

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**DOMATES LEKELİ SOLGUNLUK VİRÜS HASTALIĞINA KARŞI
DAYANIKLILIĞI KIRAN TSWV (*TOMATO SPOTTED WILT VIRUS*)
İZOLATININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Nuray SARI

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2018

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**DOMATES LEKELİ SOLGUNLUK VİRÜS HASTALIĞINA KARŞI
DAYANIKLILIĞI KIRAN TSWV (*TOMATO SPOTTED WILT VIRUS*)
İZOLATININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Nuray SARI

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2018

ANTALYA

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

**DOMATES LEKELİ SOLGUNLUK VİRÜS HASTALIĞINA KARŞI
DAYANIKLILIĞI KIRAN TSWV (*TOMATO SPOTTED WILT VIRUS*)
İZOLATININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Nuray SARI

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2017-2619 nolu proje ile desteklenmiştir.**

HAZİRAN 2018

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOMATES LEKELİ SOLGUNLUK VİRÜS HASTALIĞINA KARŞI
DAYANIKLILIĞI KIRAN TSWV (*TOMATO SPOTTED WILT VIRUS*) İZOLATININ
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Nuray SARI

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 01.06.2018 tarihinde jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Hakan FİDAN



Prof. Dr. Hüseyin BASIM



Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU



ÖZET

DOMATES LEKELİ SOLGUNLUK VİRÜS HASTALIĞINA KARŞI DAYANIKLILIĞI KIRAN TSWV (*TOMATO SPOTTED WILT VIRUS*) İZOLATININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Nuray SARI

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hakan FİDAN

Haziran 2018; 81 sayfa

Domateste lekeli solgunluk virüsü (*Tomato spotted wilt virus*) (TSWV), dünya çapında en yaygın görülen ve ekonomik olarak önemli zararlara neden olan thrips vektörleri ile hızla yayılan virüslerden biridir. Son zamanlara kadar domateste Sw-5 ve biberde Tsw genleri aracılığı ile dayanıklılık sağlanmaktadır. Fakat günümüzde Sw-5 ve Tsw dayanımı bulunan çeşitler üzerinde TSWV enfeksiyonlarının meydana gelmesi ile birlikte dünyanın birçok bölgesinde bu hastalıklara karşı dayanıklılığın kırıldığı rapor edilmiştir. Ülkemizde de dayanıklılığın kırıldığı belirlenmesi üzerine bu çalışma planlanmıştır. Yapılan tez çalışmasında Türkiye-Antalya bölgesine ait dayanıklılığı kıran TSWV izolatının (TSWVAntRB) tüm genom dizilimleri çıkarılarak bu izolatın dünya izolatları içerisindeki yeri filogenetik analizler ile belirlenmiş ve dayanıklılığı kıran izolatın üstünde Sw-5 dayanımı kıran mutasyon belirlenmiştir. TSWV’de meydana gelen mutasyonları anlamak amacıyla tüm genomu çıkarılarak dayanıklılığı kıran ve kırmayan izolatlar ile kıyaslaması yapılmış ve farklılıkları belirlenmeye çalışılmıştır. TSWV genomu üç parçalı segmentli bir yapıdan oluşmaktadır. Large segmentleri-8913 nt, Medium-4752 nt ve Small-2924 nt uzunluğundaki bölgeler RT-PCR tekniği ile çoğaltılmış sekans dizileri elde edilmiş gen dizileri üzerinde protein sentezi yapan açık okuma bölgeleri belirlenmiş bu bölgelerde nükleotid aminoasit ve protein düzeyinde farklılıklar ortaya konulmuştur. TSWVAntRB izolatının Medium segmentine ait nükleotid, aminoasit ve protein bazında yapılan eşleştirmelerde bu izolatın (non-structural protein) (NSm) NSm alanındaki bu bölge hücreden hücreye geçişten sorumlu olan alan

üzerinde C118Y noktasında bir mutasyon meydana geldiği ve bu mutasyon sebebiyle de dayanıklılık durumunun ortadan kalktığı belirlenmiştir. Ayrıca M ve S segmenti ile yapılan gen dizi karşılaştırmalarında bölgemizde dayanıklılığı kıran izolatın (TSWVAntRB) İspanya’da dayanıklılığı kıran izolatlar ile %99 oranında benzerlik göstermiştir. Yapılan filogenetik analizlerde aynı kökenden olduklarını ve aynı yerde dallanma yaptığı belirlenmiştir. Filogenetik analizlere bize Avrupa’daki dayanıklılığı kıran izolat ile ülkemizde dayanıklılığı kıran izolat TSWVAntRB aynı kökenden geldiğini göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Dayanıklılığın kırılması, Domates, Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV), Mekanik inokulasyon, RT-PCR

JÜRİ: Dr. Öğr. Üyesi Hakan FİDAN
Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU
Prof. Dr. Hüseyin BASIM

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF RESISTANCE BREAKING TOMATO SPOTTED WILT VIRUS (TSWV) ISOLATE IN THE TOMATO PLANT

Nuray SARI

MSc Thesis in Plant Protection

Supervisor: Dr. Hakan FIDAN

June 2018; 81 pages

Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) is one of the plant viruses that spreads rapidly with thrips vectors and causes the most common and economically important yield losses in worldwide. *Sw-5* gene in tomato and *Tsw* genes in pepper are responsible for the resistance towards TSWV. However, it has recently been reported that resistance to these genes broken allowing spreads of TSWV infections on tomato varieties with *Sw-5* and *Tsw* resistance genes in many parts of the World. The main purpose of this study was to understand the mechanism of the breaking of TSWV resistance in tomato varieties with the resistance genes in Turkey. The resistance-breaking TSWV isolate (TSWV AntRB) was collected and its whole genome sequences were compared with those of the World's TSWV isolates in order to establish phylogenetic trees and find out a mutation which breaks the *Sw-5* gene resistance. Based on the whole genome sequences, the TSWV genome has consisted of three-part segmented structures which were: Large segments-8913 nt, Medium-4752 nt and Small-2924 nt length regions. Their three regions coding proteins were amplified by RT-PCR, and their sequences were obtained. Open reading regions responsible for protein synthesis were identified on the gene sequences. Differences in nucleotides, amino acid and protein levels were revealed in these regions. There was a mutation on non-structural protein (NSm) region. The NSm region is responsible cell to cell movement where a mutation at the C118Y site on the NSm domain has been determined. These mutations allow breaking of resistance. Additionally, the comparisons of the M and S segments (TSWV AntRB) have showed 99% similarity with those of the virus isolates broken resistance in Spain. It has been determined that analysis located the virus on the same root and same branch in the same place. The phylogentic

trees have shown us that the isolate TSWVAntRB has come from the same origin in Europe.

KEYWORDS: Resistance breaking, Tomato, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), Mechanical inoculation, RT-PCR

COMMITTEE: Dr. Öğr. Üyesi Hakan FİDAN
Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU
Prof. Dr. Hüseyin BASIM

ÖNSÖZ

Yapılan tez çalışmasında domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda önemli ölçüde verim kayıplarına neden olan Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (*Tomato spotted wilt virus*, (TSWV)’ne karşı dayanıklılığı kıran yeni ırkın moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla dayanıklılık genine (Sw-5) sahip olduğu bilinen 5 adet ticari çeşit ve bir duyarlı çeşit üzerinde mekanik inokulasyon yöntemi ile bulaştırmalar meydana getirilmiştir. İnokulasyonu takiben test bitkilerinin sadece TSWV ile enfekteli olduğu belirlendikten sonra dayanıklılığı kıran izolatın dizi analizlerinin verileri üzerinde çalışılmıştır.

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Moleküler Viroloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında hertürlü yardımını esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Hakan FİDAN’a teşekkür ederim.

Tez jürime katılarak görüş ve tecrübeleri ile tezime destek olan Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU ve Prof. Dr. Hüseyin BASIM hocalarıma sonsuz şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmada projeyi destekleyen Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu’na, çalışma imkanları sunan Akdeniz Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Başkanlığına, Bioinformatik çalışmalarında bana yardımlarını esirgemeyen Ar. Gör. Duygu SARI’ya, projem esnasında yardımlarda bulunan Murat BARUT’a yüksek lisans eğitimim boyunca çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen bütün bölüm arkadaşlarıma ve bana yüksek lisans döneminde her türlü maddi ve manevi desteği esirgemeyen değerli babam Haluk SARI’ya ve annem Leyla SARI’ya yaptıkları tüm fedakârlıklardan dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	5
2.1. Domateste Zarar Meydana Getiren Virüsler	5
2.2. TSWV'ye Ait Simptomlar ve Genel Bilgiler	6
2.3. TSWV'nin Genom Yapısı ve Morfolojisi	9
2.4. Virüsün İletimi	10
2.5. Virüsün Konukçuları	13
2.6. Hastalığın Bulunuşu ve Dünyadaki Farklı Konukçular Üzerindeki Yayılımı	14
2.7. Dayanıklılık Geni Sw-5 Hakkında Bilgiler	19
2.8. Dünyada Dayanıklılık Genlerini Karşı Dayanıklılığı Kıran İzolatlar	19
3. MATERYAL VE METOT	26
3.1. Materyal	26
3.2. Metot	27
3.2.1. Mekanik inokulasyonda kullanılan bitki çeşitlerinin tanıtılması	27
3.2.2. Bitkiler üzerinde mekanik inokulasyon çalışmaları	27
3.2.3. Bitkiler üzerinde TSWV'nin moleküler olarak belirlenmesi	27
3.2.4. TSWV Medium ve Small segmentlerinin dizilimlerinin belirlenmesi	30
4. BULGULAR	33
4.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Mekanik İnokulasyon	33
4.2. Bitki Çeşitleri Üzerinde Dayanıklılık Durumunun Belirlenmesi	34
4.3. Bitkilerde Mekanik İnokulasyon Sonrası Simptomlar	34
4.3.1. <i>Solanum peruvianum</i> çeşidine ait gözlemler	37
4.3.2. TSWV Ant01 çeşidine ait gözlemler	37

4.3.3. TSWVAnt02 çeşidine ait gözlemler	39
4.3.4. TSWVAnt03 çeşidine ait gözlemler	40
4.3.5. TSWVAnt04 çeşidine ait gözlemler	41
4.3.6. TSWVAnt05 çeşidine ait gözlemler	43
4.4. Bitkiler Üzerinde TSWV Varlığının Moleküler Analizler ile Belirlenmesi	43
4.5. TSWV'ye Ait Medium Ve Small Primerleri ile Genom Amplifikasyonlarının Elde Edilmesi	45
4.6. Small Segmentinde Yapılan İşlemler	49
4.7. Small Segmenti Üzerinde Üç Boyutlu Protein Modellemesi.....	50
4.8. Small Segmentine Ait Filogenetik Analizler	52
4.9. Medium Segmentine Ait Filogenetik İşlemler	54
4.10. Medium Segmenti Üzerinde Protein Bazında Yapılan Karşılaştırmalar	56
4.11. Medium Segmentine Ait Filogenetik Analizler	57
5. TARTIŞMA.....	61
6. SONUÇLAR.....	66
7. KAYNAKLAR.....	69
8. EKLER.....	79
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans “Domates lekeli solgunluk virüs hastalığına karşı dayanıklılığı kıran TSWV (*Tomato spotted wilt virus*) izolatının moleküler karakterizasyonu” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, Yapılan tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

Tarih: 01/06/2018

Nuray SARI



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	: Santigrat Derece
%	: Yüzde
µl	: Mikro litre
ml	: Mili litre

Kısaltmalar

A	: Adenin
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AÜ	: Akdeniz Üniversitesi
BATEM	: Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
Bp	: Baz çifti
C	: Sitozin
C	: Cys - Sistein
CAPS	: Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
CMV	: <i>Cucumber Mosaic Virus</i> – Hıyar Mozaik Virüs
DAS-ELISA	: Double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay
ddH ₂ O	: Çift distil 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	: Guanin
GC (G1)	: TSWV membranında bulunan ve reseptör olarak görev yapan glikosilat proteini

GN (G2)	: TSWV membranında bulunan ve reseptör olarak görev yapan glikosilat proteini
HR	: Hipersensitif (aşırı hassasiyet) reaksiyonu
M	: Molar
MAS	: Marker Assisted Selection (Markör Destekli İslah)
N	: TSWV nükleokapsid protein geni
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NRB	: None Resistance Breaking-Dayanıklılığı Kırmayan izolat
NSm	: Non-Structural protein
ORF	: Okuma çerçevesi RB: Resistance Breaking-Dayanıklılığı Kıran İzolat
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RNA	: Ribonükleik asit RT-PCR: Reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu
RdRp	: RNA-dependent RNA polymerase
Rpm	: Rounds per minute (Devir/dakika)
SCAR	: Sequence Characterized Amplified Region
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
Sp.	: Species (Türler)'in Kısaltması
ss	: Tek iplikçikli
Sw-5	: Domateste 9. kromozomda bulunan dayanıklılık geni
T	: Timin
TAE	: (Tris-acetate-EDTA) Elektroforez buffer
Taq	: Termo stabil polimeraz enzimi
TMV	: <i>Tobacco Mosaic Virus</i> -Tütün Mozaik Virüsü
ToMV	: <i>Tomato Mosaic Virus</i> -Domates Mozaik Virüsü
Tsw	: Biberde <i>Tomato Spotted Wilt Virüs</i> 'e karşı dayanıklılık sağlayan gen
TSWV	: <i>Tomato spotted wilt virüs</i> Domates Lekeli Solgunluk Virüsü

TSWVAntRB : TSWV Antalya Dayanıklılığ Kıran İzolatı

TUİK : Türkiye İstatistik Kurumu

TYLCV: : *Tomato yellow leaf curl virus*– Domates sarı yaprak kıvrıcıklığı
Virüsü

