

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



DOMATES VE BİBER BİTKİLERİNDE GÖRÜLEN *TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS* (ToBRFV), *TOMATO SPOTTED WILT VIRUS* (TSWV) VE *PEPINO MOSAIC VIRUS* (PepMV) HASTALIK ETMENLERİNE KARŞI MULTİPLEKS PRİMER VE PROB GELİŞTİRİLMESİ

Havva Nur CAYAK

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAYIS 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



DOMATES VE BİBER BİTKİLERİNDE GÖRÜLEN *TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS* (ToBRFV), *TOMATO SPOTTED WILT VIRUS* (TSWV) VE *PEPINO MOSAIC VIRUS* (PepMV) HASTALIK ETMENLERİNE KARŞI MULTİPLEKS PRİMER VE PROB GELİŞTİRİLMESİ

Havva Nur CAYAK

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAYIS 2023

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOMATES VE BİBER BİTKİLERİNDE GÖRÜLEN *TOMATO BROWN
RUGOSE FRUIT VIRUS* (ToBRFV), *TOMATO SPOTTED WILT VIRUS* (TSWV)
VE *PEPINO MOSAIC VIRUS* (PepMV) HASTALIK ETMENLERİNE KARŞI
MULTİPLEKS PRİMER VE PROB GELİŞTİRİLMESİ**

**Havva Nur CAYAK
BİTKİ KORUMA
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2023-6107 nolu proje ile desteklenmiştir.**

MAYIS 2023

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOMATES VE BİBER BİTKİLERİNDE GÖRÜLEN *TOMATO BROWN
RUGOSE FRUIT VIRUS* (ToBRFV), *TOMATO SPOTTED WILT VIRUS* (TSWV)
VE *PEPINO MOSAIC VIRUS* (PepMV) HASTALIK ETMENLERİNE KARŞI
MULTİPLEKS PRİMER VE PROB GELİŞTİRİLMESİ**

Havva Nur CAYAK
BİTKİ KORUMA
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 25/05/2023 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Hakan FİDAN (Danışman)	[imza]
Doç. Dr. Özer ÇALIŞ	[imza]
Doç. Dr. Gökmen KOÇ	[imza]

ÖZET

DOMATES VE BİBER BİTKİLERİNDE GÖRÜLEN *TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS* (ToBRFV), *TOMATO SPOTTED WILT VIRUS* (TSWV) VE *PEPINO MOSAIC VIRUS* (PepMV) HASTALIK ETMENLERİNE KARŞI MULTİPLEKS PRIMER VE PROB GELİŞTİRİLMESİ

Havva Nur CAYAK

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hakan FİDAN

Mayıs 2023; 47 sayfa

Domates (*Solanum lycopersicum*) ve biber (*Capsicum annuum*), dünyada olduğu gibi ülkemizde de insan gıdası olarak çok farklı kullanımları olan ve ülke ekonomisine katkı sağlayan vazgeçilmez sebze türleridir. Virüs hastalıkları domates üretimindeki en önemli sorunlardan biridir. Virüslere karşı kullanılan kimyasal savaş yönteminin uygulanamaması ve diğer kontrol yöntemlerinin üretici firma tarafından bilinmemesi virüs kaynaklı kayıpların artmasına neden olmaktadır. Bu çalışmada, üç önemli bitki virüsünün eş zamanlı tespiti için üç farklı primer-prob çiftine sahip Taqman® prob tabanlı Real-time multiplex PCR yöntemi geliştirilmiştir. Domates ve biberde çok fazla verim kaybına neden olan bu virüsler, *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* (ToBRFV), *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) ve *Pepino Mosaic Virus* (PepMV)' dir. Yukarıda bahsedilen üç virüsün kılıf protein dizileri, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'nden (NCBI) elde edildi ve BLAST gerçekleştirildi. Daha sonra ortak bölgeler belirlenerek Primer3 programı kullanılarak primer ve prob tasarımları yapılmıştır. Yoğun optimizasyon süreçleri gerektiren bir yöntem olan Multiplex qRT-PCR çalışmamızın temel amacı hassas, hızlı ve ekonomik bir yöntem sağlamak olduğu için PCR yönteminin istenilen noktaya ulaşmasını sağlayacak optimum koşullar belirlenerek dilüsyon serileri hazırlanmıştır. Bu hedefler ToBRFV için FAM kanalı, Tswv için HEX kanalı ve Pepmv için Cy5 kanalı seçildi. Multipleks qRT-PCR deneyi, sırasıyla 19.09, 21.89 ve 21.63 Ct değerleriyle başarılı olmuştur.

ANAHTAR KELİMELELER: Multiplex qRT-PCR, virus, ToBRFV, TSWV, PepMV, domates, biber

JÜRİ: Doç. Dr. Hakan FİDAN

Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Doç. Dr. Gökmen KOÇ

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF MULTIPLEX PRIMER AND PROBE AGAINST TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS (ToBRFV), TOMATO SPOTTED WILT VIRUS (TSWV) AND PEPINO MOSAIC VIRUS (PepMV) DISEASE FACTORS IN TOMATO AND PEPPER PLANTS

Havva Nur CAYAK

MSc Thesis in Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Hakan FİDAN

May 2023; 47 pages

Tomato (*Solanum lycopersicum*) and pepper (*Capsicum annuum*) are indispensable vegetable species that have many different uses as human food in our country as well as in the world and contribute to the national economy. Virus diseases are one of the most important problems in tomato production. The inability to apply the chemical warfare method used against viruses and the fact that other control methods are not known by the manufacturer cause virus-related losses to increase. In this study, a Taqman® probe-based Real-time multiplex PCR method with three different primer-probe pairs was developed for the simultaneous detection of three important plant viruses. These viruses that cause a lot of yield loss in tomatoes and peppers are Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), Tomato spotted wilt virus (TSWV) and Pepino mosaic virus (PepMV). The coat protein sequences of the three viruses mentioned above were obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and BLAST was performed. Then, the common regions were determined and primer and probe designs were made using the Primer3 program. Since the main purpose of our Multiplex qRT-PCR study, which is a method that requires intensive optimization processes, is to provide a sensitive, fast and economical method, dilution series were prepared by determining the optimum conditions that will enable the PCR method to reach these goals. The FAM-channel was selected for ToBRFV, the HEX-channel for Tswv, and the Cy5-channel for Pepmv. The multiplex qRT-PCR experiment was successful with Ct values of 19.09, 21.89 and 21.63, respectively.

KEYWORDS: Multiplex qRT-PCR, virus, ToBRFV, TSWV, PepMV, tomato, pepper

COMMITTEE: Assoc. Prof. Hakan FİDAN

Assoc. Prof. Özer ÇALIŞ

Assoc. Prof. Gökmen KOÇ

ÖNSÖZ

Yapılan tez çalışmasında ülkemizde en fazla üretimi yapılan domates ve biber bitkilerinde çok büyük verim kayıplarına neden olan bazı virüs hastalık etmenlerinin tespiti yapılmıştır. Bu virüsler Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), Tomato spotted wilt virus (TSWV) ve Pepino mosaic virus (PepMV) olup, her bir virüs için farklı primerler ve probler dizayn edilerek bu virüslerin Real Time RT-PCR ile RT-PCR çalışılarak tanı ve tespitleri yapılmıştır.

Yapılan tez çalışmaları Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı Viroloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın planlanmasında, yürütülmesinde ve gerçekleştirilmesinde değerli bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan ve daima bana destek olup yardımlarını hiç esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Hakan FİDAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez jürime katılarak görüş ve tecrübeleri ile tezime destek olan Doç. Dr. Gökmen KOÇ ve Doç. Dr. Özer ÇALIŞ hocalarıma saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmada projemi destekleyen Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu'na, çalışma imkanları sunan Akdeniz Üniversitesi Bitki Koruma Başkanlığına, laboratuvar ve serada tüm çalışmalarımda destek ve yardımlarını esirgemeyen Sefanur ÇELİK'e, tez çalışmalarım boyunca daima yanımda olan, desteklerini esirgemeyen Pelin SARIKAYA ve Kübra YILDIZ'a , maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili eşim Ozan CAYAK'a, bana yüksek lisans yapma fırsatı veren ve desteklerini esirgemeyen AR-GE Müdürü Sinan ZENGİN ve Tohum Üretim Müdürü Mehmet ÇETİN başta olmak üzere Antalya TARIM yönetimine ve eğitim hayatım boyunca her zaman desteklerini hissettiğim başta annem Arife ŞAHİN ve kız kardeşlerim Esra NEVRUZ, Zuhale DEVECİ ve Elif ATAN'a tüm yaptıkları fedakarlıklardan dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)	4
2.2. Tomato spotted wilt virus (TSWV).....	8
2.3. Pepino mosaic virus (PepMV)	12
2.4. Multiplex Klasik ve Real Time ile Yapılmış Önceki Çalışmalar.....	14
3. MATERYAL VE METOT	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Araştırmanın yürütüldüğü yer ve kullanılan bitki materyalleri	20
3.1.2. Moleküler çalışmalarda kullanılan materyaller	20
3.1.2.1. Total nükleik asit izolasyonunda kullanılan materyaller	20
3.1.2.2. Reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) için kullanılan materyaller	20
3.1.2.3. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) için kullanılan materyaller	20
3.2. Metot	21
3.2.1. Mekanik inokülasyon çalışmaları	21
3.2.2. Total nükleik asit ekstraksiyonu	21
3.2.3. Primer dizayn çalışmaları	22
3.2.3.1. Klasik RT-PCR primer dizayn çalışmaları	22
3.2.3.2. RT-PCR çalışmaları	24
3.2.4.1. RT-qPCR çalışmaları	24
3.2.5. Multipleks RT-PCR.....	25
4. BULGULAR.....	26
4. 1.Simptomatolojik Bulgular	26

4.2. Moleküler Bulgular	27
4.2.1. Total nükleik asit ekstraksiyonu	27
4.2.2. Primer-prob dizaynı	28
4.2.3. Klasik RT-PCR bulguları	29
4.2.4. Real Time RT-PCR sonuçları	30
5. TARTIŞMA	34
6. SONUÇLAR	37
7. KAYNAKLAR	39
8. EKLER.....	46
ÖZGEÇMİŞ	



AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Domates ve Biber Bitkilerinde Görülen Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), Tomato spotted wilt virus (TSWV) ve Pepino mosaic virus (PepMV) Hastalık Etmenlerine Karşı Multipleks Primer ve Prob Geliştirilmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

Tarih: 25/05/2023

Havva Nur CAYAK

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	: santigrad derece
bp	: baz çifti
g	: gram
mg	: miligram
ml	: mililitre
µl	: mikrolitre
ng	: nanogram
nM	: Nanometre

Kısaltmalar

BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik asit
CMV	: <i>Cucumber mosaic virus</i>
Ct	: Cycle threshold PCR
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ddH ₂ O	: Çift distile su
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
F	: Forward
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
ITS	: International Transcribed Spacer
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
ORF	: Open Reading Frame
pH	: Potenz hidrojen
PepMV	: <i>Pepino Mosaic Virus</i>

PCR	: Polymerase Chain Reaction
PVY	: <i>Potato Y virus</i>
R	: Reverse
RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
RT-PCR	: Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction
TAE	: Tris-Asetik Asit-EDTA
TEV	: <i>Tobacco etch virus</i>
TMV	: <i>Tobacco Mosaic Virus</i>
TNA	: Total Nükleik Asit
ToBRFV	: <i>Tomato brown rugose fruit virus</i>
ToMV	: <i>Tomato mosaic virus</i>
ToMMV	: <i>Tomato mottle mosaic virus</i>
TSWV	: <i>Tomato spotted wilt virus</i>
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
WT	: Wild type
3'	: DNA molekülünün terminal hidroksil ucu
5'	: DNA molekülünün terminal fosfat ucu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. ToBRFV'nin ORF bölgelerini gösteren genom yapısı (Zhang ve ark. 2022).....	5
Şekil 2. 2. TEM altında viral partiküllerin morfolojik karakterizasyonu. A–C: domates; D–F;biber; B ve E, –20°C'de saklanan ToBRFV parçacıkları. C ve F, taze hazırlanmış ToBRFV parçacıkları. Bar=0.1 µm. (Fidan ve ark. 2021)	5
Şekil 2. 3. ToBRFV'nin EPPO (2023) kayıtlarına göre dünyadaki dağılımı	6
Şekil 2. 4. ToBRFV'nin domates bitkisinin yaprak ve meyvelerinde meydana getirdiği belirtiler	7
Şekil 2. 5. TSWV'nin genomik organizasyonu (L: büyük (large) RNA, RdRp: RNA-dependent-RNA polimeraz, M: orta (medium) RNA, NSm: yapısal olmayan protein, G1/G2: glikosilat membran proteinleri, S: küçük (small) RNA, NSs: yapısal olmayan protein, N: nükleokapsid proteini)	9
Şekil 2. 6. TSWV'nin biber ve domates bitkilerinde yaprak ve meyve belirtileri.....	9
Şekil 2. 7. PepMV'nin genomik organizasyonu (Gomez vd., 2012).	12
Şekil 2. 8. PepMV'nin EPPO (2023) kayıtlarına göre dünyadaki dağılımı.....	13
Şekil 2. 9. PepMV'nin domates bitkisinde yaprak ve meyve belirtileri.....	14
Şekil 3. 1. Mekanik inokulasyon çalışmaları	21
Şekil 3. 2. Sekans üzerinde primer tasarlama çalışmaları.....	22
Şekil 3. 3. BioEdit programında ClustalW analiziyle consensus sekansların analizi	23
Şekil 3. 4. Farklı izolatların SnapGene programındaki BLAST analizi	23
Şekil 3. 5. RealTime PCR için primer-prob tasarlama çalışmaları.....	24
Şekil 4. 1. ToBRFV mekanik inokülasyonu yapılan bitkilerin gösterdiği belirtiler ..	26
Şekil 4. 2. TSWV mekanik inokülasyonu yapılan fidelerin gösterdiği belirtiler	27

Şekil 4. 3. PepMV mekanik inokülasyonu yapılan fidelerin gösterdiği belirtiler	27
Şekil 4. 4. a) Klasik RT-PCR çalışmalarında 1)PepMV2, 2)ToBRFV2 3)TSWV 4)TSWV + PepMV2 5)PepMV2 + ToBRFV2 6)TSWV + ToBRFV2 7) PepMV2 + TSWV + ToBRFV2 8)Negatif kontrol primerleriyle yapılan tekli, dubleks ve multipleks analiz sonuçları (b) 1)PepMV1, 2)TSWV ve 3)T	29
Şekil 4. 5. Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) için dilüsyon serisi	30
Şekil 4. 6. Tomato spotted wilt virus (TSWV) için dilüsyon serisi	31
Şekil 4. 7. Pepino mosaic virus (PepMV) için dilüsyon serileri	32
Şekil 4. 8. Dubleks ve Multipleks RealTime PCR sonuçları	33
Şekil 4. 9. ToBRFV primer- prob çiftinin diğer Tobamovirüsler ile cross reaksiyon sonuçları	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Domates ve biber üretimlerinin yıllara göre TÜİK verileri.....	2
Çizelge 4. 1. Elde edilen nükleik asitlerin spektrofotometre ölçümleri.....	28
Çizelge 4. 2. Klasik RT-PCR için tasarlanan primer dizilimleri	28
Çizelge 4. 3. RealTime RT-PCR için tasarlanan primer-prob dizilimleri	29
Çizelge 4. 4. Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) için dilüsyon serisine ait Ct değerleri.....	30
Çizelge 4. 5. Tomato spotted wilt virus (TSWV) için dilüsyon serisine ait Ct değerleri.....	31
Çizelge 4. 6. Pepino mosaic virus (PepMV) için dilüsyon serisine ait Ct değerleri.....	32

1. GİRİŞ

İnsan gıdası olarak en çok tüketilen sebzeler arasında bulunan domates, biber, patlıcan vb. gibi bitkilerin bulunduğu *Solanaceae* (Patlıcangiller) familyası içerisinde 3500 tür bulunmaktadır. Bu familyaya ait olan domates ve biber bitkileri, tüketimi en fazla sebzeler olduğundan ülkemizde en fazla üretimi yapılan ve ihracatta da ilk sıralarda yer alan bitkilerdir. Domates (*Solanum lycopersicum*) ve biber (*Capsicum annuum*), dünyada olduğu gibi ülkemizde de insan gıdası olarak çok farklı kullanım alanı olan, ülke ekonomisine katkı sağlayan, vazgeçilmez sebze türlerindendir. Domatesin anavatanı, Peru, Ekvator, Galapagos Adaları ve Şili'nin dağlık bölgeleri olup, ilk kez kültüre alınarak tarımının yapıldığı yer Meksika olmuştur. Daha sonra bu bölgeden dünyaya yayılmış ve 1900'lü yılların başında ise Anadolu'da ilk olarak Adana bölgesinde yetiştirilmeye başlanmıştır. Ancak ülkemizde ise diğer bölgelerde 1950'lerden sonra kültürü yapıp, halkımız tarafından yoğun olarak üretime ve tüketime başlanmıştır. (Zengin, 2010)

Amerika kıtasının Orta ve Güney bölgeleri biberin anavatanı olarak bilinmektedir. İlk olarak Avrupa'ya 1493 yılında İspanya'ya, daha sonra İngiltere'ye 1548 yılında ve 1578'li yıllarda ise Orta Avrupa ve diğer Avrupa ülkelerine girişi olmuştur. Araştırmalara göre 16.yüzyıl içerisinde Osmanlı imparatorluğu döneminde Avrupa ülkeleri ile kurulan etkileşimler vasıtası ile biber ilk olarak İstanbul'a getirilmiş daha sonra tüm Anadolu'ya yayılmıştır. (Oraman, 1968)

1492 yılında Amerika'nın Cristof Colomb tarafından keşfedildiği dönemde Colomb ve arkadaşları burada meyvesi çok acı olan bitkilerin yetiştiğini görmüşlerdir. Güney Hindistan'da yoğun olarak karabiber yetiştiğini bildiklerinden dolayı buraya Güney Hindistan demişlerdir. Fakat yapılan araştırmalar sonucu ve verilerine göre buranın Amerika olduğu, bu çok acı olan meyvenin de baharat ve sos olarak kullanılan biber bitkisi olduğunu bulmuşlardır. Colomb ve arkadaşları Amerika'nın keşfi ile birlikte biber bitkisini de keşfetmişlerdir (Bozokalfa ve Eşiyok 2010).

Domates sebzesinin içeriğinde bulunan A, B1, B6, C vitaminlerinin yanı sıra potasyum, kalsiyum, demir ve fosfor mineralleri açısından da oldukça zengindir. Bu vitamin ve mineral zenginliğinin yanı sıra içeriğinde likopen, beta karoten, lutein, zeaxanthin gibi bitki sterollerinin bulunması bakımından antioksidan, antikanserojen ve yaşlanma önleyici (antiaging) gibi çok fazla bilinen özelliği ile önemli bir sebze türü olmuştur (Vural vd.2000).

Biber (*Capsicum annuum*), baharat olarak da kullanıldığı gibi aynı zamanda turşu, kurutmalık, taze olarak çok fazla kullanım alanı mevcuttur. Bu kullanım alanlarından dolayı ekonomik açıdan çok fazla önem kazanmaya devam eden bir üründür. Biber *Solanaceae* familyasına ait olup *Capsicum spp.* cinsine dahildir. *Capsicum spp.* 'de 41 tür bulunmaktadır fakat bunların 5 tanesinin kültürü yapılmaktadır (*Capsicum annuum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* L., *C. pubescens* Ruiz ve Pavón). Bu 5 türün

içinde ise meyve kalitesi, meyve tip çeşitliliği ve verimi incelendiğinde pazarda en çok rağbet gören *Capsicum annuum* olmuştur. (Wang ve Bosland, 2006).

