

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**DOMATES KAHVERENGİ BURUŞUK MEYVE VİRÜSÜ'NE (ToBRFV) KARŞI
SOLARİZASYON VE TOPRAĞA DEZENFEKTAN UYGULAMASININ
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hüseyin Utku ŞİMŞİR

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞUBAT 2024

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**DOMATES KAHVERENGİ BURUŞUK MEYVE VİRÜSÜ'NE (ToBRFV) KARŞI
SOLARİZASYON VE TOPRAĞA DEZENFEKTAN UYGULAMASININ
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hüseyin Utku ŞİMŞİR

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞUBAT 2024

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOMATES KAHVERENGİ BURUŞUK MEYVE VİRÜSÜ'NE (ToBRFV) KARŞI
SOLARİZASYON VE TOPRAĞA DEZENFEKTAN UYGULAMASININ
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Hüseyin Utku ŞİMŞİR

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞUBAT 2024

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOMATES KAHVERENGİ BURUŞUK MEYVE VİRÜSÜ'NE (ToBRFV) KARŞI
SOLARİZASYON VE TOPRAĞA DEZENFEKTAN UYGULAMASININ
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Hüseyin Utku ŞİMŞİR
BİTKİ KORUMA
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 15/02/2024 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Hakan FİDAN (Danışman)

Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Doç. Dr. Gökmen KOÇ

ÖZET

DOMATES KAHVERENGİ BURUŞUK MEYVE VİRÜSÜ'NE (ToBRFV) KARŞI SOLARİZASYON VE TOPRAĞA DEZENFEKTAN UYGULAMASININ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Hüseyin Utku ŞİMŞİR

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hakan FİDAN

Şubat 2024; 27 sayfa

ToBRFV (Tomato brown rugose fruit virus), önemli bir viral etmen olup domates üretim alanlarında verim ve kayıplarına neden olmaktadır. Hastalık kaynağı virüs kökenli olmasından dolayı doğrudan bir kimyasal uygulaması ile kontrol altına alınamamaktadır. Bu nedenle hastalığın kontrolünde, yalnızca dayanıklı çeşitlerin kullanılması ve sanitasyon gibi kültürel önlemler alınmaktadır. ToBRFV, domates üretim alanlarındaki topraklarda iki yıldan daha uzun bir süre kalmakta olup enfeksiyon meydana getirmektedir. Bu çalışma ile önceki yıllarda ToBRFV denemesi yapılmış bir domates üretim alanındaki ToBRFV enfeksiyonu, enfeksiyonun etkinliği, ToBRFV'nin virülensliği, enfeksiyonu önlemek amaçlı solarizasyon ve çeşitli dezenfektan denemeleri yapılması amaçlanmıştır. ToBRFV bulunan sera içerisinde, solarizasyon ve dezenfektan uygulaması yapıldıktan sonra, toprağa dikilecek olan domates bitkilerinde oluşan belirtiler gözlemlenecek, moleküler RT-PCR analizleri yapılacak ve sonuçlara göre istatistiksel analizlerle birlikte farklı dezenfektan uygulamalar karşılaştırılarak, hangi yöntemin topraktaki ToBRFV varlığına olan etkinliğinin daha verimli olduğu araştırılacaktır. Bu sayede ToBRFV bulunan domates üretim alanlarında, hastalığın kontrol altına alınması ve verim/kalite kayıplarının önüne geçilmesi amaçlanmıştır.

ANAHTAR KELİMELE: Dezenfektan, RT-PCR, Solarizasyon, ToBRFV, Toprak

JÜRİ: Doç. Dr. Hakan FİDAN (Danışman)

Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Doç. Dr. Gökmen KOÇ

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTIVENESS OF SOLARIZATION AND SOIL DISINFECTANT APPLICATION AGAINST TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS (ToBRFV)

Hüseyin Utku ŞİMŞİR

MSc Thesis in Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hakan FİDAN

February 2024; 27 pages

ToBRFV (Tomato Brown Rugose Fruit Virus) is an important viral agent that causes yield and yield losses in tomato production areas. Since the source of the disease is viral, it cannot be controlled by a direct chemical application. Therefore, only cultural measures such as the use of resistant varieties and sanitation are taken to control the disease. ToBRFV persists in the soils of tomato production areas for more than 2 years and causes infection. The aim of this study was to investigate ToBRFV infection in a tomato production area where ToBRFV trials were conducted in previous years, the effectiveness of infection, virulence of ToBRFV, solarization and various disinfectants to prevent infection. In the greenhouse with ToBRFV, after solarization and disinfectant application, the symptoms of the tomato plants to be planted in the soil will be observed, molecular RT-PCR analysis will be carried out and according to the results, statistical analysis and different disinfectant applications will be compared and which method is more effective against the presence of ToBRFV in the soil will be investigated. In this way, it is aimed to control the disease and prevent yield/quality losses in tomato production areas with ToBRFV.

KEYWORDS: Disinfectant, RT-PCR, Soil, Solarization, ToBRFV

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Hakan FİDAN

Assoc. Prof. Dr. Özer ÇALIŞ

Assoc. Prof. Dr. Gökmen KOÇ

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın yürütülmesinde deneyimi ve yol göstericiliğiyle bana her konuda destek olan değerli hocam Doç. Dr. Hakan FİDAN'a çok teşekkür ediyorum.

Değerli katkı ve önerileriyle tezime son şeklini verilmesini sağlayan, tez savunma jürimde yer alan Doç. Dr. Özer ÇALIŞ ve Doç. Dr. Gökmen KOÇ'a ve istatistiksel analizlerde tecrübelerini benimle paylaştığı için Doç. Dr. Engin YOL'a teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olan değerli ekip arkadaşlarım Pelin SARIKAYA ve Damla ULUSOY'a, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Kübra YILDIZ, Nur CAYAK ve Sefanur ÇELİK'e tezime katkılarından dolayı çok teşekkür ediyorum.

Her zaman yanımda olan aileme en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
AKADEMİK BEYAN	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
3. MATERYAL VE METOT	8
3.1. Materyal.....	8
3.1.1. Araştırmanın yürütüldüğü yer ve kullanılan materyaller.....	8
3.2. Metot	8
3.2.1. Toprak örneklerinden RNA izolasyonu.....	8
3.2.2. RT-PCR çalışmaları.....	10
3.2.3. Uygulama Deseni.....	10
3.2.4. Solarizasyon uygulaması	12
3.2.5. Dezenfektan uygulamaları	13
3.2.6. Bitkilerin deneme desenine göre dikimi	13
3.2.7. ToBRFV simptomlarının gözlenmesi	14
3.2.8. Domates bitkilerinden Total nükleik asit ekstraksiyonu	14
3.2.9. PCR çalışmaları	15
3.2.10. İstatistiksel değerlendirmeler.....	15
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	16
4.1. Solarizasyon ve Deneme Serası Organizasyonu	16
4.2. Nükleik Asit Ekstraksiyonları Bulguları	16
4.3. RT-PCR Bulguları	17
4.4. İstatistiksel bulgular	19
6. SONUÇLAR	22
7. KAYNAKLAR	23
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Domates Kahverengi Buruşuk Meyve Virüsü’ne (ToBRFV) Karşı Solarizasyon ve Toprağa Dezenfektan Uygulamasının Etkinliğinin Araştırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

15/02/2024

Hüseyin Utku ŞİMŞİR



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C : Santigrat Derece

% : Yüzde

µl : Mikrolitre

ml : Mililitre

cm: Santimetre

mm: Milimetre

Kısaltmalar

AÜ :Akdeniz Üniversitesi

BAP :Bilimsel Araştırma Projeleri

Bp :Baz Çifti

CMV :Cucumber mosaic virus

CGMMV :Cucumber green mottle mosaic virus

CP :Coat protein (Kılıf proteini)

CTAB :Cetyltrimethylammonium Bromide

ddH₂O :Çift Distile Su

DNA :Deoksiribonükleik Asit

dNTP :Deoxyribonucleotide Triphosphate

EDTA :Etilendiamin Tetraasetikasit

EPPO :Avrupa ve Akdeniz Bitki Sağlığını Koruma Örgütü

FAO :Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü

g :Force (g kuvveti)

HCl :Hidroklorik Asit

HPLC :High Performance Liquid Chromatography

Kb :Kilobaz

kDA	:Kilodalton
MP	:Movement protein (Hareket proteini)
NCBI	:National Center for Biotechnology Information
ORF	:Açık Okuma Bölgeleri
PepMV	:Pepino mosaic virus
pH	:Power of Hydrogen
PSTVd	:Potato spindle tuber viroid
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	:Ribonükleik Asit
RT-PCR	:Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rpm	:Revolutions per minute (Dakikada dönme sayısı)
TMV	:Tobacco mosaic virus
ToCV	:Tomato chlorosis virus
TICV	:Tomato infectious chlorosis virus
ToMV	:Tomato mosaic virus
ToBRFV	:Tomato brown rugose fruit virus
TSWV	:Tomato spotted wilt virus
TÜİK	:Türkiye İstatistik Kurumu
TYLCV	:Tomato yellow leaf curl virus
UV	:Ultra Viole
V	:Volt
vd.	:ve diğerleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. ToBRFV'nin domates bitkisindeki simptomları ve genom yapısı	2
Şekil 3.1. Toprak örneklerinden yapılan RNA izolasyonu işlemleri	10
Şekil 3.2. Uygulama serasında solarizasyon işlemi yapılan parseller	13
Şekil 3.3. Uygulama serasındaki dikim işlemleri	14
Şekil 4.1. Deneme serasında yetiştirilen domates bitkileri	16
Şekil 4.2. Toprak örneklerinden elde edilen RNA izolasyonu görüntüleri.....	16
Şekil 4.3. Domates örnekleri total nükleik asit ekstraksiyonundan elde edilen bant görüntüleri	17
Şekil 4.4. Toprak örneklerinin RT- PCR sonuçları.....	17
Şekil 4.5. Kontrol gruplarından alınan domates örneklerinin RT- PCR sonuçları	18
Şekil 4.6. Toprak örneklerinin ToBRFV ile enfekteli olan parsellerin şeması.....	20
Şekil 4.7. Duncan varyans analizi ve Tukey gruplama analizi sonuç tablosu	21

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1. Denemede kullanılan dezenfektan içerikleri ve kullanım dozları	11
Çizelge 3. 2. Tesadüf blokları deneme deseni şeması	12



1. GİRİŞ

Solanaceae familyasının bir üyesi olan domates (*Solanum lycopersicum* L.), dünya çapında en yaygın yetiştirilen sebzelerden biridir. Günümüzde dünya çapında 180 milyon ton domates yetiştirilmekte ve üretim her yıl artmaktadır (FAO 2021). Domates, açık tarla, tünel ve sera gibi çeşitli iklim koşullarına yetiştirilebilmektedir. Geniş bir iklim kuşağına sahip olan Türkiye, önemli domates üreticileri arasında yer almaktadır (FAO 2021). *Solanum lycopersicum*, birçok ülkede ticari olarak yetiştirilen ve tüketilen önemli bir tek yıllık sebze türüdür. Ülke genelinde 4 milyon tonu seralarda olmak üzere domates üretimi ile Türkiye, dünyada dördüncü sırada yer almaktadır (FAO 2021). Türkiye'nin Akdeniz Bölgesi'nde yer alan Antalya ilinde her yıl sofralık tüketim için hem seralarda hem de tarlalarda bir milyon ton domates yetiştirilmektedir (TUİK 2022).