UV : Ultra Viole

V : Volt

vd : Ve diđerleri

Y : Tyr - Triozin



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Türkiye il bazında domates üretimi	2
Şekil 1.2. Antalya ilçelerinde domates üretimi	3
Şekil 2.1. Domateste TSWV'ye ait yaprak simptomları	6
Şekil 2.2. TSWV'nin biber ve domates bitkileri üzerindeki simptomları	7
Şekil 2.3. TSWV'ye ait yaprak simptomları.....	8
Şekil 2.4. TSWV'nin domates üzerindeki halka şeklinde belirtileri	8
Şekil 2.5. TSWV'nin genom yapısı.....	9
Şekil 2.6. TSWV'nin morfolojik özellikleri	10
Şekil 2.7. Thrips vektörü.....	11
Şekil 2.8. Larva ve ergin döneminde kazanılan virüsün taşınım aşamaları.....	12
Şekil 2.9. TSWV'nin dünya üzerindeki yayılımı.	18
Şekil 3.1. Mekanik inokulasyon çalışmaları.	27
Şekil 4.1. Test edilen domates bitkilerinin dikim sonrası görüntüleri.....	33
Şekil 4.2. Kullanılan Bitki Materyallerinin Dayanıklılık Durumlarının Belirlenmesi..	34
Şekil 4.3. Dayanıklı çeşitler üzerindeki simptomları.....	35
Şekil 4.4. Hastalıklı ve sağlıklı bitkiler arasındaki gelişim farkı	35
Şekil 4.5. Domates üzerinde TSWV'nin gövde simptomları.....	36
Şekil 4.6. <i>Solanum peruvianum</i> 'da meydana gelen yaprak simptomları.....	37
Şekil 4.7. TSWVAnt01 domates bitkisinde meydana gelen simptomlar	38
Şekil 4.8. TSWVAnt02 domates bitkisinde meydana gelen simptomlar.	39
Şekil 4.9. TSWVAnt03 domates bitkisinde meydana gelen simptomlar	40
Şekil 4.10. TSWVAnt04 domates bitkisinde meydana gelen simptomlar	41
Şekil 4.11 TSWVAnt04 domates bitkisinde meydana gelen simptomlar	42
Şekil 4.12. TSWVAnt05 domates bitkisinde meydana gelen simptomlar	43
Şekil 4.13. TSWV ve diğer virüslere karşı moleküler analizler.....	44
Şekil 4.14. TSWV PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	44
Şekil 4.15. TSWV genomu üzerinde Small primerlerinin çoğaltığı lokasyonlar.....	46
Şekil 4.16. TSWV Small segmentine ait PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	47
Şekil 4.17. TSWV Medium segmentine ait PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	47

Şekil 4.18. TSWV genomunda Medium (NSm ve GN,GC alanları) ve Small (NSs ve N alanları) segmentine ait kirli dizilerin Chromas programı kullanılarak kesilmesi ve temiz diziler ile birleştirilmesi	48
Şekil 4.19. CodonCod programı kullanılarak TSWV genomu Small (NSs ve N alanları) segmentine ait genom parçasının oluşturulması	49
Şekil 4.20. CodonCod programı kullanılarak TSWV genomu Medium (NSm ve GN, GC) segmentine ait genom parçasının oluşturulması	49
Şekil 4.21. TSWV genomu Small segmentine ait N protein alanı (kılıf proteinini) üç boyutlu protein modellemesi web arayüzü.....	51
Şekil 4.22. TSWV genomu Small segmentine ait N protein alanı (kılıf proteinin) üç boyutlu protein modellemesi	52
Şekil 4.23. TSWVAntRB izolatu ile dünya izolatları arasındaki ilişkiyi gösteren Filogenetik analiz.....	53
Şekil 4.24. TSWVAntRB izolatının Medium segmenti NSm proteinine ait açık okuma bölgeleri.....	56
Şekil 4.25. TSWVAntRB izolatının Medium Segmentinin NSm protein alanı (ORF- Açık Okuma Bölgeleri) içerisindeki mutasyon noktası.	57
Şekil 4.26. Mega 7 Programı kullanılarak oluşturulan TSWVRntRB izolatına ait filogenetik analiz.....	58
Şekil 5.1. Meyve üzerinde TSWV'ye ait farklı simptomlara ait gözlemlerin resmi.	62
Şekil 5.2. Domates yaprakları üzerinde TSWV'nin neden olduğu farklı simptomlara ait gözlemler.....	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Ülkelere göre domates üretimi.....	2
Çizelge 3.1. Bitki çeşitlerinin özellikleri	26
Çizelge 3.2. RT-PCR çalışmalarında kullanılan primerler	28
Çizelge 3.3. Moleküler analizler için kullanılan PCR karışımı	29
Çizelge 3.4. Moleküler analizler için kullanılan PCR protokolü	29
Çizelge 3.5. RT-PCR çalışmasında kullanılan kitin içerikleri	30
Çizelge.3.6. PCR çalışmasında kullanılan PCR protokolü	30
Çizelge 3.7. RT-PCR çalışmalarında kullanılan primer ismi ve dizilimleri	31
Çizelge 3.8. RT-PCR çalışmalarında kullanılan primer ismi ve dizilimleri	32
Çizelge 4.1. Primer Dizilimleri	46
Çizelge 4.2. TSWV genomu Small segmenti filogenetik analizde kullanılan izolatlar .	53
Çizelge 4.3. TSWV genomu Medium segmentifilogenetik anlizde kullanılan izolatlar	59

1. GİRİŞ

Domates (*Solanum lycopersicum* L.) dünya üzerinde en fazla tarımı yapılan ürünler arasında yer almaktadır. Domatesin anavatanı Güney Amerika olmasına rağmen, 15. yy.'da Avrupa sınırlarına girmeyi başarabilmiş ve daha sonra tüm dünyaya yayılma imkânı bulmuştur. Domates dünyada en çok tüketilen sebzelerin başında gelmesine rağmen ilginç bir tarihe sahiptir. İlk olarak sarı renkli yabani bir domates türü Bolivya ve Peru'da bulunduktan sonra Meksika'da yetiştirilmeye başlanılmıştır. Daha sonra Christophe Colomb'un Amerika'yı keşfiyle birlikte gelen gemilerle Avrupa'ya yayılma imkânı bulmuştur. İtalyanlar yabani domates meyvelerinin sarı renginden dolayı ona "altın elma" ismini vermişlerdir. Zaman geçtikçe domatesin farklı çeşitlerinin bulunmasıyla birlikte kırmızı renkli meyve türleri de keşfedilmiştir. Domatesin uzun bir süre zehirli olduğunun düşünülmesinden dolayı tüketim amaçlı üretimi yapılmamıştır. İlk defa Amerika'da Thomas Jefferson tarafından yetiştirilmiş ve daha sonra lezzetinin farkına varılmasıyla birlikte ithalat ve ihracatı artmış, günümüzde ise dünyada en fazla tüketilen ve üretilen sebzelerin başında yer almıştır.

Günümüzde morfolojik, fizyolojik ve moleküler çalışmalarla domates türleri arasındaki farklılıklar ortaya koyulmaktadır. Çok sayıda yabani türün Galapagos adalarından Peru'nun And Dağlarına, Ekvator ve Bolivya adalarına bile yayıldığı rapor edilmiştir (Rick 1973; Taylor 1986). 15 yıl sonra İngiliz bir botanikçi olan Phillip Miller tarafından *Lycopersicon esculentum* Mill. olarak kayıt edilmiştir (Taylor 1986; Heiser ve Anderson 1999). Orijinal isimlendirmenin *S. lycopersicon* olduğunu düşünen birçok taksonomist olmasına rağmen literatürde *S. esculentum* olarak geçmektedir. Ancak Kuzey Peru bölgesinde yapılan bir araştırmada *Solanaceae* familyasına ait bazı yeni yabani domates türlerinin de bulunmasıyla yapılan farklı sınıflandırmada domates *Solanum lycopersicum* olarak isimlendirilmiş ve diğer türlerde farklı isimler kullanılmıştır (Peralta vd. 2005).

Domates bitkisi etli, kırmızı, cezbedici meyveleri için üretilmekte ve dünyanın birçok ülkesinde farklı isimler ile adlandırılmaktadır. Bunlar; tomat (Alman), tomaatti (Finish), pomodoro (İtalyan), kamalis (Malay), jitomat (İspanyol), pomidor (Rusça).

Domates yetiştirilme alanları göz önünde tutulduğunda hektar başına verdiği yüksek verim sebebiyle üreticiler arasında en fazla tercih edilen kültür bitkileri içerisinde yer almaktadır. FAO'nun 2016 yılı üretim verileri incelendiğinde Çin'in ilk sırayı alarak lider konumda olduğu, devam eden sıralarda Hindistan, ABD ve Türkiye'nin yer aldığı görülmektedir. Çizelge 1.1'de dünyada domates üreticisi ülkeler ve üretim (t) değerleri verilmiştir. Çizelge 1.1'de verilen bilgiler özetlenerek gösterilmeye Şekil 1.1'de çalışmıştır.

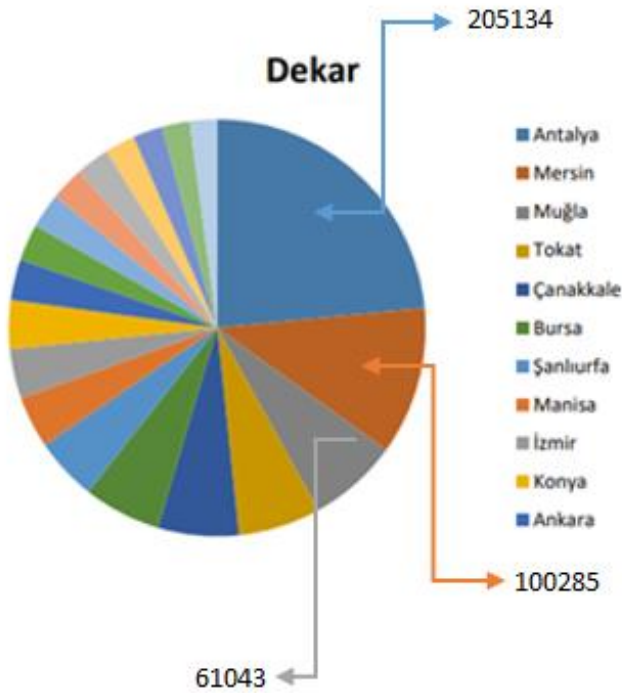
Domates insanlığın vazgeçilmez temel gıdalarından biri olmasından dolayı dünyada ve ülkemizde en çok tüketilen, üretilen ve ticareti yapılan sebzelerinden biridir. Günümüzde gıda sanayisinde; dondurulmuş olarak, salçalık tüketimde, ketçap, reçel ya da taze gıda olarak çok çeşitli şekillerde kullanımı mevcuttur. Domates dünyada buğday, şeker pancarı, patates ve yemlik bitkilerden sonra en çok üretimi yapılan sebzedir (FAO, 2016). Domates yetiştiriciliği dünyanın farklı bölgelerinde yapılmakta olup en çok üretim yapan 5 ülke sırasıyla; Çin (56.308.914 ton), Hindistan (18.399.000 ton), Amerika

Birleşik Devletleri (13.038.410 ton), Türkiye (12.600.000 ton) ve Mısır (7.943.285 ton)dır (FAO, 2016).

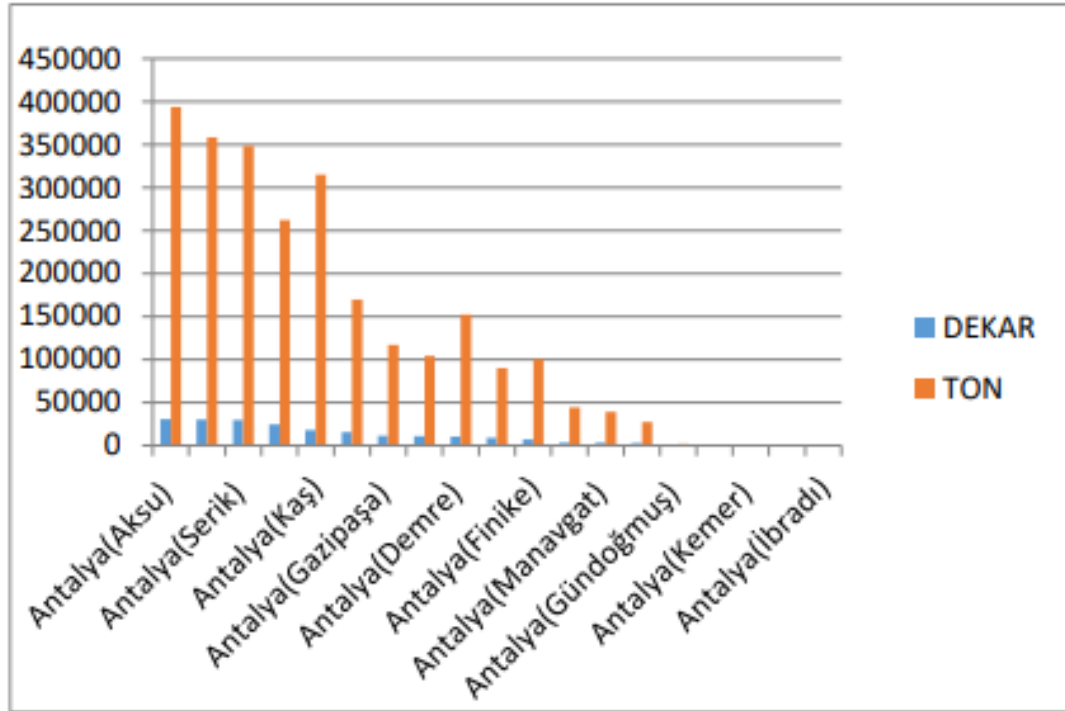
Çizelge 1.1. Ülkelere göre domates üretimi (FAO, 2016)

Ülke	Üretimi (t)
Çin	56.308.914
Hindistan	18.399.000
Amerika Birleşik Devletleri	13.038.410
Türkiye	12.600.000
Mısır	7.943.285

Ülkemizde gerek salçalık gerekse sofralık olarak üretim miktarları (dekar/ton) TÜİK 2017 verileri kullanılarak Çizelge 1.2.’de özetlenmeye çalışılmıştır. Türkiye’deki sofralık ve salçalık domates üretim miktarları yıllar temel alınarak incelendiğinde 2005 yılından 2017 yılına doğru üretim alanlarında azalmalar görülürken dekar başına alınan ürün miktarında artışlar gözlemlenmiştir.



Şekil 1.1. Türkiye il bazında domates üretimi



Şekil 1.2. Antalya ilçelerinde domates üretimi

Domates yetiştirildiği dönem boyunca abiyotik ve biyotik faktörlerden etkilenmektedir. Domates tarımı yapılan alanlarda en önemli bitki zararlıları; thripsler, beyazsinekler, yaprakbitleri ve domates güvesi olarak sıralanabilmektedir. Ayrıca bu zararlılar domates tarımı yapılan alanlarda virüs etmenlerinin vektörlüğünü yapan en önemli unsurlardır. Bu vektörler, domates tarımı yapılan alanlarda en fazla rastlanılan ve en büyük zararı dokunan üç virüs olan *Tomato yellow leaf curl virüs* (TYLV), *Cucumber mosaic virüs* (CMV) ve *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)'e vektörlük yapmaktadırlar. Bu vektörler ile mücadele ise üretim kalitesini etkilemektedir. Toprak parazitleri bakımından da en önemli zararlar, *Meloidogyne* cinsi nematodlar tarafından meydana gelmektedir. Bu zararlı, köklerde iletim demetlerinin tıkanmasına ve bitkinin daha az gelişmesine, ayrıca yüksek sıcaklıklarda solgunluğa neden olmakta, besinlerin emilimini engelleyen bitki nodülleri oluşturmaktadır. Bu etmenin kontrolü için toprak dezenfeksiyonun yapılması gerekmektedir. Enfeksiyöz hastalıklar olarak da domates üzerinde *Botrytis cinerea* P., *Leveillula taurica* L., *Sclerotinia sclerotiorum* B., *Fusarium oxysporum* S., *Verticillium dahliae* K. gibi zararlı etmenler sayılabilir (Anonim 2018).