Ülkemizde örtü altı yetiştiriciliğinde en fazla üretimi yapılan ürün domatestir ve ikinci sırada biber gelmektedir. TÜİK verilerine göre 2021 yılında toplam biber üretimi 3,091,295 ton olmuştur. Domates, TÜİK verilerine göre ülkemizde 2021 yılında 13.095.258 ton üretilerek pazar payının %41,2'sini oluşturmuştur. Taze olarak tüketildiği gibi aynı zamanda salçalık, turşu, kurutmalık, ketçap ve sos gibi pek çok kullanım alanı mevcut olduğundan dolayı ekonomik açıdan da çok önemlidir. Domates ve biber tarımında 2020, 2021 ve 2022 yıllarındaki üretim miktarları karşılaştırmalı olarak Çizelge 1.1'de verilmiştir. (TÜİK 2022)

Çizelge 1. 1. Domates ve biber üretimlerinin yıllara göre TÜİK verileri

SEBZELER	YILLARA GÖRE ÜRETİM (ton)		
	2020	2021	2022
Domates	13.204.015	13.095.258	13.000.000
Biber (salçalık, kapyra)	1.291.091	1.445.275	1.481.612
Biber (dolmalık)	389.957	420.918	404.459
Biber (sivri)	838.890	1.064.633	979.180
Biber (çarliston)	116.967	160.469	153.524

Doğada bulunan pek çok fungus, bakteri, virüs, viroid gibi biyotik etmenler pek çok hastalığa sebep olmaktadır. Türkiye’de ekonomiye çok fazla katkı sağlayan, üretimde ilk sıralarda yer alan domates ve biber bitkileri için bu biyotik etmenler ciddi tehdit oluşturmaktadır. Bu etmenler, domates ve biberde deformasyonlara sebep oldukları gibi verimi, kaliteyi önemli ölçüde etkilemektedir. Biyotik etmenler arasında bulunan virüsler hastalık açısından çok önemli bir yer tutmaktadırlar. Özellikle son dönemlerde domates ve biber üretiminde viral hastalıklar önem kazanmıştır. Bunların arasında Tomato spotted wilt virus (TSWV), Pepino mosaic virus (PepMV) ve Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) ilk sıralarda gelmektedir.

Tomato spotted wilt virus’un genomunda meydana gelen mutasyon ile bu virüse dayanıklı olan çeşitlerin hastalandığı bilinmektedir. Tomato brown rugose fruit virus ise ilk olarak İsrail’den rapor edilen ve sonrasında dünyaya yayılan, 2019 yılından itibaren de ülkemizde görülmeye başlamış ve domates üretiminin en önemli problemi haline

gelmiştir. Domates üretiminde meyvelerin pazar değerini düşürerek üreticilerin seralarda domates sökmeye neden olarak verimi büyük ölçüde etkilemiştir. TÜİK verilerinin domates için yıllara göre üretim miktarları incelendiğinde de azalma meydana geldiği açıkça görülmektedir. Tomato spotted wilt virus (TSWV), Pepino mosaic virus (PepMV) ve Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) etmenleri, ülkemiz Karantina listesinde olup, ülkemize gelen domates ürünleri için mutlaka analiz edilen etmenlerdir.

Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından yayınlanan 18.12.2020 tarih ve E-21817801-320.03.05-3571272 sayılı kararda belirtildiği gibi Rusya Federasyonu'nun bildirim kapsamında bu ülkeye domates ve biber bitkilerinde bu üç etmenin analizi istenmektedir. Ülkemizde yaş sebze meyve ihracatımızın en fazla olduğu başta Rusya federasyonu göz önüne alınarak; özellikle hasat olmuş ve ticarete söz konusu ürünlerin 3 tane virüs etmeni analizi için bekletilmesi ürünlerin kalitesinin bozulması ve zamanla başka dezavantajlar oluşturmaktadır. Tarım ve Orman Bakanlığı, bundan kaynaklanan analiz işlemlerinin yoğunluğu nedeniyle, son dönemde ihracat ve ithalat kontrollerinde aksaklıklar yaşamaktadır. Özellikle Rusya Federasyonu'na ihracata konu olan ürünlerin analizlerinde yaşanan yoğunluk nedeni ile ivedilikle çözüm üretilmesi gerektiğini bildirmiştir (Ek 3).

Türkiye'de bu üç virüs hastalığı ile enfekteli olan domateslerin ülkeye girişine izin verilmemektedir. Bu sebeplerle hem Karantina müdürlüklerinde kullanılmak üzere hem de bu üç virüs için çoklu analiz ile moleküler teşhise olanak sağlanması adına bu tez çalışması planlanmıştır. Bu tez çalışmasında belirtilen üç adet viral etmen için hem domates hem de biberde virüs etmenlerini spesifik olarak tanımlayabilecek primer çiftleri ve prob dizaynları yapılarak, moleküler çalışmalar yürütülmesi ve sonucunda üç virüs etmenini tek bir analizle tanımlama yapabilecek kitler geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

Solanaceae familyası, besin kaynağı, biyoaktif molekül kaynağı veya süs bitkisi gibi pek çok türde yaygın olarak yetiştirilen mahsulleri içeren ürün grubudur. Patates (*Solanum tuberosum*), domates (*S. lycopersicum*), biber (*Caspicum annuum*) veya tütün (*Nicotiana tabacum*) gibi bu aileye ait türler, ılıman veya tropikal iklime sahip tüm kıtalarda yetiştirilmektedir. Solanaceae familyasından bitkiler de son yüz yılda genetik araştırmalarda önemli bir rol oynamıştır. Yetiştirilmiş Solanaceae türleri yetiştirildiği ekosistem içinde virüsler de dahil olmak üzere bulaşıcı patojenlere maruz kalmaktadır (Hančinský ve ark. 2020).

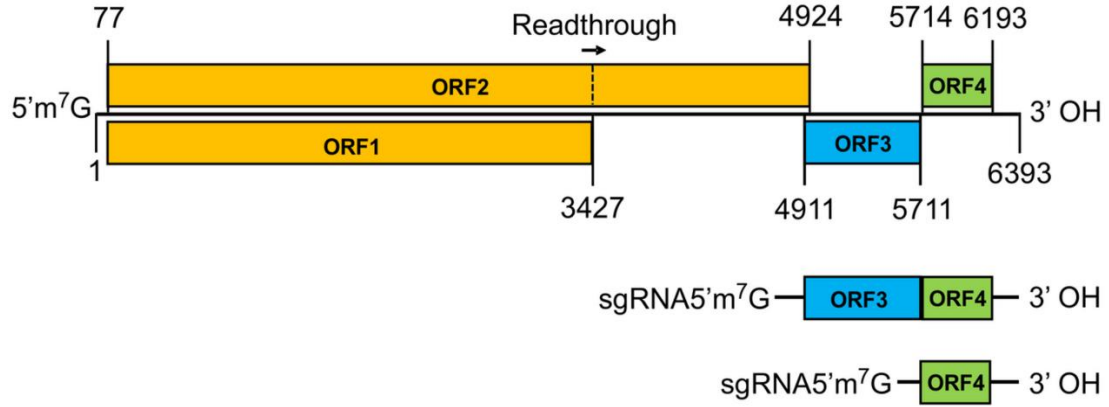
Solanaceae familyası tropikal ve subtropikal bölgelerde yayılmış 90 cins ve yaklaşık 2500 tür barındırmaktadır. (Fidan ve Sarıkaya 2019). Solanaceae grubunda patojen enfeksiyonlarını önleme çabalarına rağmen, viral hastalıkların kontrolü oldukça zordur. Mücadele stratejileri, mevcut virüslerin yeni ırklarının veya tamamen yeni virüslerin sürekli ortaya çıkmasıyla giderek zorlaşmaktadır. Virüsler, geniş popülasyonları, genetik varyasyonu kolaylaştıran tamir mekanizmalarının genomlarında olmaması ve kısa sürede çoğalabilmeleri gibi nedenlerle doğal seleksiyon baskısına uyum sağlama konusunda büyük bir potansiyele sahiptir (Hanssen ve Thomma 2010). Viral genomlarda yüksek mutasyon ve rekombinasyon yeteneği, popülasyonda hızla yayılan yeni varyantların üretimini arttırmaktadır. Viral hastalıklardan etkilenen domates bitkilerinin besin içeriği, meyve kalitesi ve verimi azalarak raf ömrü kısalmaktadır (Fidan 2020).

Virüsler, yalnızca canlı organizmaların hücrelerinde çoğalabilen küçük bulaşıcı hastalık etmenleridir. Kaydedilen ilk virüs, Tütün mozaik virüsü (TMV), bir Solanaceae olan tütünde keşfedilmiştir. Ayrıca TMV, bir virüsü tanımlayan temel özellikleri aydınlatmak için tercih edilen sembolik bir model olarak kabul edilmiştir. Uluslararası virüs taksonomisi komitesine (ICTV) göre, 1901 bitki virüsü türünü içeren 6 takım, 32 familya ve 141 cins şu anda tanınmaktadır. Bu sayı, bitki virüs hastalıklarının tarafsız ve sağlam bir analizini mümkün kılan ve çok sayıda yeni virüsün keşfedilmesine yol açan yüksek verimli dizileme teknolojilerinin uygulanması sayesinde hızla artmaktadır (Hančinský ve ark. 2020).

Domates ve biber üretiminde birçok bitki patojeni etmenin hastalık yaptığı bilinmektedir. Ülkemizde ve dünyada sıklıkla rapor edilen Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), Tomato spotted wilt virus (TSWV) ve Pepino mosaic virus (PepMV) hastalık etmenleri karantina uygulamalarında test edilmesi zorunlu virüs hastalıklarıdır.

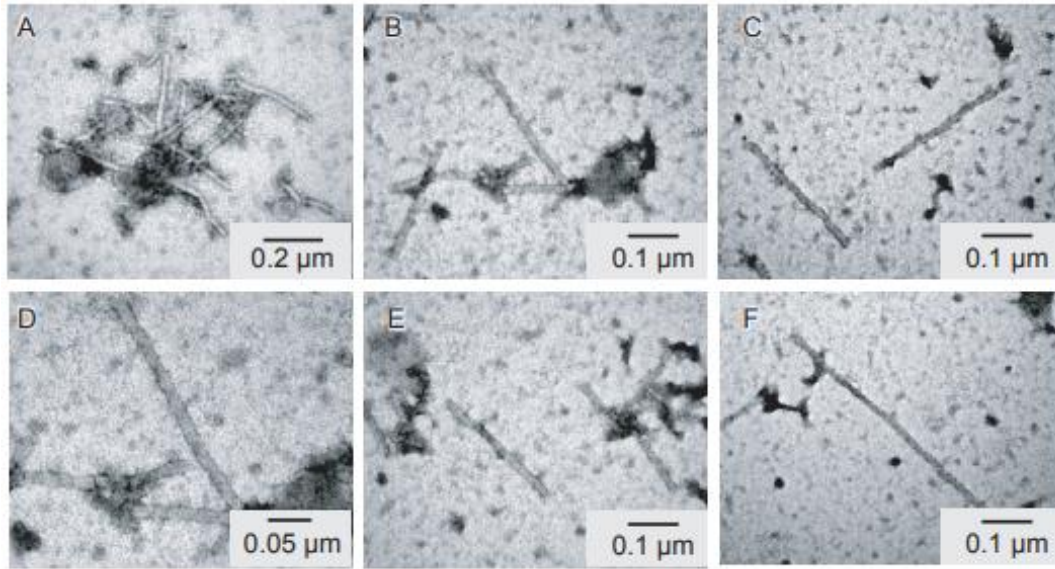
2.1. Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)

Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) tıpkı Tobacco mosaic virus (TMV) ve Tomato mosaic virus (ToMV) gibi Tobamovirus cinsine dahil bir RNA virüsüdür. ToBRFV genomu, dört açık okuma çerçevesini (Open reading frame-ORF) kodlayan, yaklaşık 6.4 kb'lik tek sarmallı, pozitif sense bir RNA'dır (Şekil 2.1).

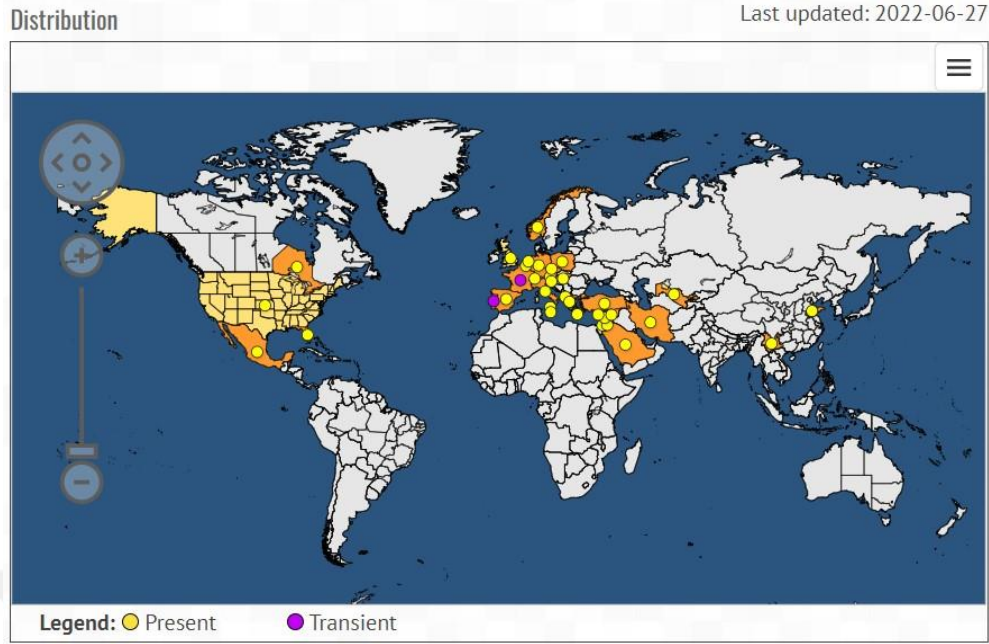


Şekil 2. 1. ToBRFV'nin ORF bölgelerini gösteren genom yapısı (Zhang ve ark. 2022)

ToBRFV'nin viral RNA'sı, çubuk şeklinde, yaklaşık 300 nm uzunluğunda ve 18 nm çapında genomu çevreleyen protein kılıf ile virionlarını oluşturmaktadır (Şekil 2.2). Tobamovirus virionları son derece stabildir ve bitki artıklarında veya tohum yüzeylerinde uzun süre hayatta kalabilmektedir.



Şekil 2. 2. TEM altında viral partiküllerin morfolojik karakterizasyonu. A–C: domates; D–F; biber; B ve E, –20°C'de saklanan ToBRFV parçacıkları. C ve F, taze hazırlanmış ToBRFV parçacıkları. Bar=0.1 µm. (Fidan ve ark. 2021)



Şekil 2.3. ToBRFV'nin EPPO (2023) kayıtlarına göre dünyadaki dağılımı

ToBRFV'nin doğrulanmış olan doğal konukçuları domates (*Solanum lycopersicum*) ve biber (*Capsicum annuum*) bitkileridir. Bu virüs, ToMV ve TMV gibi Tobamovirüsleri için uzun süreli dayanıklılığı sağlayan Tm1 ve Tm2 dayanıklılık genlerini taşıyan domates bitkilerini enfekte edebilmeleriyle önem kazanmıştır. Biber bitkilerinde ise bu dayanıklılığı sağlayan direnç genleri L genleridir. L3 dayanıklılığını kıran ToBRFV için direnç sağlayan gen L4 genidir. Ancak biber bitkileri ToBRFV ile bulaşık alanların çok yakınında üretilse bile L genlerini barındıran biber bitkilerinde herhangi bir sistemik bulaşıklık olmadığı kayıt altındadır (EPPO 2023).

ToBRFV, 2014 yılında ilk olarak İsrail ve Ürdün'den rapor edilmiştir. İsrail'de domates bitkilerinde görüldükten sonra aslında ToBRFV tarafından enfekte edilen yabancı ot türlerinin de olduğu gözlemlenmiştir. Dombrovsky ve ark. 2019 yılında bu türleri *Chenopodium murale* ve *Solanum nigrum* olarak yayınlamışlardır.

Tobamovirüslerin virüs partikülleri oldukça stabildir ve yaygın olarak kültürel uygulamalarda serada çalışan işçilerin elleri, kıyafetleri, bıçaklar dahil aletler, bağlama ipi, taşıma kasaları dahil ekipmanlar, açık alanlardaki traktör yolları ve hidroponik üretim sırasında bitkiden bitkiye taşındığı belirlenmiştir. (Dombrovsky ve Smith, 2017).

ToBRFV'nin sebep olduğu belirtiler çeşitlere ve genotiplere göre değişiklik göstermektedir. Domateste gözlemlenen simptomatolojik açıdan değerlendirildiğinde ise genç yapraklarda mozaiklik, yaprak ayasında daralmalar, kalikte kararma yapabildiği gibi meyvede ise sarı veya kahverengi lekeler ve şekil bozuklukları da oluşturmaktadır (Fidan ve ark. 2021). Domatesteki belirtileri iki tipte sınıflandırmak mümkündür; bazı çeşitlerin yapraklarında şiddetli mozaik belirtileriyle gösterebilirken, bazı çeşitlerde

meyve oluşuncaya kadar yaprak semptomu göstermemekte ve bu virüsün varlığı ancak Meyvedeki semptomlar ile fark edilebilmektedir. Domates yapraklarında klorotik mozaikler, buruşma ve deformasyonlar; Tm² dayanımı olan çeşitlerde meyvede düzensiz sarı halkalar meydana gelmektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. ToBRFV'nin domates bitkisinin yaprak ve meyvelerinde meydana getirdiği semptomlar

ToBRFV ilk olarak 2016 yılında Salem ve ark. tarafından Nisan 2015'te Ürdün'de yetiştirilen ve tipik viral semptomlar gösteren sera domates bitkilerinden izole edilmiştir (Salem ve ark. 2016). Sezon sonunda yaprak belirtileri görünüşte hafif olmasına rağmen, meyvelerde güçlü kahverengi buruşukluk belirtileri meyvenin pazarlanabilirliğini büyük ölçüde etkilemiştir. Bu domates bitkilerinin daha sonra moleküler biyoloji ve biyoinformatik araçlarla teşhisi, bu etmenin yeni bir Tobamovirüs olduğunu belirlemiş ve virüse Tomato brown rugose fruit virus adı verilmiştir (Salem ve ark., 2016). Bu çalışmadan kısa bir süre sonra, İsrail'deki Dombrovsky laboratuvarı, Ekim-Kasım 2014'te İsrail'in güneyinde yetiştirilen domates bitkilerinden yeni bir tobamovirüs izolatu keşfedildiğini bildirmiştir. (Luria ve diğerleri, 2017). Salgına neden olan virüsü karakterize etmek için kapsamlı bir moleküler ve morfolojik çalışma yapılmıştır. İsrail izolatının (GenBank erişim no. KX619418) Ürdün izolatu (KT383474) ile yüksek sekans özdeşliği paylaştığı tespit edilmiştir. Böylece, ToBRFV'nin ilk salgını İsrail'de Ekim 2014'e kadar izlenmiştir. Ayrıca Luria ve ark., ToBRFV'nin Tm-1, Tm-2 veya Tm-2² taşıyan domates çeşitlerini ve biber çeşitlerini enfekte edebildiğini keşfetmişlerdir (Luria ve ark, 2017). ToBRFV'nin Ürdün ve İsrail'de keşfedilmesinden sonra, ToBRFV'ye sahip

Ülkelerin listesi çok hızlı genişlediğinden virüs hızla yayılmıştır. Asya, Avrupa, Kuzey Amerika ve Afrika dahil olmak üzere dört kıtada, ağırlıklı olarak Orta Doğı ve Avrupa'da yayılım göstermiştir.

Tobamovirüslerin virüs partikülleri oldukça stabildir ve yaygın olarak kültürel uygulamalarda serada çalışan işçilerin elleri, kıyafetleri, bıçaklar dahil aletler, bağılama ipleri, taşıma kasaları dahil ekipmanlar, açık alanlardaki traktör yolları ve hidroponik üretim sırasında bitkiden bitkiye taşındığı belirlenmiştir. (Dombrovsky ve Smith, 2017).