Yaklaşık 200 bitki patojeni domates bitkilerini enfekte etmektedir. Virüsler, funguslar, bakteriler ve fitoplazmalar, domates bitkilerini enfekte ederek üretim üzerinde önemli bir etkiye neden olabilir (Panno vd. 2021). Özellikle virüs enfeksiyonları, düşük ürün verimine, düşük besin içeriğine, kısa raf ömrüne ve kötü meyve kalitesine yol açarak ürünlerin pazarlanamaz hale gelmesine sebep olabilir (Hanson vd. 2016). Domates bitkilerinde 130'dan fazla virüs ve virüs benzeri patojen rapor edilmiştir (Hanssen ve ark. 2010). Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV), Domates bulaşıcı kloroz virüsü (TICV), Hıyar mozaik virüsü (CMV), Domates sarı yaprak kıvrıcılık virüsü (TYLCV), Pepino mozaik virüsü (PepMV) ve Domates kloroz virüsü (ToCV) gibi domatesi enfekte eden birçok virüs etmenine sıklıkla rastlanmaktadır (Roselló vd. 1996; Navas-Castillo vd. 2011; Duffus vd. 1996; Rendina vd. 2019; Van der Vlugt vd. 2011; Wintermantel ve Wisler 2006). Son zamanlarda, domates üretiminde ciddi kısıtlamalara neden olan yeni virüsler rapor edilmiştir, bunlar arasında torradovirüsler ve Domates kahverengi buruşuk meyve virüsü (ToBRFV) yer almaktadır (Van der Vlugt ve ark. 2015; Oladokun ve ark. 2019).

Domates kahverengi buruşuk meyve virüsü (ToBRFV), Tütün mozaik virüsü (TMV) ve Domates mozaik virüsü (ToMV) gibi bir tobamovirüstür. Tobamovirüsler pozitif polariteye sahip tek sarmallı bir RNA molekülüne sahiptir. Domatesleri tobamovirüslere karşı dayanıklı hale getiren Tm-2² genini kırabilir; TMV ve ToMV'ye dayanıklı çeşitleri, bu yeni virüse karşı savunmasız hale getirebilir. Tm-2²'ye dayanıklı çeşitlerde meyve rengi değişene kadar semptom vermezken, Tm-2²'ye dayanıklı olmayan çeşitlerde çoğunlukla kahverengi lekeler ortaya çıkar. Bu belirtiler çeşide bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (Fidan 2020).

Bitki hücresi öldüğünde, toprakta veya bitki artıklarında enfektivitesini sürdürebilen bazı stabilitesi yüksek virüs etmenleri bulunmaktadır. Bunlar genellikle Tobamovirüs cinsinde içerisinde yer almaktadır. 2014'te Domates kahverengi buruşukluk meyve virüsü de bu gruba dahil olmuştur. Bu virüs etmenleri, temas yoluyla ve özellikle üretim esnasında yapılan kültürel işlemler esnasında taşınmaktadır. Virüsün hücre içerisine girmesi için yara dokuları oluşması gerekmektedir. Bu kültürel işlemler sırasında epidermal tüyler kırılır, bulaşık bitki özsuğu işlemi gerçekleştiren kişinin eline, kullandığı alet ve ekipmana ve hatta kıyafetlerine bulaşmaktadır. Bitkide meydana gelen mikro yaralar virüslerin bitki hücresine giriş yapmasına olanak sağlayarak yayılmaya neden olmaktadır. Tobamovirüslerin aynı zamanda tohumla taşınmaları ciddi problemlere yol açabilmektedir (Fidan vd., 2024)



Şekil 1.1. ToBRFV'nin domates bitkisindeki belirtileri ve genom yapısı

ToBRFV, son zamanlarda tanımlanmış ve domates bitkileri için ciddi ekonomik kayıplara neden olan bir tehdit olarak öne çıkmaktadır. ToBRFV'nin belirtileri hem yapraklarda hem de meyvelerde ortaya çıkmaktadır. Yapraklarda kıvrılma, mozaik desenler ve renk değişikliği gözlemlenirken, meyvelerde kahverengi, pürüzlü ve rugoz (buruşuk) lekeler gözlemlenmektedir. Virüs son derece bulaşıcıdır ve doğrudan temas, kontamine aletler ve tohumlar aracılığıyla yayılmaktadır. Bu virüsün etkisi, domates veriminde hem miktar hem de kalite açısından bir azalmaya neden olmaktadır. Enfekte meyveler, istenmeyen görünümleri sebebiyle genellikle pazarlanamaz hale gelmektedir. ToBRFV'nin dünya genelinde çeşitli bölgelerde görülmesi, coğrafi yayılmasını önlemeye yönelik çabaları teşvik etmektedir. Yönetim stratejileri arasında sertifikalı tohum kullanımı, uygun sanitasyon uygulamaları ve entegre zararlı yönetimi tekniklerinin uygulanması bulunmaktadır (Fidan vd. 2019)

ToBRFV (Tomato brown rugose fruit virus), 2016 yılından beri EPPO listesinde yer alan önemli bir viral etmen olup domates üretim alanlarında verim ve kayıplarına neden olmaktadır (Salem vd. 2016). Türkiye'de ise 2019 yılında domates ekim alanlarında görülmeye başlamıştır ve önemli verim kayıplarına neden olmaya devam etmektedir (Fidan vd. 2019). Hastalık kaynağı virüs kökenli olmasından dolayı doğrudan bir kimyasal uygulaması ile kontrol altına alınamamaktadır. Bu nedenle hastalığın kontrolünde, yalnızca dayanıklı çeşitlerin kullanılması ve sanitasyon gibi kültürel önlemler alınmaktadır. ToBRFV, domates üretim alanlarındaki topraklarda 10 yıldan uzun bir süre kalmakta olup enfeksiyon meydana getirmektedir (Batuman vd. 2020). Bu nedenle hastalığın görüldüğü alanlarda, dayanıklı çeşitler kullanılmadığı alanlarda hastalık uzun yıllar boyunca domates üretimini kısıtlamaktadır. Topraktaki inokulumun, enfeksiyon yeteneğinin engellenmesi amacıyla solarizasyon ve dezenfektan uygulamaları gibi farklı yöntemler öne sürülmüştür. Ancak bunların etkinliğine dair çalışmalar oldukça

kısıtlıdır. Bu nedenle çalışma kapsamında solarizasyon yönteminin ve dört farklı dezenfektanın, ToBRFV enfeksiyon etkinliği üzerine etkisi incelenmiştir. ToBRFV bulunan sera içerisinde, solarizasyon ve dezenfektan uygulaması yapıldıktan sonra, toprağa dikilen domates bitkilerinde oluşan belirtiler gözlemlenmiştir. Hastalık skorlaması ile farklı uygulamaların virüs üzerine etkisi incelenmiştir. Ayrıca hastalığın latent olarak, uygulama sonrasında bitki dokusunda yayılımı RT-PCR metodu ile kontrol edilmiştir. Bu sayede farklı dezenfektan uygulamalarının ve solarizasyon uygulamasının, hastalığın belirtilerine olan etkisinin araştırılmasına ek olarak aynı zamanda, ToBRFV'nin bitkide yayılımına etkisi araştırılmıştır. Farklı uygulamalar karşılaştırılarak, hangi yöntemin topraktaki ToBRFV varlığına olan etkinliğinin daha verimli olduğu araştırılmıştır. Bu sayede ToBRFV bulunan domates üretim alanlarında, hastalığın kontrol altına alınması ve verim/kalite kayıplarının önüne geçilmesi amacı ile çözüm önerileri ortaya koyulmuştur.

Tobamovirüsler, dünya çapında sebze ürünlerine ciddi zararlar veren, oldukça stabil, mekanik olarak bulaşan tohum kaynaklı virüslerdir. Tobamovirüsler, enfekte olmuş büyüme döngülerinden kalan bitki kalıntılarındaki aylarca toprakta korunur ve yaşayabilmektedir (Reingold vd. 2016, Dombrovsky vd. 2017). Kil materyaline adsorbe edilen virüs partikülleri bir yıldan uzun süre bulaşıcılığını sürdürebilmektedir (Gülser vd. 2008). Kirlenmiş toprak, birbirini takip eden büyüme döngüleri sırasında viral yayılımının birincil kaynağını oluşturmaktadır (Lister 2022). Özellikle, tobamovirüslerin toprak aracılı hastalık yayılımı genellikle dikim aşamasında virüslerin mekanik olarak taşınması, yaralı kökler ve kontamine toprağın fidelere yapışması yoluyla gerçekleşmektedir. Dikkatli bir şekilde sterilize edilmiş dikim prosedürlerinin uygulanması ve kontamine toprakla temas eden kökleri izole etmek için ara ortamların ya da toleranslı anaçların kullanılması tobamovirüs yayılımını azaltmıştır (Elleouze vd. 2022). Bununla birlikte, sulama suyu hala kontamine topraktan veya enfekte anaçlardan hastalığın yayılmasına aracılık edebilmektedir (Smith vd. 2019, Darzi vd. 2020). En az tehlikeli işlem olan toprağın buharda pişirilmesi, özellikle de tobamovirüsleri etkisiz hale getirmek için uygun zemin derinliklerinde yüksek sıcaklıklara ulaşmak için ekzotermik kimyasalların eklenmesi gerektiğinde, bazen kullanımı çok zahmetli olmaktadır (Luvisi vd. 2015). Bu nedenle, meyve kalitesini düşüren ve dünya çapında paydaşlara büyük zararlar veren ToBRFV'nin topraktaki viral inokulumunu azaltmada dezenfektan etkinliğini test etmek için bu tez çalışması tasarlanmıştır.

Bu tez çalışmasında domates yetiştiriciliğinin yapıldığı üretim alanında ToBRFV'li bitkiler inokulum kaynağı olarak bulunduğu sera içerisindeki enfeksiyon varlığı belirlenerek hasat sonunda oluşan ve inokulum kaynağı olan enfekteli toprakların moleküler olarak analizi yapılması, ToBRFV'nin toprakta kalma stabilitesi değerlendirilerek farklı dezenfeksiyon uygulamalarıyla virüsten arı toprak kazanımı sağlanmasına katkıda bulunulması amaçlanmıştır. Ülkemizde benzer bir çalışma olmadığı literatür taramalarında ortaya koyulmuştur. Bu proje sayesinde ülke tarımında çok önemli bir yere sahip olan ToBRFV için toprak kontaminasyonu kaynaklı enfeksiyonların çeşitli dezenfektan kullanımlarıyla toprak dezenfeksiyonun en etkili metodu tespit edilmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

Tobamovirus'ler, tipik bir çubuk şekilli parçacık morfolojisine sahip dört ORF (Açık okuma çerçevesi)'yi kodlayan 6.4 kb'lik tek sarmallı +ssRNA genomunu kapsar. ORF1 ve ORF2, replikaz kompleksini oluşturan yapısal olmayan proteinleri bir stop kodonu ile ayırmaktadır. Yapısal olmayan hareket proteini veya hareket proteini (MP), büyük subgenomik RNA üzerinde ORF3 tarafından kodlanır. Küçük subgenomik RNA üzerindeki ORF4, 17-18 kDa'lık bir kılıf proteini (CP) kodlamaktadır. Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), Tobamovirüs cinsinde yer almaktadır. Domates (*Solanum lycopersicum*) ve biber (*Capsicum sp.*) bitkileri ToBRFV'nin ana konukçularıdır. Bir grup araştırmacı patates (*Solanum tuberosum* cv *Nicola*) ve patlıcan (*Solanum melongena* cv *Classic*, cv 206) bitkileri üzerinde mekanik inokülasyon yöntemiyle yaptığı çalışmalar sonucunda bu bitkilerin enfekte olmadığını belirlemişlerdir (Cambrón-Crisantos vd. 2018).