Bakteriyel kökenli hastalıklar söz konusu olduğunda, en önemlileri *Clavibacter*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* ve *Erwinia* cinslerine ait türlerin neden olduğu hastalıklardır. Fungal ve bakteriyel olan hastalık etmenleri yetiştiricilik yapılan alanlarda bitki koruma ürünleri ile nispeten kontrol altına alınabilirken virüs hastalıklarına karşı geliştirilmiş etkili bir ilaç yoktur. Bu nedenle bitki yetiştirilen alanlardaki en önemli hastalıklar virüs hastalıklarıdır. Bitki virüs hastalıkları ile mücadele, virüs hastalıkları yetiştiricilik yapılan alanlara gelmeden önce yapılan kültürel önlemlerle ve vektörlerle mücadele edilerek sağlanabilir. Virüs hastalığı bir bitkide gelişmeye başladığı zaman, o bitkinin yetiştiricilik yapılan alandan uzaklaştırılarak imha edilmesi gerekmektedir. Bazı durumlarda ise vektör yoğunluğunun ve hastalığın yayılma eğilimi o kadar fazladır ki,

istenilen alanlarda yetiştiricilik yapılması için şiddetli enfeksiyon meydana getiren virüse karşı konukçusu olmayan çeşitlerin tercih edilmesi gerekebilmektedir (Anonim 2018).

TSWV'nin ülkemizde özellikle Akdeniz kuşağı boyunca üretim yapılan domates ve biber alanlarında ciddi ekonomik kayıplar meydana getiren virüsler sıralamasında ilk sıralarda almaktadır.

Domates üretimi yapılan alanlarda karşılaşılan en büyük problemlerden biri Domates Lekeli Solgunluk Virüsü'nün meyve üzerinde meydana getirdiği hasarlardır. Hastalık, meyve üzerindeki yoğun belirtilerinden dolayı domatesin ekonomik değerinin çok düşmesine ve verim kayıplarına neden olarak domates tarımının yapılmasını neredeyse imkânsız kılmaktadır. Bu virüse karşı domateslerde bulunan Sw-5 geni vasıtasıyla uzun bir dönem dayanıklılık sağlanırken son zamanlarda bu gene karşı dayanıklılığı kıran izolatın ortaya çıkışıyla artık piyasada dayanıklı çeşit bulunamamaktadır.

Dünyada ve ülkemiz için çok önemli bir hastalık olan TSWV domates üretim alanlarını sınırlandırma kapasitesine sahip olan bir hastalıktır. Dayanıklılığı kıran izolatın ortaya çıkması ile de bu hastalık için oluşturulan dayanıklı çeşitlerin üretiminin yapılamamasına neden olmuştur. Dayanıklı çeşitler geliştirebilmek için dayanıklılığı kıran TSWV izolatların biyolojik ve moleküler karakterizasyonunun belirlenip tüm genom yapısının ortaya konulması gerekmektedir. Dayanıklılığı kıran izolat ile kırmayan izolatın nükleotit karşılaştırılması yapılarak mutasyonların belirlenmesi gerekmektedir. Ülkemizde bu konularda çalışmanın yapılmamış olması üzerine bu tez çalışması planlanmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Domateste Zarar Meydana Getiren Virüsler

Domates (*Solanum lycopersicum*) Solanaceae (Patlıcangiller) familyasına ait ucuz, lezzetli, bol vitamin ve mineral kaynağı olmasından dolayı en çok tüketilen ve üretilen sebzelerin başında yer almaktadır. Domatesin hobi bahçeciliğinden, tarla ve serada yetiştirilmesine kadar geniş bir yelpaze içerisinde üretimi gerçekleştirilmektedir. Ülkemiz yetiştiricilik sırası göz önüne alındığında bölgemizin stratejik bir ekonomik faaliyetini oluşturmaktadır. Bu niteliklerinden dolayı da üreticilerin önemli bir gelir kaynağı içerisinde yer almaktadır. Ege ve Akdeniz Bölgeleri'nde büyük miktarlarda salçalık ve sofralık tüketime yönelik domates yetiştiriciliği yapılmaktadır. Ülkemizin iklim şartlarının domates yetiştirilmesi için çok uygun oluşu, bu sebzeyi işleyecek sanayinin 1970'li yıllardan itibaren hızla kurulmuş olması, bu sebzeyle olan yönelimi hızlandırmış ve ülkemiz, domates üretiminde dünya ülkeleri arasında alt sıralardan üst sıralara hızla tırmanarak Amerika ve İtalya gibi üretim devlerinin arasına girmiştir (Vural vd. 2000).

Sebze üretimi yapılan alanlarda, fide döneminden hasata kadar geçen gelişme döneminde 200'den fazla bakteriyel, fungal ve viral kökenli hastalık etmeni domates ve biber bitkisine zarar meydana getirmektedir (Güldür 1995). Bu patojenler bitkilerin yapraklarında klorotik ve nekrotik alanlar, mozayik, küçülme ve deformasyon, gövde üzerinde nekroza dönüşen yağ görünümlü alanlar, gövde içinde öz boşalması, meyvelerde çürüklük, klorotik ve nekrotik lekeler, genel olarak bitki boyunda kısalma ve sararma gibi belirtilere neden olmaktadır.

Virüs hastalıkları, kimyasal mücadelesinin olmamasından dolayı domates yetiştirilen alanlarda oldukça büyük bir tehdit faktörünü oluşturmaktadır. Yetiştiriciler bu özelliğinden dolayı virüs hastalıklarının zararlarından korunmak için vektör mücadelesi yapmakta ve aynı zamanda dayanıklı çeşitler kullanmaya yönelmektedir. Virüs hastalıklarının görülme sıklığı iklime, çeşide, yetiştirme zamanına, vektör yoğunluğuna ve çiftçi bilincine göre değişmekle beraber, dünya genelinde açık alan ve seralarda yetiştirilen domateslerde en fazla zarar yapan virüsler; *Tomato mosaic virus*(TMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) ve *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)'tür. Bu virüsler tek enfeksiyon iken dahi büyük zararlar meydana getirebilmektedir. Bir bitki veya tarlada virüsler, karışık enfeksiyonlara da neden olabilmektedir. Karışık enfeksiyonlar, virüslerin tek başına neden olabileceğinden daha şiddetli belirtilere neden olabilmektedir.

Bunlar içerisinde, Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV) domates ve biberlere zarar veren ve ekonomik anlamda büyük kayıplara neden olan en önemli virüslerden bir tanesidir. TSWV, domates ve biber bitkisinden başka, karpuz, marul, bezelye, bakla, yerfıstığı ve patates gibi birçok kültür bitkisinde de zarar yapmaktadır.

Ayrıca, birçok süs bitkisi ve yabancı otların da bulunduğu çok geniş bir konukçu dizisine sahiptir (Goldbach ve Peters, 1994).

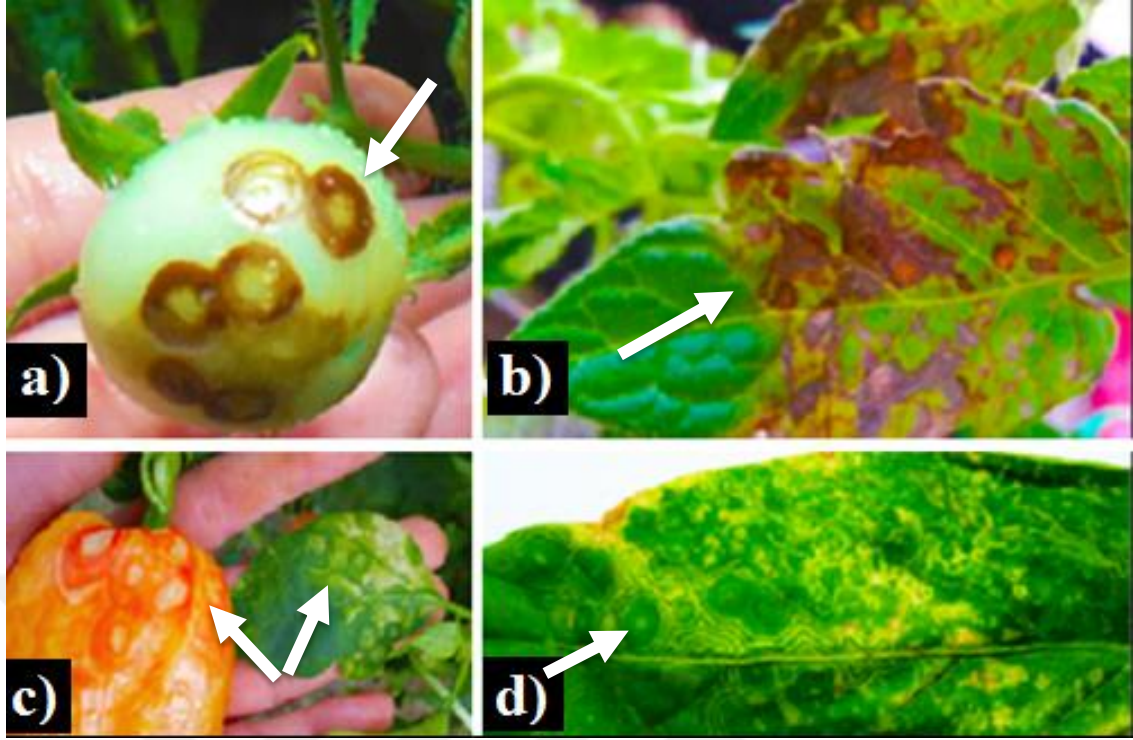
2.2. TSWV'ye Ait Simptomlar ve Genel Bilgiler

Domates tarımı yapılan alanlarda en sık rastlanan sorunlardan birisi virüs hastalıklarıdır. Bu alanlarda en sık rastlanan virüslerin başında ise Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (*Tomato spotted wilt virus* – TSWV) gelmektedir. *Bunyaviridae* familyası içerisinde *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus*, *Orthobunyavirus* ve *Orthospovirüs*'lerini bünyesinde bulunduran bitki ve hayvanlarda önemli hastalıklara neden olabilen geniş ve zararlı bir familyadır (Saidi ve Warade 2008; Pappu vd 2009). Son zamanlarda *Bunyaviridae* familyası üyelerinde yeniden düzenlemeler yapılarak önceden *Tospovirüsler* içerisinde yer olan TSWV'nin üyesi olduğu grup *Orthospovirüsler* olarak değiştirilmiştir (Adams vd. 2017).

TSWV ile enfekte olmuş domatesler, çok çeşitli belirtiler sergilemektedir. TSWV belirtilerinin görünüşü ve şiddeti; genotipe, gelişme dönemine , virüs izolatına ve çevresel şartlara bağlıdır (Adkins 2000). TSWV'nin domates ve biber bitkileri üzerinde meydana getirdiği belirtiler Şekil 2.1., 2.2., 2.3. ve 2.4'de gösterilmeye çalışılmıştır.



Şekil 2.1. Domateste TSWV'ye ait yaprak belirtileri



Şekil 2.2. TSWV'nin biber ve domates bitkileri üzerindeki dairesel, iç içe geçmiş lekeler. **a)** Domates meyvesi üzerinde TSWV belirtileri; **b)** Domates yaprağı üzerinde TSWV belirtileri; **c)** Biber meyvesi üzerinde TSWV ait belirtiler; **d)** Biber yaprağı üzerinde TSWV ait belirtiler.

Enfeksiyon, bitkilerde sistemik olarak meydana gelmekte, bitkinin gelişim evrelerinin erken safhalarında ise çok daha yıkıcı zararlar doğurabilmektedir. TSWV enfeksiyonunun domates yaprakları üzerinde karakteristik bir symptom olan morumsu kahverengimsi nekrotik lekeler meydana getirdiği belirtilmiştir (Debreczeni vd. 2015). Meyve belirtileri genellikle olgun meyvenin üzerinde eş merkezli halkalara ve yeşil, sarı veya daha açık tonlara sahiptir (Rodriguez vd. 2007) Şekil 2.1.3.'de gösterilmeye çalışılmıştır. Meyveler üzerinde meydana getirdiği deformasyonlar nedeniyle kalitenin düşmesine bağlı olarak ticarileşmesini önleyen bir etmendir (Aramburu ve Aos 2001). Meyve üzerinde meydana getirdiği belirtiler ise Şekil 2.1.4.'de gösterilmeye çalışılmıştır.