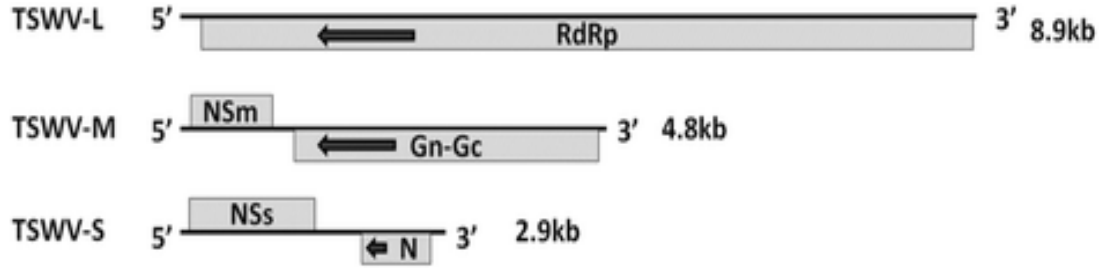
ToBRFV, İsrail'in Ramat Negev Bölgesine ve daha sonra da ülkenin genelinde domates yetiştirilen seralara yayılmıştır (Luria vd. 2017). Meksika (Yurecuaro ve Tanhuato)'da 2018 yılında domates ve chili biberlerde (Cambrn-Crisantos vd. 2018), ABD'nin Kaliforniya eyaletinde 2018 yılında (Chitambar 2018), Almanya'da 2018 yılında (Menzel vd. 2019), İtalya Sicilya'da 2018'de domates bitkilerinde görülmüştür (Panno vd 2019). Filistin'den (Alkowni ve ark. 2019), Çin'den (Yan vd. 2019) ve İngiltere'den (Skelton vd. 2019)'den de rapor edilmiştir. Türkiye'de ise 2019 yılında domates bitkilerinin yaprak ve meyve örneklerinde varlığı belirlenmiştir (Fidan vd. 2019).

ToBRFV EPPO'nun A2 listesine eklenmesi ile birçok ülkede patojenin teşhisi için zirai karantina gibi, artık yaş meyvelerden bile ülkelerin kamu kuruluşlarına ait laboratuvarlarda zorunlu analizler yapılmaya başlanmıştır.

2.2. Tomato spotted wilt virus (TSWV)

Tomato spotted wilt virus, Bunyaviridae familyasına ait olan bir Tospovirs cinsidir. Kültür bitkilerinde hastalığa sebep olan virüs hastalıklarından Dünya'da yapmış olduğı epidemi dolayısıyla ilk 10 virüsten ikinci sırada yer almaktadır. Konukçu aralığı çok fazla olan TSWV; başta domates ve biber olmak üzere patlıcan, marul, tütün, bezelye, brokoli, ananas, papaya, yer fıstığı, patates, ss bitkileri, çok sayıda yabancı ot türünde yayılımları mevcuttur. Doğada toplam 1090 bitki türü bu virüse konukçuluk etmektedir. (şevik 2011)

TSWV yapısı 80-110 nm çapında, içeriğinde ise lipit membran bulunduran bazı küresel partiküller vardır. Bu partiküller, %5 nükleik asit (RNA), %70 protein, %20 lipit ve %5 karbonhidrat bulundurmaktadır (Adkins, 2000). Tswv genomu 3 bölümden oluşmaktadır. S RNA; 2.9 kb, M RNA; 4.9 kb ve L RNA; 8.9 kb uzunluğunda olup, (-) sens ve ambisens ssRNA molekülünden oluşmaktadır (şekil 2.5).



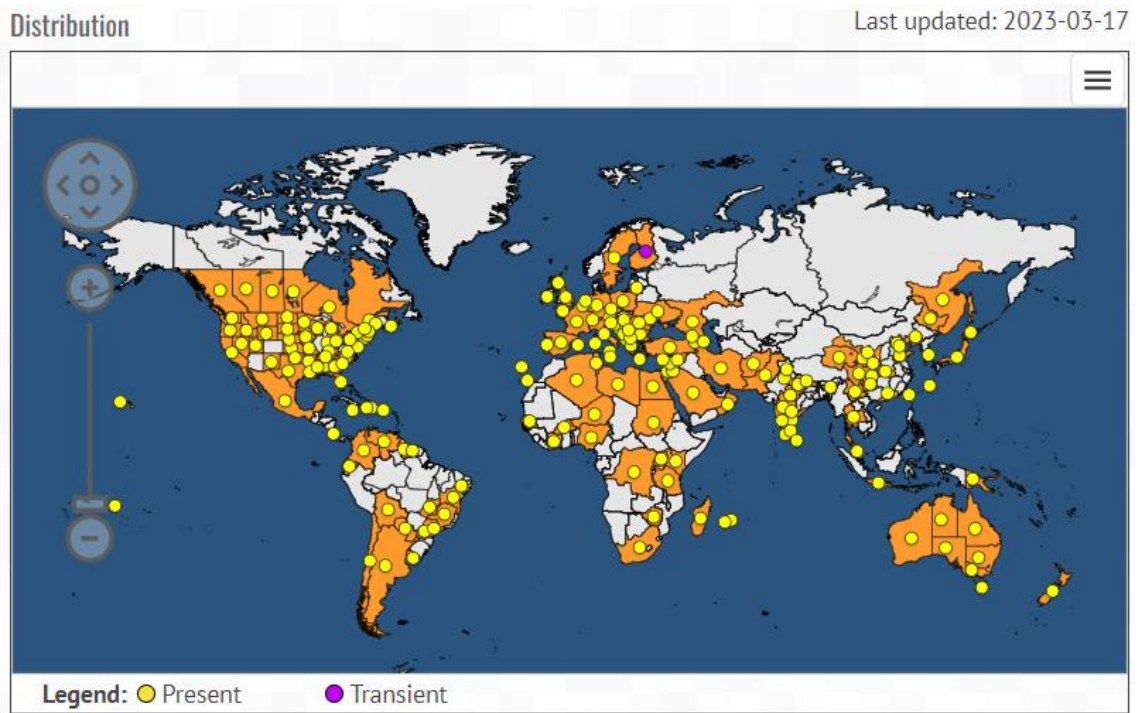
Şekil 2.5. TSWV'nin genomik organizasyonu (L: büyük (large) RNA, RdRp: RNA-dependent-RNA polimeraz, M: orta (medium) RNA, NSm: yapısal olmayan protein, G1/G2: glikosilat membran proteinleri, S: küçük (small) RNA, NSs: yapısal olmayan protein, N: nükleokapsid proteini)

TSWV, domates bitkilerinde; bronzlaşma, yaprak kıvrıkcılığı, nekrotik lekeler, nekrotik çizgiler, cüceleşme, olgunlaşmamış meyvelerde yeşil, açık yeşil, kahverengi halka şeklinde belirtiler, olgun meyvelerde açık koyu sarı, kırmızı alanlar, şiddetli nekroz belirtileri oluşturmaktadır. Bazen şiddetli enfeksiyonlarda, virüs bitkiyi tamamen öldürebilmektedir. Biberde, bodurluk, tüm bitkide genel sararma, yapraklarda klorotik düzensiz lekeler, mozaik, sürgün ucunda kurumalara bağlı olarak nekrotik çizgiler meydana getirmektedir (Şekil 2.6). Meyvede ise sarı lekeler, konsantrik halkalar, nekrotik çizgiler gözlenmektedir (Şevik 2015).



Şekil 2. 6. TSWV'nin biber ve domates bitkilerinde yaprak ve meyve belirtileri

Tomato spotted wilt virus (TSWV) ilk kez 1915 yılında Avustralya'nın Victoria eyaletinde, 1934'te ise Yeni Zelanda'da rapor edilmiştir (Adkins, 2000). Dünyada diğer bölgelere yayılması ise bu virüsün taşınmasını sağlayan bir vektör olan *Frankliniella . occidentalis*'in 1993 yılında gelişiyile olmuştur. Bunlara ek olarak 1895 yılında Amerika Birleşik Devleti Ohio kentinde domateste görülmüştür. 1905 yılında ise Cape Town'da bulunan tütün bitkilerinde diğerlerine benzer simptomlar gözlenmiş ve bilinmeyen hastalık olarak rapor edilmiştir. Türkiye'de ise ilk kez Mersin ilinde farklı sebze (patlıcan, marul, biber, fasulye) türlerinde görüldüğü Tekinel (1969) tarafından kaydedilmiştir. Son yıllarda büyük ekonomik önem kazanan bu viral hastalığın Kuzey ve Güney Amerika, Avrupa ve Asya'ya yayıldığı ve dünyanın birçok yerinde çok yaygın olarak görüldüğü bildirilmiştir (Adkins ve ark. 2005).



TSWV etmeni Çanakkale'de tütün yetiştirilen alanlarda görüldükten sonra Balıkesir, Manisa, Uşak ve Samsun İllerinde de rapor edilmiştir (Azeri 1981). Hastalık etmeninin İzmir ve Manisa'daki tarım arazilerinde önemli zararlara neden olduğu kaydedilmiştir (Azeri 1994). TSWV'nin, Akdeniz bölgesinde ilk kaydı 1995 yılında İçel ve çevresinde açık arazide yetiştirilen domateslerde saptanmıştır (Güldür ve ark. 1995). Bu viral hastalığın sadece domateste bulunduğu düşünülürken; 1997-1998 yıllarında İçel'in Kazanlı yöresinden gelen acı biberlerde de tespit edilmiştir. Virüsün bu bölgede *F.occidentalis* ve *Thrips tabaci* vektörleri tarafından bulaştığı bildirilmiştir (Yurtmen ve ark. 1998).

Arlı Sökmen ve ark. (2005) Samsun ilinde biber üretim alanlarında TSWV'nin de dahil birçok virüs hastalığı olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca TSWV'yi *Amaranthaceae* familyasına dahil *Amarantus refoflexus* ile *Malvaceae* familyasına dahil *Hibiscus trianum* bitkilerinde saptamışlardır. Bu çalışma ile biber tarlalarında bulunan bu yabancı otların TSWV'nin inokulum kaynağı olarak risk taşıdığını bildirmişlerdir. 2004 yılında Şevik (2007), TSWV'nin domates üretim alanlarındaki vektör türlerinin taşınma durumları, hastalığın bulaşma ve yayılmasındaki rollerini araştırdığı çalışmada *Frankliniella intonsa Trybom* ve *Thrips tabaci Lindeman* türü thripslerini tespit etmiştir.

TSWV hastalığı, biber bitkilerini enfekte eden farklı virüs cinslerine ait türlerle karışık enfeksiyon gösterebilmektedir. Deligöz ve ark. (2023) yaptıkları bir çalışma kapsamında, 2018 yılında Türkiye biber üretiminin büyük bir bölümünün gerçekleştirildiği Antalya, Manisa, Çanakkale, Samsun ve Bursa illerinde biber yetiştirilen alanlardan virüs-benzeri simptom sergileyen 616 adet biber örneği toplanmıştır. Çalışmada inceledikleri örneklerin %6,5'inin ise birden fazla virüs ile karışık enfekteli olduğu tespit etmişlerdir. Karışık enfeksiyonlu örnekler içerisinde en yaygın olarak TSWV+CMV ikili enfeksiyonuna (%4,5) rastlanırken, bunu sırası ile; TSWV+PVY (%0,6), TSWV+PMMoV (% 0,5) karışık enfeksiyonlarının takip ettiğini bildirmişlerdir.

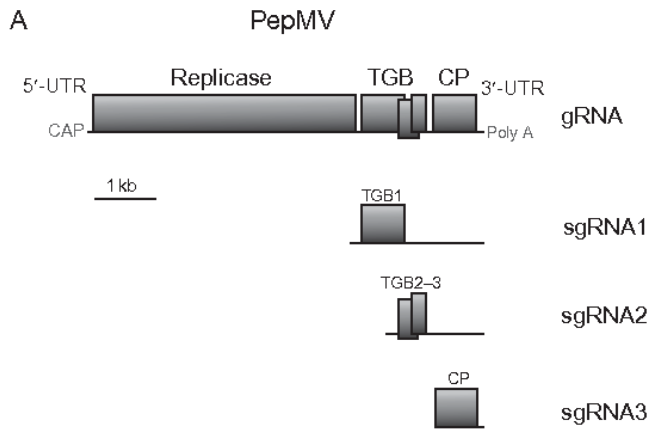
Küçük (2006), bu çalışmasında Adana ve Mersin illerinde yetiştirilen domates ve biberlerde TSWV'yi teşhis etmeyi amaçlamıştır. Tarladan toplanan enfekte olduğundan şüphelenilen bitkiler önce ELISA yöntemi ile test edilmiş ve hastalık oranı %45,4 olarak hesaplanmıştır. TSWV ile enfekte olmuş numuneler, mekanik aşılama çalışmalarında kullanılmıştır. Semptom aşılanmış bitkilerde 5-15 gün içinde gözlenmiştir. TSWV ile enfekte olmuş test bitkilerinden total RNA ekstrakte edildi ve bunlar RT-PCR yöntemi ile kontrol edilmiştir. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile test edildi ve beklenen bant boyutları gözlenmiştir.

TSWV ile mücadelede dayanıklı çeşitler kullanımı, kimyasal ve kültürel mücadele olanakları entegre bir şekilde kullanılmaktadır. Girdi maliyetlerini artıran ve artık sorun yaratan kimyasal mücadele, bazı hastalık ve zararlıların yayılmasını engellemekte, ancak viral etkenlere karşı etkili olmamaktadır. Ek olarak, kültürel yönetimler hastalık ve vektör kontrolü için her zaman ekonomik olarak iyi bir yöntem olmamaktadır. Bu nedenle özellikle viral hastalıklarda dayanıklı çeşitlerin kullanılması en etkili yöntemdir (Şimşek vd., 2015; Şimşek, 2014).

Almasi ve ark., (2015), Macaristan'dan elde edilen dayanıklılığı kıran (RB) ve wild tip (WT) izolatları analiz etmiş ve bu sekansları farklı coğrafi bölgelerden bildirilen izolatlarla karşılaştırmıştır. Filogenetik analizler, farklı RB izolatlarının yerel WT izolatları ile en yakın ilişkiye sahip olduğunu ve farklı coğrafi bölgelerden RB izolatlarının tüm NS genlerinde korunmuş bir mutasyona sahip olmadığını göstermiştir. Bu sonuçlara göre RB izolatlarının coğrafik olarak ayrı ayrı ve ayrıca RB mekanizmasına göre geliştiğini bildirmişlerdir.

2.3. Pepino mosaic virus (PepMV)

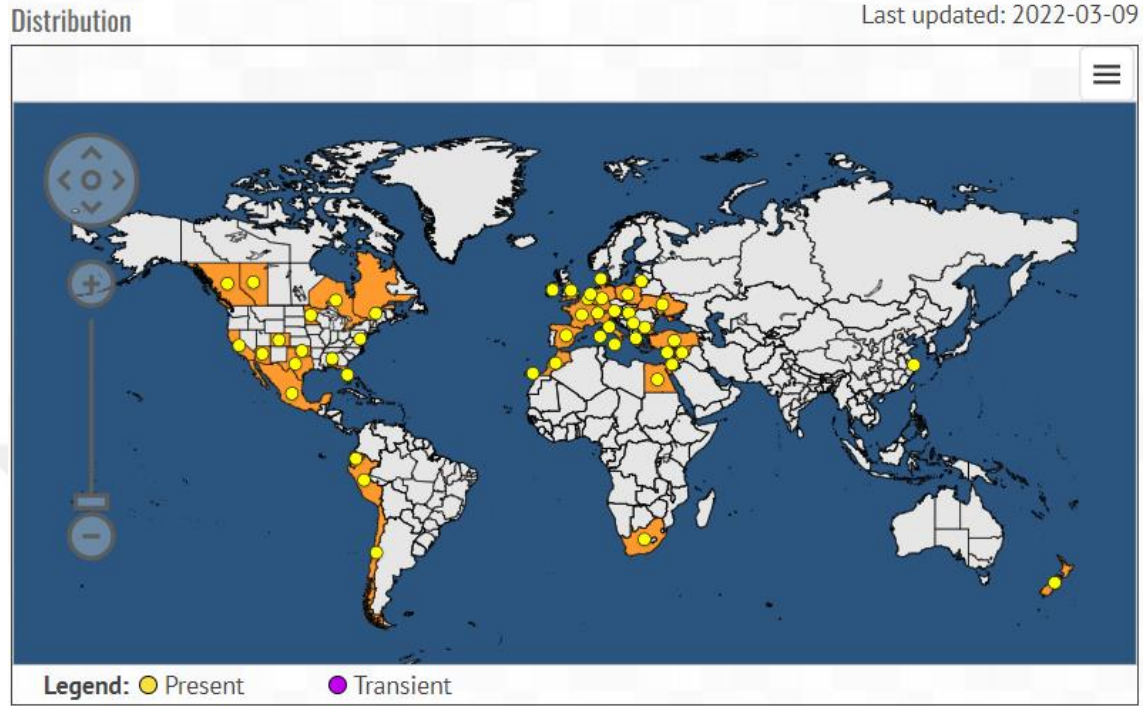
PepMV, hızla yayılan bir domates patojeni olarak bilinmekte olup dünya genelinde özellikle sera domatesi üretiminde önemli bir verim azalmasına neden olmaktadır (Aguilar vd., 2002; Ling, 2008; Maroon-Lango vd., 2005; Schenk vd., 2010). Alphaflexiviridae familyasına dahil olan bir Potexviruslerden sadece 3 tanesi Solanaceae familyasını enfekte ettiği ortaya çıkmıştır. Bu üç virüs ise; Pepino mosaic virus (PepMV), Potato aucuba mosaic virus (PAMV), ve Potato virus X (PVX) olarak tanımlanmıştır. Pepino mozaik virusu (PepMV), Flexiviridae ailesine ait olup Potexvirus cinsinde bulunur. PepMV virionları, zarfsız, esnek ve çubuk şeklinde olup 508 nm uzunluğundadır (Jones vd., 1980). Tek zincirli pozitif iplikçikten oluşan RNA (ssRNA) genomuna sahiptir. 3' Poli A kuyruğuna sahip olan virionun büyüklüğü 6.4 kb'dir. Genom, ORF 1 tarafından kodlanan 164-kDa RNA-bağımlı RNA polimerazı (RdRp), ORF 2 ve 4 tarafından kodlanan 26, 14 ve 9 kDa'lık üçlü gen blok proteinini (NTP) ve ORF 5'ten kodlanan 25-kDa'lık kılıf proteinini (CP) olmak üzere beş açık okuma çerçevesini (ORF'ler) içermektedir (Şekil 2. 7.) (Aguilar vd., 2002).



Şekil 2. 7. PepMV'nin genomik organizasyonu (Gomez vd., 2012).

Pepino mozaik virüsü, ilk olarak 1974 yılında Peru'da pepino (*Solanum murricatum*) bitkilerinde tespit edilmiştir (Jones vd., 1980). Virüsün domates bitkisinde varlığı ise ilk kez 1999 yılında Hollanda'da belirlenmiştir (Van der Vlugt vd., 2000). Peru ve Hollanda'dan kısa bir süre sonra Almanya (Schmatz vd., 2003), İtalya (Roggero vd., 2001), Macaristan (Forray vd., 2004), ABD (French, 2007), Suriye (Fakhro vd., 2010), Güney Afrika (Carmichael, 2011), Yunanistan (Efthimiou vd., 2011), Fas (Souiri vd., 2017), Hırvatistan (Novak vd., 2011) gibi birçok ülkede varlığı tespit edilmiştir (Şekil 2. 7.). Ülkemizde ise ilk olarak 2008-2009 yılları arasında Muğla'nın Dalaman ilçesindeki seralarda yetiştirilen domates bitkilerinde Özdemir tarafından fark edildi ve bitkiler DAS-ELISA yöntemiyle test edilerek virüsün varlığı teyit edilmiştir (Özdemir, 2010). Virüsün ülkemizdeki ikinci tespiti ise Batı Akdeniz Bölgesi'nde bulunan seralarda yetiştirilen

domateslerde yapılmıştır (Yardımcı vd., 2014). Bu iki çalışma dışında ülkemizde ve bölgemizde virüsün varlığına dair başka bir kayıt bulunmamaktadır.



Şekil 2. 8. PepMV'nin EPPO (2023) kayıtlarına göre dünyadaki dağılımı

PepMV'nin farklı ülkelerde ve bitki türlerinde tespit edilen izolatlarının moleküler karakterizasyonları, virüsün beş farklı ırka sahip olduğunu ortaya koymuştur: Avrupa (EU), Peru (LP), Güney Peru (PES), Amerikan (US1) ve Şili 2 (CH2) (Hanssen vd., 2009; Moreno-Pérez vd., 2014).