Tütün mozaik virüsü (TMV) ve Domates mozaik virüsü (ToMV), Solanaceae ailesindeki çeşitli bitki türlerinde hastalıklara neden olan virüslerdir. Bu virüsler sadece bilinen en eski virüsler olmanın ötesinde, aynı zamanda bu familyaya ait ürünlerin üretimini azaltma potansiyeline sahiptirler (Smith ve Dombrovsky 2019). Viral hastalıkların yönetimi için önemli bir strateji, Solanaceae bitkilerinde bulunan hastalık dirençli genlerin kullanılmasıdır; bu genler, viral çoğalmayı etkili bir şekilde sınırlamaktadır. Ancak virüs, mutasyona uğrarsa ve artık konukçu bağışıklık reseptörleri tarafından tanınamayacak şekilde değişirse, bu direncin etkinliği azalabilmekte ve konak savunma mekanizmalarını aşabilmektedir (Xu vd. 2017). Dünya genelinde ticari domates tarlalarında yaygın olarak görülen ve Tobamovirusler sınıfına ait olan başka bir tehdit, Domates kahverengi buruşuk meyve virüsü (ToBRFV)'dür (Salem vd. 2016). Domates gözlemlenen yaprak belirtileri arasında kloroz, mozaik desenler, beneklenme, zaman zaman yaprak daralması, çanak yaprakları ve sapçıklarda nekrotik lekeler bulunmaktadır (Cambrón-Crisantos vd. 2018; EPPO 2019; Fidan vd. 2019). Ticari çeşitlerde tipik meyve belirtileri, sarı alanların, pürüzlülüğün -genellikle rugoz olarak tanımlanan- ve nekrotik kahverengi alanların gelişimi şeklinde ortaya çıkar (Luria vd. 2017; Cambrón-Crisantos vd. 2018; Fidan vd. 2019). ToBRFV, bitki verimini önemli ölçüde azaltmakla birlikte domates meyvelerinin estetik yapısını bozmaktadır. Özellikle domatestede etkili olan bu viral hastalık verim ve ekonomik anlamda domates üretiminde büyük bir tehdit oluşturmaktadır. ToBRFV belirtileri arasında meyve dokusunda kahverengi lekeler ve kabarcıklar belirtiler gözle görülür haldedir. Bu ve benzeri belirtiler meyve kalitesini ve verimi etkilemektedir (Luria vd. 2017).

ToBRFV için genomik analizlerin yapıldığı bir çalışmada, Tobamovirus cinsindeki diğer virüsler gibi, tipik bir izolatın yaklaşık 6.4 kb uzunlukta bir genomu olduğunu ve izolatların genetik olarak birbiriyle yakından bağlantılı olduğunu göstermiştir. Bu, enfekte olmuş bölgelerden sekanslanan izolatların aynı ToBRFV soyundan geldiğini göstermektedir. Bu amaçla Antalya'da domates ve biberde bulunan ToBRFV izolatlarının tüm genomları çıkarılmıştır. NCBI'nin veritabanına göre MT107885 TBRFV-Ant-Tom (6386 nükleotit) ve MT118666 TBRFV-Ant-Pep (6373 nükleotit) biber izolatı. Dayanıklılığın kırılmasına neden olan genomik dizilim, örneğin ToMMV ve TMV veya ToMV arasında %9-15 oranında farklılık gösterebileceğini göstermiştir. Bu, Tobamovirus RNA genomunun değişkenliğinden kaynaklanabilir. Domingo ve Holland, 1997 yılında Bununla birlikte, filogenik analiz, ToBRFV'nin

genomik sekansının ToMV veya TMV'den %18 oranında farklı olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, ToBRFV'nin ToMV ve TMV'nin ortak atalarından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir (Maayan vd., 2018). Bu virüs hastalığı, Tobamovirus üyesi ToBRFV'yi diğer Tobamovirusler'den ayırt edecek tanılama kitlerinin (DAS-ELISA vb.) geliştirilmesinde gecikmeler ya da bu tanılama kitlerinin spesifikliğı ve etkinliğinde sorunlar nedeniyle hızla yayılmıştır.

Mekanik yollarla yaprak ve bitki dokuları aracılığıyla yayılım göstermektedir. Bu viral hastalık aynı zamanda tohum yoluyla da yayılım gösterdiği için, tohumdan üretilen bitkilerde de görülme olasılığı yüksektir. Sıcak ve kuru iklim koşullarında bulunan bitkilerde yayılma olasılığı daha da kolay hale gelmektedir. Yapılan çalışmada Petunya (*Petunia hybrida*) bitkisinde enfekte görülmesine karşın belirgin bir semptom görülmemiştir. *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa* ve *N. sylvestris* gibi tütün türlerine inoküle edilen ToBRFV 7-14 gün aralığında yaprak çökmesi gibi belirtiler göstermektedir. ToBRFV'nin rezervuar kaynağı olarak *Solanum nigrum* ve *Chenopodium murale* yabancı ot türleri tanımlanmıştır.

ToBRFV hastalığının mücadelesinde, enfekte olan bitkilerin izolasyonu, hastalıklı bitkilerin imhası ve hastalığa dayanıklı bitkilerin kullanılması başlıca önlemlerdir. Tm-1, Tm-2 ve alleli Tm-2² genleri, Tütün Mozaik Virüsü'ne (TMV) karşı dayanıklılık kontrolünü sağlamaktadır. Ancak, sadece Tm-2 ve Tm-2², farklı alanlar ve protein yapı gereksinimleri nedeniyle, domateslerde dayanıklılık oluşturur, çünkü her dayanıklılık için farklı alanlar hareket proteininde (Movement Protein) gerekmektedir (Meshi vd. 1989). Tm-2² direnci, bitkilerde virüs hücreden hücreye hareketini engellemektedir. Örneğin, Domates mozaik virüsü (ToMV), ToMV-2²'nin, Tm-2² direncini aşmak için virüsün 30-kDa hareketproteinin karboksiterminal bölgesinde iki amino asit değişimini baskılaması gerekmektedir (De Ronde vd. 2014). ToMV'nin hareket proteini alanları, Tm-2 veya Tm-2² direncini aşmak için gereken ilgili mutasyonların etkileşime girdiğı veya birbirine yakın olduğı bölgelerdir. Bu nedenle, iki pozisyonel olarak farklılaşan mutasyon setleri, iki R proteininin ve bir hareket proteini içeren kompleksin arasındaki iki yüksek benzer etkileşimi etkileyebilmektedir. İki alanın yakınlığı veya etkileşimi, virulent ToBRFV'nin hem Tm-2 hem de Tm-2² direncini nasıl aşabildiğini açıklayabilmektedir (Lanfermeijer vd. 2005). Tohumda da bulunan bu viral hastalığa karşı iyi şekilde işlenmesi ve hastalığın belirlenmesi için testlenmesi enfeksiyon olasılığını düşürmektedir.

Tarım ve Orman Bakanlığı Zirai Karantina Müdürlüğü, 2019 yılında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Moleküler Viroloji Laboratuvarlarında ToBRFV'yi diğer Tobamoviruslerden ayırt etmek için RT-PCR ve gerçek zamanlı RT-PCR primer ve problemleri geliştirdi (Fidan 2019). Bu tanılama kitleri teşhis çalışmalarında hala başarıyla kullanılmaktadır.

ToBRFV'nin domates üretim bölgelerinde görülme durumu, ABD'de (California ve Florida), Çin'de, İran'da, İsrail'de, Ürdün'de, Suudi Arabistan'da, Suriye'de, Türkiye'de, Birleşik Krallık'ta ve İtalya, Almanya, Yunanistan, Hollanda, Belçika, Polonya, Avusturya ve Çek Cumhuriyeti gibi birçok AB ülkesinde doğrulanmıştır. Virüsün yayılması hızlanmış ve bu da büyük bir ekonomik endişeyi beraberinde getirmiştir, bu da sonuç olarak AB'de fitosaniter düzenlemelere yol açmıştır (Eichmeier ve ark. 2023).

ToBRFV mekanik yollarla bulaşan bir hastalıktır. Toprağın dezenfektasyonu bu

yüzden önemli bir uygulamadır. Toprak dezenfeksiyonu ve hijyenik koşullar sağlandıktan sonra ekilen bitkiler ve tohumlar bu viral hastalığın yayılmasında önemli bir mücadeledir. ToBRFV toprakta bitkisel atıklarla uzun süre yaşamını sürdürebilmektedir ve bir yıldan uzun bir süre toprağa yapışabilmektedirler. Enfekte bir büyüme döngüsünü takiben toprakta düşük bir yüzde oranında enfeksiyon odağı oluşur, bu da birkaç kontamine bölgenin dezenfeksiyon çalışmalarını büyük ölçekli ürün üretimleri için kesin sonuçlar elde edilememesine neden olur. Bu viral hastalığın yayılmasına önlem olarak kimyasal yardımıyla toprak dezenfektasyonu ve toprak solarizasyonu yapılması önerilmektedir.

ToBRFV mekanik yollarla bulaşan bir hastalıktır. Toprağın dezenfektasyonu bu yüzden önemli bir uygulamadır. Toprak dezenfeksiyonu ve hijyenik koşullar sağlandıktan sonra dikilen bitkiler ve tohumlar bu viral hastalığın yayılmasında önemli bir mücadele yöntemidir. ToBRFV toprakta bitkisel atıklarla uzun süre yaşamını sürdürebilmektedir. Toprak, ToBRFV ile enfekte olmuş domates bitkilerinin önceki 30-50 günlük büyüme döngüsünden kök artıkları içerdiğinde yaklaşık %3 oranında toprak aracılı enfeksiyon göstermektedir.

Tohum kaynaklı bazı bakteriyel etmenlere ve ToMV'ye karşı tohumlar üzerinde farklı dezenfektanlar test edilmiştir. Hidroklorik asit, asetik asit, laktik asit ve karbonat gibi dezenfektanlar kullanılmıştır. Kirlilik oranı yüksek tohumlar için hipoklorit kullanımı tavsiye edilmiştir (Siviero 1991). Sodyum hipoklorit etkili bir dezenfektan olmasına rağmen; yüzeyler ve aletler üzerindeki aşındırıcı etkisi ve verimliliğin azalması gibi toksik özellikleri, alternatif dezenfeksiyon çözümlerinin aranmasına yol açmıştır.

Güçlü bir oksidan olan Ozon, tüm canlı organik maddelerle reaksiyona girebilmektedir. Ozon aynı zamanda içme suyu endüstrisi ve evsel atık suların dezenfekte edilmesinde de kullanılmaktadır. Ozon uygulamasından 75 dakika sonra CGMMV'nin elimine edildiği rapor edilmiştir (Runia, 1995). Ancak ozon difüzyonu, dezenfeksiyon sistemlerinin en pahalı yöntemi olduğundan yaygın olarak kullanılmamaktadır.

