu HF, Xu L, Song FM, Brown JK (2011) First report of cucurbit chlorotic yellows virus in cucumber, melon, and watermelon in China. *Plant Dis.* 95(1): 73.
- Gyoutoku Y, Hayashida S, Okazaki S, Okuda M (2008) The occurrence of melon yellowing disease caused by cucurbit chlorotic yellows virüs in Kumamoto prefecture. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 74: 219-219.
- Gyoutoku Y, Okazaki S, Furuta A, Etoh T, Mizobe M, Kuno K, et al. (2009) Chlorotic yellows disease of melon caused by cucurbit chlorotic yellows virus, a new crinivirus. *Jpn. J. Phytopathol.* 75: 109-111. (In Japanese with English abstract)
- Hamed K, Menzel W, Dafalla G, Gadelseed AMA, Winter S (2011) First report of cucurbit chlorotic yellows virus infecting muskmelon and cucumber in Sudan. *Plant Dis.* 95: 1321.
- Hassan AA, Duffus JE (1991) A review of a yellowing and stunting disorder of cucurbits in The United Arab Emirates. *Emirate J. Agric. Sci.* 2: 1-16.
- Huang L, Tseng HH, Li JT, Chen TC (2010) First report of cucurbit chlorotic yellows virus infecting cucurbits in Taiwan. *Plant Dis.* 94(9): 1168.
- Kao J, Jia L, Tian T, Rubio L, Falk BW (2000) First report of Cucurbit yellow stunting disorder virus (genus Crinivirus) in North America. *Plant Dis.* 84: 101.
- Keshavarz TM, Shams-Bakhsh K, Izadpanah S, Nassaj Hossini M (2013) Geographic distribution and phylogenetic analysis of cucurbit yellow stunting disorder virus in Iran. *Acta Virol.* 57: 415-420.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547-1549.
- Kuo YW, Rojas MR, Gilbertson RL, Wintermantel WM (2007) First report of cucurbit yellow stunting disorder virus in California and Arizona, in association with cucurbit leaf crumple virus and squash leaf curl virus. *Plant Dis.* 91(3): 330.
- Louro D, Vicente M, Vaira AM, Accotto GP, Nolasco G (2000) Cucurbit yellow stunting disorder virus (genus Crinivirus) associated with the yellowing disease of cucurbit crops in Portugal. *Plant Dis.* 84: 1156.
- Luis-Arteaga M, Alvarez JM, Alonso-Prados JL, Bernal JJ, Garcia-Arenal F, Lavina A, Batlle A, Moriones E (1998) Occurrence, distribution, and relative incidence of mosaic viruses infecting field-grown melon in Spain. *Plant Dis.* 82: 979-982.
- Mackenzie DJ, Mclean MA, Mukerji S, Green M (1997) Improved RNA extraction for woody plants for the detection of viral pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Plant Dis.* 81: 222-226.
- Okuda M, Okazaki S, Yamasaki S, Okuda S, Sugiyama M (2010) Host range and complete genome sequence of cucurbit chlorotic yellows virus, a new member of the genus Crinivirus. *Phytopathol.* 100: 560-566.

- Orfanidou CG, Maliogka VI, Katis NI (2014) First report of Cucurbit chlorotic yellows virus in cucumber, melon, and watermelon in Greece. *Plant Dis.* 98: 1446.
- Orfanidou CG, Maliogka VI, Katis NI, Kontosfyris G, Smith T, Caglayan K (2017) First report of cucurbit chlorotic yellows virus in cucumber in Turkey *J. Plant Pathol.* 99(2): 533-543.
- Rubio L, Soong J, Kao J, Falk BW (1999) Geographic distribution and molecular variation of isolates of three whitefly-borne closteroviruses of cucurbits: Lettuce infectious yellows virus, cucurbit yellow stunting disorder virus, and beet pseudo-yellows virus. *Phytopathol.* 89: 707-711.
- Saitou N, Nei M (1987) The Neighbor-Joining Method-a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sertkaya G (2015) Hatay İli marul ve ıspanak alanlarında bazı virüslerin araştırılması. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 20: 7-12.
- Sertkaya G, Özdağ Y (2017) Investigation on viruses causing yellowing disease in pepper in Hatay-Turkey. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 22: 16-22.
- Shakeel MT, Amer MA, Al-Saleh MA, Al-Shahwan IM, Kamran A, Orfanidou, CG, Katis NI (2018) Molecular characterization of Criniviruses involved in the etiology of cucumber yellowing disease in Riyadh region, Saudi Arabia. *Eur. J. Plant Pathol.* 150: 39-47.
- Tomassoli L, Lumia V, Siddu GF, Barba M, (2003) Yellowing diseases of melon in Sardinia (Italy) caused by beet pseudo-yellows virus. *J. Phytopathol.* 85: 59-61.
- TÜİK (2021) Türkiye bitkisel üretim istatistikleri <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>. (erişim tarihi: 28/02/2022).
- Wintermantel WM, Gilbertson RL, McCreight JD, Natwick, ET (2016) Host-specific relationship between virus titer and whitefly transmission of cucurbit yellow stunting disorder virus. *Plant Dis.* 100(1): 92-98.
- Wintermantel WM, Wisler GC (2006) Vector specificity, host range and genetic diversity of tomato chlorosis virus. *Plant Dis.* 90: 814-819.
- Wisler GC, Duffus JE, Liu H.Y, Li RH (1998) Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted closteroviruses. *Plant Dis.* 82: 270-280.
- Zeng R, Dai FM, Chen WJ, Lu JP (2011) First report of cucurbit chlorotic yellows virus infecting melon in China. *Plant Dis.* 95(3): 354.