PepMV, doğal açıklıklardan veya hücre duvarlarındaki yaralardan geçerek, domates bitki hücrelerine mekanik olarak etkili bir şekilde taşınmaktadır; ayrıca düşük bir tohum bulaşma oranı gösterilmiştir. Bu etmenin tohum ile taşınması, birkaç çalışmada tohum hasat zamanına, domates çeşidine ve uygulanan tohum temizleme veya dezenfeksiyon yöntemlerine bağlı olarak % ~ 2 oranında olduğu belirtilmiştir (Krinkels, 2001; Córdoba-Selles vd., 2007; Ling, 2008; Hanssen vd., 2010). Ayrıca, bombus arılarının virüsü enfekte olmuş bitkilerden sağlıklı bitkilere taşıyabildiği gözlemlenmiştir; ancak bombus arılarıyla taşınma, virüs ile enfekteli bir bölgede virüsün yayılması için önem teşkil etmektedir. Enfekteli bölgenin ötesinde enfeksiyonun başka bölgelere veya ülkelere bulaşma riski bulunmamaktadır.

Domates bitkilerinde PepMV'nin ilk belirtileri, Patates virüsü X (PVX) tarafından oluşturulan belirtilere benzeyen küçük sarı yaprak lekeleridir. Daha sonra, yaşlı yapraklarda beneklenme ve üst yapraklarda hafif kıvrılma görülebilmektedir. Belirtiler iklim koşullarına bağlı olabilir ve (göreceli) düşük ışık koşullarında daha belirgin hale gelebilmektedir. Domateste, PepMV enfeksiyonunun sergilediği semptomlar arasında

yapraklarda mozaikleşme, sarı parlak dikdörtgen lekeler, şekil bozuklukları, kabarcıklaşma, meyvelerde mermerleşme ve cüceleşme yer almaktadır (Şekil 2. 8). Virüs ile enfekteli bitkilerin tüm kısımları enfeksiyondan etkilenebilmektedir. Diğer Solanaceae bitkilerindeki belirtiler farklılık gösterebilir. Bazı patates çeşitleri, mekanik bulaştırma sonrasında hiçbir belirgin semptom göstermezken, diğerleri nekroz ile güçlü bir tepki verebilmektedir (Jones vd., 1980)



Şekil 2. 9. PepMV'nin domates bitkisinde yaprak ve meyve belirtileri

PepMV'nin diğer Potexvirusler gibi oldukça dar bir konukçu aralığı vardır. Konukçu aralığının çoğunlukla Solanaceae türlerine sınırlı olduğu düşünülmektedir (Salomone ve Roggero, 2002; Soler vd., 2002; Verhoeven vd., 2003). Orta ve güney Peru'da yapılan bir araştırmada, virüs *S. chilense*, *S. chmielewskii*, *S. parviflorum* ve *S. peruvianum* gibi yabani domates türlerinde doğal enfeksiyonlarda tespit edilmiştir (Soler et al., 2002). Ayrıca, in-vitro koşullarda mekanik inokülasyonlar yapılarak PepMV'nin konakçı aralığı patlıcangiller (*S. melongena*), patates (*S. tuberosum*) ve Nicotiana (*N. benthamiana*), Datura (*D. stramonium*), Capsicum (*C. annuum*) ve Physalis (*P. floridana*) cinslerine ait türleri içerdiği gösterilmiştir (Salomone ve Roggero, 2002; Verhoeven vd., 2003; Jones vd., 1980; Martin ve Mousserion, 2002).

2.4. Multipleks Klasik ve Real Time ile Yapılmış Önceki Çalışmalar

Biber ve domates bitkilerini enfekte eden bitki virüsleri, seçilen spesifik primerlere bağlı olarak aynı anda ve tek reaksiyonda belirlenebilmektedir. Bu amaçla, 1994 yılında ilk defa multiplex PCR çalışan Chamberlain and Chamberlain; DNA temelli 9 farklı virüs üzerinde çalışmıştır. Bu çalışmaya takiben kapsamda bitki patojenlerinden biri olan RNA virüsleri için çoklu PCR analizi (multipleks PCR) 1994 yılında Barriana ve ark. tarafından yapılmıştır. Baklagiller için büyük önem taşıyan Alfalfa mosaic alfamovirus, Bean yellow mosaic potyvirus, Clover yellow vein potyvirus, Cucumber mosaic cucumovirus ve Subterranean clover mottle sobemovirus olmak üzere 5 adet tohum kaynaklı baklagil virüsünün varlığı için bir tüpteki numuneyi aynı anda test edebilen bir multipleks ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) testi geliştirilmiştir. Primerler, RT-PCR ürününün boyutu, çoğaltılan virüsün göstergesi olacak şekilde tasarlanmış ve birden

fazla virüs ırkının dizilerinin mevcut olduğu durumlarda, primer hedefleri olarak korunmuş bölgelere öncelik verilmiştir. RT-PCR testi, her virüs için test edilen tüm izolatları saptamıştır ve bu çalışmanın ELISA testinden 5 kata kadar daha duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir. Diğer araştırmacılar bu çalışmayı baz alarak kendi çalışmalarına ışık tutmuşlardır.

Barriana ve ark.(1994) tarafından yapılan bu çalışmayı takiben yine 1994 yılında Minafra ve Hadidi Grapevine virus A, Grapevine virus B ve Grapevine leafroll-associated virus için multipleks PCR geliştirmişlerdir. Bu virüsler için spesifik DNA primerleri, her bir viral genomun bir bölümünün nükleotit sekansına dayalı olarak dizayn edilmiştir. Her virüsün amplifiye edilmiş DNA fragmanı, klonlanmış viral genomun bir cRNA probu ile Southern hibridizasyon analizi ile tanımlanmıştır. Enfekte asma yapraklarının ekstraktlarında GVA, GVB ve/veya GLRaV-III tespiti için ters transkripsiyon (RT)-PCR, immüno capture (IC)-RT-PCR ve/veya multipleks (M)-RT-PCR testleri geliştirilmiştir. Viral spesifik DNA, enfekte olmamış asma dokusunun veya virüssüz olmayan unlu bitlerin çoğaltılmış ekstraktlarında tespit edilmezken; IC-RT-PCR'nin uygulanması, virüslü unlu bitlerden GVA'nın tespiti için RT-PCR'den daha kolay sonuç almayı sağlamıştır. Bu çalışmada multipleks RT-PCR'ın, enfekteli asma dokusundan GLRaV-III'ün tespiti için IC-RT-PCR'dan daha kolay ve hızlı olduğunu belirtmişlerdir.

1999 yılında Grieco ve Gallitelli tarafından enginar bitki özsuyundaki Artichoke mottled crinkle tombusvirus (AMCV), Artichoke Italian latent nepovirus (AILV) ve Artichoke latent potyvirus (ALV) genomik RNA parçalarının ters transkripsiyon-amplifikasyonu için altı spesifik primer geliştirilmiştir. Çalışmadaki tüm primer çiftleri, her bir viral RNA şablonu için son derece spesifik olarak dizayn edilmiş, multipleks ters transkripsiyon-amplifikasyon reaksiyonlarında bağımsız olarak çalışmış ve beklenen virüslere özgü boyutta ürünler vermiştir. Araştırmacılar, bu yöntemin, doğada meydana gelmesi muhtemel viral karışık enfeksiyonlar vakalarında eş zamanlı tespit için yararlı olduğu kanıtlanmıştır.

Saade ve ark. (2000) sert çekirdekli meyve ağaçlarında zararlı olan virüs olan Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV), Prune dwarf virus (PDV) ve Apple mosaic virus (ApMV) virüslerini aynı anda tespit edebilen izotopik olmayan moleküler hibridizasyon ve multipleks RT-PCR çalışmaları sürdürmüşlerdir. Multipleks RT-PCR reaksiyonunda üç virüsün saptanması için amplifikasyon etkinlikleri, tek tek virüsler için tekli RT-PCR reaksiyonlarında elde edilenlerle aynı olup; bu primerler tekli veya çoklu enfeksiyonlarda doğal olarak oluşan konukçular badem, kayısı, kiraz, şeftali ve erik olmak üzere beş *Prunus spp.* türünde test edilen tüm PNRSV, ApMV ve PDV izolatlarından dizileri çoğaltmayı başarmıştır. Meyve ağaçlarındaki ApMV izolatları için, PCR ürünlerinin elektroforetik Araştırmacılar, bu çalışmanın odunsu konukçu bitkilerdeki multipleks RT-PCR ile üç bitki virüsünün aynı anda saptanmasına ilişkin ilk rapor olduğunu bildirmişlerdir.

2000 yılında Sharman ve ark. muzda görülen virüsler için multipleks PCR geliştirme çalışmalarını sürdürmüşlerdir. Muz bitkisinin öz suyundan üç virüsün eş zamanlı tespiti için bir multipleks, immüno capture PCR (M-IC-PCR) geliştirilmiştir. Araştırmacılar, ssRNA genomlarına sahip Banana bract mosaic virus ve Cucumber mosaic virus için bir ters transkripsiyon adımının gerekli olduğunu, Banana bunchy top virus'un (ssDNA genomu) saptanması, bu adıma dahil edilmesinden olumsuz etkilenmediğini belirtmişlerdir. Üç virüsün tümü, karışık bir enfeksiyondan aynı anda tespit edilebilir olduğunu bildirmişlerdir.

2005 yılında Roy ve ark. turuncgillerde hastalığa sebep olan 6 RNA virüsü ve 1 DNA virüsü olmak üzere 7 virüs üzerinde çalışmışlardır. Bu virüsler: Citrus leaf rugose virus (CLRV), Citrus psorosis virus (CPsV), Citrus tatter leaf virus (CTLV), Citrus tristeza virus (CTV), Citrus variegation virus (CVV), Citrus yellow mosaic virus (CYMV) ve Indian citrus ringspot virus (ICRSV)'dir. Virüslere özgü yedi farklı fragment (245-942 bp), multipleks PCR kullanılarak aynı anda amplifiye edilmiş ve moleküler boyutlarına göre tanımlanmıştır. PCR'ların tutarlı sonuçları, her virüs patojeninin tespiti için tekli PCR ile karşılaştırılmış ve multipleks PCR sonuçları sıralama analizi ile doğrulanmıştır. mPCR, sertifikasyon programları için virüssüz narenciye bitkilerinin üretimine yardımcı olacak, narenciye bitkilerinde çoklu virüslerin saptanması için yararlı bir hızlı yöntem sağlayacağını belirtmişlerdir.

Baranwal ve ark., 2005 yılında elektron mikroskopisi, sekans analizi ve multipleks PCR tekniğini kullanarak turuncgillerde sorun teşkil eden Citrus yellow mosaic virus ve *Candidatus liberibacter asiaticus* etmenlerini tanılamıştır.

Domates tohumlarını enfekte eden ve bir bakteri olan *Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis* (Cmm) ve domates bitkilerini enfekte eden bir virüs olan Pepino mosaic virus (PepMV) multipleks realtime PCR yöntemiyle saptanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, MCH-multipleks gerçek zamanlı PCR'ın ticari bir tohum sağlığı analizi olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu ve daha fazla iyileştirmeden sonra bitki patojenlerinin tohum üzerinde küresel hareketini önlemek için önemli bir araç olarak hizmet edebileceğini göstermektedir. (Johnson, 2005).

Price ve ark. (2010) Wheat streak mosaic virus ve Triticum mosaic virus'ü, tek bir buğday bitkisi örneğinde her iki patojenin tespiti için gerçek zamanlı multipleks PCR tekniği geliştirmeyi amaçlamıştır. Çalışmada WSMV ve TriMV'nin tespiti için özel primerler ve prob kombinasyonları geliştirmiş, çoklu reaksiyon sırasında hassasiyetteki herhangi bir kaybın yanı sıra diğer yaygın buğday virüsleriyle herhangi bir çapraz reaksiyonu tespit etmek için tekli ve çoklu reaksiyonlar aynı anda yürütmüşler ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Bu multipleks tekniğin, yalnızca tanısal değerlendirmeler için değil, aynı zamanda ekolojik ve epidemiyoloji çalışmaları ve konukçu/patojen etkileşimlerinin araştırmaları için, özellikle konukçu her iki patojenle de enfekte olduğunda, değerli bir araç olarak faydalı olacağını belirtmişlerdir.

2011 yılında Vinayarani ve ark. tarafından Hindistan'da Tobacco mosaic virus (TMV) ve Tomato mosaic virus (ToMV) ile enfekteli buldukları domates ve dolmalık biber yaprak örneklerinde total nükleik asit izolasyonu yapmışlardır. Tobamovirüs familyasına dahil olan TMV ve ToMV için primer dizaynını movement protein (MP) bölgesinden yapmışlardır. Bu çalışmada primerleri TMV için 454 bp, ToMV için 623 bp uzunluklarını kullanmışlardır. Moleküler tespitlerinin sonuçlarını doğrulamak için, virüsleri tespit etmek için Dolaylı Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi kullanılmışlar. Her iki virüsün aynı konukçuya eş zamanlı enfeksiyonunu, dubleks RT-PCR yöntemi kullanılarak tespit edilebilir olduğunu raporlamışlardır.

Chen ve ark. tarafından 2011 yılında CMV'nin ırkları (1,2) ve domatesi enfekte eden Tobamovirüs cinsine ait TMV, ToMV için 18S RNA ve satellite RNA'ya multipleks primer geliştirip başarılı olmuşlardır. Çalışmada ekstrakte edilen toplam RNA kullanılarak reaksiyon bileşenleri ve döngü parametreleri optimize edilmiş ve bir multipleks RT-PCR prosedürü oluşturulmuştur. Sırasıyla CMV alt grubu II, CMV alt grubu I, ToMV, TMV, uydu RNA ve 18S rRNA'ya özgü 704, 593, 512, 421, 385, 255 bp'lik altı fragment aynı anda amplifiye edilmiştir. Multiplex RT-PCR yönteminin CMV'yi saptama hassasiyetinin, çift antikorlu sandviç enzim bağlantılı immünosorbent testinden (DAS-ELISA) 100 kat daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada, Doğu Çin'den toplanan 141 örnek arasında, yukarıdaki izolatlardan biriyle 106 tek enfeksiyon tespit etmişler ve 13 karışık enfeksiyon bulmuşlardır. Sonuçlar, domatesi enfekte eden viral hastalıkların epidemiyolojisini araştırmak için bu yöntemin potansiyel kullanımını göstermişlerdir.

Dai ve ark., (2012) tütünde bulunan virüsleri multipleks PCR yöntemi ile saptamışlardır. Çalışmaya konu olan Tobacco mosaic virus (TMV), Cucumber mosaic virus (CMV), Tobacco etch virus (TEV), Potato virus Y (PVY) ve Tobacco vein banding mosaic virus (TVBMV) etmenleri, tütünü enfekte eden ve ciddi mahsul kayıplarına neden olabilen başlıca virüslerdir. Beş virüsün tümünü aynı anda saptamak ve ayırt etmek için bir multipleks ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu testi geliştirilmiştir. Çalışmada, sırasıyla TMV, CMV alt grup I, TEV, PVY⁰ ve TVBMV'yi temsil eden beş farklı fragment (237, 273, 347, 456 ve 547 bp) üreten her virüs için spesifik primer setleri kullanılmıştır. Bu primerler, tekli PCR ve multipleks PCR ile farklı virüslerin tespiti için kullanılmış ve sonuçlar DNA dizileme analizi ile doğrulanmış. Araştırmacılar geliştirdikleri protokolün, Çin'in farklı yerlerinden virüsleri tespit etmek için kullanıldığını, multipleks PCR tekniklerinin kullanılarak farklı virüslerin eşzamanlı ve hassas tespiti, tütün virüsleri tespiti için diğer geleneksel yöntemlerden daha verimli ve ekonomik olduğunu vurgulamışlardır.

Kumar ve ark. 2017 yılında patatesten 5 farklı virüs ile çalışmışlardır. Bu virüsler Potato aucuba mosaic virus (PAMV), Potato leafroll virus (PLRV), Potato virus M (PVM), Potato virus S (PVS) and Potato virus X (PVX) virüsleri olup, ilave olarak efla bölgesi ve her bir virüs için farklı primer geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, bitki iç kontrolü olarak

uzama faktörü ile birlikte PAMV, PLRV, PVM, PVS ve PVX'in eş zamanlı tespiti için bir multipleks ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) testi geliştirmişlerdir. Tekli ve/veya çoklu RT-PCR için beş patates virüsünün ve patatesin ef1a'nın genomik sekanslarının korunmuş bölgelerinde en az üç primer çifti tasarlayıp optimize etmiş ve tekli RT-PCR'ı standardize etmişlerdir. Ardından, sırasıyla PAMV, PLRV, PVM, PVS, PVX ve ef1a'yı temsil eden 305, 452, 408, 363, 565, 803 bp'lik farklı fragmentler üreten multipleks RT-PCR için ef1a dahil her virüs için bir çift primer seçilmiştir. Tüm primerler, özgüllük ve uyumluluğa dayalı olarak tasarlanmış ve güvenilirliği için klonlama, dizileme ve BLAST analizi ile doğrulanmıştır. Bu multipleks RT-PCR çalışmasının, yapraklarda olduğu kadar patates yumrularında da beş virüsün karışık enfeksiyonunu tespit etmede eşit derecede yeterli olduğunu, patates tohumu üretiminde eş zamanlı olarak beş virüs için ana stokların virüs endekslemesi testinin güvenilir olduğunu ve tohum sertifikasyon programı, ıslah ve epidemiyolojik çalışmalar için faydalı olacağını vurgulamışlardır.

2019 yılında Brezilya'da de Souza Aguiar ve ark. tarafından karpuz bitkisinde görülen virüsler için multiplex PCR çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada Cucumber mosaic virus (CMV), Papaya ringspot virus type W (PRSV-W), Watermelon mosaic virus (WMV), Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV), Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) için 5 virüs çalışılmıştır. Doubleks PCR'da ZYMV ve ZLCV kombinasyonu hariç tüm kombinasyonlar için ürün elde etmede başarılı olmuşlardır. Metodolojide elde ettikleri ürün boyutları 644 bp (CMV), 535 bp (WMV-2), 398 bp (PRSV-W), 244 bp (ZLCV) ve 214 bp (ZYMV) olan multipleks PCR etmenlerinin etkinliğini test etmek için Brezilya Cerrado'da bulunan Tocantins eyaletindeki dört belediyeden virüs belirtileri gösteren bitkileri analiz etmişler ve tüm belediyelerdeki örneklerin %80'inde karışık enfeksiyonlar tespit ederek, multipleks RT-PCR testinin karpuz virüslerini tespit etmek ve ayırt etmek için kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Domateste tohumla taşınan hastalıklar, etkili tohum sağlığı testiyle iyi yönetilmezse ciddi şekilde küresel tohum ticaretini engellediği bilinmektedir. Sombat ve ark., 2018 yılında domates tohumları ile taşınan, pospiviroid olan iki viroid için multiplex PCR geliştirmişlerdir. Bu viroidler Pepper chat fruit viroid (PCFVd) ve Columnea latent viroid (CLVd)'dir PCFVd ve CLVd, domates ve diğer *Solanaceae* türlerini enfekte eden, gelişmekte olan ve ekonomik açıdan önemli iki pospiviroid türüdür. Daha büyük dizi çeşitliliği ile domatesi enfekte eden diğer yaygın pospiviroidlerden farklı olarak, yeni bir saptama yönteminin geliştirilmesi gerektiğini vurgulayan araştırmacılar, tohum sağlığı analizi için yararlı olan PCFVd ve CLVd'yi etkili bir şekilde tespit edebilen gerçek zamanlı bir multipleks metodolojisi geliştirmişlerdir. Bu çalışma başarılı olduğu için tohum sağlığı açısından önemli olmuştur.