Şekil 2.3. TSWV'ye ait yaprak belirtileri

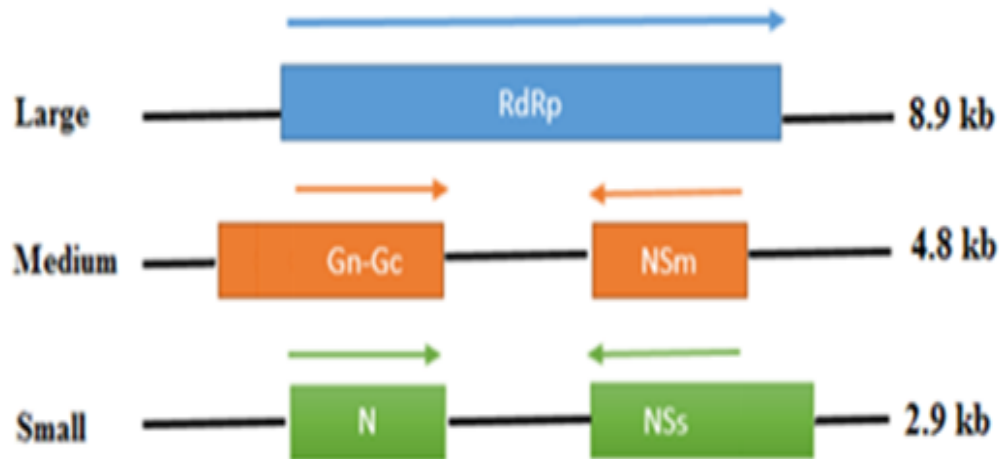


Şekil 2.4. TSWV'nin domates üzerindeki halka şeklinde belirtileri

2.3. TSWV'nin Genom Yapısı ve Morfolojisi

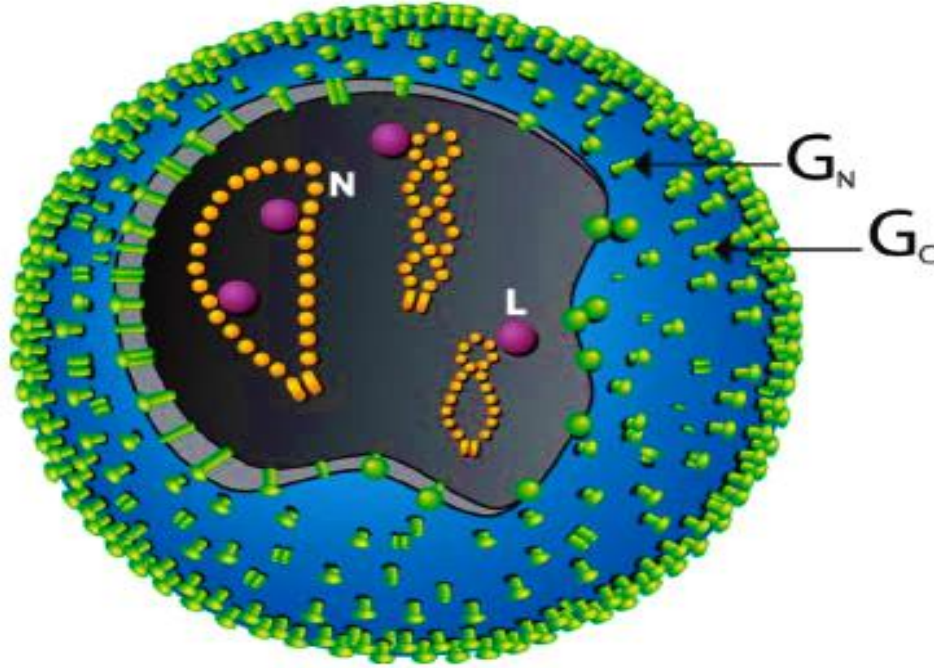
Domates Lekeli Solgunluk Virüsü, *Bunyaviridae* familyasının *Orthospovirüs* cinsi içerisinde yer almaktadır (Adams vd. 2017). *Bunyaviridae* familyası 5 cinse yayılmış 97 tür içermektedir: *Hantavirus* (24 tür), *Nairovirus* (7 tür), *Orthobunyavirus* (48 tür), *Phlebovirus* (9 tür) ve *Orthospovirüs* (9 tür). *Orthospovirüs*ler bu aile içerisinde bitkileri hastalandırabilen tek cinstir. Diğer virüsler insanlarda ve memelilerde enfeksiyonlar meydana getirebilmektedir (Briese vd. 2013; Granval ve Gracia 1999; King vd. 2011; Rodriguez vd. 2007).

*Orthospovirüs*lerin yapısı incelendiğinde yarı küresel zarflı parçacıklardan oluştuğu ve tek iplikçikli, doğrusal ambisens bir RNA bulundurduğu belirlenmiştir. Genomu 17,2 kb büyüklüğünde olup üç segmente ayrılmaktadır: S (2,9kb), M (4.8kb) ve L (8.8kb). Bu segmentler, L (büyük), M (orta) ve S (küçük) segmentler olarak boyutlandırılır. L segmenti (~ 9 kb), tamamlayıcı iplikçikten RNA'ya bağlı bir RNA polimerazı (RdRp) veya L proteinini kodlar (de Haan vd. 1991). M ve S segmentleri, kodlayıcı olmayan intergenik bölgelerde üst üste binen iki zıt polarite transkriptini kodlayan ambisens yapısına sahiptir. M segmenti (~ 4.9 kb), hücreden hücreye hareketi ile ilişkili yapısal olmayan bir M proteinini (NSm) kodlar (Kormelink vd. 1994; Lewandowskia ve Adkins 2005) ve glikoprotein prekürsörü (GP) virüs-thrips etkileşimlerinde yer alan viral zarf (Kikkert vd. 2001) bölümünü kodlar. S segmenti (3 kb) nükleokapsid proteini (N) (de Haan vd. 1990) ve yapısal olmayan RNA-susturucu süpresör proteinini (NSs) kodlar (Takeda vd. 2002). Şekil 2.3.1'de TSSWV'nin genom yapısı şematize edilmeye çalışılmıştır.



Şekil 2.5. TSWV'nin genom yapısı

Orthospovirüs'ler, lipid membranla çevrili, 80-120 nm çapında küresel parçacıklara sahiptir. Virüs parçacıkları %5 nükleik asit, %70 protein, %20 lipit ve %5 karbonhidrat içermektedir (Adkins 2000; Küçük 2006; Şevik 2007) Şekil 2.3.2'de TSWV'nin morfolojik yapısı gösterilmeye çalışılmıştır.



Şekil 2.6. TSWV'nin morfolojik özellikleri (Anonymous 2018).

2.4. Virüsün İletimi

TSWV'nin son zamanlarda dünyada, özellikle de bölgemizde domates ve biber gibi kültür bitkileri üzerinde yaptığı zararlar artan oranlar ile karşımıza çıkmaktadır. Bu hastalığın yayılmasında rol oynayan en önemli etmenlerden biri de hastalığa vektörlük yapan thripslerdir. Domates Lekeli Solgunluk Virüsü etkin bir şekilde *Thysanoptera* (alt takımı *Terebrantia*, aile *Thripidae*) takımı vektörleri tarafından, yaygın bir şekilde thripsler olarak bilinen zararlılar ile gerçekleştirilmektedir (Whitfield vd. 2005).

Thysanoptera takımı *Thripidae* familyası içerisinde yer alan thripsler sadece TSWV değil birçok bitki virüsüne de vektörlük etmektedir. Polifag bir zararlı olmakla birlikte çok geniş bir konukçu aralığına da sahiptir (Şevik 2014).

Diğer birçok *Orthospovirus*'de olduğu gibi TSWV, tripslerle persistent (sürekli) olarak taşınmaktadır. Domates Lekeli Solgunluk Virüsünün (TSWV) vektörleri, 'Batı Çiçek Tripsleri' denilen 9 tür trips (*Frankliniella occidentalis*) ve Soğan Trips (*Thrips tabaci*) olarak tanınmaktadır. *Thrips tabaci*, *T.setosus*, *T.palmi*, *Frankliniella occidentalis*, *F.fusca*, *F.intonsa*, *F.schultzei* ve *Scirtothrips dorsalis* türleri ile etkin olarak

taşıyabildikleri bildirilmektedir (Rosello vd. 1996). TSWV'nin taşınmasında en etkili vektör batı çiçek thrips'i *F. occidentalis* ve tütün thrips'i olarak bilinen *T. tabaci* olarak bildirilmiştir (Todd vd. 1995; Mandal vd. 2001). Ülkemizde de yapılan çalışmalarda TSWV'nin yayılmasında etkili olan iki önemli vektörün, *Frankliniella occidentalis* ve *Thrips tabaci* olup tarla ve sera ürünlerinde hastalığın yayılmasına neden olduğu belirtilmiştir (Lodos 1982, Tunç 1985, Tunç ve Göçmen 1995; Coutts ve Jones 2003). Şekil 2.4.1'de TSWV'nin etkin vektörü gösterilmeye çalışılmıştır.

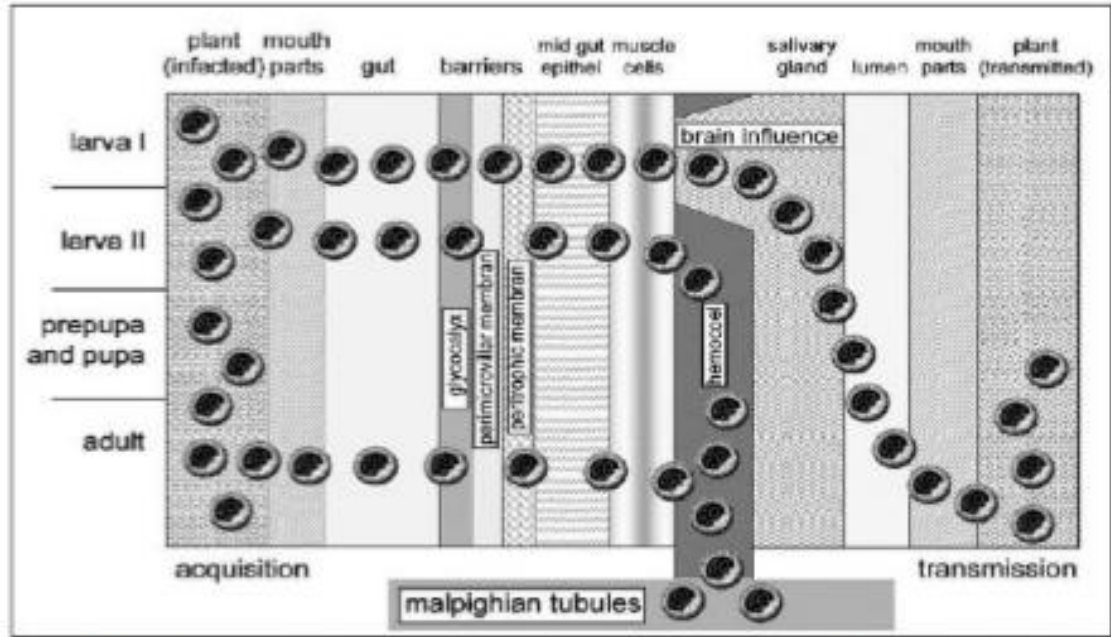


Şekil 2.7. Thrips vektörü. (<http://russellipm-agriculture.com/frankliniella-occidentalis-thrips/>)

Thripslerin gelişim dönemleri yumurta, larva, prepupa, pupa ve ergin dönemleri olmak üzere ayrılırlar ve bunlar sırasıyla 2-3, 4-5 ve 10-30 gün sürmektedir. TSWV enfeksiyonunun epidemiyolojisinde ise en önemli dönem ergin dönemleridir. Larva döneminde bünyesine virüsü alan vektör persistent olarak konukçulara taşınımını gerçekleştirmektedir (German vd. 1992)

Tospovirüs-thrips ilişkisinde, thripslerin biyolojik dönemi kritik rol oynamaktadır (Nagata ve Peters 2001). Thripsler neometabola (yumurta, 2 nimf dönemi, prepupa, pupa ve ergin) başkalaşım geçirirler. Thripsler tarafından 1. larva ve 2. larva dönemlerinde virüs kazanılır. 1. larva döneminde edindiği virüsü tüm yaşamı boyunca bünyesinde barındırır. 2. larva döneminde ve yetişkin dönemde ise virüs kazanımı azdır. Hemocel'den Malpighian tüplerine gelir oradan dışarıya atılır. Bu olay Şekil 2.4.2'de gösterilmeye çalışılmıştır. Thripsler tarafından esas taşınma ise ergin dönemde gerçekleşmektedir. Thripslerin 1. larva döneminde primer tükürük bezleri, orta bağırsak ve iç organ kasları thoraksın bir bölgesine sıkışmıştır. Virüsün vektör bünyesinde sirkülasyonu sırasında geçmek zorunda olduğu bu yapılar 2. larva dönemine kadar birbirleri ile direkt temas halindedir. Bu dokulardaki yakınlık ve temas sayesinde larva döneminde virüsler orta bağırsak ve kas hücrelerinden salgı kanallarına taşıyabilmektedir. Böcekler geliştikçe, bu organlar birbirinden uzaklaşmaktadır. Bu organların ayrılması ve uzaklaşması, dokular arasındaki virüs hareketinin engellemesi ile sonuçlanmaktadır. Yine

bu sonuçlar larva döneminde virüsün kazanılabildiğini açıklamaya yardımcı olmaktadır (Moritz vd. 2004).



Şekil 2.8. Larva ve ergin döneminde kazanılan virüsün taşınım aşamaları (Whitfield vd. 2005). 1; enfekteli bitki hücrelerinden virüs partiküllerinin kazanılması, 2; virüslerin thrips bünyesinde bağlanabileceği özel bölgelere ulaşması, 3; virüsün vektör bünyesinde replikasyonu, 4; thripslerin beslenmesi sırasında virüs partiküllerinin salgı ile tekrar sağlıklı bitkilere aktarılması, 5; bitki hücrelerinde enfeksiyon bölgesine virüs partiküllerinin dağılması, şeklinde meydana gelmektedir.

TSWV'nin thripsler ile taşınması oldukça karmaşık bir ilişkiye sahiptir. Thripslerin TSWV'yi taşımasına ait bir araştırmada en önemli thrips türü olan *F. occidentalis*'in TSWV'yi taşıma kapasitesinin dişi ve erkek bireyler arasındaki rolü açıklanmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada *Capsicum annum* yaprakları üzerinde beslenen *F. occidentalis* (batı çiçek thripsi) kullanılarak Domates Lekeli Solgunluk Virüsü'nün taşıma kapasitesi dişi ve erkek bireyler arasında belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışma sırasında sağlıklı yapraklar üzerine pupalar ayrı ayrı aktararak; hayatta kalma süreleri, gelişme oranları, erkek ve dişi bireyler arasında beslenme davranışları da irdelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre erkek bireylerin dişi bireylere göre daha uzun ömürlü olduğu, daha düşük ölüm oranına sahip olduğu ve daha kısa bir gelişim süresi geçirmesine rağmen dişilerin TSWV'ye maruz kalmalarına ya da kalmamalarına bakılmaksızın daha yoğun bir beslenme periyodu geçirdiği belirlenmiştir. Virüsün iletim verimliliği açısından yapılan incelemede en iyi aktarma yüzdesine dişi bireylerin sahip olmasına rağmen, başarılı bir aktarma döneminden sonra konukçuda virüsün gelişmesinde erkek bireylerin dişi bireylere göre daha yüksek orana sahip olduğu vurgulanmıştır. Bu çalışmada elde edilen bulgular bir *F. occidentalis* popülasyonunun TSWV iletkenliğinin değişkenliğini

kısmen açıklanmaktadır ve TSWV'nin bulaşmasındaki biyolojik faktörler hakkında bilgiler sunmaktadır (Ogada vd. 2015).

Hastalık üçgeni (virüs, vektör ve konukçu) üzerindeki karmaşık ilişkiyi konu alan başka bir çalışma verilerine göre de TSWV'nin *F. occidentalis* ile etkili bir şekilde taşınması üzerine bir çalışma yürütülmüştür. Bu çalışmada *F. occidentalis*'in tercihli bir davranış yaparak sağlıklı bitkiler üzerinde beslenmeleri sonucunda, hastalık yoğunluğunda %33'e varan bir artış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada vektör tabanlı modellemelerin geliştirilmesinin, kültür bitkileri üzerinde virüs hastalıklarının etkileşimlerinin anlaşılmasında yardımcı olabileceği ve ürünler üzerinde virüs hastalıklarına karşı konulabileceği konusunda hassas kontrol sistemlerinin geliştirilebileceği vurgulanmıştır (Ogada vd. 2016).