Li ve ark. (2015), yaptıkları bir çalışmada toplam 16 dezenfektanı, Pepino mozaik virüsüne (PepMV), Patates tüber viroidine (PSTVd), Domates mozaik virüsüne (ToMV) ve Tütün mozaik virüsüne (TMV) karşı değerlendirilmiştir. Her dezenfektanın patojen enfektivitesini etkisiz hale getirmedeki etkinliği, en az üç bağımsız deneye dayanan paralel deneylerle değerlendirilmiş; Sera bitkileri için, domates bitkilerinde yaygın virüs ve virüsleri önlemek için üç yaygın virüse ve bir viroide karşı etkili %2 Virkon S, %10 Clorox çamaşır suyu ve %20 yağsız süt tozu dahil olmak üzere çeşitli dezenfektanlar önermişlerdir. Çalışmalarda dört dezenfektanın, iki farklı tobamovirüse (ToBRFV ve CGGMV) karşı geniş spektrumlu aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Bu dezenfektanlar, %0,5 Laktoferrin, %2 Viroid ve %10 Clorox, her iki Tobamovirüse karşı da %90-100 etkili olduğu tespit edilmiştir (Chanda ve ark. 2021).

Klein ve arkadaşları (2023) yaptığı çalışmada ToBRFV enfekte domates bitkilerinin önceki 90-120 günlük bir büyüme döngüsüne ve ToBRFV inokulumuna sahip olacak şekilde katı koşullar tasarlamışlardır ayrıca fidan köklerini kısaltarak fidanların ToBRFV enfeksiyonuna daha duyarlı hale gelmesini sağlamışlardır. Bu sıkı koşullar, dört yenilikçi kök kaplama teknolojisinin toprak aracılı ToBRFV enfeksiyonunu azaltmadaki etkinliğini sınamak ve herhangi bir fitotoksik etkiden kaçınmak için kullanmışlardır. Bu dört farklı kök kaplama içerikleri metilselüloz (MC), polivinil alkol (PVA), silika

Pickering emülsiyonu ve süper emici polimer (SAP) temelli formülasyonları şeklindedir. Klorlu trisodyum fosfat (Cl-TSP) eklenmiş formülasyonlar, sırasıyla %0, %4.3, %5.5 ve %0 oranlarında toprak aracılı ToBRFV enfeksiyonu bulmuşlardır. Bu formülasyonlar, negatif kontrol bitkilerinin (ToBRFV inokülasyon koşulları altında yetiştirdikleri) büyüme parametreleri üzerinde olumsuz bir etkiye rastlamamışlardır. Aviv ve ark. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada Tobamovirüs familyasına dahil olan Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) ve Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) ‘ün toprakta etkinliklerinin değerlendirilmesi yapılmıştır. ToBRFV ve CGMMV izolatları toprağa verilmiştir. Daha sonra aynı yerlere klor bazlı dezenfektanların etkinliğini ölçmek için toprağa ilave edilmiştir. Bu uygulamaların yapıldığı bölgelere fidelerin kökleri denk gelecek şekilde dikimleri yapılmıştır. Dikimi yapılan fideler ELİSA yöntemi ile testlenerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre fitotoksiste yaratmayan klor bazlı dezenfektanlar arasında CGMMV için en etkili olanı Taharan, ToBRFV için ise %3-Cl-TSP (klorlanmış TSP) olarak belirlenmiştir. Bu çalışmalarda gördüğümüz gibi topraktan kaynaklı enfeksiyonun yayılmasının engellenmesi adına önlem olarak kimyasal yardımıyla toprak dezenfektasyonu ve toprak solarizasyonu yapılması önerilmektedir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmanın yürütüldüğü yer ve kullanılan materyaller

Bu tez çalışması, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji laboratuvarı ve Akdeniz Üniversitesi'ne ait üretim ve uygulama seralarında yürütülmüştür. Denemenin yapıldığı bu sera, 2022 yılında FYL-2021-5683 kodlu BAP projesinin yürütüldüğü, ToBRFV enfeksiyonunun test bitkilerine bulaştırıldığı sera olmakla birlikte sera içerisinde ToBRFV enfeksiyonu pozitif olan bitkilerin köklerinin toprakta inokulum olarak bırakılarak proje sonlandırılmıştır. Bu tez kapsamında ToBRFV ile enfekteli domates bitkilerinin yetiştirildiği toprakların bulunduğu sera içerisinde, deneme desenine göre dikimi yapılan hassas domates fideleri kullanılmıştır.

Toprak numunelerinden yapılan RNA izolasyonunda RNeasy PowerSoil Total RNA Kit (Qiagen) kullanılmıştır. Dikimi yapılan fidelerden alınan yaprak örnekleri için tampon çözeltiler CTAB, β -Mercaptoethanol içeren ekstraksiyon çözeltisi, kloroform, 2-propanol, etanol) eppendorf tüpleri kullanılmıştır. Ayrıca, Beckman Allegra 30R marka santrifüj, Eppendorf marka thermomixer, -22°C ye kadar soğutabilen dondurucu kullanılmıştır. Elde edilen RNA'ların virüs analizlerinde Xpert One-Step RT-PCR Kit (Grisp) kullanılmıştır. DNA analizi için Mastermix (Grisp) kullanılmıştır.

ToBRFV analizleri için virüse spesifik primer çifti, Tm² analizi için SCAR marker dizilimi, PCR strip tüpleri, mikro pipetler ve steril pipet uçları, HPLC su, klasik RT-PCR testlemeleri için Biorad T100 termal cycler cihazı kullanılmıştır. Agaroz jel çalışmalarında Sigma marka agarose, 1X TAE, Grisp marka DNA stain boya ve Thermo scientific marka yatay jel elektroforezi cihazı kullanılmıştır. Jel görüntüleme çalışmalarında ise Syngene InGenius Transillumilator cihazı kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Toprak örneklerinden RNA izolasyonu

Çalışmanın yürütüldüğü deneme serası daha önceki dönemde ToBRFV ile enfekteli domates bitkilerinin tüm yetiştirme dönemlerini içeren bir çalışmada kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında ToBRFV'nin enfeksiyonunu belirlemek üzere aynı toprak kullanılarak tez çalışması yürütülmüştür. Topraktaki ToBRFV enfeksiyonunu belirlemek amacıyla ilk olarak farklı parsellerden toprak numuneleri örnek poşetlerine alınarak etiketlenmiştir. Bu aşamada RNeasy PowerSoil Total RNA Kit (50 örnek) ile ToBRFV ile enfekteli olup dezenfektan uygulaması yapılmış olan topraktan örnekler alınıp kitin protokolüne göre aşağıdaki protokole göre genetik materyal izolasyonu yapılmıştır.

1. 15 ml PowerBead Tüpüne 2 g'a kadar toprak örneği eklenmiştir.

2. 2,5 ml PowerBead Solüsyonu, 0,25 ml SR1 Solüsyonu ve 0,8 ml IRS Solüsyonu eklenmiştir.
3. 3,5 ml fenol/kloroform/izoamil alkol (pH 6,5-8,0) eklenmiş ve iki fazlı tabaka kaybolana kadar karıştırmak için 15 dakika maksimum hızda PowerBead Tüpünü vortekslenmiştir.
4. PowerBead Tüpü 2500 x g'de 10 dakika santrifüjlenmiştir.
5. Üst sulu fazı (interfaz ve alt fenol katmanından temas ettirmeden) temiz bir 15 ml Toplama Tüpüne aktarılmıştır.
6. Sulu faza 1,5 ml SR3 Çözeltisi eklenmiş, karıştırmak için vortekslenmiştir. +4°C'de 10 dakika inkübe edin ve ardından oda sıcaklığında 10 dakika boyunca 2.500x g'de santrifüjleyin.
7. Süpernatant, peleti bozmadan yeni bir 15 ml Toplama Tüpüne aktarılmıştır.
8. Toplama Tüpündeki süpernatana 5 ml SR4 Çözeltisi eklenmiş ve karıştırmak için vortekslenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir.
9. 30 dakika boyunca 2500 x g'de santrifüj yapılmıştır.
10. Süpernatantı uzaklaştırılmış ve 15 ml Toplama Tüpünü 5 dakika boyunca kağıt havlu üzerinde ters çevrilerek kurumaya bırakılmıştır.
11. SR5 Çözeltisini çalkalayarak karıştırmış ve 15 ml Toplama Tüpüne 1 ml eklenmiştir. Vorteksleyerek pelet tamamen karıştırılmıştır.
12. Her RNA izolasyon numunesi için bir JetStar Mini Kolon tüpü hazırlarak, 15 ml'lik bir Toplama Tüpünün kapağını çıkarılmış ve JetStar Mini Kolonu içine yerleştirmiştir. Sütun, Toplama Tüpü içinde asılı kalmıştır. JetStar Mini Kolona 2 ml SR5 Çözeltisi eklenmiştir. Yer çekiminin etkisiyle kolondan geçmesi beklenmiş ve 15 ml Toplama Tüpünde toplanmıştır.
13. Adım 11'deki RNA izolasyon numunesini JetStar Mini Kolona eklenmiş ve kolondan 15 ml Toplama Tüpüne yerçekimiyle akmasını sağlanmıştır.
14. JetStar Mini Kolona 1 ml SR5 Solüsyonu eklenmiş ve 15 ml'lik Toplama Tüpüne tamamen yerçekimiyle akması beklenmiştir.
15. JetStar Mini Kolonu yeni bir 15 ml Toplama Tüpüne aktarılmıştır.
16. SR6 Solüsyonunu çalkalayarak karıştırmış ve ardından bağlı RNA'yı elüte etmek için JetStar Mini Kolona 1 ml eklenmiştir. SR6 Solüsyonunun 15 ml'lik Toplama Tüpüne yerçekimiyle akması sağlanmıştır.
17. Elüte edilen RNA, 2,2 ml'lik bir Toplama Tüpüne aktarılmıştır. 18. 1 ml SR4 Çözeltisi eklenmiştir. Karıştırmak için alt-üst yapılmış ve -20°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
18. RNA'yı peletlemek için 2,2 ml Toplama Tüpü 13.000 x g'de 15 dakika santrifüjlenmiştir.
19. Süpernatantı boşaltılmış ve 2,2 ml Toplama Tüpü ters çevirerek peleti kurutmak için 10 dakika boyunca bir kağıt havlu üzerinde bekletilmiştir.
20. RNA peletini 100 µl SR7 Çözeltisi içinde çözdürülmüştür.



Şekil 3.1. Toprak örneklerinden yapılan RNA izolasyonu işlemleri

RNA'lar elde edildikten sonra ToBRFV'nin varlığı tespiti için RT-PCR analizi yapılmak üzere derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.2.2. RT-PCR çalışmaları

Akdeniz Üniversitesi Moleküler Viroloji Laboratuvarı'nda yürütülen çalışmada GRISP marka RT-PCR kiti ile bir önceki aşamada elde edilen total RNA'lar ToBRFV'ye karşı analiz edilmiştir. ToBRFV, RNA kökenli bir virüs olduğu için yapılan analizlerde RT-PCR metodu uygulanmıştır. GRISP markasının Xpert One-Step RT-PCR kiti kullanılarak PCR reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. 7,25 µl steril su, 12,5 µl PCR Mastermix, 1,25 µl RTase mix, 0,7 µl forward primer, 0,7 µl reverse primer eklenerek PCR karışımı hazırlanmış ve PCR strip tüplerine eşit miktarda dağıtılmıştır. Kalıp RNA olarak topraktan ve bitki yaprak örneklerinden elde edilen RNA'lar 2 µl miktarında eklenmiştir. RT-PCR koşulları bir döngü 45°C'de 15 dk, 95°C'de 3 dk; 95°C'de 10s, 59°C'de 10s, 72°C'de 15s, döngü 35; ve bir döngü 72°C'de 5dk şeklinde uygulanmıştır.