Nie ve Singh (2020), patateste bulunan beş adet patates virüsü için multipleks PCR geliştiren bu çalışmayı yürütmüşlerdir. Bu çalışmada birden çok virüsün eş zamanlı saptanması için multipleks ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu, patates

virüsleri [(carlavirus (PVS), polerovirus (PLRV), potexvirus (PVX), potyvirus (PVA ve PVY))] dahil olmak üzere dört viral cins ve bir viroid genomu (pospiviroid (PSTVd)) içeren bir viroid cinsi geliştirmek için kullanılmıştır. Yapay olarak oluşturulmuş viral RNA karışımlarında, altı RNA patojeninin tümü tekli ve çoklu RT-PCR ile başarılı bir şekilde tespit edilmiştir. Doğal olarak enfekteli tarlada yetiştirilen yumrularda, m-RT-PCR, yumrularda bulunan iki ila üç virüsün enfeksiyonunu saptayabileceğini rapor etmişlerdir

Jailani ve ark. tarafından Güneydoğu Amerika Birleşik Devletleri'nde karpuz ve kabakta büyük sorun oluşturan, 2021 yılında çalışılan multipleks PCR'da DNA virüsü olan *Cucurbit leaf crumple virus* (CuLCrV) ve üç tane RNA virüsü Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV), Squash vein yellowing virus (SqVYV), ve Cucurbit chlorotic yellows virus (CCYV) için toplamda dört adet virüs için çalışmışlardır. Çalışmada kabakgillerden elde edilen bir bitki geni olan rubisco, analizin standardizasyonunda dahili kontrol olarak ve yanlış amplifikasyonu izlemek için kullanılmıştır Ek olarak, karışık viral enfeksiyonun eş zamanlı saptanması için OMRT-PCR'de şablon olarak toplam nükleik asidin kullanımını inceledik. One-step Multipleks RT-PCR yüksek hassasiyet gösterdi ve tek bir reaksiyonda 1 ng toplam bitki nükleik asidinden dört virüs enfeksiyonunun hepsini saptadı. Çoklu virüs saptama yaklaşımı, Florida'daki ticari alanlardan toplanan 16 karpuz ve 18 kabak örneğinin teşhisinde başarılı oldu. One-step Multipleks RT-PCR sistemi, birden çok virüsün tespiti için spesifik, hızlı, hassas ve uygun maliyetli olan bu tekniğin CuLCrV, CYSDV, SqVYV ve CCYV'nin saptanmasındaki kolaylığı artırması ve ticari kabakgil üretim alanlarında viral patojenlerin izlenmesine yardımcı olacağını bildirmişlerdir.

Tiberini ve ark. 2022 yılında Tobamovirusler için yaptığı çalışmada, TaqMan problemleri kullanılarak domates yaprakları ve tohumları üzerinde Tomato brown rugose fruit virus ve Tomato mottle mosaic virus için yeni bir realtime RT-PCR tespit sistemi geliştirilmiştir. Bu testin performansı, tohumlar ve yapraklar için sırasıyla 10^{-5} – 10^{-6} kat seyreltme analitik duyarlılık gösterdiği belirtilmiştir. ToBRFV tespiti için bu kiti kullanarak 2021'de farklı kıtalardan toplanan 106 resmi numune üzerinde daha önce gerçekleştirilen analizlerle %100 uyumlu olduğunu beyan etmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmanın yürütüldüğü yer ve kullanılan bitki materyalleri

Bu tez çalışmasında tekli, dubleks ve multipleks PCR çalışmaları, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarı ve Antalya Tarım Moleküler Genetik Laboratuvarında yürütülmüştür. Kullanılan domates ve biber bitki materyalleri daha önceden test edilip pozitif bulunmuş virüs hastalıkları ise Akdeniz Üniversitesi Tohumculuk ve Tarımsal Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (ATOM)’nden temin edilmiştir.

3.1.2. Moleküler çalışmalarda kullanılan materyaller

3.1.2.1. Total nükleik asit izolasyonunda kullanılan materyaller

Total Nükleik Asit (TNA) izolasyonunda steril tissuelyser tüpleri, eppendorf tüpleri, havan ve havan eli kullanılmıştır. Ayrıca tampon çözeltiler (CTAB, β -Mercaptoethanol içeren ekstraksiyon çözeltisi, kloroform, 2-propanol, etanol) ile Eppendorf marka ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları, otoklavlanmış steril bidistile su, Beckman Allegra 30R marka santrifüj, Eppendorf marka thermomixer, -22°C ye kadar soğutabilen dondurucu kullanılmıştır.

3.1.2.2. Reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) için kullanılan materyaller

Total Nükleik Asit izolasyonu sonucunda ToBRFV, PepMV ve TSWV izolatlarından elde edilen TNA ekstraktları temel materyalleri oluşturmuştur. cDNA sentezi için gerekli olan enzimlerin bulunduğu hazır kit olan GRISP marka Xpert One Step Fast PROBE Master mix kullanılmıştır. Bu virüslere özel tasarlanan primerler, steril PCR tüpleri, ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları, steril bidistile su, klasik PCR testlemeleri için Applied Biosystems SimpliAmp thermal cycler kullanılmıştır. Klasik PCR cihazı kullanımı sonrası hazırlanan jel için Sigma marka agaroz, ve 1X TAE kimyasalı, Etidyum bromide, daha sonra jel elektroforezi için Cleaver Scientific Görüntüleme cihazı kullanılmıştır.

3.1.2.3. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) için kullanılan materyaller

Total Nükleik Asit izolasyonu (TNA) sonucunda ToBRFV, PepMV ve TSWV izolatlarından elde edilen TNA ekstraktları temel materyalleri oluşturmuştur. cDNA sentezi için gerekli olan enzimlerin bulunduğu hazır kit olan GRISP marka Xpert One Step Fast PROBE Master mix kullanılmıştır. Bu virüslere ait özel tasarlanan primer ve probalar, steril PCR tüpleri, ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları, steril bidistile su ve BIORAD CFX96 Real Time PCR cihazı kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Mekanik inokülasyon çalışmaları

Akdeniz Üniversitesi Tohumculuk ve Tarımsal Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen çalışma konusu virüsler ile enfekteli bitki izolatlarının virüs yoğunluklarını arttırmak ve taze bitkilerden kaliteli viral RNA elde etmek amacıyla hassas test bitkilerine mekanik inokülasyon işlemi uygulanmıştır. ToBRFV ile enfekteli yapraklar 1/10 gram/Volume (hacim) oranında tartılmıştır. Burada kullanılan izolatlar ToBRFV-Ant-Tom: ve MT107885'tir. TSWV ve PepMV ile enfekteli olan yapraklar ayrı ayrı 1/5 gr/V oranında tartılmıştır. Tartılan yapraklara %0,1'lik 2-mercaptoethanol + 0,02 M Fosfat tampon çözeltisi (pH:7) (Ek 2.) eklenmiştir ve blender yardımı ile ezilmiştir. Daha sonra hazırlanan izolat 15-20 dakika +4°C' de bekletilmiştir. Antalya Fide'den alınan fideler önce saksılara alınmış ve daha sonra "Soft Sponge Pad" yöntemi ile izolat bulaştırılmıştır. Fidelerin kotiledonlarına ve 3. ve 4. gerçek yapraklarına sünger yardımı ile mekanik inokülasyon yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1. Mekanik inokülasyon çalışmaları

Mekanik inokülasyon sırasında yaprak yüzeyinde doku ölümüne sebep olmayacak şekilde mikro yaralar açılmasına özen gösterilmiştir. Bu işlem üç tekerrürlü olacak şekilde uygulanmıştır.

3.2.2. Total nükleik asit ekstraksiyonu

Simptomatik bitkilerden yaprak örneği alınarak Total nükleik asit ekstraksiyonu işlemi uygulanmıştır. Total nükleik asit ekstraksiyonu yapılırken CTAB metodu (Ek 1) uygulanmıştır. Virüs ile enfekteli yaprak örnekleri bitkinin büyüme noktasından alınarak tissuelyser tüplerine alınmıştır. Tüplerin her birine metal boncuk atılarak 100 µl CTAB solüsyonu eklenerek Qiagen marka Tissuelyser cihazında ezilmiştir. Cihazdan çıkarılan tüpler kısa santrifüj yapılarak çöktürülmüştür. Daha sonra kapakları açılarak üstüne tekrar 400 µl CTAB solüsyonu eklendikten sonra 65°C'de 20 dakika bekletilmiştir. Üstüne 500 µl kloroform eklendikten sonra iyice çalkalanarak 14.000 rpm de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Mikro pipet yardımı ile üst sıvıdan (süpernatant) 200 µl çekilerek

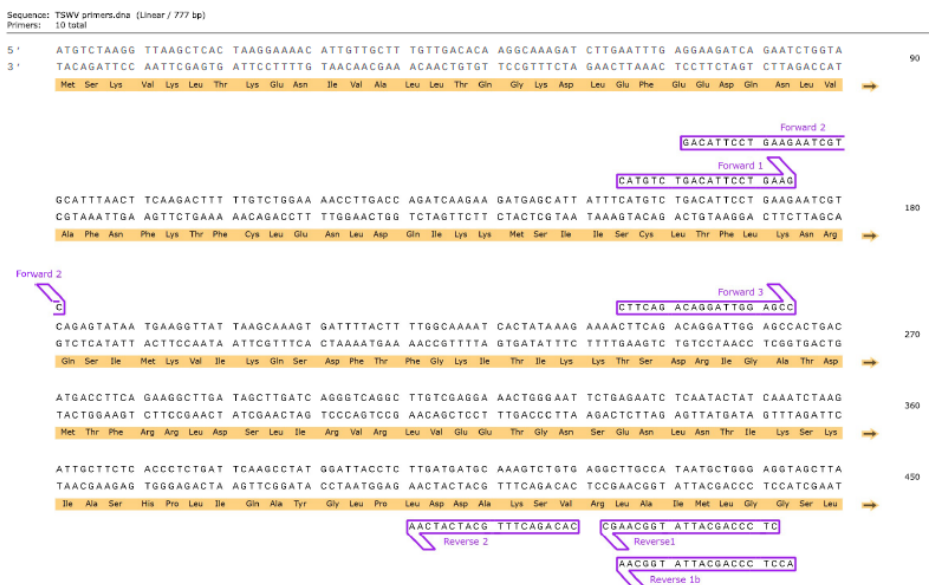
üstüne 200 µl isopropanol (2-propanol) eklenerek 60 dakika -20°C’de bekletilmiştir. Daha sonra 14.000 rpm’de 15 dk santrifüj yapılarak nükleik asitin çöktürülme işlemi gerçekleştirilmiştir. Tüp içerisindeki mevcut sıvı boşaltılarak üstüne 500 µl %70’lik etanol eklenmiştir. 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüj yapılmıştır ve daha sonra lavaboya yavaşça dökülmüştür. Bu yıkama işlemi 2.kez tekrarlanmıştır. Daha sonra tüpler 2 saat kurumaya bırakılmıştır. Kurumaya bırakılan total nükleik asitler 100 µl bidistile su ile sulandırılmıştır.

Sulandırılan total nükleik asitler spektrofotometre ile ölçülerek içerisinde bulunan DNA ve RNA miktarlarını belirlenmiştir. Daha sonra tüm total nükleik asitler, ölçülen RNA miktarına göre 100 ng ‘a eşitlenecek şekilde tekrar sulandırılmıştır. Elde edilen nükleik asitler 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} ve 10^{-9} olmak üzere dilüte edilerek PCR çalışmalarında optimize edilmiştir.

3.2.3. Primer dizayn çalışmaları

3.2.3.1. Klasik RT-PCR primer dizayn çalışmaları

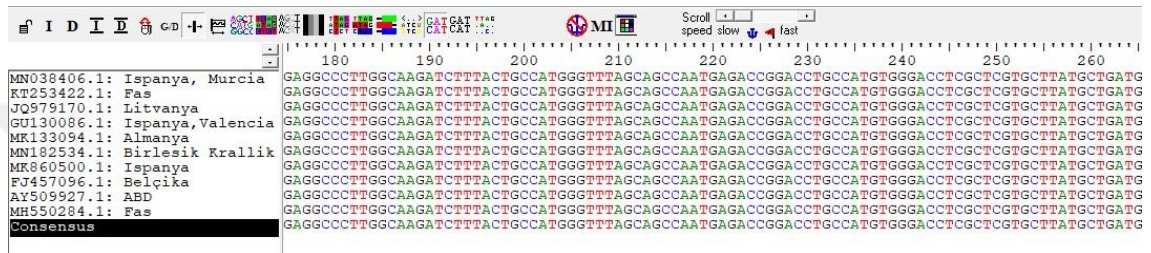
Polimeraz zincir reaksiyonunda hedeflenen gen bölgesini veya virüslerin amplifikasyonu için en önemli basamaklardan biri hedef bölgeye spesifik primer dizaynıdır. ToBRFV, TSWV ve PepMV etmenlerine ait primerler gen bankasında bulunan bilgiler belirli kriterler göz önünde bulundurularak oluşturulmuştur. Bu çalışmada dizaynı yapılan primerler multipleks olarak çalışılacağı için birbirleri ile reaksiyona girmemesi açısından gerekli kontroller yapılmıştır. Manuel olarak hesaplamalar yapılarak oluşturulan primerlerin baz boyutları dikkate alınarak, primerlerin cross-dimer oluşumu ve self-dimer oluşumu engellenmiştir (Şekil 3.2). Multipleks primerlerin hepsinin aynı koşullarda çalışabilmesi için Tm değerleri birbirine yakın olacak şekilde istenen sıcaklıklarda ayarlanmıştır.



Şekil 3. 2. Sekans üzerinde primer tasarlama çalışmaları

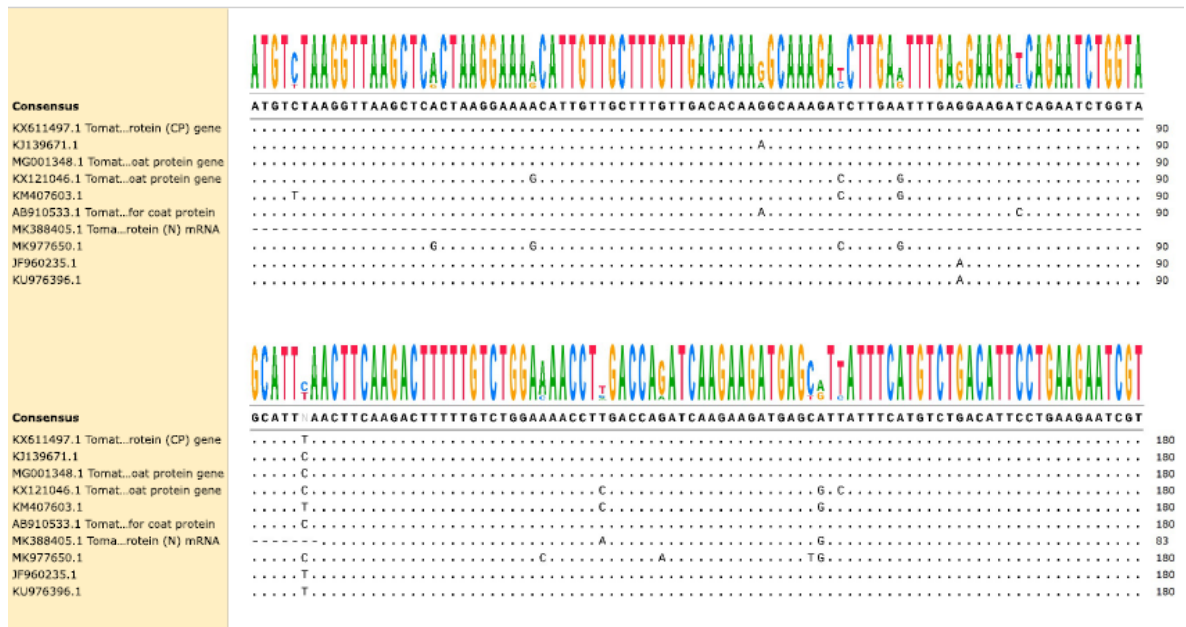
Primer dizaynı sırasında dikkat edilen diğer bir madde ise dizideki Guanin-Sitozin oranı olmuştur. GC oranı %50-60 oranı arasında tutulmuştur. Bu aşamada iki nükleotit arasındaki hidrojen bağının üçlü bağ olması nedeni ile kırılması için yüksek sıcaklık uygulanacak olması, çoğaltmada özgül olmayan bağlanmaları engellemek amaçlanmıştır.

Bu çalışma kapsamında primer dizaynı için National Center of Biotechnology Information (NCBI) veri tabanından yararlanılmıştır. NCBI'dan mevcut virüslerin farklı ülkelerden rapor edilen izolatların kılıf proteinleri ve RdRp polimeraz bölgelerinin sekans verileri toplanmıştır. Her bir virüs için toplanan sekans verileri FASTA formatları not defterine kaydedilmiştir. FASTA formatındaki veriler BioEdit programında ClustalW analiziyle consensus sekansları incelenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3. 3. BioEdit programında ClustalW analiziyle consensus sekansların analizi

Analiz sonucunda tüm izolatlardaki ortak bölgeler belirlenmiştir. Belirlenen ortak bölgelerden üç virüs etmeni için ayrı olarak primer dizaynları SnapGene programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3. 4. Farklı izolatların SnapGene programındaki BLAST analizi

3.2.3.2. RT-PCR çalışmaları

Dizayn edilen primerlerin T_m sıcaklıkları sentez yapan firma tarafından gönderildikten sonra $T_m = [4 (G+C) + 2(A+T)]$ °C formülü ile annealing sıcaklıkları hesaplanmıştır. Burada multipleks PCR'ın çalışabilmesi için önce tüm virüsler için optimum Annealing sıcaklığı bulunmuştur. Primerlerin optimizasyonu için Gradient PCR kurularak optimum çalışma sıcaklığı belirlendikten sonra tekli ve multipleks RT-PCR çalışmaları yürütülmüştür. GRISP markasının Xpert One-Step RT-PCR kiti kullanılarak PCR reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. 7,25 µl steril deiyonize su, 12,5 µl PCR mastermix, 1,25 µl RTase mix, 0,7 µl forward, 0,7 µl reverse ve 1 µl total nükleik asit eklenerek PCR karışımı hazırlanmıştır.

Kullanılan tek adımlı RT-PCR koşullarına göre bir döngü 45°C'de 15 dk, 95°C'de 3 dk; 95°C'de 10s, 61'de 10s, 72'de 15s, döngü 35; ve bir döngü 72'de 5dk şeklinde uygulanmıştır.

3.2.4. Prob dizayn çalışmaları

RealTime PCR çalışmalarında kullanılmak üzere Taqman probolar tasarlanmıştır. Klasik RT-PCR çalışmalarında anlatıldığı gibi virüslere ait verilerle işlenen sekans dizilimlerinden primer-prob çiftleri tasarlanmıştır.

1	cTattttttta	tTgtctctncA	TGTCTAAGGT	TAAGCTCACT	AAGGAAAACA
51	TTGTTGCTTT	GTTGACACAA	GGCAAAGATC	TTGAATTTGA	AGAAGATCAG
101	AATCTGGTAG	CATTTAACTT	CAAGACTTTT	TGTCTGGAAA	ACCTTGACCA
151	GATCAAGAAG	ATGAGCATT	TTTCATGTCT	GACATTCCTG	AAGAATCGTC
201	AGAGTATAAT	GAAGGTTATT	AAGCAAAGTG	ATTTTACTTT	TGGCAAAATC
251	ACTATAAAGA	AAACTTCAGA	CAGGATTGGA	GCCACTGACA	TGACCTTCAG
301	AAGGCTTGAT	AGCTTGATCA	GGGTCAGGCT	TGTCGAGGA	ACTGGGAATT
351	CTGAGAATCT	CAATACTATC	AAATCTAAGA	TTGCTTCTCA	CCCTCTGATT
401	CAAGCCTATG	GATTACCTCT	TGATGATGCA	AAGTCTGTGA	GGCTTGCCAT
451	AATGCTGGGA	GGTAGCTTAC	CTCTTATTGC	TTGAGTTGAT	AGCTTTGAGA
501	TGATCAGTGT	TGCTCTGGCT	ATATATCAGG	ATGCAAAATA	CAAAGACCTC
551	GGGATCGATA	CAAGAAGTA	TGACACCCAGG	GAAGCCTTAG	GAAAGTTTG
601	CACGTGTGCTA	AAAAGCAAG	CATTTGAAAT	GAATGAAGAT	CAGGTGAAGA
651	AAGGGAAGA	GTATGCTGCT	ATACTTAGCT	CCAGCAATCC	TAATGCTAAA
701	GGAAGTATTG	CTATGGAACA	TTACAGTGAA	ACTCTTAACA	AGTTCTATGA
751	AATGTTCCGG	GTTAAAAAC	AGGCAAAACT	TGCAGAACTT	GCTTAA

Şekil 3. 5. RealTime PCR için primer-prob tasarlama çalışmaları

3.2.4.1. RT-qPCR çalışmaları

PCR evrelerinden biri olan bağlanma (annealing) evresinde primerler bağlanarak ve Taq polimeraz ile uzama gerçekleşme prensibiyle Taq polimerazın 5'Exonucleaz aktivitesi sayesinde proba bağlı florofores kesilir ve floresan açığa çıkar. Bu sayede hedef gen ışığa vererek analiz edilmektedir. Taqman metodunun avantajı farklı renkteki raportörleri içeren probalarla multiplex deneylerde kullanılabilmesidir. RT-qPCR, kalıp RNA'nın başlangıç miktarını spesifik, hassas ve tekrarlanabilir şekilde tespit edebilmesi ve RNA

miktarı saptanabilmesi ile klasik PCR'ye göre daha fazla tercih edilmektedir. Her bir döngüde açığa çıkan floresan miktarını kaydedilerek, PCR ürünündeki ilk anlamlı artışın gözlemlendiği ekspanensiyel faz görüntülenmektedir. PCR ürününün ekspanensiyel artış gösterdiği ilk döngü başlangıç materyalinin miktarı ile doğru orantılı olmaktadır.