2.5. Virüsün Konukçuları

Domates Lekeli Solgunluk Virüsü polifag bir virüstür. Domates, biber, marul, tütün, yerfıstığı ve farklı süs bitkileri bu virüsün konukçularındandır. TSWV; 15 monokotiledon ve 69 dikotiledon familya olmak üzere toplam olarak 84 familyada 900'den fazla bitki türünde hastalık oluşturabilmektedir. Ayrıca yabancı otlar ve süs bitkileri virüs kaynağı olarak bildirilmiştir (Gordillo vd. 2008).

Arlı Sökmen ve ark (2005), Samsun ilinde biber üretim yerlerinde birçok virüs hastalığı olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı araştırmacılar, 1998 ve 1999 yılları arasında bu virüsleri tespit için toplam 313 örnek almış ve ELISA ile testlemişlerdir. Bu örneklerde AMV, CMV, PVY, ToMV, TMV ve TSWV olmak üzere 6 adet virüs tespit edilmiş, ayrıca TSWV' nin birçok yabancı ot üzerinde de varlığı ortaya konulmuştur. Bu çalışma ile biber tarlalarında bulunan bu yabancı otların aynı zamanda biberler için TSWV enfeksiyon riski meydana getirdiğini bildirmişlerdir.

Şevik (2007), TSWV' nin domates üretim alanındaki zamana ve mesafeye bağlı olarak thrips türleri ile yayılışının, virüs taşınmasında etkili olan vektör türleri ve bunların hastalığın bulaşma ve yayılmasındaki rollerinin saptanması amacıyla 2004 yılında yaptıkları çalışmada, 2100 m²'lik bir alana 4080 domates bitkisi dikmişler ve TSWV ile bulaşık bitkileri haftalık olarak izlenmesi sonucu, vektör popülasyonu ile ilişkisini araştırmışlardır. Bu amaçla, TSWV- domates izolatu ile inokule edilmiş 15 adet domates bitkisi, inokulum kaynağı olarak deneme alanının merkezine bırakılmış ve daha sonra bu infekteli bitkiler 15 gün ara ile yenileriyle değiştirilerek virüs konsantrasyonunun sürekli olarak yüksek seviyede tutulması sağlanmıştır. Deneme alanındaki toplam bitki sayısının % 6'sını oluşturacak şekilde on hafta boyunca 240 bitkiden örnek alınmış ve DAS-ELISA yöntemiyle testlenmiştir. Aynı zamanda haftalık olarak araziye yerleştirdikleri tuzaklardaki thrips türlerinin popülasyonundaki değişiklikler de takip edilmiştir. Yaptıkları çalışmada deneme alanında *Frankliniella intonsa*, *Trybom* ve *Thrips tabaci* *Lindeman* türü thripsleri tespit etmişler ve thrips popülasyonu ile infekteli bitki sayısı

arasındaki ilişkiyi istatistiki olarak $P < 0.01$ düzeyinde önemli bulmuşlardır. Araştırmacılar, inokulum kaynağının araziye bırakılmasından üç hafta sonra, inokulum kaynağına 24.5 m ve 25 m uzaklıktaki iki bitkinin infekteli olduğu, yeni infekteli hale gelen bitki sayısının sekizinci haftaya kadar artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, bu çalışmada domatesten izole edilen TSWV- Samsun izolatının domates ve tütünden tekrar domatese *T. tabaci* bireyleri ile taşınabilirliği biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemlerle belirlenmiştir.

TSWV'nin dağılım ve yayılımında, thrips vektörlerinin aktif taşıma özelliklerinin yanı sıra bu virüsün çok geniş bir konukçu ağına sahip olması da yatmaktadır. Kültüre alınmış tarım ürünlerinden yabancı otlara, süs bitkilerine kadar çok geniş bir konukçu aralığına sahip olması epidemiyolojisine katkıda bulunmaktadır. Konukçusu olan tarım ürünleri; *Cynara cardunculus*, *Solanum melongena*, *Capsicum annuum*, *Cichorium intybus* L., *cucurbits*, *Vicia faba*, *Lactuca sativa*, *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum lycopersicumes*, *Cicer arietinum*, *Lens culinaris*, *Alstroemeria*, *Anemone*, *Antirrhinum*, *Araceae*, *Aster*, *Begonia*, *Bouvardia ternifolia*, *Calceolaria*, *Callistephus*, *Celosia*, *Cestrum*, *Columnea*, *Cyclamen*, *Dahlia*, *Dendranthema x grandiflorum*, *Eustoma*, *Fatsia japonica*, *Gazania*, *Gerbera jamesonii*, *Gladiolus*, *Hydrangea*, *Impatiens*, *Iris*, *Kalanchoe*, *Leucanthemum*, *Limonium*, *Pelargonium*, *Ranunculus*, *Saintpaulia*, *Senecio cruentus*, *Sinningia*, *Tagetes*, *Verbena*, *Vinca* ve *Zinnia* olarak sıralanırken yabancı ot konukçuları *Amaranthus* spp., *Conyza bonariensis*, *Galinsoga* spp., *Polygonum lapathifolium*, *Portulaca oleracea*, *Senecio vulgaris*, *Solanum nigrum*, *Sonchus* spp., *Stellaria media*, *Taraxacum officinale* olarak sıralanmıştır (Parrella vd. 2003).

Kenya'da tarım yapılan alanlarda TSWV'den kaynaklanan zararların artmasından dolayı, hastalığın etkin vektörü ve konukçuları hakkında bir çalışma yapılmıştır. Yetiştirilme alanlarından toplanan 43 yabancı ottan örnekler alınarak TSWV'nin konukçusu olup olmadığına bakılmıştır. Alınan 43 bitki örneğinden 29 tanesinin TSWV'nin konukçusu olduğu belirlenmiştir. TSWV'nin konukçusu olarak saptanan bitkiler *Amaranthus hybridus*, *Solanum nigrum*, *Tagetes minuta* ve *Datura stramonium* olup, bu bitkilerde virüsün thrips vektörü ile aktif olarak taşındığı belirlenmiştir. Ortamda en etkili vektörün *F. occidentalis* olduğu belirtilmiştir. Çalışmada TSWV'nin yönetim ve epidemiyolojisi için konukçusu olabilecek yabancı otların önemli bir yer tuttuğu belirtilmiştir (Macharia vd. 2016).

2.6. Hastalığın Bulunuşu ve Dünyadaki Farklı Konukçular Üzerindeki Yayılımı

Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV) ilk olarak, 1915 yılında Brittlebank tarafından Avusturalya'da domates bitkisi üzerinde tespit edilmiştir. Viral orijinli olduğu ise, Samuel ve arkadaşları tarafından 1930 yılında ortaya konulmuştur. Yapısal morfolojisi, konukçu aralığı ve thrips vektörleri ile bulaşma özelliklerine göre de ilk kez 1970'de bir sınıflandırılmaya tabi tutulmuştur. TSWV'nin ilk kaydından başlayarak

geçen süre içerisinde dünyada yetiştiricilik yapılan alanlarda en yıkıcı on virüs içerisinde nitelendirilmiştir (German vd. 1992). Son yıllarda büyük ekonomik öneme sahip olan bu virüs dünyanın birçok domates üretim bölgesinde yaygın olarak görülmeye başlanmış, Kuzey ve Güney Amerika, Avrupa ve Asya kıtalarına kadar yayılmıştır (Lewandowski vd. 2005).

TSWV, ülkemizde ilk olarak Akdeniz Bölgesi zirai alanlarında saptanmıştır. (Tekinel vd. 1969), Mersin ili çevresinde yetiştirilen biber, patlıcan, marul ve fasulyelerde bulunan hastalıkları belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, maruldaki belirtilerin TSWV etmenine bağlı olabileceği yönünde bazı bulgu elde etmişlerdir. Bundan sonra TSWV etmeninin neden olduğu hastalık ilk kez Çanakkale’de tütün yetiştirilen alanlarda görülmüş, bunun ardından Balıkesir, Manisa, Uşak ve Samsun illerinde de saptanmıştır (Azeri 1981). Hastalık İzmir ve Manisa’da önemli zararlara neden olmuştur (Azeri 1994). Demre’den Kahramanmaraş’a kadar uzanan Akdeniz sahil kuşağında 1994 yılında yapılan bir survey çalışmasında biberlerdeki hastalıklar belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmada örnek alınan yedi farklı lokasyonda, diğer birçok virüs hastalık etmeni bulunmuş olmasına karşın henüz o yıllarda TSWV etmenine rastlanmamıştır. Akdeniz Bölgesi’ne virüsün girişi, ilk 1995 yılında İçel ili ve çevresinde açık alanda yetiştirilen domates bitkilerinde tespit edilmesiyle anlaşılmıştır (Güldür vd. 1995). 1997 yılında Şanlıurfa’da domates yetiştirilen alanlarda tarafından TSWV etmeninin bulunduğu ilk kez rapor edilmiştir (Güldür 1997).

İtalya’da 2000 yılında yapılan bir çalışmada *Euphorbia eritrea* bitkileri üzerinde klorotik ve nekrotik lekeler meydana getiren örnekler toplanmıştır. Bu örneklerde ELISA yöntemi ile TSWV varlığı belirlenmiştir. 2002 yılında da *Asclepias curassavia* üzerinde TSWV varlığı ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Bu çalışma bu bitkiler üzerinde TSWV’ye ait ilk rapor olmaktadır (Salomone vd. 2000).

Mersin ilinde yapılan survey çalışmalarında bir süs bitkisi olan *Ranunculus arvensis* L. üzerinde; sararma, mozayik, nekrotik lekeler ve cücelik semptomlarına rastlanılmıştır. Semptomlu ve semptomsuz olarak toplanan 38 örnek DAS ELISA yöntemi ile test edilmiş ve TSSWV ile enfekteli olduğu bulunmuştur. Ayrıca Dr. E Atakan tarafından yapılan bir görsel tanılama ile de *Ranunculus arvensis* L. üzerinde batı çiçek thripsisi olarak bilinen *Frankliniella occidentalis*’in etkin vektör olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada Türkiye’de ilk kez *Ranunculus arvensis* L. ve *R. Muricatus* üzerinde TSWV’nin doğal enfeksiyonun olduğu saptanmıştır (Kamberoğlu vd. 2005).

Arlı-Sökmen ve Şevik (2006), domatesleri enfekte eden virüslerin tespit edilmesi ve yoğunluğunun ortaya konulması amacıyla, 2002 ve 2003 Mayıs ayları arasında Samsun’da yaptıkları survey çalışmasında, 31 adet tarladan 186 domates örneği almışlar ve ELISA yöntemi ile testlemişlerdir. Testlenen örneklerde, ToMV, TSWV, PVX ve CMV enfeksiyonlarını bildirmişlerdir. ToMV, TSWV, PVX ve CMV’ nin sırasıyla, % 52.1, 12.9, 10.7 ve 6.9 sıklığında tespit ettiklerini rapor etmişlerdir. 30 tane örnekte

karışık infeksiyon tespit ettiklerini belirtmişlerdir (% 16.1). En yaygın ve dominant olan ToMV ve TSWV (% 6.4), PVX (% 4.9), ve CMV (% 3.2) karışık infeksiyon meydana getirdiği rapor edilmiştir.

Şevik (2007) tarafından Samsun ili ve çevresinde domates yetiştirilen alanlarda yapılan bir çalışmada, virüs hastalıklarının özellikle son yıllarda üretimi etkileyen bir problem haline geldiği kaydedilmektedir. Bu çalışmada, domateste zarar oluşturan virüslerin başında Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV)'nün geldiğini bildirmektedir. TSWV'nin Samsun ilinde domates üretim alanlarındaki bulunuş ve yayılış oranlarının saptanması, bölgede virüs taşınmasında etkili olan vektör türlerinin ve bunların hastalığın bulaşma ve yayılmasındaki rollerinin belirlenmesinin amaçlandığı çalışmada; 2002 yılında 55 farklı alandan 295, 2003 yılında 45 alandan 265 olmak üzere toplam 560 adet örnek toplanmıştır. 2002 yılında örneklerin %14.6' sının, 2003 yılında ise %18.11'inin TSWV ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Araştırmacı, TSWV'nin domateste %42.1 oranında ürün kaybına ve %95.5 oranında pazarlanabilir değer kaybına sebep olduğunu ifade etmektedir.

Marmara Bölgesi'nde (Bilecik, Bursa ve Sakarya) yapılan çalışma sonucunda testlenen bitki örneklerinin %5-78 oranında TSWV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir (Değirmenci ve Uzunoğulları, 2007). Bu ve diğer çalışmalar TSWV' nün ülkemizin önemli domates üretim bölgelerinin tümünde yaygın olarak bulunduğunu göstermiştir.

Ülkemizin en önemli domates üretim bölgesi olan Antalya ve bazı ilçelerinde yapılan bir çalışma sonucunda, testlenen domates örneklerinden %80, biber örneklerinden %91 ve marul örneklerinden %93 oranında TSWV ile enfekteli bitki bulunmuştur (Bozdoğan, 2009).

Batı Akdeniz bölgesinde yapılan bir çalışmada domates, biber, patates, marul, kabak ve hıyar yaprak örnekleri alınarak 12 bölgeden 337 örnek kullanılmış ve DASELISA yöntemiyle testlenmiştir. Sonuçta 157 örnek TSWV ile infekteli bulunmuştur (Yardımcı ve Kılıç, 2009).

2006 ve 2007 yıllarında kış ve yaz döneminde Mersin (Doğu Akdeniz Bölgesi) açık yetiştiricilik yapılan alanlarda ve Antalya (Batı Akdeniz Bölgesi) örtüaltı yetiştiricilik yapılan alanlarda patlıcan bitkilerinden TSWV semptomuna benzer semtom gösteren bitki örnekleri toplanarak ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile tanımlanmıştır. Bu çalışmada elde edilen rapora göre ülkemizde ilk defa bu hastalık etmeni virüsün patlıcan bitkisinde görüldüğü belirtilmiştir (Kameroğlu vd. 2009).

Isparta ve Burdur illerinde 2014 yılında domates üretim alanlarında TSWV benzeri semptomlar gösteren bitki örnekleri toplanarak DAS-ELISA yöntemi ile TSWV'nin varlığı belirlenmeye çalışılmıştır. DAS-ELISA sonuçları negatif çıkan örnekler ile RT-PCR çalışması yapılmış ve örneklerin TSWV ile bulaşık olduğu

belirlenmiştir. Yapılan bu çalışma TSWV'nün teşhisinde RT-PCR yönteminin DAS-ELISA yönteminden daha hassas olduğunu göstermiştir (Yardımcı vd. 2014).