RT-PCR çalışmaları sonucunda elde edilen ürünlerin, UV ışık altında görünür hale getirmek için DNA stain dye eklenerek boyanmıştır. Ardından %1,5'luk agaroz jel hazırlanmış ve 80 V'de yürütülmüştür. Elektroforez yürüme işlemi tamamlandıktan sonra jel, UV transilluminatör altında görüntülenmiştir.

3.2.3. Uygulama Deseni

Toprak örneklerinin ToBRFV ile enfekteli olma durumu doğrulandıktan sonra solarizasyon uygulaması, farklı dezenfektanlar ve kontrol bitkilerinin yer aldığı deneme deseni tesadüf blokları deneme deseni planlanmıştır. Dezenfektan Uygulamaları farklı içeriklere sahip dört dezenfektan, şekildeki deneme desenine ve kullanım dozlarına göre

uygulanmıştır. Etiketlerindeki uygulama dozları dikkate alınarak oranlanmıştır. Denemede kullanılan dezenfektanların içerikleri Çizelge 3.1.de paylaşılmıştır.

Çizelge 3.1. Denemede kullanılan dezenfektan içerikleri ve kullanım dozları

Dezenfektan kodu	İçerik bilgisi	Kullanım dozu
A	Potasyum peroksimonosülfat (21,41) + sodyum klorit (%1,5)	1 kg/da
B	Perasteik asit (%15,2) + Hidrojen peroksit (11,2)	10 kg/da
C	Alkil dimetil benzil amonyum klorit (%17) + Didecil dimetil amonyum klorit (%7,8) + Glutaraldehit (%10) + Isopropanol + Çam yağı	0,5 kg/da
D	Hidroklorik asit (%10)	1 kg/da
S	Solarizasyon	

Dezenfektanlar, uygulamanın yapıldığı serada tesadüf blokları deneme deseni şablonu oluşturduktan sonra belirlenen bölgelere uygulanmıştır. Uygulama ve kontrol (herhangi bir uygulama yapılmayan) grubu için tesadüfi deneme bloklarını planlanmıştır. Çizelge 3.2.'de uygulaması yapılan dezenfektanlar ve solarizasyon işlemlerinin tesadüfi blokları deneme deseni belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. Tesadüf blokları deneme deseni şeması

1. Parsel	2. Parsel	3. Parsel	4. Parsel
10 Bitki A A A Kontrol A A A Kontrol A A	10 Bitki B Kontrol B B B B B Kontrol B B	10 Bitki Kontrol C C C C C C C Kontrol C	24 Bitki S S + A Kontrol S + A S Kontrol S S + C S S + C Kontrol S Kontrol S S + B S S + B S S + D S S + D Kontrol S S + D
10 Bitki B Kontrol B Kontrol B B B B B B	10 Bitki D D D Kontrol D D D Kontrol D D	10 Bitki A Kontrol A A A A A Kontrol A A	10 Bitki C Kontrol C C C C C Kontrol C C
24 Bitki S S + A S Kontrol S S + B S S + B S Kontrol S S + C S S + C Kontrol S S + C S Kontrol S S + D S S + D Kontrol S S + D	10 Bitki C Kontrol C Kontrol C C C C C C	10 Bitki D D D D D D D Kontrol D D	10 Bitki Kontrol B B B B B B B B B
10 Bitki C Kontrol C C C C C C Kontrol C	10 Bitki A A A A A A Kontrol A Kontrol A	24 Bitki S S + C S S + C S Kontrol S S + D S S + D S S + A S S + A Kontrol S S + A Kontrol S S + B S S + B	10 Bitki D D Kontrol D D D D D D Kontrol D
10 Bitki D D D D Kontrol D Kontrol D D D	24 Bitki S Kontrol S S + B S S + B Kontrol S + D S Kontrol S S + D Kontrol S S + C S S + C S Kontrol S S + A S S + A	10 Bitki Kontrol B B B B B B Kontrol B B	10 Bitki A A A Kontrol A A A A A Kontrol

3.2.4. Solarizasyon uygulaması

Bu amaçla ilk olarak deneme desende S olarak gösterilen alanlara (Çizelge 3.2.) toprak solarizasyonu yapılmıştır. Uygulama yapılan alan, önce 30-40 cm derinliğe kadar işlenmiş, kesekleri kırılarak tesviyesi yapılmıştır. Isının iletkenliğini artırmak amacıyla toprak 40-50 cm derinliğe kadar karık, salma, yağmurlama veya damla sulama sistemlerinden biriyle doyum noktasına kadar sulanmıştır. Toprak tava gelince düzgün bir yüzey oluşturulmuş, 0,025 – 0.1 mm kalınlığında deliksiz, şeffaf plastik örtü ile

kapatılmıştır (Şekil 3.2). Bu sırada toprak ve örtü arasında, hava keseleri oluşmamasına, örtünün gergin durmasına ve toprak yüzeyinin örtü ile temasının sağlanmıştır. Örtü kenarları, önceden açılmış 15-20 cm derinliğindeki karıklar içine iyice gömülmüştür.



Şekil 3.2. Uygulama serasında solarizasyon işlemi yapılan parseller

3.2.5. Dezenfektan uygulamaları

Solarizasyon işlemi tamamlandıktan sonra Çizelge 3.2.'deki deneme deseninde A,B, C ve D olarak gösterilen ve içerikleriyle uygun kullanım dozları Çizelge 3.1.'de belirtilen dezenfektanlar deneme serasında deneme desenine göre uygulanmıştır.

3.2.6. Bitkilerin deneme desenine göre dikimi

Tez çalışması kapsamında ToBRFV'ye karşı bir dayanımı olmayan bir domates çeşidi kullanılmıştır. Hassas domates fideleri, daha önce ToBRFV ile enfekteli domates bitkilerinin yetiştirildiği Akdeniz Üniversitesi deneme serasında yürütülmüştür. ToBRFV ile enfekteli domateslerin söküldüğü deneme serası toprağındaki ToBRFV enfeksiyonunun varlığı, virülensliği, enfektivitesinin belirlenmesi üzerine kurulan bu tez çalışmasında, belirtilen deneme serasından tesadüf blokları deneme desenine göre yürütülmüştür.



Şekil 3.3. Uygulama serasındaki dikim işlemleri

Çalışma kapsamında 256 bitki kullanılmış ve fideler 64'er adet olmak üzere tesadüfi deneme desenine göre farklı uygulamalar yapılmış olan dört sıra üzerine dikilmiştir. Hassas domates fidelerinin dikimi tamamlandıktan sonra tüm gelişme dönemlerinde tüm kültürel işlemlerde ToBRFV'ye maruz kalmıştır.

3.2.7. ToBRFV simptomlarının gözlenmesi

ToBRFV ile enfekteli toprakta yetiştirme dönemi tamamlanan hassas domates fidelerinin simptomları gözlenmiştir. Bu aşamada deneme deseninde yer alan kontrol bitkilerinin ToBRFV enfeksiyonu durumları izlenmiş ve simptomlar morfolojik olarak tespit edilmiştir.

3.2.8. Domates bitkilerinden Total nükleik asit ekstraksiyonu

Kontrol bitkilerinin bulunduğu bölümlerde dikimi yapılan domates fidelerinden her parselden 6'şar örnek olmak üzere toplamda 24 yaprak örneği alınmıştır. Simptomatik domates bitkilerinden yaprak örneği alınarak CTAB total nükleik asit ekstraksiyonu işlemi uygulanmıştır. Yaprak örnekleri eppendorf tüplere alınarak üzerine 500 µl CTAB solüsyonu eklenerek bitki dokuları ezme çubukları yardımıyla ezilmiştir. Örnekler 65°C'de 20 dakika bekletilmiştir. Tüplere 500 µl kloroform eklendikten sonra alt-üst yapılarak karıştırılmış ve 14.000 rpm de 15 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj sonrası mikro pipet yardımı ile süpernatant 300 µl çekilerek üstüne 300 µl isopropanol (2-propanol) eklenerek 120 dakika -20°C'de bekletilmiştir. Ardından 14.000 rpm'de 10 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 alkol yavaşça dökülerek tüplerden uzaklaştırılmıştır. Bu aşama iki kez tekrarlanmıştır. Daha sonra tüpler iki saat kurumaya bırakılmıştır. Kurumaya bırakılan total nükleik asitler 100 µl steril HPLC su eklenerek çözündürülmüştür. Muhafaza için derin dondurucuya kaldırılmıştır.

3.2.9. PCR çalışmaları

Denemede kullanılan domates fidelerinin Tobamovirus dayanıklılık geni olan Tm2² moleküler marker kullanılarak PCR analizi yapılmıştır. Bu analiz için domates bitkilerinden elde edilen total nükleik asit PCR analizlerinde kalıp olarak kullanılmıştır. PCR analizlerinde Grisp marka MasterMix 10 µl, steril su 10 µl, forward ve reverse primerlerden 1 µl ve kalıp DNA 2 ul olarak kullanılmıştır. Çalışmadan Tm22 geninin analizi için NC-Tm2 F: TCGGGTTAGAAGTTTTGTGTTC ve NC-Tm2 R: TCCCTATTTGAAATTGTTGTCG primer dizilimleri (Zhang ve Panthee 2021) markeri kullanılmıştır. PCR koşulları bir döngü 95°C'de 3 dk; 95°C'de 10 s, 55°C'de 10s, 72°C'de 15s, döngü 35; ve bir döngü 72°C'de 5dk şeklinde yürütülmüştür.

3.2.10. İstatistiksel değerlendirmeler

İstatistiksel analiz yapılabilmesi ve denemedeki tüm bitkilerin sonuçlarının değerlendirilebilmesi için 256 domates bitkisinden örnek alınarak DAS-ELISA analizi yapılmıştır. Dezenfektan uygulanan toprakta yetiştirilen domates bitkilerindeki ToBRFV enfeksiyonunu belirlenmek amacıyla Clark ve Adams (1977)'in protokolüne göre 256 adet test bitkisinin tümüne DAS-ELISA analizi uygulanmıştır. Yapraklarından örnek alınan domates bitkileri ToBRFV etmenine özgü antiserum (LOEWE) kullanılarak test edilmiştir. Antiserumlar, 1/200 oranında sulandırılmış, örnek sayısına göre hesaplanmıştır. Elde edilen analiz sonuçlarına göre varyans analizi yapılmıştır. Domates bitki örneklerinin sonuçlarının farklılıklarını belirlemek amacıyla iki faktörlü (Faktöriyel) varyans analizi yapılmıştır. Varyans analizini takiben farklı grupları belirlemek için Duncan çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır. Böylece uygulama yapılan dezenfektanların farklılıkları ortaya koyulmuştur.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Solarizasyon ve Deneme Serası Organizasyonu

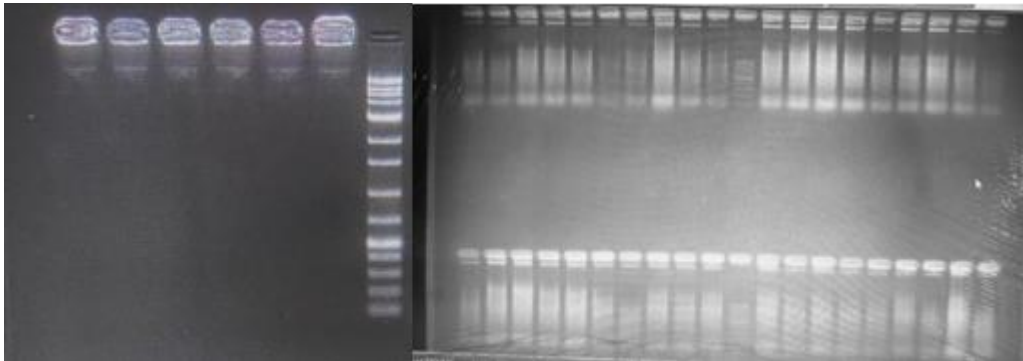
Çizelge 3.2.'de şematize edilen tesadüf blokları deneme deseni uygulama serasında uygulanmıştır. Deneme deseninde yer alan dezenfektanlar ve uygulama dozları Çizelge 3.1.'deki miktarlarda uygulanmıştır. Solarizasyon yapılan parsellerin işlem süreci tamamlandıktan sonra, deneme desenindeki parsellerde solarizasyon ve dezenfektan uygulaması olarak gösterilen kısımların dezenfektan uygulama işlemleri yapılmıştır.