Realtime PCR çalışmalarında 50°C'de 15 dk, 94°C'de 10 s, 60°C'de 10 s ve 72°C'de 10 s olmak üzere 40 döngü uygulanmıştır.

3.2.5. Multipleks RT-PCR

Hem klasik PCR primerleri hem de realtime primer-prob çiftleri ToBRFV, TSWV ve PepMV izolatları ile belirtilen PCR döngüleri ile aynı olmak üzere tek tüpte önce dubleks olarak denenmiştir. Bu aşamada ToBRFV ve TSWV, ToBRFV ve PepMV, TSWV ve PepMV nükleik asitleri birleştirilerek tek tüpte reaksiyon hazırlanmış ve ikili analiz sonuçları incelenmiştir. İkili kombinasyonlardan sonra üçlü kombinasyon reaksiyonunda üç virüse ait nükleik asit tek tüpte hem klasik RT-PCR hem de Realtime RT-PCR analizi yapılmıştır.

4. BULGULAR

4. 1.Simptomatolojik Bulgular

Mekanik inokülasyon çalışmalarında Akdeniz Üniversitesi Tohumculuk ve Tarımsal Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen ToBRFV, TSWV ve PepMV ile enfekteli bitkiler inokulum kaynağı olarak kullanılmıştır. Virüs inokülasyonlarında kullanılan hassas domates çeşitlerinde, söz konusu virüs hastalıklarına karşı oluşturdukları reaksiyonlar 7, 14 ve 21. günde morfolojik gözlem ile simptom takibi yapılmıştır. ToBRFV (Şekil 4.1.), TSWV (Şekil 4.2) ve PepMV (Şekil 4.3) inokülasyonlarının hassas domates bitkilerinde meydana getirdiği belirtiler kaydedilmiştir.



Şekil 4. 1. ToBRFV mekanik inokülasyonu yapılan bitkilerin gösterdiği belirtiler



Şekil 4. 2. TSWV mekanik inokülasyonu yapılan fidelerin gösterdiği belirtiler



Şekil 4. 3. PepMV mekanik inokülasyonu yapılan fidelerin gösterdiği belirtiler

4.2. Moleküler Bulgular

4.2.1. Total nükleik asit ekstraksiyonu

Bu tez çalışması kapsamında 2022 yılında tekli ve çoklu multipleks PCR çalışmaları için Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarında bulunan domates ve biber bitkilerinde enfekteli yaprak izolatlarında bulunan Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), Tomato spotted wilt virus (TSWV) ve Pepino mosaic virus (PepMV) varlığı moleküler olarak belirlenmiştir. Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu yapıldıktan sonra elde edilen nükleik asitler spektrofotometre ile ölçülmüştür (Çizelge).

Çizelge 4. 1. Elde edilen nükleik asitlerin spektrofotometre ölçümleri

Örnek (Total Nükleik Asit)	260-230 nm oranları (λ)
Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)	1,63
Tomato spotted wilt virus (TSWV)	2,14
Pepino mosaic virus (PepMV)	1,62

Yukarıdaki sonuçlara göre bahsi geçen üç virüs nükleik asit izolasyonlarının hepsi 100 ng 'a eşitlenmiştir. Eşitlenen total nükleik asitler, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} ve 10^{-9} şeklinde sulandırılarak dilüsyon serileri hazırlanmıştır.

4.2.2. Primer-prob dizaynı

Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) için kılıf proteini (coat protein), Tomato spotted wilt virus (TSWV) için nükleokapsid protein geni ve Pepino mosaic virus (PepMV) etmeni için TGB2 protein geni dizilimleri hedef alınmıştır. Bu gen bölgeleri NCBI gen bankaları kullanılarak bulunmuştur. Primer ve probe dizaynı Clustal W alingment programı ve oligo7 software kullanılarak yapılmıştır. Tasarlanan primerler Çizelge 4.2.'d2 ve probe'lar Çizelge 4.3'Te listelenmiştir.

Çizelge 4. 2. Klasik RT-PCR için tasarlanan primer dizilimleri

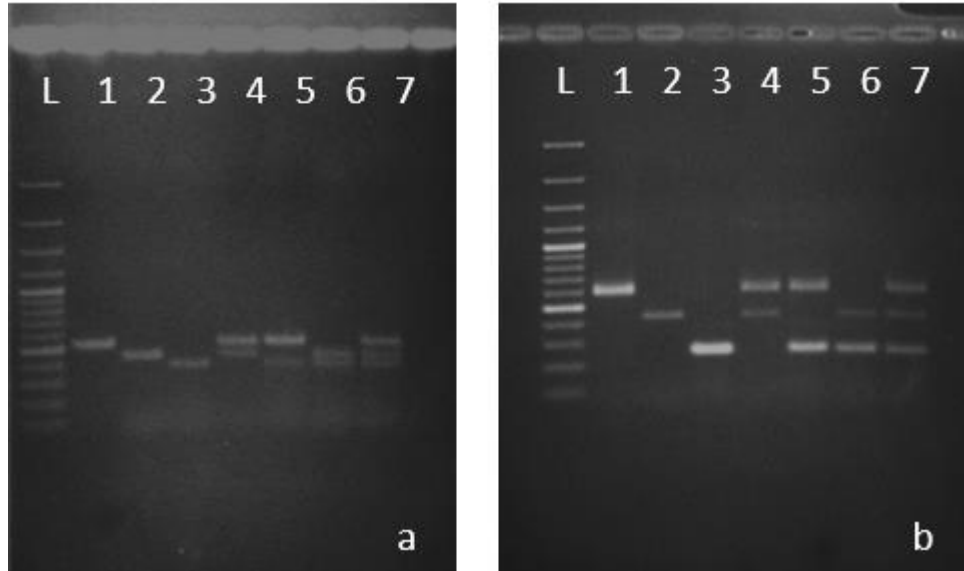
Primer	Primer dizisi (5' - 3')	PCR ürünü
ToBRFV 1 Forward	GGGCCGACCCTATAGAATTA	251 bp
ToBRFV 1 Reverse	CGCCTGATTTTCGACTTCTA	
ToBRFV 2 Forward	GGGCCGACCCTATAGAATTA	284 bp
ToBRFV 2 Reverse	AGTAGCGTCTAACGTTTCG	
TSWV 1 Forward	CATGTCTGACATTCCTGAAG	435 bp
TSWV 1 Reverse	GCACAGTGCAAACCTTTTCCT	
PepMV 1 Forward	TCAAATCCYAAYACAGCTCCT	584 bp
PepMV 1 Reverse	CCCATGTGNCCACGTGT	
PepMV 2 Forward	ATCTTCACCGCTATGGGCCT	521 bp
PepMV 2 Reverse	AGTTCAGGGGGTGCGTCTAT	

Çizelge 4. 3. RealTime RT-PCR için tasarlanan primer-prob dizilimleri

Primer	Dizilim (5'- 3')	Kanal
ToBRFV Forward	ACTAGGTAATCAGTTCCAAACA	FAM
ToBRFV Reverse	GGACAGGTTTCCACACTT	
ToBRFV Probe	AGCTAGAACAACCGTTCAACGGCA	
TSWV Forward	CTAAGATTGCTTCTCACCTCT	HEX
TSWV Reverse	AAGCTACCTCCCAGCATTAT	
TSWV Probe	TGATGCAAAGTCTGTGAGGCTTGC	
PepMV Forward	CTAAGATTGCTTCTCACCTCT	CY5
PepMV Reverse	AAGCTACCTCCCAGCATTAT	
PepMV Probe	TGATGCAAAGTCTGTGAGGCTTGC	

4.2.3. Klasik RT-PCR bulguları

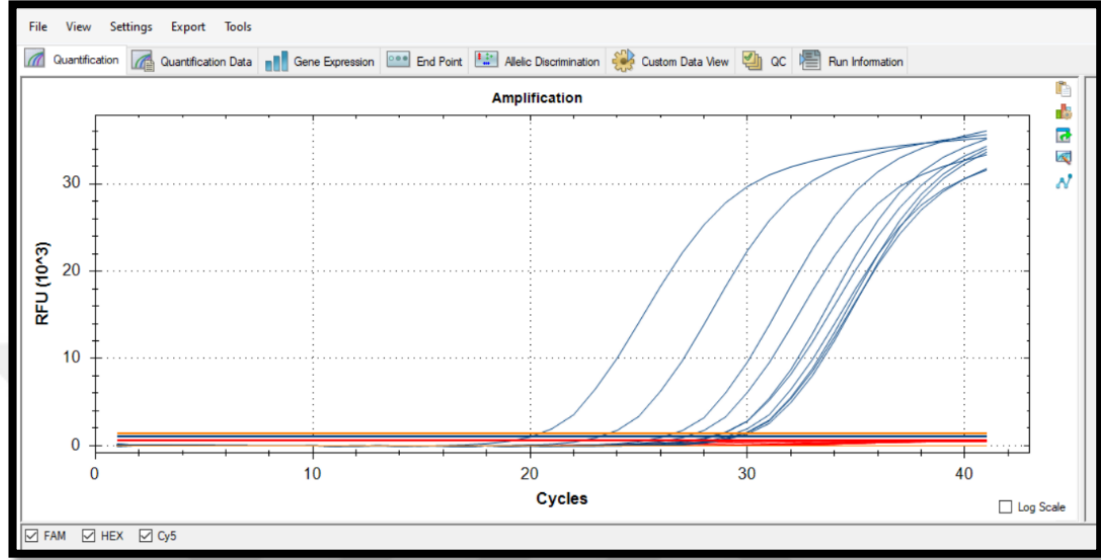
Bahsi geçen 3 virüs için özel olarak dizayn edilen primerler ile önce tek tek daha sonra ikili ve en son multipleks olarak analiz yapılmıştır ve bant görüntüleri elde edilmiştir. Dizayn edilen birden çok primer sipariş edilip denenmiştir.



Şekil 4. 4. a) Klasik RT-PCR çalışmalarında 1)PepMV2, 2)ToBRFV2 3)TSWV 4)TSWV + PepMV2 5)PepMV2 + ToBRFV2 6)TSWV + ToBRFV2 7) PepMV2 + TSWV + ToBRFV2 8)Negatif kontrol primerleriyle yapılan tekli, dubleks ve multipleks analiz sonuçları (b) 1)PepMV1, 2)TSWV ve 3)T

4.2.4. Real Time RT-PCR sonuçları

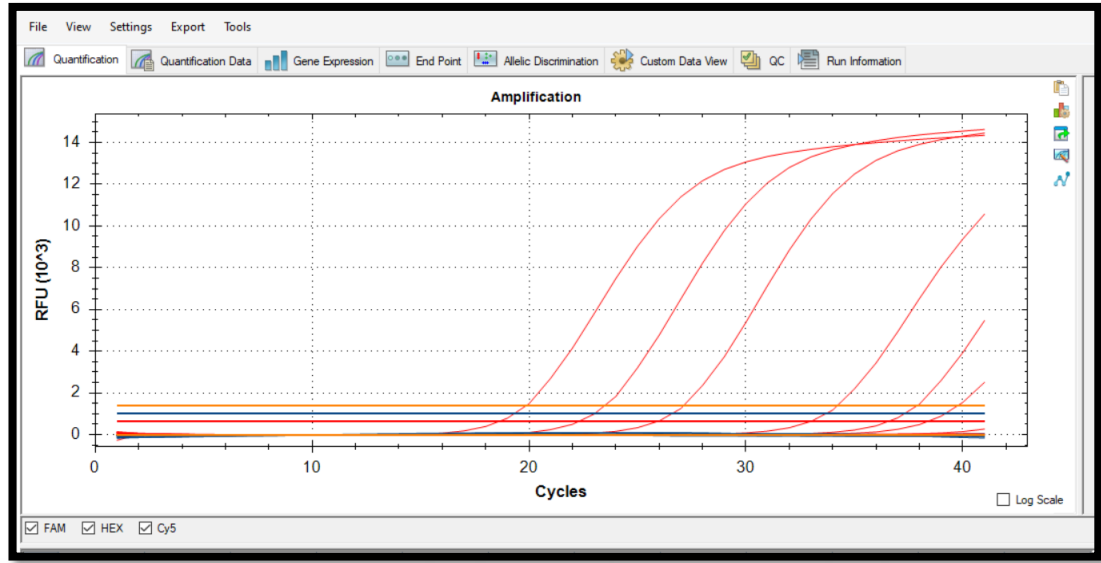
Nükleik asitler için yapılan dilüsyon çalışmalarında ToBRFV, TSWV ve PepMV için yürütülen Real PCR çalışmalarında örneklere standart eğriler Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7) ve eğrilere ait Ct değerleri elde edilmiştir (Çizelge 4.4, Çizelge 4.5, Çizelge 4.6)



Şekil 4. 5. Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) için dilüsyon serisi

Çizelge 4.4. Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) için dilüsyon serisine ait Ct değerleri

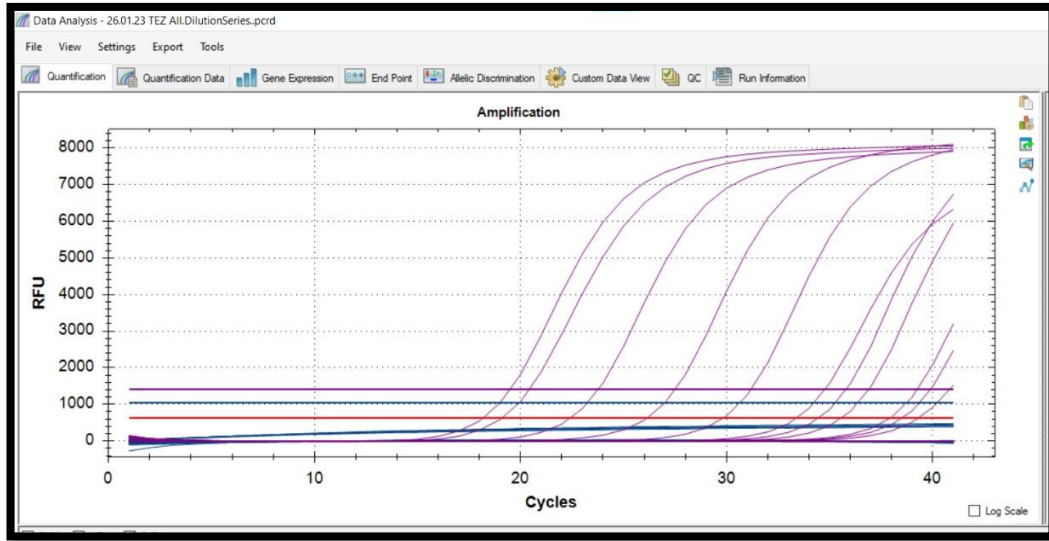
Örnek	FAM kanalı Ct değeri
Stok TNA	20,05
10^{-1}	23,18
10^{-2}	26,13
10^{-3}	28,38
10^{-4}	29,30
10^{-5}	29,52
10^{-6}	29,88
10^{-7}	30,12
10^{-8}	31,49
10^{-9}	32,78



Şekil 4. 6. Tomato spotted wilt virus (TSWV) için dilüsyon serisi

Çizelge 4.5. Tomato spotted wilt virus (TSWV) için dilüsyon serisine ait Ct değerleri

Örnek	HEX kanalı Ct değeri
Stok	18,61
10^{-1}	22,28
10^{-2}	25,93
10^{-3}	32,99
10^{-4}	36,55
10^{-5}	39,86
10^{-6}	-
10^{-7}	-
10^{-8}	-
10^{-9}	-



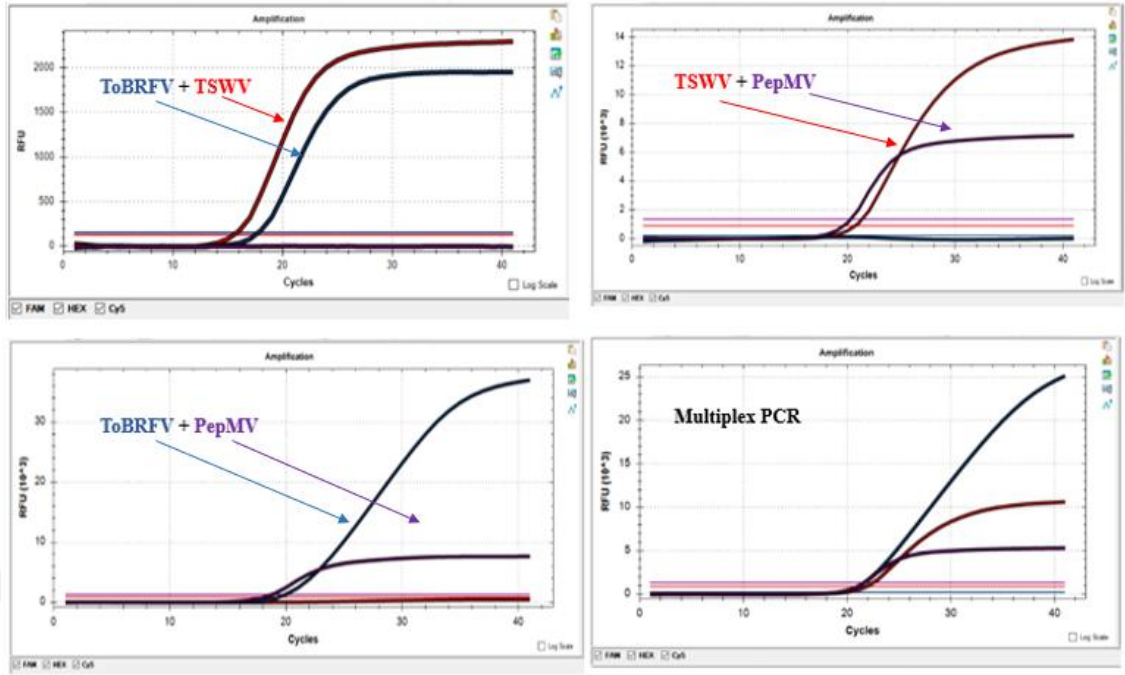
Şekil 4. 7. Pepino mosaic virus (PepMV) için dilüsyon serileri

Çizelge 4.6. Pepino mosaic virus (PepMV) için dilüsyon serisine ait Ct değerleri

Örnek	Cy5 kanalı Ct değeri
Stok	19,47
10^{-1}	20,40
10^{-2}	23,75
10^{-3}	27,47
10^{-4}	31,17
10^{-5}	35,77
10^{-6}	36,89
10^{-7}	39,23
10^{-8}	39,88
10^{-9}	40,81

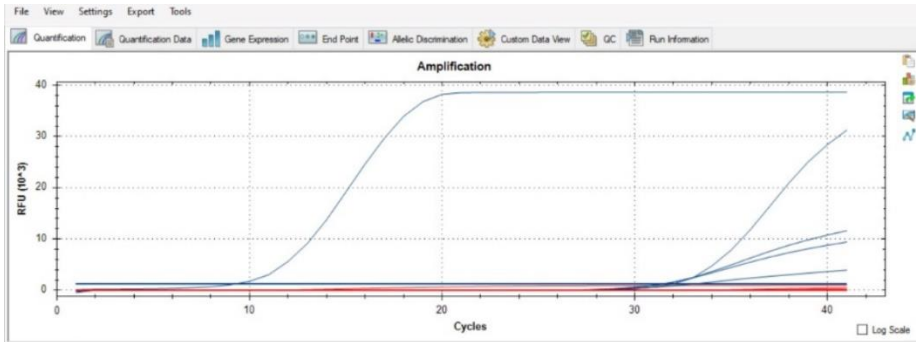
Dilüsyon serileri her bir virüs için farklı Ct değerleri içermektedir. ToBRFV için 10^{-6} serisine kadar pik verirken, TSWV için bu sayı 10^{-3} bulunmuştur. PepMV için ise bu sayı 10^{-4} olduğu saptanmıştır.