Hatay ilinde 2011-2012 yıllarında yapılan arazi çalışmalarında, marul (*Lactuca sativa*) ve ıspanak (*Spinacia oleracea*) bitkilerinin yapraklarında kabarıklık, aşağı veya yukarı doğru kıvrılma, gevrekleşme, mozaik, klorotik veya nekrotik lezyonlar, halkalı lekeler, damar açılması, damar nekrozu, bitkide bodurluk, şiddetli kloroz ve ölüm gibi belirtiler gözlenmiştir. Bu marul ve ıspanak bitkilerinden alınan yaprak örnekleri biyolojik (mekanik inokulasyon) ve serolojik (DAS-ELISA) yöntemler ile *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Beet western yellows virus* (BWYV), *Mirafiori lettuce big vein virus* (MiLBVV), *Lettuce mosaic virus* (LMV), *Tobacco mosaic tobamovirus* (TMV), *Tobacco ring spot virus* (TRSV) ve *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) yönünden test edilmiştir. Marul ve ıspanak bitkilerinden alınan örneklerde sırası ile %67.9 ve %38.8 oranında virüs enfeksiyonu saptanmıştır. Test edilen 53 adet marul örneğinde LMV (%47,1), MiLBVV (%11,3), TSWV (%5,6) ve CMV (%3,7), 18 adet ıspanak örneğinde ise CMV (%16,6), TSWV (%11,1) ve LMV (%11,1) belirlenmiştir. Hatay ilinde yetiştirilen ıspanak bitkilerinde, TSWV ve LMV enfeksiyonu ilk kez belirlenmiştir. *Conyza (Erigeron) canadensis* örneklerinde LMV ve TSWV, *Sonchus oleraceus* bitkilerinde LMV ve *Cichorium intybus* bitkilerinde TSWV ilk kez belirlenmiştir (Sertkaya 2015).

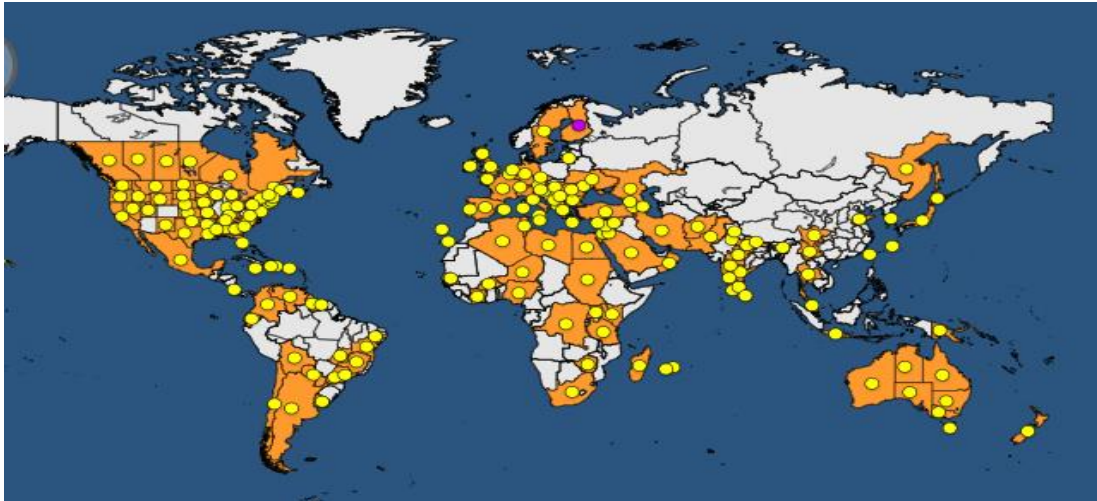
Solanum betaceum Cav. Güney Amerika'da yetiştirilen ve tüketimi yapılan *Solaneceae* familyasına ait bir meyvedir. 2014-2015 yılları arasında Ekvator'un Azuay bölgesinde *Solanum betaceum* Cav. üzerinde TSWV'ye ait tipik belirtiler gösteren örnekler toplanmıştır. TAS-ELISA ve RT-PCR teknikleri kullanılarak belirtilerin TSWV'ye ait olduğu belirlenmiştir. Yapılan filogenetik çalışmalar doğrultusunda da *Solanum betaceum*'un Japonya'dan elde edilen dizi analizleri ile grup oluşturmuştur. Bu çalışma, Ekvator bölgesinde *Solanum betaceum*'a ait ilk TSWV raporudur (Yeturu vd. 2016).

Antalya'da *Anthurium sp'de (Anthurium scherzerianum)* bitkileri yetiştirilen alanlarda 2015 yılında yapılan gözlemlerde virüs benzeri belirtilere rastlanılmıştır. Flamingo çiçeği olarak bilinen bitkilerinin yapraklarında, sistemik klorotik mozaik ve düzensiz sarımsı koyu kahverengi nekrotik lekeler gözlenmiştir. Tanılama için yaprak DAS-ELISA tekniğine göre AMV (Alfalfa Mosaic Virus), ArMV (Arabis Mosaic Virus), CMV (Cucumber Mosaic Virus), Poty (Group Poty Virus), SLRSV (Strawberry Latent Ringspot Virus), TMV (Tobacco Mosaic Virus), TNV (Tobacco Necrosis Virus), ToMV (Tomato Mosaic Virus), ToRSV (Tomato Ringspot Virus), Tospogrup (Tospovirus), TRSV (Tobacco Ringspot Virus), TSWV (Tomato Spotted Wilt Virus), Impatiens necrotic spot virus (INSV), PVX (Potato Virus X), SqMV (Squash mosaic virus) ve ZYMV (Zucchini yellow mosaic virus) gibi süs bitkilerinde bulunma olasılığı bulunan virüsler için testlenmiştir. DAS-ELISA tekniği kullanılarak pozitif sonuç elde edilen bitki örneklerinin virüs ile enfekteli olduğunun doğrulanması için RT-PCR çalışmaları

yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada Antalya ilinde üretimi gerçekleştirilen *Anthurium* bitkilerinin TSWV ile enfekteli olduğu doğrulanmıştır (Fidan vd. 2016).

TSWV'nin dünya çapında birçok tarım ürünü üzerinde zarar yaptığı bilinmektedir. Açık alanda ve serada yetiştirilen ürünler için yılda 1 milyar ABD dolarının üzerinde kayıplara neden olmaktadır. Bilinen konukçularının yanı sıra son zamanlarda dünyanın çeşitli yerlerinde farklı konukçular üzerinde TSWV varlığı saptanmaya başlanmıştır. Çin'in Shandong eyaletinde 2015 yılı Ağustos ayında kabak (*Cucurbita moschata*) bitkileri üzerinde bazı simptomlar gözlemlenmiştir. Bu bölgedeki popülasyonu da dikkate alındığında bu simptomların TSWV'ye ait olmasından şüphelenilmiştir. Toplanan örneklerin moleküler çalışması sonucunda TSWV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Araştırılan 4 dekarlık kabak tarlası üzerinde TSWV görülme yoğunluğu %0,45 olarak belirlenmiştir. Bu, Çin'de kabak üzerinde ilk TSWV kaydı olarak rapor edilmiştir (Sun vd. 2016). Zimbabwe'deki TSWV'nin coğrafik dağılımını, konukçu aralığını ve filogenisini belirlemek üzere 18 bölgeden yaprak örnekleri toplanarak yapılan bir çalışmada, bilinen konukçuların yanı sıra *Cucurbita moschata*, *Cucurbita pepo*, *Cucumis sativus* ve *Gypsophila elegans*'da ilk kez TSWV tespit edilmiştir. Dünyanın geri kalanından elde edilen izolatlarla karşılaştırıldığında, Zimbabwe'nin TSWV izolatları, İtalya, Karadağ, Yeni Zelanda ve Sırbistan'dan gelen izolatlarla yakından ilişkilendirilmiştir (Karavina ve Gubba 2017).

TSWV'nin dünya çapında yayılım desenleri incelendiğinde ve hastalığın meyve üzerindeki hasarları göz önünde tutulduğunda sebze tarımını etkileyen en önemli hastalıkların başında yer aldığı görülmüştür. Dayanıklılığı kıran izolatın ortaya çıkması ile EPPO'ya göre TSWV'nin 2018 yılında dünya üzerindeki yayılımı Şekil 2.9'da gösterilmeye çalışılmıştır (Anonymous 2018).



Şekil 2.9. TSWV'nin dünya üzerindeki yayılımı (Anonymous 2018).

2.7. Dayanıklılık Geni Sw-5 Hakkında Bilgiler

TSWV'nin çok geniş bir konukçu ağına sahip olmasına rağmen kültüre alınmış olan domates ve biber çeşitlerine dayanıklılık genleri aktararak bu hastalığa karşı son zamanlara kadar dayanıklılık sağlanmaktadır. TSWV'den kaynaklı zararları önlemenin en etkili yöntemi dayanıklı çeşit kullanılmasıdır. TSWV'ye karşı dayanıklılık domates bitkilerinde *Solanum peruvianum*'dan sağlanan Sw-5 geni ve biber bitkilerinde ise *Capsicum chinense*'den sağlanan Tsw geni aracılığı ile olmaktadır (Spasova vd. 2001).

Sw-5 geninin bitkilerde hipersensitif reaksiyona (HR) neden olduğu ve bundan dolayı bitki virüs ile bulaşık olduğunda enfeksiyonun nekrotik lokal lezyonlarla sınırlı kaldığı bildirilmektedir. Hipersensitif reaksiyonda, virüs tarafından ilk zarar gören bitki hücrelerinin hızlı bir şekilde ölümü gerçekleşir ve canlılığını yitiren hücrelerde virüs de hayatını devam ettiremeyerek ölmektedir. Bu reaksiyon, bitki dokusuna dışarıdan bakıldığında nekrotik bölgesel lezyonlar olarak yansımaktadır. Bu reaksiyon, virüsün bitki hücresine girmesiyle başlamaktadır. Virüs bitkiye girdiğinde bitkide dayanıklılık geni (dominant dayanıklılık geninin ürünü= resistance gene; R gene) hemen saldırının bulunduğu bölgede hücrelerin ölmesine neden olan reaksiyonu başlatır. Bu durumda bitkideki R geni virüsün gen ürününü (avirülens gen= avirulence gene) tanır ve ona göre virüsün çoğalarak diğer hücrelere taşınmasını engeller. Sw-5 geni taze tüketime uygun olan bir domates çeşidine 'Stevens' aktarılmıştır (Stevens vd.1992). Daha sonra yapılan çalışmalarda TSWV'nin R geni, Sw-5 genidir (Goldbach vd. 2003).

Sw-5 geninin (Sw-5a'dan Sw-5b'ye kadar) beş gen çeşidi olduğu belirtilmiştir (Dianese vd. 2010). Daha önceleri Sw-5 geni içeren bitkilere mekanik inokulasyon yöntemi ile virüsün bulaştırılmaya çalışıldığı ve hastalığa karşı dayanıklılık sağlandığı rapor edilmiştir (Spasova vd. 2001).

TSWV'nin meyve ve yaprak üzerinde en fazla zarar meydana getirdiği bitkilerden biride biberdir. Biber dünyada domates ve karpuzdan sonra en fazla yetiştiriciliğinin yapıldığı sebze türüdür. 2017 yılında tamamlanan bir çalışmaya görede TSWV'ye karşı dayanıklı biber hatlatı geliştirilmeye çalışılmıştır. Pedigri yöntemi kullanılarak yapılan ıslah metodunda TSWV'ye dayanıklı 10 adet sivri biber hattı geliştirilmiştir (Çelik vd. 2017).

2.8. Dünyada Dayanıklılık Genlerini Karşı Dayanıklılığı Kıran İzolatlar

Ülkemizde domates üzerinde 2016 yılında TSWV dayanımını kıran izolat ilk kez rapor edilmesine rağmen dünyanın birçok ülkesinde bu izolat daha önceden rapor edilmiştir. Dünyadaki ilk kaydı İspanya'nın kuzey ve doğu bölgelerinde Sw-5 genine sahip olduğu bilenen çeşitler üzerinde TSWV enfeksiyonun görülmesiyle birlikte dayanıklılığın kırıldığıdır (Fidan 2016). Dayanıklılığı kıran izolatlar toplanarak CAPS moleküler işaretleyiciler ile Sw-5 geni tespit edildikten sonra 4 ticari domates çeşidi üzerinde mekanik inokulasyonlar gerçekleştirilerek dayanıklılığın kırıldığı rapor

edilmiştir (Aramburu ve Marti 2003). Domatesteki Sw-5 geni tarafından sağlanan dayanıklılığın üstesinden gelen Domates Lekeli Solgunluk Virüsü'nün (TSWV) dayanıklılık kıran izolatı (RB), 2002'de Kuzey-Doğu İspanya'da ilk kez bulunmasına rağmen sadece sınırlı bir yayılım göstermiş olduğu tespit edilmiştir. Simptom şekli, homojenliği, stabilitesi ve dayanıklılığı kıran ve kırmayan izolatlarının iletim kapasitesi biyolojik olarak karşılaştırılmıştır. Bütün TSWV izolatları, Sw-5 dayanıklılık geni taşıyan domateste ve *Tsw* dayanıklılık genini taşıyan biberde RB izolatları dışında, çok çeşitli bitki türlerinde benzer sistemik semptomlara neden olmuştur. Dayanıklılığı kıran izolatların Sw-5 geni olan domates bitkilerine mekanik olarak bulaştırması yapılırken bazı çalışmalarda başarısızlıklar olduğu ama dayanıklılığı kırmayan izolatın mekanik inokulasyonunda bu sorun ile karşılaşmadığı ve ayrıca *Frankliniella occidentalis* ile test edilmesi sonucunda iletiminde bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. İspanya'da dayanıklılığı kıran izolatların, domates tarımı yapılan alanlarda düşük oranda gözlemlendiği ve thripsler ile taşıma kapasitesinde bir farklılık olmadığı bildirilmiştir (Lopez vd. 2011).

İspanya'nın Almeria bölgesinde dayanıklı biber çeşitlerinde TSWV'nin dayanıklılık kıran izolatları araştırılmıştır. 2003 yılı sonbaharında, daha önce TSWV'ye dayanıklı olduğu görülen biber çeşidinin bir kısmı, TSWV enfeksiyonu ile sıklıkla ilişkili semptomları ortaya çıkarmıştır. TSWV dayanıklılık kıran izolatlar daha önce İtalya'dan, *Tsw* genini taşıyan *Capsicum* türlerinde ve Sw-5 genini taşıyan domates türlerinde İspanya'dan bildirilmiştir. Bu, İspanya'daki arazi koşulları altında *Tsw* geninin sağladığı dayanıklılığı kıran TSWV izolatlarının ilk raporudur (Margaria vd. 2004).