Şekil 4.1. Deneme serasında yetiştirilen domates bitkileri

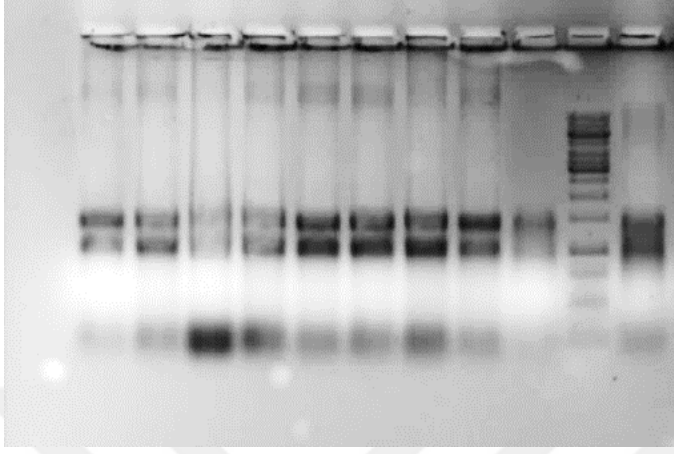
4.2. Nükleik Asit Ekstraksiyonları Bulguları

Deneme desenindeki parsellerden yapılan güdümlü örnekleme sonucunda toplam 96 adet toprak örneği toplanmıştır. Elde edilen örneklerin RNA izolasyonu tamamlandıktan sonra kontrol etmek için agaroz jelde yürütülmüştür. Elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Toprak örneklerinden elde edilen RNA izolasyonu görüntüleri

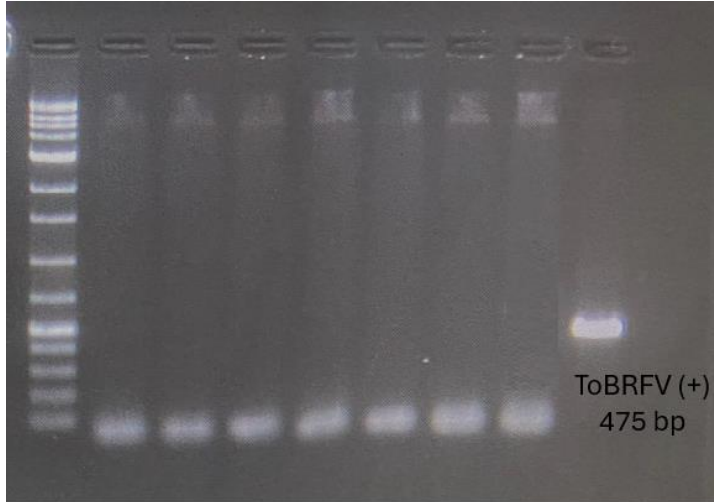
Dezenfektan uygulamalarından sonra sera içerisindeki deneme deseni parselleri üzerine dikimi yapılan domates fidelerinden alınan yaprak örneklerinin CTAB metoduyla yapılan total nükleik asit ekstraksiyonu sonrası elde edilen genetik materyal agaroz jelde yürütülmüş, sonuçları 4.3.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Domates örnekleri total nükleik asit ekstraksiyonundan elde edilen bant görüntüleri

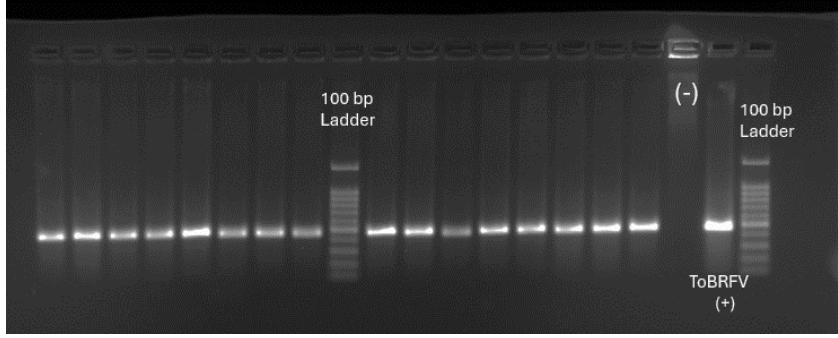
4.3. RT-PCR Bulguları

Toprak örneklerinden ve domates bitki örneklerinden elde edilen genetik materyal ile ToBRFV'ye karşı yapılan RT- PCR çalışmaları yürütülmüştür. Toprak örneklerinin ToBRFV için yapılan analiz sonuçları Şekil 4.4.'te; domates yapraklarının analiz sonuçları ise Şekil 4.5.'te paylaşılmıştır.



Şekil 4.4. Toprak örneklerinin RT- PCR sonuçları

Toprak örneklerinin ToBRFV için yapılan RT-PCR sonuçları değerlendirildiğinde; örneklerin çoğunlukla negatif olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. Kontrol gruplarından alınan domates örneklerinin RT- PCR sonuçları

Tobamovirüs cinsinde yer alan Domates kahverengi buruşuk meyve virüsü (ToBRFV) dünya çapında ciddi ürün hasarlarına neden olmuştur. Mekanik olarak bulaşan tobamovirüslerin toprak yoluyla yayılması, sterilize koşullar altında dikkatlice ekimi ürünlerde hastalığın yayılmasını azaltmaya yönelik büyük bir engel teşkil etmektedir. Tobamovirüsler toprakta ve bitki döküntülerinde aylarca yaşayabilmekte ve bir yıldan uzun süre kile yapışabilmektedir. Bununla birlikte, tobamovirüsle enfekte bir büyüme döngüsünün ardından toprakta düşük oranda enfeksiyöz odak meydana gelmekte ve bu da birkaç kontamine arazinin dezenfeksiyon çalışmalarını büyük ölçekli mahsul üretimleri için yetersiz kılmaktadır. Dombrovsky vd. 2022 yılında yaptıkları bir çalışmada, toprak üzerinde dezenfektan uygulamasından önce dikim çukurlarına virüs inokulumu dökerek ve dikimden önce fide köklerini keserek seralarda dezenfektan etkinliğini incelemek için titiz bir deneme yapmışlardır. Bu işlemi, denemenin sterilize koşullar altında gerçekleştirmektense enfeksiyonlu toprakta sonuçları görmek amacıyla yapmışlardır. Bu tez çalışmasında ise 2022 yılında ToBRFV denemesi yapılmış ve deneme serasındaki tüm domates bitkilerine ToBRFV inokule edilerek enfeksiyon oluşturulmuş serada yapılmıştır. Domates bitkileri kök üzerinden kesilerek enfekte bitki parçaları toprakta bırakılmış ve enfeksiyonlu toprak materyali olarak dezenfeksiyon işlemleri uygulanmıştır.

Serada yetiştirilen ürünler üzerinde yapılan çalışmalar, viral hastalık yayılımını azaltmak için tasarlanan stratejilerin uygulanmasına yönelik temel adımları oluşturmaktadır. Genel olarak, hastalık yayılımını önleyici tedbirler, son derece umut verici veri uygulamasını sağlamak için titiz ve elverişsiz koşullar altında test edilmelidir. Mekanik olarak bulaşan tobamovirüslerle ilgili olarak, özellikle daha önce toprak dezenfeksiyonu yapıldığında, dikkatli ekim koşullarının korunmasının, dezenfekte edilmiş tesislerin kullanılmasının yanı sıra işlerin dezenfekte edilmiş giysiler, eldivenler ve galoşlar giyen işçiler arasında dağıtılmasının ve böylece herhangi bir yapışma aracılı viral enfeksiyonun önlenmesiyle, tobamovirüs enfeksiyonlarını azalttığı bildirilmiştir (Chanda vd., 2021). Toprak dezenfeksiyonunun etkinliği sadece tercih edilen dezenfektana değil aynı zamanda toprak türlerine de bağlı olduğu tespit edilmiştir (Smith vd. 2018). Topraktaki çakıllar köklerde ekstra yaralanmalara neden olabilmekte; tobamovirüsün yapışmasına ve yayılmasına aracılık edebilmektedir. Ayrıca topraktaki organik madde aktif kloru tüketerek klorlu bileşiklerin etkinliğini azaltmaktadır (Lambert vd. 2000). Kumlu toprak, çözünür maddelerin sızması ve tobamovirüsleri ve nükleik asitleri adsorbe eden yüksek kil mineral içeriği nedeniyle dezenfektan etkinliğini azaltabilmektedir (Yu vd., 2013).

Tobamovirus cinsindeki başka bir virüs hastalığı olan Cucumber green mottle mosaic

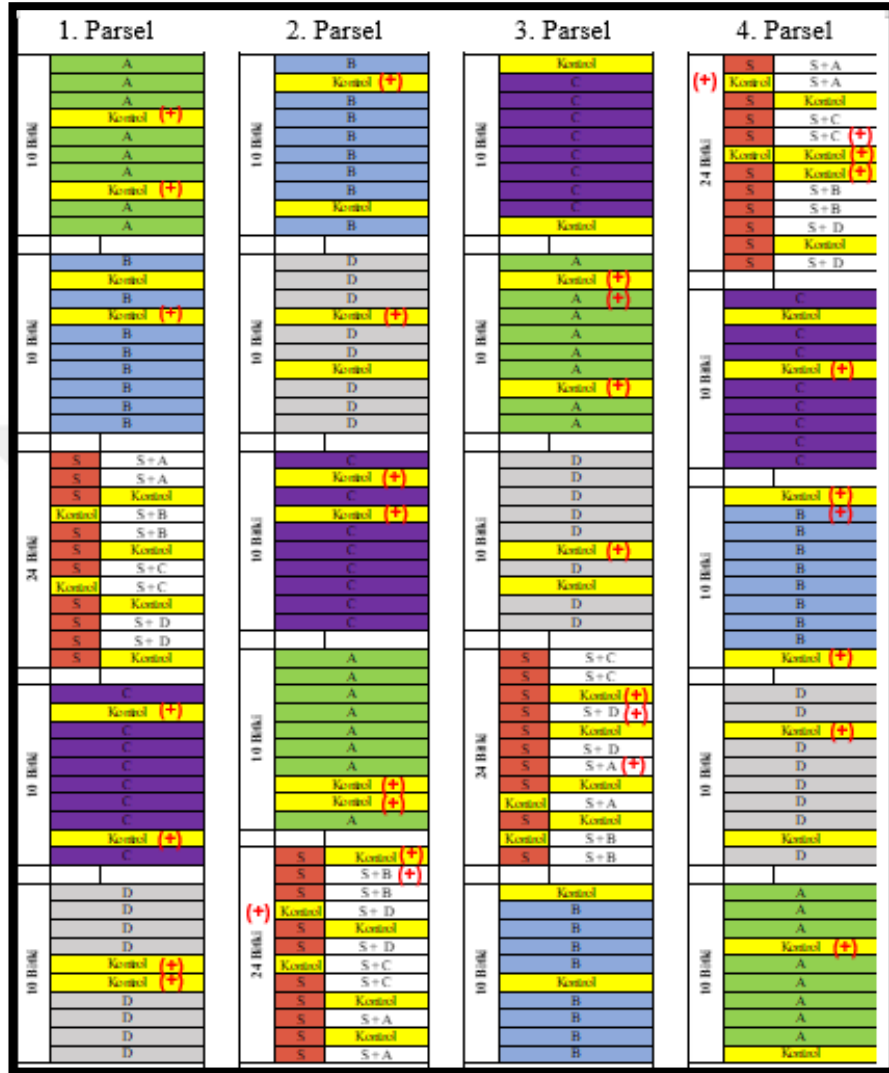
virus (CGMMV)'ün toprak aracılı bulaşması üzerine yapılan bir çalışmada, kumlu ve ağır kontamine toprakların hesaplanan bulaşma oranlarının sırasıyla ~%1 ve ~%2 olduğunu, sadece tuf matrisinin %30-70 gibi yüksek bulaşma oranlarına ulaştığını gösterilmiştir (Smith vd., 2018).