Mevcut izolatlardan elde edilen TNA ile qRT-PCR analizleri gerçekleştirildiğinde ise sonuçlar aşağıdaki gibi olmuştur. İlk önce ikili (dubleks) olarak çalışılıp daha sonra multipleks sonuçları elde edilmiştir (Şekil 4.8) Real Time qRT-PCR için dizayn edilen primer ve problarda herhangi bir problem yaşanmamış olup, başarılı sonuçlandırılmıştır.



Şekil 4. 8. Dupleks ve Multipleks RealTime PCR sonuçları

Elde edilen bulgulara ek olarak; ToBRFV için dizayn edilen primer prob çifti, Tobamovirus'lerin genom yapılarının birbirine benzerliği ve cross reaksiyona girebileceği ön görülerek, domateste enfeksiyon yapan TMV, ToMV ve ToMMV pozitif kontrolleri ile realtime RT-PCR analizine tabii tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4. 9. ToBRFV primer- prob çiftinin diğer Tobamovirusler ile cross reaksiyon sonuçları

Cross reaksiyon analizleri sonucunda ToBRFV'ye spesifik geliştirilen primer-prob çiftinin, diğer Tobamovirus'ler ile bağlanma gerçekleştirmediği ve sadece ToBRFV için pozitif sonuç vermiş, diğer Tobamovirus'ler için herhangi bir bağlanma ve çoğalma gözlenmemiştir.

5. TARTIŞMA

Domates ve biber ülkemizde ve dünyada yetiştiriciliği en fazla ürün gruplarıdır ve üretim aşamalarında pek çok farklı biyotik ve abiyotik faktörlerden etkilenmektedir. Türkiye'nin önemli ölçüde tarım arazisi bulunduran bir bölge olması, ülkemiz ihracatına katkı sağlaması amacıyla sağlıklı ve verimli çeşitlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Sebze üreticiliğinde üretilen sebzelerin en çok etkilendiği organizmalar arasında virüs, fungus, bakteri ve böcek gibi etmenler en başta gelmektedir. *Solanaceae* ürün gruplarında zarar yapan virüs hastalıkları; viral patojenlere doğrudan etki eden kimyasal mücadele olmaması, virüslere vektörlük yapan birçok böcek, fungus, nematod olması, bazı virüslerin tohumla ve mekanik olarak kolaylıkla bulaşabilmesi gibi özellikleri göz önüne alındığında virüs hastalıklarının önemi artmaktadır. Virüs hastalıklarının tespit edilmesi de mücadelesi kadar önemlidir. Bu doğrultuda bitkilerde enfeksiyon meydana getiren bitki virüs hastalığının doğru teşhisi mücadele yöntemini belirlemede esas faktörlerden biridir. Ayrıca sağlıklı tohum elde edebilmek amacı ile bitkilerin ve tohumların virüsten arı olup olmadıklarını kontrol etmek gerekmektedir.

Virüs hastalıklarının tanılmasında çeşitli metotlar kullanılmaktadır. Serolojik, biyolojik, moleküler yöntemler, elektron mikroskobu tanınması gibi metotlar; virüslerin adına doğru teşhisini yapabilmek için kullanılabilen metotlardır. Bu kapsamda serolojik testlerin protein düzeyinde tanılama yapması, bazı durumlarda çapraz reaksiyon göstererek yanıltıcı sonuçlar doğurması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Elektron mikroskobisi ile virüslerin çubuk, küresel, zarflı, zarfsız vb. gibi fiziksel özellikleri virüs cinsleri için ayırt edici olmaktadır. Moleküler teknikler ise virüslerin sahip olduğu DNA ve RNA kökenli genom parçalarına spesifik olarak dizayn edilen primer ve probalar ile tespit yapılmasına olanak sağladığından güvenilir metot olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu tez çalışmasında ülkemiz ve dünyada domates ve biber bitkilerini enfekte ederek önemli verim ve kalite kayıplarına, maddi boyutta zararlara sebep olan ve ülkemizdeki ürün giriş çıkışlarında karantina etmenleri listesinde test edilmesi zorunlu olan ToBRFV, TSWV ve PepMV için multipleks primer-prob geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Biber ve domates bitkilerini enfekte eden bitki virüsleri, seçilen spesifik primerlere bağlı olarak aynı anda ve tek reaksiyonda belirlenebilmektedir. 1994 yılında ilk defa multiplex PCR çalışan Chamberlain ve Chamberlain; DNA temelli 9 farklı virüs üzerinde çalışmasını takiben, RNA virüsleri için çoklu PCR analizi 1994 yılında Barriana ve ark. tarafından yapılmıştır. Baklagiller için büyük önem taşıyan *Alfalfa mosaic alfamovirus*, *Bean yellow mosaic potyvirus*, *Clover yellow vein potyvirus*, *Cucumber mosaic cucumovirus* ve *Subterranean clover mottle sobemovirus* olmak üzere 5 adet tohum kaynaklı baklagil virüsünün varlığı için bir tüpteki numuneyi aynı anda test edebilen bir multipleks ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) testi geliştirilmişler ve bu çalışmanın ELISA testinden 5 kata kadar daha duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmayı takiben 1994 yılında *Grapevine virus A*, *Grapevine virus B* ve *Grapevine leafroll-associated virus* için multipleks PCR geliştirilmiştir (Minafra ve Hadidi 1994).

İlerleyen yıllarda enginar bitkisinde *Artichoke mottled crinkle tombusvirus* (AMCV), *Artichoke Italian latent nepovirus* (AILV) ve *Artichoke latent potyvirus* (ALV) genomik RNA parçalarının ters transkripsiyon-amplifikasyonu için altı spesifik primer geliştirilmiştir (Grieco ve Gallitelli 1999). 2000 yılında Sharman ve ark. muzda görülen virüsler için multipleks PCR geliştirmek için yaptıkları çalışmada muz bitkisinin öz suyundan üç virüsün eş zamanlı tespiti için bir multipleks, immüno capture PCR (MIC-PCR) metodunu kullanmışlarken bu çalışmada klasik ve Real time olmak üzere iki farklı PCR metodu için primer-prob çiftleri geliştirilmiştir.

Bu çalışmada ToBRFV, TSWV ve PepMV için multipleks PCR primer ve problemleri geliştirilirken; 2005 yılında yapılmış bir çalışmada domates tohumlarını enfekte eden bir virüs olan Pepino mosaic virus (PepMV) ve bir bakteri olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) kombine edilerek multipleks realtime PCR yöntemiyle geliştirilmiştir. (Johnson, 2005).

Vinayarani ve ark. (2011) tarafından Hindistan'da yapılan çalışmada domates ve dolmalık biberleri enfekte eden ve o tarihlerde henüz keşfedilmemiş olan ToBRFV ile aynı grup olan Tobamovirüs cinsinde yer alan Tobacco mosaic virus (TMV) ve Tomato mosaic virus (ToMV) için primer dizaynını movement protein (MP) bölgesinden; yine 2011 yılında Chen ve ark. tarafından domatesi enfekte eden Tobamovirüs cinsine ait TMV, ToMV için 18S RNA ve satellite RNA'ya multipleks primer geliştirip başarılı olmuşlardır. Bu çalışmada ise ToBRFV için dizayn edilen primer-prob çiftleri ToBRFV'yi diğer Tobamovirüslerden ayırarak çapraz reaksiyona girmesinin önüne geçilerek kılıf proteini (CP) bölgesinden spesifik olarak dizayn edilmiştir. Türkiye'de domates ve biberde yaygın olarak görülen diğer türlerden olan Cucumber mosaic virus (CMV), Pepper mild mottle mosaic virus (PMMoV), Potato virus Y (PVY) ve Tobacco etch virus (TEV) gibi virüslerle yapılan kontrollerde de çapraz reaksiyona girmediği doğrulanmıştır.

2012 yılında yapılan bir çalışmada tütünleri enfekte eden beş virüs hastalığı için klasik PCR metodunda kullanmak üzere virüsleri multipleks PCR yöntemi ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu testi (Dai ve ark. 2012), Kumar ve ark. 2017 yılında patatesten 5 virüs için multipleks PCR ve 2020 yılında yine bir *Solanaceae* türü olan patatesten bulunan beş adet patates virüsü için multipleks PCR (Nie ve Singh (2020) geliştirilmişken; bu tez çalışmasında *Solanaceae* grubunda yer alan domates ve biber bitkilerinin ikisinde de ortak olarak zarar yapabilen virüs hastalıkları için multipleks PCR geliştirilmiştir.

Multipleks PCR çalışmalarının yürütüldüğü diğer çalışmalar incelendiğinde kabakgillerde de yapılan çalışmalar önem kazanmıştır. 2018 yılında Brezilya'da de Souza Aguiar ve ark. tarafından karpuz bitkisinde görülen beş adet virüs için, Jailani ve ark. tarafından Güneydoğu Amerika Birleşik Devletleri'nde karpuz ve kabakta büyük sorun oluşturan, 2021 yılında çalışılan multipleks PCR'da DNA virüsü olan *Cucurbit leaf crumple virus*

(CuLCrV) ve üç tane RNA virüsü *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV), *Squash vein yellowing virus* (SqVYV), ve *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV) için toplamda dört adet virüs için multipleks PCR çalışmaları yürütmüşlerdir. Jailani ve ark. tarafından çalışmada kabakgillerden elde edilen bir bitki geni olan rubisco, analizin standardizasyonunda dahili kontrol olarak ve yanlış amplifikasyonu izlemek için kullanılmıştır. Buna benzer olarak bu tez çalışmasında domatese ve bibere ait 16S RNA dizilimine spesifik ITS bölgelerinden elde edilen primerler de multipleks PCR analizine dahil edilmiştir. Böylece analizi yapılan domates ve biber bitkilerinin bulundurduğu RNA bölgelerinden ayrı olarak virüse ait RNA'ları içerdiği ortaya konmuş ve bu çalışmada dizayn edilen primerlerin sadece çalışma konusu virüslere spesifik olduğu ve analizi yapılan bitkilerin kaliteli RNA içerdiği ITS bölgelerinin de bant vermesiyle kanıtlanmıştır.

Ülkemiz ihracatı için önemli olan domateste Lafrance ve ark. (2023) bazı virüs ve fungus patojenlerine karşı dayanıklılık genlerini tespit edebilmek için moleküler markırlar kullanmışlardır. Bu çalışmada, domates için önemli olan Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), Tomato spotted wilt virus (TSWV) ve bir fungus olan *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) patojenlerinin dayanıklılık genleri için multipleks PCR geliştirmişlerdir. Moleküler markır yardımı ile dayanıklılık genlerinin kontrolü için yapılan çalışmada başarılı sonuç elde etmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise domateste önemli olan üç virüs patojeni hedef alınmıştır. Söz konusu çalışılan virüsler RNA kökenli olmalarından dolayı multipleks olarak RT-PCR metoduna uygun kitler geliştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında elde edilen ToBRFV, TSWV ve PepMV için spesifik olan primer-prob çiftleri hem ayrı ayrı hem de multipleks olarak analize imkân sağlamaktadır. ToBRFV için yapılan primer-prob çiftinin diğer Tobamovirusler (Tobacco mosaic virus (TMV), Tomato mosaic virus (ToMV), Tomato mottle mosaic virus (ToMMV)) için denenip negatif sonuçların alınması ile spesifikliğinin doğrulanmış ve herhangi bir cross reaksiyon göstermediği ortaya koyulmuştur. Ayrıca bahsi geçen bu üç virüsün birinin zarflı (TSWV) ve vektörle taşınan bir virüs olması, diğer ikisinin zarfsız ve tohumla taşınan bir virüs olması (ToBRFV, PepMV) gibi birbirinden yapısal farklılıklarının olması önemli olmuştur. Yapısal farklılıkları olan bu üç virüsün multipleks olarak aynı tüpte aynı anda analiz sonuçlarını doğru bir şekilde vermesi ve çapraz reaksiyonu girmemesi bu tezin özgünlüğünü ve katma değerini artırmıştır. Bu primer dizilimleri Karantina müdürlükleri ile paylaşarak, ülkemiz karantinası için yapılan virüs analizlerine olumlu bir katkı sağlayacaktır. Bu çalışmadan elde edilen veriler ile multipleks PCR çalışmalarının artması, diğer ürün gruplarında da geliştirilmesi için öncü olması hedeflenmiştir. Özellikle ülkemiz için önemli olan ürün gruplarında daha fazla virüs hastalığı dahil edilerek geniş kapsamlı bir multipleks PCR analizine ışık tutması amaçlanmıştır. Viral patojenlerin bakteri, fungus, nematod, viroid gibi diğer bitki patojenleri ile kombine edilerek multipleks PCR çalışmalarına yön verecek olması, bu tez çalışmasından beklenen yararlar arasında yer almaktadır.

6. SONUÇLAR

Dünyada ve Türkiye’de biber ve domates bitkileri ithalat ve ihracatta çok önemli bir yer tutmaktadır. *Solanaceae* familyasına dahil olan domates ve biber bitkileri ülkemizde ihracatta ilk sıralarda yer almaktadır. Verimli, kaliteli yaş meyve ve tohum üretebilmek açısından virüs hastalıklarından arı olması önemlidir. Son zamanlarda domates ve biber için önemli olan Tomato spotted wilt virus, Tomato brown rugose fruit virus ve Pepino mosaic virus’ten arı olması önemlidir. Bahsi geçen virüslerden arı olduğunu görebilmek için Zirai Karantina Müdürlüğü, Batı Akdeniz Araştırma Enstitüsü ve özel sektör çalışanları için çeşitli analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Bu çalışmada ise bu üç virüs için moleküler tanımlama yapılabilmesi açısından multipleks olarak primer ve prob dizaynı gerçekleştirilmiştir.

- Akdeniz Üniversitesi Viroloji laboratuvarından daha önce doğrulaması yapılmış olan virüs izolatları ile domates fidelerinde bahsi geçen bu üç virüs PepMV, TSWV ve ToBRFV’nin inokülasyonları yapılmıştır. Bu inokülasyon sonucu başarılı olup mevcut virüslerin çoğaltılması yapılmıştır.
- Klasik RT-PCR yapılabilmesi için önce NCBI’den her bir virüse ait farklı ülkelerin izolatları bulunmuştur. Daha sonra bulunan farklı ülkelerin izolatlarının kılıf protein ve hareket proteinlerinden FASTA formatları not defterine kaydedilmiştir. FASTA formatları Alignment işlemi yapılarak tüm izolatlar alt alta getirilmiştir.
- Alignment işlemi yapılan bu izolatlar daha sonra NCBI programında BLAST yapılmıştır. Bu işlem sonrasında proteinlerin gen dizilerinde mutasyon olmayan ortak bölgeler seçilerek consensus sekansları elde edilmiştir. Bulunan bu sekanslar bu aşamada bahsi geçen üç virüs için ait oldukları familyalarda o familyada diğer türler ile eşleşmediği kontrol edilmiştir.
- Elde edilen bu consensus sekansları SnapGene programı kullanılarak primer dizaynları yapılmıştır. Aynı sekanslar kullanılarak Real Time RT-PCR için ise Primer3 programı kullanılarak primer ve prob dizaynı yapılmıştır. Annealing sıcaklıklarının çok yakın olmasına dikkat edilmiştir. Prob dizaynı yapılırken her bir virüs için farklı boya seçilmiştir. Bu boyalar FAM, HEX ve Cy5 boyalarıdır.
- Çoğaltmış olduğumuz virüsler için total nükleik asit izolasyonu yapılmıştır. Bu TNA’lar spektrofotometrede RNA ölçümleri yapılarak hepsi optimize edilmiştir.
- Optimize edilen TNA ile hem klasik RT-PCR hem de Real Time RT-PCR analizleri yürütülmüştür. Önce tek tek, daha sonra dubleks, en son multipleks olarak çalışılmış olup, istenilen bant boyutları ve pikler elde edilmiştir.
- Bu tez çalışması sonucunda elde edilen ToBRFV, TSWV ve PepMV için spesifik olan primer-prob çiftleri hem ayrı ayrı hem de multipleks olarak analize imkan sağlamakla birlikte; multipleks PCR tekniği kullanılarak yapılacak yeni araştırmaların çoğaltılması, ülkemiz tarımı için önemli olan kabakgil, baklagil, turunçgil, çeşitli tarla bitkileri gibi diğer ürün gruplarında da geliştirilmesi için öncü olması, viral hastalıkların haricinde diğer bitki patojenleri ile kombine edilerek de yeni tanımlama metodlarının geliştirilmesine ışık tutmasıyla literatüre

hem metotta kullanılan teknikler hem de elde edilen başarılı bulgular ile ışık tutacaktır.



7. KAYNAKLAR

Adkins, S. (2000). Tomato spotted wilt virus—positive steps towards negative success. *Molecular plant pathology*, 1(3), 151-157.

Adkins S, Zitter T, Momol T (2005). Tospoviruses (Family Bunyaviridae, Genus Tospovirus). Fact Sheet PP-212, One of a Series of The Plant Patology Department, Florida Cooperative Extension Services Institute of Food And Agricultural Sciences, University of Florida.

Aguilar, J. M., Hernandez-Gallardo, M. D., Cenis, J. L., Lacasa, A., & Aranda, M. A. (2002). Complete sequence of the Pepino mosaic virus RNA genome: Brief Report. *Archives of virology*, 147, 2009-2015.

Alkowni R, Alabdallah O, Fadda Z (2019) Molecular identification of Tomato brown rugose fruit virus in tomato in Palestine. doi: <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00240-7>.

Almási, A., Csilléry, G., Csömör, Z., Nemes, K., Palkovics, L., Salánki, K., & Tóbiás, I. (2015). Phylogenetic analysis of Tomato spotted wilt virus (TSWV) NSs protein demonstrates the isolated emergence of resistance-breaking strains in pepper. *Virus Genes*, 50, 71-78.

Arli-Sokmen, M., Mennan, H., Sevik, M. A., & Ecevit, O. (2005). Occurrence of viruses in field-grown pepper crops and some of their reservoir weed hosts in Samsun, Turkey. *Phytoparasitica*, 33, 347-358.

Azeri T (1981). Preliminary Report of Tomato Spotted Wilt Virüs and Its Epidemy on Tobacco in the Çanakkale Region of Turkey. *J Turkish Phytopathology*, 10(2-3): 79-87.

Azeri T (1994). Detection of Tomato Spotted Wilt Virüs in Tabacco and Tomato Cultivars by Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *J. Turkish Phytopathology*, 23(1): 37-46.

Baranwal, V. K., Majumder, S., Ahlawat, Y. S., & Singh, R. P. (2005). A novel approach for simultaneous detection of Citrus yellow mosaic virus and Citrus greening bacterium by multiplex polymerase chain reaction.

Barriana, H. S., Shannon, A.L., Chu, W.G. and Waterhouse, P.M., (1994). Detection of five seed borne legume viruses in one sensitive multiplex polymerase chain reaction test, *Phytopathology*, 84: 1201-1205.

Bozokalfa, M. K., Eşiyok, D. (2010). Biber (*Capsicum annuum* L.) aksesyonlarında genetik çeşitliliğin agronomik özellikler ile belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 47(2), 123-134.

Cambron-Crisantos JM, Rodríguez-Mendoza J, Valencia-Luna JB, Alcasio-Rangel S, García-Ávila CJ, López-Buenfil JA, Ochoa-Martínez DL (2018) First report of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in Michoacan, Mexico. doi: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1810-5>.

Carmichael, D. J., Rey, M. E. C., Naidoo, S., Cook, G., & Van Heerden, S. W. (2011). First report of Pepino mosaic virus infecting tomato in South Africa. *Plant Disease*, 95(6), 767-767.