İtalyanın Mesagne, Apulia bölgelerindeki tarla bitkilerinden 2004 yılında Sw-5 genine sahip bitkiler üzerinde TSWV örnekleri toplanmıştır. Alınan yaprak örnekleri, virüs varlığı açısından test edilmiş ve sadece TSWV ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Bu örneklerden alınan izolatlar ile Sw-5 geni taşıyan F1 çeşitleri üzerinde mekanik inokulasyon gerçekleştirilerek TSWV'nin, dayanıklılığın üstesinden gelebilme yeteneği araştırılmıştır. Test edilen F1 bitkileri üzerinde enfeksiyon meydana getiren izolat, İtalya'da dayanıklılığı kıran ilk izolat olarak rapor edilmiştir (Margaria vd. 2004).

Dayanıklılığı kıran izolatın ilk olarak İspanya'da ortaya çıkmasından sonra dünyanın farklı yerlerinde rapor edilmiş örnekleri olmuştur. Kore'nin çeşitli bölgelerinden ve farklı konukçulardan elde edilen 10 TSWV izolatının tüm genom bilgileri paylaşılmıştır. Bu 10 Kore izolatı ve önceden belirlenen 3 Kore izolatı ile birlikte 13 izolatın iki farklı kökene sahip olduğu yapılan moleküler ve filogenetik çalışmalarla belirlenmiştir. Yapılan filogenetik analizlerde TSWV-Kore izolatının Large ve Medium bölümlerinin Batı Avrupa ve Kuzey Amerika ile ortak grublandığı, Small bölümünün ise Çin ve Japon izolatları ile grublandığı ortaya koyulmuştur. Bu yapılan çalışma hem rekombinasyon hem de reassortment (Aynı hücreyi enfekte eden iki rakip virüsün genetik materyalinin karıştırılması) olayının TSWV'nin moleküler çeşitliliğine katkı sağladığı yorumunun yapılmasını sağlamıştır (Lian vd. 2013).

Sw-5b geninin TSWV de dahil beş tane *Orthotospovirüs* üzerinde HR yanıtını tetiklediği bilinmektedir ve TSWV'nin dayanımının kırılması ile birlikte bu dayanıklılığı ortadan kaldıran faktörler üzerinde yoğunlaşmıştır. Son zamanlarda yayınlanan raporlara göre *Orthotospovirüs*lerin genomunda NSm proteinin olduğu bölgelerde C118Y ve T120N bölgelerinde bir nokta mutasyonun meydana geldiğini ve bu mutasyona bağlı olarak da *Sw-5* geni aracılığı ile sağlanan HR yanıtlarının etkisiz olduğu belirlenmiştir. NSm proteini *Sw-5b* aracılığı ile HR hücreden hücreye hareket fonksiyonlarını düzenlediği belirtilmiştir. Domates Lekeli Solgunluk Virüsünün (TSWV) Hücreden Hücreye Hareket Proteini (NSM), kısa bir süre önce, dayanıklı domates örneklerinden tek dominant *Sw-5b* dayanıklılık genin efektörü olarak tanımlanmıştır. Her ne kadar birçok TSWV ait semptom gösteren örneklerde HR reaksiyonları meydana gelse de son zamanlarda dayanıklılığı kıran izolatların ortaya çıkması ile birlikte NSm'de iki adet nokta mutasyonun meydana gelmesi sonucunda *Sw-5b* dayanıklılığının kırıldığı belirtilmiştir. *Sw-5b* geninin, sadece TSWV değil aynı zamanda 5 tane daha *Orthotospovirüs*e karşı dayanıklılık sağladığı belirlenmiştir. Bu virüsler *Alstroemeria necrotic streak virus* (ANSV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) ve *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) olarak belirtilmiştir. TSWV, TCSV ve CSNV izolatlarında NSm bölgelerinde C118Y ve T120N bölgelerinde nokta mutasyonlarının meydana gelmesi ile birlikte de *Sw-5b* aracılığı ile sağlanan dayanıklılığın ortadan kalktığı belirtilmiştir. Bu çalışmada *Orthotospovirüs*lerde NSm proteinleri bölgelerinde nokta mutasyonlarının verilen HR yanıtları üzerinde ne kadar önemli olduğunun vurgulanması amaçlanmıştır (Leastro vd. 2015).

TSWV ve *Sw-5b* geni arasındaki ilişkiyi inceleyen bir başka çalışmada, daha önceki dayanıklılığı kıran izolatlar (C118Y ve T120N) ve dayanıklılığı kırmayan izolat kullanılarak dizi analizleri karşılaştırılması yapılmıştır. *Nicotiana benthamiana*'da üç adet TSWV izolatı (RB1 T120N, RB2 C118Y ve dayanıklılığı kırmayan izolat) kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda NSm alanın, *Sw-5* dayanıklılığının avirülens belirleyicisi olduğu ve dayanıklılığın kırılmasından C118Y ve T120N mutasyonlarının sorumlu olduğu belirtilmiştir (Peiro vd. 2014). İspanya'da yapılan bir çalışmaya göre de dayanıklılık genine sahip domates ve biber bitkileri üzerinde TSWV izolatları, biyolojik ve moleküler olarak karakterize edilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada, *Sw-5* genine sahip domatesler üzerinden elde edilen TSWV izolatının domates üzerindeki mekanik inokulasyonu başarılı olurken biber bitkisi üzerindeki mekanik inokulasyonun başarılı olmadığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde biber bitkisi üzerinden elde edilen TSWV izolatının biber bitkisi üzerindeki mekanik inokulasyonu başarılı olurken domates bitkisi üzerindeki mekanik inokulasyonunun başarılı olmadığı tespit edilmiştir. Bu bilgilere bağlı olarak üç farklı biyotip belirlenmiştir. Belirlenen bu biyotipler N biyotipi (*Sw-5* ve *Tsw* dayanımı bulunan çeşitler, hastalık bulaştırmayan), T biyotipi (*Sw-5* dayanımını kıran TSWV izolatı) ve P biyotipi (*Tsw* dayanımını kıran biber izolatı) olarak ayrılmıştır. Dayanıklılığın üstesinden gelmesi ile genetik varyasyonların arasında herhangi bir

korelasyon bulunamamıştır. Yapılan bir çalışmada, TSWV'nin dayanıklılığı kıran ve kırmayan izolatlarının genetik ve biyolojik tanımları, dayanıklılığı kıran izolatların ortaya çıkması ve yayılmasında yer alan evrimsel ve epidemiyolojik faktörlerin anlaşılması, yeni dayanıklı kaynakların veya toleranslı çeşitlerin değerlendirilmesi araştırılmıştır (Debreczeni 2015).İspanya'da yapılan bir başka çalışmada yabani ve kültür çeşitleri üzerinde dayanıklılığı kıran izolatlar belirlenmiştir. TSWV üzerinde genom çalışmaları ile L, M ve S segmentleri üzerindeki 5 adet ORF (Open Reading Frame=Açık Okuma Bölgeleri) üzerinde analizler yapılmış ve dayanıklılığı kıran izolata ait bilgiler elde edilmiştir (Debreczeni vd. 2015).

2009 yılında İspanya'nın kuzey-doğu bölgesinde ticari olarak satılan *Tsw* genine sahip dayanıklı biber çeşitleri üzerinde TSWV simptomları gözlemlenmeye başlanmıştır. *Tsw* dayanıklılık genine sahip biber çeşitleri üzerinden toplanan örnekler *Nicotiana glotonasa*'ya bulaştırılmış ve buradan alınan örnekler *Tsw* dayanıklı biberlere bulaştırılmıştır. Dayanıklılığı kıran ve dayanıklılığı kırmayan izolatlar ile *Tsw* genine sahip çeşitler üzerinde bulaştırılma yapılmıştır. NRB (None Resistance Breaking- Dayanıklılığı kırmayan izolat) izolatları herhangi bir symptom oluşturmazken, RB (Resistance Breaking- Dayanıklılığı Kıran izolat) izolatları *Tsw* dayanıklılık genine sahip biber çeşitleri üzerinde şiddetli symptomlara neden olmuştur (Aramburu vd. 2015).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2016 yılında domates üzerinde *Sw-5* dayanıklılığını kıran TSWV izolatının ilk kez tüm genom bilgileri yayınlanmıştır. Üç parçadan oluşan L, M ve S segmentlerine ait uzunluklar 8914, 4765 ve 2984 nükleotid olarak belirlenmiştir. Nükleotid ve aminoasit bazlarının karşılaştırılması yapılmıştır. Filogenetik analizler sonucunda RdRp bölgesindeki izolatlar daha önceden Hawaii izolatlarından farklı bir alanda grublanmıştır. M segmentine ait veriler kıyaslandığında Güney Kore, İtalya ve Brezilya izolatları arasında reassortment meydana geldiği ve TSWV'nin evrimleşmesinde farklı coğrafik orijinlerin olduğu belirtilmiştir (Margaria vd. 2015).

Avustralya'da Domates Lekeli Solgunluk Virüsü izolatının (TSWV-QLD1) ilk tüm genomu 2016 yılında oluşturulmuştur. Üçlü genom 8914 nt L segmenti, 4869 nt M segmenti ve 3003 nt S segmentinden oluşmaktadır. N protein dizisinin filogenetik analizleri, Avustralya izolatının, Avustralya'nın diğer bölgelerindeki izolatlar ile TSWV izolatlarından farklı bir sınıfla grublandığı göstermiştir (Moyle vd. 2016).

TSWV'nin son zamanlarda Çin'in farklı bölgelerinde yaygın olarak görüldüğü ve farklı konukçular üzerinde rapor edilmesinden sonra bu farklı konukçular üzerinden elde edilen TSWV izolatlarının moleküler ve filogenetik çalışması yapılmıştır. Bu farklı konukçular üzerinde TSWV'nin çeşitliliği ve evrimsel karakterlerinin yorumlanması, hastalığın yapısal özelliklerinin anlaşılması bakımından oldukça önemlidir. Bu çalışmanın sonucunda Çin'de üç yeni TSWV izolatının RNA'larının A-U açısından oldukça zengin bir intergenik bölgeyi (IGR) kapsayan, önemli varyasyonlar içeren

bölgesi olduğu tespit edilmiştir. Çin'den elde edilen izolatların, yapılan moleküler ve filogenetik analizler doğrultusunda köken bakımından iki farklı gruba dayandıkları tespit edilmiştir. TSWV'nin evrimleşmesi sırasında bir ortak kökenlerde meydana gelen rekombinasyon olaylarının, negatif iplikli RNA virüslerinin gelişiminde önemli bir mekanizma olduğu düşünülmüştür (Zhang 2016).

2017 yılında ise İspanya'da TSWV enfeksiyonun görülme oranlarının artması ile birlikte üç farklı biyotip üzerinde TSWV enfeksiyonları incelenmiştir. Bu üç biyotip LL-N.05 (yabani tip, WT), Pujol1TL3 (Sw-5 dayanıklılığını kıran, SBR) ve PVR (Tsw dayanımını kıran, TBR) olarak isimlendirilmiştir. Beş TSWV açık okuma alanlarının filogenetik analizi, farklı rekombinasyon tespit algoritması analizi ile desteklenmiştir (Debreczeni vd. 2015).

Sw-5 dayanımını kıran izolatların dünyanın farklı bölgelerinde görülmeye başlanmasıyla birlikte bu dayanıklılığı kıran TSWV izolatın üzerinde nasıl bir değişiklik olduğunu yorumlamak için moleküler çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Yapılan bu moleküler çalışmalar vasıtasıyla eski ve yeni izolat arasında olması muhtemel bir mutasyonun varlığının araştırılmasına yönelik çalışmalar yürütülmüştür.

TSWV'nin domates üzerinde meydana getirdiği zararlar kadar biber üzerinde de büyük ekonomik kayıplara neden olduğu bilinmektedir. Özellikle biber üzerinde Tsw geni aracılığı ile dayanıklılığı kıran izolatın ortaya çıkması ile birlikte bu hastalığın biber tarımı yapılan alanları olumsuz etkilediği bilinmektedir. Ülkemizde ilk kez Samsun ili ve çevresinde biber yetiştirilen alanlarda 2014 yılında görülmesine rağmen dünyada çok daha öncesinde dayanıklılığı kıran izolatın varlığı teşhis edilmiştir. Biberde hastalık kontrolü için en iyi yöntem, *Capsicum chinense* ile TSWV arasındaki gen akışında dayanıklı çeşitlerin ıslah edilmesi ile meydana gelmektedir. Ancak Tsw geni ile sağlanan dayanıklılığın da iki dezavantajı vardır; bunlardan biri eğer bitki erken dönemde ve uzun süreli yüksek sıcaklıklarda enfeksiyona maruz kalır ise TSWV, dayanıklılığın üstesinden hızlı bir şekilde gelebilmektedir. Bu çalışmada, *Capsicum baccatum*'dan yeni bir katılım seçilip değerlendirilmiştir. Seçilen *Capsicum baccatum* ile birlikte hassas bir biber çeşidi (Negral) ve Tsw dayanıklılığı olan bir biber çeşidi karşılaştırılmıştır. Tsw dayanıklılığına sahip biber çeşitlerinin TRB izolatlarına karşı dayanıklılığının diğerlerine göre daha yüksek olmasından ve oluşturdukları semptomlara dayandırılarak *Capsicum baccatumun*'un yeni TBR izolatları için dayanıklı biber çeşitleri yetiştirmek amacıyla bir aday olabileceği belirlenmiştir (Lopez vd. 2015).

Macaristan'da ilk kez 2010-2011 yıllarında görülmeye başlanılsa da 2012 yılında rapor edilebilmiştir. Daha önceki çalışmalarda TSWV'nin S RNA'sı tarafından kodlanan NSs proteinlerinin Tsw dayanıklılığı için avirülens faktörü olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle Macaristan bölgesinde ortaya çıkan RB izolatlarının ve Wilt tip izolatlarının S RNA'larının farklı coğrafi bölgelerden elde edilen izolatlar ile karşılaştırılması yapılmıştır. Yapılan filogenetik analizlerde farklı bölgelerden karşılaştırılan RB izolatları

arasında yakın bir ilişki olduğunu ve bu izolatların NSs bölgelerinde herhangi bir korunmuş mutasyon olmadığını göstermişlerdir. Bu sonuçlara göre, RB izolatlarının coğrafi açıdan ve ayrıca RB mekanizmasına göre ayrı ayrı evrimleştiği sonucuna varılmıştır (Almasi vd. 2015).

Ülkemizde ise ilk kez Samsun ili ve çevresinde sera koşullarında yetişen dayanıklı biber çeşidi üzerinde simptomlarının gelişmesi ile gözlemlenmiştir (Deligöz 2014). Daha sonra ise Antalya ili ve çevresinde dayanıklı domates ve biber çeşitleri üzerinde TSWV dayanıklılığını kıran enfeksiyonlara rastlanmıştır (Fidan 2016).