Bu çalışma, kayda değer deneme sonuçları elde etmek için iki yıl üst üste bahar ve sıcak yaz aylarını kapsayan birkaç ay boyunca yürütülmüştür. Çalışmada ToBRFV ile enfekte olmuş topraklardaki solarizasyon etkinliği, çeşitli dezenfektanların etkinliğini ve solarizasyon ile birlikte kullanılma durumları test edilmiştir. Denemede ADBAC: Alkyl Dimethyl Benzyl Ammonium Chloride, DDAC: Didecyl Dimethyl Ammonium Chloride, NaCl: Sodium Chloride, Perasetik asit, Hidroklorik asit gibi kimyasallarının etken madde olarak kullandığı ticari dezenfektanlar kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre solarizasyon uygulamasının ToBRFV üzerinde oldukça etkili olduğu anlaşılmıştır. Kullanılan dezenfektan maddeler içerisinde enfeksiyonu önleme etkinliklerinin olduğu; fakat her bir dezenfektanın ayrı ayrı, izolasyon mesafelerine uyularak etkinliklerinin denenmesi gerektiği öngörülmüştür.

4.4. İstatiksel bulgular

Bu tez kapsamında deneme desenine göre toprak üzerine solarizasyon ve farklı dezenfektan kombinasyonları uygulanmış ve daha sonra dikimi yapılan domates bitkilerinden örnekler alınarak DAS-ELISA analizi yapılmıştır. 405 nm okuma değerleri Ek.1'de paylaşılmış olup istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Bitki örneklerinin ToBRFV'ye karşı yapılan DAS-ELISA analizlerinin sonuçlarına göre deneme deseni üzerinde enfeksiyon gösteren bitki örneklerinin bulunduğu kısımlar (+) ile işaretlenerek Şekil 4.6.'te şematize edilmiştir.



Şekil 4.6. Toprak örneklerinin ToBRFV ile enfekteli olan parsellerin şeması

Şekil 4.6.'daki şema incelendiğinde bazı kontrol gruplarında yani dezenfeksiyon veya herhangi bir uygulamanın yapılmadığı alanlarda ToBRFV enfeksiyonu tespit edilmiştir.

Uygulanan farklı dezenfektanlar ve solarizasyon uygulamaları arasında varyans analizi sonucunda istatistiksel olarak farklar bulunmuştur. Duncan analizi ve Tukey gruplama sonuçları Şekil 4.7'de paylaşılmıştır.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	20	17.84870683	0.89243534	9.40	<.0001
Error	51	4.84386961	0.09497784		
Corrected Total	71	22.69257644			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Tekerrur uygulama	3	0.25949789	0.08649930	0.91	0.4424
	17	17.58920894	1.03465935	10.89	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Tekerrur uygulama	3	0.25949789	0.08649930	0.91	0.4424
	17	17.58920894	1.03465935	10.89	<.0001

Tukey Grouping	Mean	N	uygulama
A	1.5538	4	21
A	1.1000	4	11
A	1.0748	4	71
A	1.0688	4	41
A	0.9848	4	61
A	0.9818	4	51
A	0.9613	4	91
A	0.9570	4	81
A	0.9388	4	31
B	0.1553	4	9
B	0.1523	4	2
B	0.1393	4	8
B	0.1365	4	4
C	0.0973	4	3
C	0.0973	4	1
C	0.0948	4	7
C	0.0850	4	5
C	0.0828	4	6

Şekil 4.7. Duncan varyans analizi ve Tukey gruplama analizi sonuç tablosu

Solarizasyon uygulamasının ToBRFV'nin topraktaki dezenfeksiyonunda etkin olduğu anlaşılmaktadır. Solarizasyon uygulamasının yapıldığı 1. Parseldeki bitkilerde ToBRFV enfeksiyonuna rastlanmazken, 2., 3. ve 4. Parsellerde birkaç bitkinin pozitif çıkmış olması solarizasyonun etkinliğin olmadığından değil; kenar tesirinin etkisinden olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmanın ayrı ayrı parsellerde, kenar tesirinden etkilenmeyecek şekilde yeniden deneme kurularak doğrulama gerektiği anlaşılmıştır. Benzer sonuçlar solarizasyon ve dezenfektan uygulamasının birlikte yapıldığı kısımlarda da görülmüştür. Solarizasyon ve dezenfektan uygulamalarının (S+A, S+B, S+C, S+D) olduğu kısımlardaki toprak örneklerinin büyük çoğunluğunda ToBRFV etmenine rastlanmazken; 2.parselde 1 (S+B); 3.parselde 2 (S+D, S+A) ve 4. Parselde 1 (S+C) örneğin ToBRFV enfeksiyonun pozitif olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda toprağın homojen yapıda olmaması, sulama ile birlikte hareket etmesi de göz önüne alındığında toprak yüzeyindeki domates bitkilerinin arasında izolasyon mesafesi olsa da toprak altında bitki köklerinin izolasyon mesafesinin dışına taşıp enfekte olduğu düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında domates yetiştiriciliğinin yapıldığı üretim alanında ToBRFV'li bitkiler inokulum kaynağı olarak bulunduğunda sera içerisindeki enfeksiyon varlığı belirlenerek hasat sonunda oluşan ve inokulum kaynağı olan enfekteli toprakların moleküler olarak analizi yapılması, ToBRFV'nin toprakta kalma stabilitesi değerlendirilerek farklı dezenfeksiyon uygulamalarıyla virüsten ari toprak kazanımı sağlanmasına katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

Topraktan kaynaklı enfeksiyonun yayılmasının engellenmesi adına önlem olarak kimyasal yardımıyla toprak dezenfektasyonu ve toprak solarizasyonu yapılması önerilmektedir. Çalışmada ToBRFV ile enfekte olmuş topraklardaki solarizasyon etkinliği, çeşitli dezenfektanların etkinliğini ve solarizasyon ile birlikte kullanılma durumları test edilmiştir. Topraktaki ToBRFV enfeksiyonlarının önlenmesinde en etkili yöntemin solarizasyon olduğu belirlenmiştir.

Solarizasyon ve dezenfektan uygulamalarının (S+A, S+B, S+C, S+D) olduğu kısımlardaki toprak örneklerinin büyük çoğunluğunda ToBRFV etmenine rastlanmazken; 2.parselde 1 (S+B); 3.parselde 2 (S+D, S+A) ve 4. Parselde 1 (S+C) örneğin ToBRFV enfeksiyonun pozitif olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda toprağın homojen yapıda olmaması, sulama ile birlikte hareket etmesi de göz önüne alındığında toprak yüzeyindeki domates bitkilerinin arasında izolasyon mesafesi olsa da toprak altında bitki köklerinin izolasyon mesafesinin dışına taşıp enfekte olduğu düşünülmektedir.

Solarizasyon ve dezenfektanların birlikte uygulanmalarının birbirine benzer sonuçlar verdiği görülmüştür. Ancak tesadüf blokları deneme deseninde tekerrürler arasında homojenlik söz konusu olmamıştır. Bu homojeniteyi bozan faktörler genellikle kontrol bitki gruplarının yanındaki örneklerde tespit edilmesi, bu denemenin bağımsız parsellerde tekrar denemesi ihtiyacını göstermiştir.

.

7. KAYNAKLAR

Beris, D.; Malandraki, I.; Kektsidou, O.; Theologidis, I.; Vassilakos, N.; Varveri, C. First Report of Tomato Brown Rugose Fruit Virus Infecting Tomato in Greece. *Plant Dis.* 2020, 104, 2035.

Cambrón-Crisantos, J.M.; Rodríguez-Mendoza, J.; Valencia-Luna, J.B.; Alcasio-Rangel, S.; García-Ávila, C.D.J.; López-Buenfil, J.A.; Ochoa-Martínez, D.L. Primer reporte de Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) en Michoacán, México. *Mex. J. Phytopathol.* 2019, 37, 185–192. [Google Scholar] [CrossRef][Green Version]

Chanda, B., Shamimuzzaman, M., Gilliard, A., & Ling, K. S. (2021). Effectiveness of disinfectants against the spread of tobamoviruses: Tomato brown rugose fruit virus and Cucumber green mottle mosaic virus. *Virology Journal*, 18(1), 1-12.

Darzi, E.; Lachman, O.; Smith, E.; Koren, A.; Klein, E.; Pass, N.; Frenkel, O.; Dombrovsky, A. Paths of cucumber green mottle mosaic virus disease spread and disinfectant-based management. *Ann. Appl. Biol.* 2020, 177, 374–384.

de Ronde, D., Butterbach, P., & Kormelink, R. (2014). Dominant resistance against plant viruses. *Frontiers in plant science*, 5, 307.

Dombrovsky, A., Mor, N., Gantz, S., Lachman, O., & Smith, E. (2022). Disinfection efficacy of Tobamovirus-contaminated soil in greenhouse-grown crops. *Horticulturae*, 8(7), 563.

Dombrovsky, A.; Smith, E. Seed Transmission of Tobamoviruses: Aspects of Global Disease Distribution. In *Advances in Seed Biology*; InTech: Zagreb, Croatia, 2017; pp. 233–260.

Duffus JE, Liu HY, Wisler GC (1996) Tomato infectious chlorosis virus — a new clostero-like virus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. *Eur J Plant Pathol* 102:219–226. <https://doi.org/10.1007/BF01877960>

Eichmeier, A., Hejlova, M., Orsagova, H., Frejlichova, L., Hakalova, E., Tomankova, K., ... & Cechova, J. (2023). Characterization of tomato brown rugose fruit Virus (ToBRFV) detected in Czech Republic. *Diversity*, 15(2), 301.

Eichmeier, A., Hejlova, M., Orsagova, H., Frejlichova, L., Hakalova, E., Tomankova, K., ... & Cechova, J. (2023). Characterization of tomato brown rugose fruit Virus (ToBRFV) detected in Czech Republic. *Diversity*, 15(2), 301.