Chamberlain, J. S., & Chamberlain, J. R. (1994). Optimization of multiplex PCRs. *The polymerase chain reaction*, 38-46. Chen, S., Gu, H., Wang, X., Chen, J., & Zhu, W. (2011). Dahili kontrol olarak 18S rRNA kullanılarak Salatalık mozaik virüsü alt gruplarının ve Domates'i enfekte eden Tobamovirüslerin çoklu RT-PCR tespiti. *Açta Biochim Biophys Sin*, 43 (6), 465-471.

Chitambar J (2018) California pest rating for Tomato brown rugose fruit virus. <https://blogs.cdфа.ca.gov/Section3162/?p=5843>. Erişim 12 Mart 2020.

Cordoba-Selles, M. D. C., García-Rández, A., Alfaro-Fernández, A., & Jordá-Gutiérrez, C. (2007). Seed transmission of Pepino mosaic virus and efficacy of tomato seed disinfection treatments. *Plant Disease*, 91(10), 1250-1254.

Dai, J., Cheng, J., Huang, T., Zheng, X., & Wu, Y. (2012). A multiplex reverse transcription PCR assay for simultaneous detection of five tobacco viruses in tobacco plants. *Journal of virological methods*, 183(1), 57-62.

de Souza Aguiar, R. W., Martins, A. R., Nascimento, V. L., Capone, A., Costa, L. T. M., Campos, F. S., ... & Nagata, T. (2019). Multiplex RT-PCR identification of five viruses associated with the watermelon crops in the Brazilian Cerrado. *African Journal of Microbiology Research*, 13(3), 60-69.

Deligöz, İ., Baltacı, A., Çelik, N., Özdemir, S., Uzunoğulları, N., & Yılmaz, N. K. (2023). Türkiye'de Biberde Enfeksiyon Oluşturan Virüslerin Belirlenmesi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 38(1), 117-130.

Dombrovsky, A., & Smith, E. (2017). Seed transmission of Tobamoviruses: Aspects of global disease distribution. *Adv. Seed Biol*, 12, 233-260.

Efthimiou, K. E., Gatsios, A. P., Aretakis, K. C., Papayiannis, L. C., & Katis, N. I. (2011). First report of Pepino mosaic virus infecting greenhouse cherry tomatoes in Greece. *Plant Disease*, 95(1), 78-78.

EPPO 2023. <https://gd.eppo.int/taxon/TOBRFV/distribution>

Fakhro, A., Von Bargen, S., Bandte, M., & Büttner, C. (2010). Pepino mosaic virus, a first report of a virus infecting tomato in Syria. *Phytopathologia Mediterranea*, 49(1), 99-101.

Fidan H, Sarikaya P, Calis O (2019) First report of Tomato brown rugose fruit virus on tomato in Turkey. doi: <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.039.018>

Fidan, H. (2020). Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV): Güncel durumu ve geleceği. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 33(1), 43-49.

Fidan, H., & Sarıkaya, P. (2020). Antalya ili patlıcan (*Solanum melongena*) yetiştiriciliğinde sorun olan virüs hastalıkları. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 33(1), 27-35.

Forray, A., Tüske, M., & Gaborjanyi, R. (2004). First report on the occurrence of Pepino mosaic virus in Hungary. *Növényvédelem*, 40(9), 471-473.

French, C. J., Bouthillier, M., Bernardy, M., Ferguson, G., Sabourin, M., Johnson, R. C., ... & Mumford, R. (2001). First report of Pepino mosaic virus in Canada and the United States. *Plant Disease*, 85(10), 1121-1121.

Gómez, P., Sempere, R., & Aranda, M. A. (2012). Pepino mosaic virus and tomato torrado virus: Two emerging viruses affecting tomato crops in the Mediterranean basin. In *Advances in virus research* (Vol. 84, pp. 505-532). Academic Press.

Grieco, F., & Gallitelli, D. (1999). Multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction applied to virus detection in globe artichoke. *Journal of Phytopathology*, 147(3), 183-185.

Güldür ME, Marchouks MGM, Yurtmen E, Yılmaz MA (1995). Mersin ve Çevresinde Yetiştirilen Domateslerde Zararlı Yeni Bir Virüs Tomato spotted wilt virus. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 303-306.

Hančinský, R., Mihálik, D., Mrkvová, M., Candresse, T., & Glasa, M. (2020). Plant viruses infecting Solanaceae family members in the cultivated and wild environments: A review. *Plants*, 9(5), 667.

Hanssen, I. M., Paeleman, A., Vandewoestijne, E., Van Bergen, L., Bragard, C., Lievens, B., ... & Thomma, B. P. H. J. (2009). Pepino mosaic virus isolates and differential symptomatology in tomato. *Plant Pathology*, 58(3), 450-460.

Hanssen, I. M., & Thomma, B. P. (2010). Pepino mosaic virus: a successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. *Molecular plant pathology*, 11(2), 179-189..

Jailani, A. A. K., Hendricks, K., Roberts, P. D., & Paret, M. L. (2021). Development of a simple one-step multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of DNA and RNA viruses of Cucurbit leaf crumple virus, Cucurbit yellow stunting disorder virus, Squash vein yellowing virus, and Cucurbit chlorotic yellows virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 116, 101734.

Jones, R. C., KOENIG, R., & Lesemann, D. E. (1980). Pepino mosaic virus, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). *Annals of Applied Biology*, 94(1), 61-68.

Kajić, V., Novak, A., & Milanović, J. (2011, October). First report of Pepino mosaic virus (PepMV) in Croatia. In *V Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes 960* (pp. 321-325).

Krinkels, M. (2001). PepMV causes sticky problem. *Prophyta*, May 2001, 30-33.

Kumar, R., Jeevalatha, A., Baswaraj, R., Sharma, S., & Nagesh, M. (2017). A multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of five viruses in potato. *Journal of Plant Pathology*, 37-45.

Küçük, B. (2006). *Adana ve Mersin illerinde domates lekeli solgunluk virüsü (tomato spotted wilt virus, TSWV)nin değişik yöntemlerle saptanması* (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).

Lafrance, R., Valdez-Torres, J. B., Villicaña, C., García-Estrada, R. S., Esparza-Araiza, M. J., & León-Félix, J. (2023). Response Surface Methodology for Optimization of Multiplex-PCR Protocols for Detection of TYLCV, TSWV and Fol Molecular Markers: Analytical Performance Evaluation. *Genes*, 14(2), 337.

Ling, K. S. (2008). Pepino mosaic virus on tomato seed: virus location and mechanical transmission. *Plant Disease*, 92(12), 1701-1705.

Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I. et al. (2017) A new Israeli tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-22 resistance genes. *PLoS One*, 12, e01704.

Maroon-Lango, C. J., Guaragna, M. A., Jordan, R. L., Hammond, J., Bandla, M., & Marquardt, S. K. (2005). Two unique US isolates of Pepino mosaic virus from a limited source of pooled tomato tissue are distinct from a third (European-like) US isolate. *Archives of virology*, 150, 1187-1201.

Martin, J., & Mousserion, C. (2002). Potato varieties which are sensitive to the tomato strain of Pepino mosaic virus (PepMV). *Phytoma. La Défense des Végétaux (France)*.

Menzel, W., Knierim, D., Winter, S., Hamacher, J., & Heupel, M. (2019). First report of Tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in Germany. *New Dis. Rep*, 39(1), 2044-0588.

Minafra, A., & Hadidi, A. (1994). Sensitive detection of grapevine virus A, B, or leafroll-associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. *Journal of virological methods*, 47(1-2), 175-187.

Moreno-Pérez, M. G., Pagán, I., Aragón-Caballero, L., Cáceres, F., Fraile, A., & García-Arenal, F. (2014). Ecological and genetic determinants of Pepino mosaic virus emergence. *Journal of virology*, 88(6), 3359-3368.

Nie, X., Dickison, V., Singh, M., De Koeyer, D., Xu, H., Bai, Y., & Hawkins, G. (2020). Potato tuber necrosis induced by alfalfa mosaic virus depends on potato cultivar rather than on virus strain. *Plant disease*, 104(2), 340-347.

Oraman, M. N. 1968. Sebze İlmi. 256 s., A. Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları: 323, Ders Kitabı No:117, Ankara.

Özdemir, S. (2010). First report of Pepino mosaic virus in Tomato in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 92(4), S107-S107.

Panno, S., Caruso, A. G., & Davino, S. (2019). First report of tomato brown rugose fruit virus on tomato crops in Italy. *Plant Disease*, 103(6), 1443-1443.

Price, J. A., Smith, J., Simmons, A., Fellers, J., & Rush, C. M. (2010). Multiplex real-time RT-PCR for detection of Wheat streak mosaic virus and Triticum mosaic virus. *Journal of virological methods*, 165(2), 198-201.

Roggero, P., Masenga, V., Lenzi, R., Coghe, F., Ena, S., & Winter, S. (2001). First report of Pepino mosaic virus in tomato in Italy. *Plant Pathology*, 50(6).

Roy, A., Fayad, A., Barthe, G., & 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.

Saade, M., Aparicio, F., Sanchez-Navarro, J. A., Herranz, M. C., Myrta, A., Di Terlizzi, B., & Pallas, V. (2000). Simultaneous detection of the three ilarviruses affecting stone fruit trees by nonisotopic molecular hybridization and multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 90(12), 1330-1336.

Salem, N., Mansour, A., Ciuffo, M., Falk, B.W. & Turina, M. (2016) A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Archives of Virology*, 161, 503–50.

Salomone, A., & Roggero, P. (2002). Host range, seed transmission and detection by ELISA and lateral flow of an Italian isolate of Pepino mosaic virus. *Journal of Plant Pathology*, 65-68.

Schmatz, R., Rode, S., Lauterbach, Lesemann D.E. und Dercks, W. (2003): Pepino mosaic virus an Tomaten unter Glas. *Gemüse 3*: 24-26.

Schenk, M. F., Hamelink, R., van der Vlugt, R. A., Vermunt, A. M., Kaarsenmaker, R. C., & Stijger, I. C. (2010). The use of attenuated isolates of Pepino mosaic virus for cross-protection. *European journal of plant pathology*, 127, 249-261.

Sharman, M., Thomas, J. E., & Dietzgen, R. G. (2000). Development of a multiplex immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banana. *Journal of virological methods*, 89(1-2), 75-88.

Skelton A, Buxton-Kirk A, Ward R, Harju V, Frew L, Fowkes A, Long M, Negus A, Forde S, Adams IP, Pufal H, McGreig S, Weekes R, Fox A (2019) First report of Tomato brown rugose fruit virus in tomato in the United Kingdom. doi: <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.040.012>.

Soler, S., Prohens, J., Diez, M. J., & Nuez, F. (2002). Natural occurrence of Pepino mosaic virus in Lycopersicon species in Central and Southern Peru. *Journal of phytopathology*, 150(2), 49-53.

Sombat, S., Reanwarakorn, K., & Ling, K. S. (2018). Developing a multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of Pepper chat fruit viroid and Columnea latent viroid. *Australasian Plant Pathology*, 47, 615-621. Souiri, A., Zemzami, M., Laatiris, H.,

Amzazi, S., & Ennaji, M. M. (2017). First report of Pepino mosaic virus in tomato in Morocco. *New Disease Reports*, 35(10), 10.

Şevik MA (2007). Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV)'nün Samsun ilinde Domates Üretim Alanlarındaki Yayılış Durumunun ve Bazı Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Ondokuzmayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Ana Bilimdalı, Samsun

Şevik, M. (2011). Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV)'nün Tarımsal ürünlerde meydana getirdiği ekonomik kayıplar. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 15(1), 35-42.

Şevik, M. A. (2015). Sebze Üretimini Tehdit Eden Viral Hastalık Etmeni: Domates lekeli solgunluk virüsü (Tomato spotted wilt virus–TSWV). *Fen Bilimleri Enst. Dergisi Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech*, 5(2), 17-23.

Şimşek, D., Moleküler ıslah yöntemleri kullanılarak Tospovirus ve Tobamoviruslere dayanıklı çarlı biber (*Capsicum annum* L.) hat ve çeşitlerinin geliştirilmesi. 2014 Selçuk Tarım Bilimleri Dergisi 1(1), 1-5.

Şimşek, D., Pınar, H., & Mutlu, N. (2015). Moleküler Islah Yöntemleri Kullanılarak Tospovirus ve Tobamoviruslere Dayanıklı Yeni Dolmalık Biber (*Capsicum annum* L.) Hat ve Çeşitlerinin Geliştirilmesi. *Bahçe Kültürleri Araştırma İstasyonu Adına Sahibi*, 1.

Tekinel, N., Dolar, M. S., Sağsöz, S., & Salcan, Y. (1969). Mersin bölgesinde ekonomik bakımdan önemli bazı sebzelerin virüsleri üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 9(1), 37-49.

Tetty, C. K., Yan, Z. Y., ZHAO, M. S., Chao, G. E. N. G., TIAN, Y. P., & LI, X. D. (2022). Tomato mottle mosaic virus: Characterization, resistance gene effectiveness, and quintuplex RT-PCR detection system. *Journal of Integrative Agriculture*, 21(9), 2641-2651.

Tiberini, A., Mangli, A., Taglienti, A., Vučurović, A., Brodarič, J., Ferretti, L., ... & Mehle, N. (2022). Development and Validation of a One-Step Reverse Transcription Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection and Identification of Tomato Mottle Mosaic Virus and Tomato Brown Rugose Fruit Virus. *Plants*, 11(4), 489.

TÜİK, 2022.

Vinayarani, G., Madhusudhan, K. N., Deepak, S. A., Niranjana, S. R., & Prakash, H. S. (2011). Detection of mixed infection of tobamoviruses in tomato and bell pepper by using RT-PCR and duplex RT-PCR. *International Journal of Plant Pathology*, 2(2), 89-95.

Verhoeven, J. T. J., Van der Vlugt, R. A. A., & Roenhorst, J. W. (2003). High similarity between tomato isolates of Pepino mosaic virus suggests a common origin. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 419-425.

Vural, H., Eşiyok, D., Duman, İ. 2000. Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme), Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 440 s., İzmir.

Wang, D., & Bosland, P. W. (2006). The genes of Capsicum. HortScience, 41(5), 1169-1187.

Yan Z, Ma HY, Han SL, Geng C, Tian YP, Li XD (2019) First report of Tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in China. doi: 10.1094/PDIS-05-19-1045-PDN.

Yardımcı N, Çulal-Kılıç H, Urgan G (2014). Three emerging viruses affecting greenhouse tomato crops in West Mediterranean Region of Turkey: Pepino mosaic virus (PepMV), Tomato spotted wilt virus (TSWV) and Tomato yellow leaf curl bigeminivirus (TYLCV). In: 66. International Symposium on Crop Protection. May 20, Gent, Belgium, pp. 180-180.

Yurtmen M, Güldür ME, Yılmaz MA (1998). Tomato spotted wilt virus on Pepper in İçel Province of Turkey. Ninth Conference of the I. SHS Vegetable Virus Working Group Recent Advance in Vegetable Virus Research, 91-92, Italy.

Zhang, S., Griffiths, J. S., Marchand, G., Bernards, M. A., & Wang, A. (2022). Tomato brown rugose fruit virus: An emerging and rapidly spreading plant RNA virus that threatens tomato production worldwide. Molecular Plant Pathology, 23(9), 1262-1277.

Zengin, S. (2016). Moleküler markör yardımlı seleksiyon ile viral (domates sarı yaprak kıvrıcıklık virüsü, domates lekeli solgunluk virüsü), fungal (kök ve kök boğazı çürüklüğü) hastalıklara ve nematoda (meloidogyne incognita) dayanıklı domates hatlarının geliştirilmesi.

8. EKLER

Ek 1.

CTAB solüsyonu bileşenleri;

Kimyasallar	Miktar
Tris-HCL	25 ml / 1 M
EDTA	10 ml / 0,5 M
CTAB	5 gr
NaCl	70 ml / 5 M
Saf su	250 ml 'ye tamamlanır.

Ek 2.

FOSFAT TAMPON ÇÖZELTİ;

Az miktarda asit veya baz eklenerek hazırlanan PH değişimlerini önlemeye yarayan kimyasal içerikli solüsyonlar olarak tanımlanabilir.

Değişik PH değerlerinde Kimyasalların aldığı PH Faktörleri

PH değeri	KH_2PO_4	Na_2HPO_4
6.2	0.800	0.200
6.4	0.715	0.285
6.6	0.614	0.386
6.8	0.500	0.500
7.0	0.386	0.614
7.2	0.285	0.715
7.4	0.200	0.800
7.6	0.137	0.863
7.8	0.090	0.910
8.0	0.059	0.941
8.2	0.038	0.962

Moleküler ağırlık (MA) X Hacim (lt) X Molarite X PH Faktörü

%0,1 Mercaptoethanol ilave edilir.

Ek 3.

ToBRFV, TSWV ve PEpMV analiz işlemleri hakkındaki karar

	T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü	GIDAM KÖRÜ SOFRANA SAĞLIK
Sayı : E-21817801-320.03.05-3571272 Konu : Tomato Brown Rugose Fruit Virus, Tomato Spotted Wilt Virus, Pepino Mozaik Virüsü Analiz İşlemleri		ÇOK İVEDİ 18.12.2020
DAĞITIM YERLERİNE		
Bilindiği üzere Rusya Federasyonu'nun Dünya Ticaret Örgütü'ne yaptığı SPS bildirimi kapsamında bu ülkeye domates ve biberin (meyveleri, fideleri ve tohumları dahil) ihracatında <i>Tomato Brown Rugose Fruit Virus</i> (ToBRFV), <i>Tomato Spotted Wilt Virus</i> (TSWV) ve pepino mozaik virüsü (PepMV) yöntüyle analiz yapılarak bitki sağlık sertifikaları ve re-export bitki sağlık sertifikalarında ek deklarasyon düzenlenmesi uygulaması başlatılmıştır. Anılan etmenlerin, Rusya Federasyonu başta olmak üzere diğer ülkelere domates ve biber ihracatımızda olduğu kadar; konukçu durumundaki ürünlerin ülkemize ithalatında da gittikçe önem arz etmesi ve bundan kaynaklanan analiz işlemlerinin artan yoğunluğu nedeniyle, son dönemde ihracat ve ithalat kontrollerinde aksaklıklar yaşanmaktadır. Özellikle Rusya Federasyonu'na ihracata konu ürünlerin analizlerinde yaşanan yoğunluk için ivedilikle çözüm üretilmesi gerekmektedir. Bakanlığımız ilgili birimlerinin acil koordinasyonu, mesafe kriteri de göz önünde bulundurularak; bölgenizde bulunan, domates-biber üretiminin ve ihracatının yoğun olarak yapıldığı illerden gönderilecek numunelerin öncelikle işleme alınması ve analizlerin ivedilikle sonuçlandırılması büyük önem arz etmektedir. Bu kapsamda, Müdürlüğünüz laboratuvarında söz konusu etmenlerin analiziyle ilgili hazırlıkların tamamlanması, kit ve diğer malzemelerin ivedilikle tedarik edilerek analiz işlemlerinde devamlılığın sağlanması hususunda bilgilerinizi ve gereğini önemle arz/rica ederim.		
Dr. Yunus BAYRAM Genel Müdür V.		
Dağıtım: Gereği: Antalya Ziraî Karantina Müdürlüğüne İzmir Ziraî Karantina Müdürlüğüne İstanbul Ziraî Karantina Müdürlüğüne Mersin Ziraî Karantina Müdürlüğüne Ankara Ziraî Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne		
Bilgi: Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğüne		
Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır. Belge Doğrulama Kodu : LHPUFRLD Belge Doğrulama Adresi: https://www.turkiye.gov.tr/tarim-ve-orman-bakanligi-ebys Eskişehir Yolu 9. Km. Lodumlu Mevkii 06500 Çankaya/ Ankara Tel: (0312) 287 33 60 Faks:		
Bilgi için: Şehriban GÖREN Mühendis Telefon No: (312) 258 74 53		
		

ÖZGEÇMİŞ

Havva Nur CAYAK

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2020-2023	Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma A.B.D, Antalya
Lisans	Ege Üniversitesi
2006-2010	Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İzmir

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Laboratuvar Sorumlusu	Antalya Tarım A.Ş.
2019-Devam Ediyor	Antalya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1- Kabas, A., Fidan, H., Kucukaydin, H., & Atan, H. N. (2022). Screening of wild tomato species and interspecific hybrids for resistance/tolerance to Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV). *Chilean journal of agricultural research*, 82(1), 189-196.