Ellouze, W.; Mishra, V.; Howard, R.J.; Ling, K.-S.; Zhang, W. Preliminary Study on the Control of Cucumber Green Mottle Mosaic Virus in Commercial Greenhouses Using Agricultural Disinfectants and Resistant Cucumber Varieties. *Agronomy* 2020, 10, 1879.

Eppo (2019). European and mediterranean plant protection organization. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 27, 643-644.

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

Fidan, H., Sarikaya, P., Yildiz, K., Topkaya, B., Erkis, G., & Calis, O. (2021). Robust molecular detection of the new Tomato brown rugose fruit virus in infected

tomato and pepper plants from Turkey. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(8), 2170-2179.

Fidan, H.; Sarikaya, P.; Calis, O. First report of Tomato brown rugose fruit virus on tomato in Turkey. *New Dis. Rep.* 2019, 39, 18.

Fidan H, Ulusoy D, Albezirgan HN. Exploring Effective Strategies for ToBRFV Management in Tomato Production: Insights into Seed Transmission Dynamics and Innovative Control Approaches. *Agriculture*. 2024; 14(1):108. <https://doi.org/10.3390/agriculture14010108>

Gülser, C.; Yılmaz, N.K.; Candemir, F. Accumulation of Tobacco mosaic virus (TMV) at different depths clay and loamy sand textural soils due to tobacco waste application. *Environ. Monit. Assess.* 2008, 146, 235–242.

Hanson P, Lu S, Wang J et al (2016) Conventional and molecular marker-assisted selection and pyramiding of genes for multiple disease resistance in tomato. *Sci Hortic* 201:346–354. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.02.020>

Hanssen IM, Lapidot M, Thomma BP (2010) Emerging viral diseases of tomato crops. *Mol Plant Microbe Interac* 23:539–548. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-5-0539>

Klein, E., Smith, E., Klap, C., Bakelman, E., Ophir, A., Sela, A., ... & Dombrovsky, A. (2023). A Novel Platform for Root Protection Applies New Root-Coating Technologies to Mitigate Soil-Borne Tomato Brown Rugose Fruit Virus Disease. *Viruses*, 15(3), 728.

Lambert, R.; Johnston, M. Disinfection kinetics: A new hypothesis and model for the tailing of log-survivor/time curves. *J. Appl. Microbiol.* 2000, 88, 907–913.

Lanfermeijer, F. C., Warmink, J., & Hille, J. (2005). The products of the broken Tm-2 and the durable Tm-2 2 resistance genes from tomato differ in four amino acids. *Journal of experimental botany*, 56(421), 2925-2933.

Li, R., Baysal-Gurel, F., Abdo, Z., Miller, S. A., & Ling, K. S. (2015). Evaluation of disinfectants to prevent mechanical transmission of viruses and a viroid in greenhouse tomato production. *Virology journal*, 12(1), 1-11

Ling, K.-S.; Tian, T.; Gurung, S.; Salati, R.; Gilliard, A. First Report of Tomato Brown Rugose Fruit Virus Infecting Greenhouse Tomato in the United States. *Plant Dis.* 2019, 103, 1439.

Lister, R. Soil-borne virus diseases. *Sci. Hortic.* 1959, 14, 90–96. Available online: <https://www.jstor.org/stable/45126127> (accessed on 19 June 2022).

Luvisi, A.; Panattoni, A.; Materazzi, A. Heat treatments for sustainable control of soil viruses. *Agron. Sustain. Dev.* 2015, 35, 657–666.

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

Meshi, T., Motoyoshi, F., Maeda, T., Yoshiwoka, S., Watanabe, H., & Okada, Y. (1989). Mutations in the tobacco mosaic virus 30-kD protein gene overcome Tm-2 resistance in tomato. *The Plant Cell*, 1(5), 515-522.

Navas-Castillo J, Fiallo-Olive E, Sanchez-Campos S (2011) Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annu Rev Phytopathol* 49:219–248. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095235>

Oladokun JO, Halabi MH, Barua P, Nath PD (2019) Tomato brown rugose fruit disease: current distribution, knowledge and future prospects. *Plant Pathol* 68:1579–1586. <https://doi.org/10.1111/ppa.13096>

Panno S, Davino S, Caruso AG et al (2021) A Review of the Most Common and Economically Important Diseases That Undermine the Cultivation of Tomato Crop in the Mediterranean Basin. *Agronomy* 11:2188. <https://doi.org/10.3390/agronomy11112188>

Panno, S.; Caruso, A.G.; Davino, S. First Report of Tomato Brown Rugose Fruit Virus on Tomato Crops in Italy. *Plant Dis.* 2019, 103, 1443.

Reingold, V.; Lachman, O.; Belausov, E.; Koren, A.; Mor, N.; Dombrovsky, A. Epidemiological study of *Cucumber green mottle mosaic virus* in greenhouses enables reduction of disease damage in cucurbit production. *Ann. Appl. Biol.* 2016, 168, 29–40.

Rendina N, Nuzzaci M, Scopa A, Cuypers A, Sofo A (2019) Chitosan-elicited defense responses in Cucumber mosaic virus (CMV)-infected tomato plants. *J Plant Physiol* 234:9–17. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.01.003>

Rodríguez-Mendoza, J., García-Ávila, C. D. J., López-Buenfil, J. A., Araujo-Ruiz, K., Quezada-Salinas, A., Cambrón-Crisantos, J. M., & Ochoa-Martínez, D. L. (2019). Identificación de Tomato brown rugose fruit virus por RT-PCR de una región codificante de la replicasa (RdRP). *Revista mexicana de fitopatología*, 37(2), 345-356.

Roselló S, Díez MJ, Nuez F (1996) Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. I. The Tomato spotted wilt virus—a review. *Sci Hortic* 67:117–150. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(96\)00946-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(96)00946-6)

Runia, W. T. (1993, September). A review of possibilities for disinfection of recirculation water from soilless cultures. In IV International Symposium on Soil and Substrate Infestation and Disinfestation 382 (pp. 221-229).

Salem, N., Mansour, A., Ciuffo, M., Falk, B. W., & Turina, M. (2016). A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Archives of virology*, 161, 503-506.

Siviero, P. (1991). Tomato seed disinfection from bacteria and TomMV. *Informatore Agrario*, 47(5), 61-74.

Smith, E., & Dombrovsky, A. (2019). Aspects in Tobamovirus management in intensive agriculture. In *Plant diseases-current threats and management trends*. IntechOpen.

Smith, E.; Dombrovsky, A. Aspects in Tobamovirus management in intensive agriculture. In *Plant Diseases-Current Threats and Management Trends*; IntechOpen: London, UK, 2019; pp. 31–47.

Van der Vlugt R, Stijger CCMM, Verhoeven JTJ, Lesemann DE (2011) First report of Pepino mosaic virus on tomato. *Plant Dis* 84:103. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.1.103C>

Van der Vlugt RA, Verbeek M, Dullemans AM et al (2015) Torradoviruses. *Annu Rev Phytopathol* 53:485–512. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120021>

Wintermantel WM, Wisler GC (2006) Vector specificity, host range, and genetic diversity of Tomato chlorosis virus. *Plant Dis* 90:814–819. <https://doi.org/10.1094/PD-90-0814>

Xu, C., Sun, X., Taylor, A., Jiao, C., Xu, Y., Cai, X., ... & Wang, Q. (2017). Diversity, distribution, and evolution of tomato viruses in China uncovered by small RNA sequencing. *Journal of Virology*, 91(11), 10-1128.

Yan, Z.-Y.; Ma, H.-Y.; Han, S.-L.; Geng, C.; Tian, Y.-P.; Li, X.-D. First Report of Tomato brown rugose fruit virus Infecting Tomato in China. *Plant Dis*. 2019, 103, 2973.

Yu, W.H.; Li, N.; Tong, D.S.; Zhou, C.H.; Lin, C.X.C.; Xu, C.Y. Adsorption of proteins and nucleic acids on clay minerals and their interactions: A review. *Appl. Clay Sci*. 2013, 80, 443–45.



Ek.1 Domates örneklerinin deneme desenindeki sırasına göre DAS-ELISA sonuçları

Parsel 1	Parsel 1	Parsel 1	Parsel 1	Parsel 1	Parsel 1	Parsel 2	Parsel 2	Parsel 2	Parsel 2	Parsel 2	Parsel 2
0,118	0,126	0,096	0,111	0,094	0,051	0,129	0,063	0,127	0,133	0,074	0,744
0,12	0,055	0,138	0,118	0,065	0,067	0,048	0,081	0,065	0,094	0,095	0,065
0,096	0,124	0,078	0,127	0,102	0,075	0,116	0,103	0,059	0,094	0,087	1,233
1,253	0,135	0,034	0,119	0,129	0,063	0,319	0,911	0,089	0,076	0,056	0,965
0,096	0,096	0,106	0,126	0,121	0,697	0,133	0,117	0,102	0,063	0,122	0,104
0,138	3,258	0,058	0,332	0,139	0,589	0,104	0,085	0,135	0,081	0,079	0,094
0,078	0,117	0,077	0,084	0,469	0,111	0,094	0,122	0,068	0,103	0,063	0,076
1,569	0,101	0,065	0,288	0,114	0,13	0,076	0,296	0,578	0,076	0,797	0,063

Parsel 3	Parsel 3	Parsel 3	Parsel 3	Parsel 3	Parsel 3	Parsel 4	Parsel 4	Parsel 4	Parsel 4	Parsel 4	Parsel 4
0,081	0,078	0,425	1,259	0,791	0,087	0,126	0,092	0,079	0,111	0,127	0,093
0,103	0,034	0,085	0,127	0,827	0,056	0,129	0,128	0,082	0,13	0,065	0,425
0,079	0,104	0,073	0,119	0,063	0,048	0,021	0,114	0,066	0,129	0,059	1,369
0,082	0,589	0,096	0,126	0,097	0,051	0,797	0,093	1,108	0,114	0,089	0,188
0,066	0,697	0,138	0,332	0,135	0,067	0,989	0,425	0,678	0,898	0,102	0,012
0,059	0,13	0,078	0,076	0,089	0,056	0,107	1,369	0,135	0,085	0,135	0,136
0,058	0,119	0,112	0,063	0,074	0,048	0,125	0,126	0,084	0,122	0,079	0,115
0,077	0,064	0,124	1,459	0,095	0,106	0,114	0,082	0,062	0,296	0,114	0,102

SOLARİZASYON UYGULANAN BİTKİLER											
0,092	0,067	0,045	0,138	0,126	CONT 1,328	DEZENFEKTAN A					
0,089	0,075	0,051	0,078	0,115	CONT 1,469	DEZENFEKTAN B					
0,074	0,118	0,067	0,117	0,109	CONT 0,827	DEZENFEKTAN C					
0,092	0,12	0,075	0,124	0,118	CONT 0,625	DEZENFEKTAN D					
0,087	0,096	0,133	0,065	0,098	CONT 0,825	SOLARİZASYON + A					
0,096	1,153	0,117	0,102	0,462	PTC 0,985	SOLARİZASYON + B					
0,048	0,087	0,101	0,133	0,138	NTC 0,656	SOLARİZASYON + C					
0,051	0,056	0,096	1,108	0,108	BUF 0,774	SOLARİZASYON + D					
						SOLARİZASYON					

ÖZGEÇMİŞ

HÜSEYİN UTKU ŞİMŞİR

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2021-2024	Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2015-2020	Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antalya