2014 yılında Antalya-Çamköy yöresinden elde edilen TSWV izolatının Sw-5 geni içerdiği bilinen LA 3667 çeşidi kullanılarak mekanik inokulasyonu yapılmıştır ve Sw-5 geninin 2014 yılına kadar TSWV'e karşı dayanıklılık sağladığı rapor edilmiştir (Oğuz vd. 2014). 2014 yılında TSWV'ye karşı Sw-5 geninin dayanıklılık sağladığı bilinirken 2016 yılına gelindiği zaman Antalya çevresinde yapılan survey çalışmalarında ilk kez Sw-5 geni içerdiği bilinen domates çeşitleri üzerinde TSWV'nin varlığı moleküler olarak saptanması ile dayanıklılığı kıran izolatın bölgemize giriş yaptığı raporlanmıştır (Fidan 2016).

2.9. TSWV ile Mücadele Yöntemleri

Diğer virüslerle olduğu gibi Domates Lekeli Solgunluk Virüsüyle kimyasal mücadele mümkün değildir. Ancak kültürel önlemler alınarak virüsün yayılımı yavaşlatılarak hastalık yoğunluğu düşürülebilir. Bu amaçla sanitasyon uygulamalarına dikkat edilmeli ve fidelikler, özellikle süs bitkileri ve yabancı otların bulunmadığı bir alanda kurulmalıdır. Hastalıklı bir bitki belirlendiğinde, hemen sökülerek uzaklaştırılmalıdır. Duyarlı konukçular arasında yer alan süs bitkileri, bu tip seraların yakınında yetiştirilmemelidir. Seraların gerek iç gerekse dış alanlarında yabancı otların yok edilmesi hem enfeksiyon kaynağı olarak hem de trips popülasyonunu artırmaması açısından oldukça önemlidir. Seralar, dikim sonrasında mümkün olduğunca sık kontrol edilmeli ve sera içerisindeki sarı yapışkan tuzaklar ile trips varlığı her an incelenmelidir. Seralarda tripslerin giremeyeceği delik çapına (0.2-0.3 mm) sahip tüller, ya da tel kullanımı da korunma amacıyla alınacak önlemler arasındadır. Domates yetiştiriciliğinde ışığı yansıtan malçların kullanımı, tamamen yok etmese de trips popülasyonunu düşürmede kullanılabilir. Özellikle trips türleri arasında TSWV'nü en hızlı ve aktif taşıyabilen *Frankliniella occidentalis*'in varlığı her zaman kontrol edilmelidir (Tunç ve Göçmen 1995). Ayrıca gerekirse trips türleriyle kimyasal mücadele yapılarak vektör popülasyonu düşürülmelidir. Bu hastalık etmeni virüs ile mücadele amacıyla birçok farklı yöntem denenmiş ancak en etkin yöntemin genetik dayanıklılık olduğu tespit edilmiştir (Stevens vd. 1992). TSWV'ne dayanıklılık geliştirmek amacıyla doğal dayanıklılık genlerinin belirlenmesi için çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Hastalık etmeni virüs ile mücadelede farklı yöntemler denenmiştir. Arjantin’de bir araştırmacı grup, yüksek sıcaklığın TSWV’nin şiddetini etkilemesi üzerinde çalışmıştır. Yüksek sıcaklığın, bitkide salisilik asit birikimini artırdığı, salisilik asidin ise hastalık belirtilerinin ortaya çıkmasını sağlayan fizyolojik mekanizmada yer aldığı belirlenmiştir. TSWV’ne dayanıklılığı sağlayan Sw-5 genini taşıyan dayanıklı çeşitle, bu geni taşımayan ve hastalığa duyarlı olan ticari çeşitlerin kullanıldığı deneylerde, önce yüksek sıcaklık uygulaması yapılmış, daha sonra hastalık etmeni virüs bulaştırılmıştır. Kontrol olarak önceden virüs inokulasyonu yapılmış ancak sıcaklık stresine sokulmadan salisilik asit verilmiş duyarlı bitkiler kullanılmıştır. Duyarlı çeşitlerde, bitkiler inokulasyondan önce sıcaklık stresine girdiğinde hastalık belirtilerinin daha şiddetli olduğu ve verimin çok azaldığı belirlenmiştir. Önceden inokule edilmiş hassas bitkilere dışarıdan yapılan salisilik uygulaması sıcaklık uygulanması yapılmamış bitkilerde hastalık şiddeti azalmıştır. Salisilik asit sıcaklık uygulaması yapılmış bitkilerde virüs enfeksiyonunu azalmasında neden olmuştur (Mitidieri vd. 2001).

Meksika’da yapılan bir çalışmada domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda Domates Lekeli Solgunluk Virüsü’nden kaynaklanan zararları önlemek adına thrips vektörünün yumurta bırakma eğilimlerinin zamansal ve mekansal modellerine bakılarak TSWV’nin yönetim ve kontrol sistemleri geliştirilmeye çalışılmıştır (Carrillo vd. 2014).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmanın materyalini Sw5 dayanımı bulunan 4 ve bulunmayan 1 adet ticari çeşit dayanıklılık kaynağı yabani domates çeşidi, laboratuvar malzemeleri, tampon çözeltiler, moleküler tanı amacıyla yapılacak olan PCR ve RT-PCR analizinde kullanılacak spesifik primerler, dayanıklılık geninin belirlenmesinde kullanılacak moleküler markörler, enzimler ve diğer kimyasallar, güç kaynağı, yatay elektroforez aparatı oluşturmuştur.

TSWV ile bulaşık örnekler üzerinden bitki özsuları elde edilmesinde porselen havan ve havaneli kullanılmıştır. Laboratuvar çalışmaları esnasında kullanılan hassas terazi, vorteks cihazı (Vortex-GENE2), cam ve plastik malzemeler kullanılmıştır. RT-PCR çalışmaları için BIO-RAD firmasının T100 Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır. Ürünlerin jel üzerinde görüntüsünün elde edilmesi için Thermo Scientific firmasının jel elektroforez cihazı kullanılmıştır. Jel görüntüleme için ise BioDocAnalyze firmasının Biometra cihazı kullanılmıştır.

Mekanik inokulasyon çalışmasından sonra elde edilen bitki örnekleri üzerinde TSWV'nin varlığını moleküler yöntemler ile saptayabilmek için RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polimeraz Chain Reaksiyon) yöntemi kullanılmış olup TSWV için dizayn edilmiş spesifik primerler ile test edilmiştir. RT-PCR çalışmaları için Thermo Fisher Scientific (Fermantas, Vilnius, Lithuania) tarafından sağlanmış olan enzimler, enhanser ve master mix kullanılmıştır. Dizayn edilmiş primerler Hibrigen (Türkiye) aracılığı ile Macrogen-INC (Avrupa) firması tarafından temin edilmiştir. Dizi analizleri hizmetleri Hibrigen'den sağlanmıştır. Çizelge 3.1'de denemede kullanılan çeşitlerin bilgileri ve dayanıklılık durumları belirtilmeye çalışılmıştır. * ile belirtilen çeşitler ticari çeşitler olup firma haklarından dolayı isimleri paylaşılmamıştır.

Çizelge 3.1. Bitki çeşitlerinin özellikleri

Sıra	Çeşit ismi	Dayanıklılık
1	<i>Solanum peruvianum</i>	Homozigot dayanıklı
2	*TSWVAnt01	Heterezigot dayanıklı
3	*TSWVAnt02	Heterezigot dayanıklı
4	*TSWVAnt03	Heterezigot dayanıklı
5	*TSWVAnt04	Heterezigot dayanıklı
6	*TSWVAnt05	Hassas

3.2. Metot

3.2.1. Mekanik inokulasyonda kullanılan bitki çeşitlerinin tanıtılması

Domateste TSWV'ye karşı dayanıklılığın kırıldığını anlayabilmek için TSWV'e ait dayanıklılığı sağlayan Sw-5 genine sahip çeşitlere virüs, mekanik inokulasyon yöntemi ile bulaştırılıp enfeksiyonun gerçekleşmesi sağlanmış ve buradan elde edilen izolatlar ile çalışmalara devam edilmiştir.

3.2.2. Bitkiler üzerinde mekanik inokulasyon çalışmaları

Yapılan tez çalışmaları sırasında yetiştirilen bitkiler Akdeniz Üniversitesi Fitopatoloji seralarında muhafaza edilmiştir. Bitkiler üzerinde mekanik inokulasyon çalışmaları için %0,1'lik 2-mercaptoethanol ve 0,02 gr DIECA kimyasalı içeren ve 1:5 (w/v) oranında hazırlanmış 0,02 M Fosfat tampon (pH:7) çözeltisi kullanılmıştır. Bitkiler, porselen havanlarda ezilerek parçalanmıştır. İlk inokulasyon, bitkilerin kotiledon yapraklarına olmak üzere toplamda 5 defa mekanik inokulasyon yapılmıştır. Mekanik inokulasyon sırasında bitkiler plastik sera içerisinde muhafaza edilmiştir. Günlük ortalama sıcaklık 24-26 °C arasında kayıt edilmiştir. Şekil 3.1 mekanik inokulasyon aşamaları gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Mekanik inokulasyon çalışmaları. **a)** TSWV izolatının hazırlanmasında kullanılan havan, havan eli, bulaşık süngeri; **b); c); d)** bitkilere mekanik inokulasyon; **e)** bitkiler üzerindeki belirtileri

3.2.3. Bitkiler üzerinde TSWV'nin moleküler olarak belirlenmesi

Denemede kullanılan hassas ve dayanıklı çeşitlere ait belirti gösteren örneklerden total nükleik asit ekstraksiyonu aşağıdaki gibi yapılmıştır (Kullanılan kimyasalların içeriği Ek 1'de verilmiştir).

Hassas ve dayanıklı çeşitler üzerinde semptomların meydana gelmesi ile birlikte bu bitkilerin sadece TSWV ile bulaşık olduğunu belirlemek amacıyla domateste en fazla rastlanılan 12 adet virüse karşı RT-PCR testleme işlemi yapılmıştır ve örneklerin sadece TSWV ile bulaşık olduğu yapılan testleme sonucunda belirlenmiştir. Bu işlemin yapılmasının amacı kullanılan bitki materyallerinin TSWV ile tek enfeksiyona sahip olduğunun moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmesidir. Bu testleme sonucunda elde edilen izolat ile de tüm genom çalışmalarına devam edilecektir. Testlemede AMV, CMV, PVX, PVY, TEV, TMV, ToMV, TSWV, TYLCV, ToCV, ToRSV, PePMV virüslerine karşı testlemede kullanılan primer dizilimleri Çizelge 3.2’de paylaşılmıştır.

Çizelge 3.2. RT-PCR çalışmalarında kullanılan primerlerin isimleri, dizilimleri ve ürün boyutları

Primer İsmi	Primer Dizilimi	Ürün boyu (bp)	Referans
AMV (F)	GTGGTTGGAAGCTGGTAAA	700	(Saleh ve Amer 2013)
AMV (R)	CCCCAGTGGAGGTCAGCATT		
CMV (F)	TAACCTCCCAGTTCTCACCGT	513	(Greco vd. 2000)
CMV (R)	CCATCACCTTAGCTTCCATGT		
PVX (F)	TAGCACAACACAGGCCACAG	562	(Fidan vd. 2011)
PVX (R)	GGCAGCATTCATTTTCAGCTTC		
PVY (F)	ACGTCCAAAATAGAGATGCC	480	(Fidan vd.2011)
PVY (R)	TGGTGTTCTGATGTGACCT		
TEV-CP2-F	CTAAATGGATTTATGGTGGTGGTG	391	(Lee vd. 2011)
TEV-CP2-R	CAGTACCCACGTTGCCATCA		
TMV(F)	GCACATCAGCCGATGCAGC	880	(Kumar vd. 2011)
TMV(R)	ACCGTTTTCGAACCGAGACT		
ToMV(F)	CGAGAGGGGCAACAAACAT	318	(Kumar vd.2011)
ToMV(R)	ACCTGTCTCCATCTCTTTGG		
L1TSWVR	AATTGCCTTGCAACCAATTC	276	(Adkins vd.2005)
L2TSWVF	ATCAGTCGAAATGGTCGGCA		
VP2715	ATACTTGGACACCTAATGGCTATTTGG	543	(Anfoka vd. 2008)
RVC427	TGCCTTGGACA(A/G)TGGGG(A/G)CAGCAG		
ToCVAnkR	CCGGAACCCAAAGTCACAGT	574	(Tiberini vd. 2010)
ToCVAnkF	ATCGGTGAAACCCCGATGAC		
ToRSV-R	CCACCACACTCCACCTACC	580	(Fuchs vd. 2009)
ToRSV-F	ACTTCTGAAGGCTACCCGTT		
PepMV-R	TTAAAGTTCAGGGGGTGCG	714	(Ge vd. 2013)
PepMV-F	ATGCCTGACACAACACCTGT		

Denemede kullanılan bitkilerde mekanik inokulasyon sonucunda semptom meydana getiren çeşitler üzerinde Sw-5 geninin varlığını tespit edebilmek için total nükleik asit ekstraksiyonu yapılmıştır. Ekstraksiyon çalışması sonucunda elde edilen DNA’ların konsantrasyonları belirlenmiştir.

Kullanılan çeşitlerde Sw-5 dayanıklılığının testlemesi için Dianese vd. (2010) tarafından geliştirilen Co-Dominant SCAR markörler kullanılmıştır. Sw-5F; 5-AATTAGGTTCTTGAAGCCCATCT-3, Sw-5R; 5-TTCCGCATCAGCCAATAGTGT-3 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR karışımı ve PCR protokolü Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4.'de paylaşılmıştır.

Bu primerlerle yapılan PCR sonucunda Sw-5 genine sahip çeşitlerde 574 bp bant gözlemlenirken 500 bp bant verenler hassas olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 3.3. Moleküler analizler için kullanılan PCR karışımı

PCR Bileşenleri	Miktar
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	23 µL
Forward primer	0.1-1.0 µM
Reverse primer	0.1-1.0 µM
Template DNA	10 pg - 1 µg
Su	23 µL

Çizelge 3.4. Moleküler analizler için kullanılan PCR protokolü

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
Ön Denaturasyon	50	3	1
Denaturasyon	94	1	35
Bağlanma	55		
Uzama	72		
Son uzama	72	5	1

Sw-5 geninin varlığı moleküler olarak karakterize edildikten sonra bu bitkilerden yaprak örnekleri alınarak RT-PCR çalışmalarında kullanabilmek için Thermo Scientific–RNA izolasyon kiti ile bitkilerden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'lar spektrofotometrede optimize edilerek (A260/280 1.8-2.0) konsantrasyonları 200 ng/ul olacak şekilde ayarlanmıştır. RNA optimizasyonu yapıldıktan sonra Thermo Scientific Verso 1-StepRT-PCR Kit ReddyMix kullanılarak Tek aşamalı RT-PCR çalışmaları yürütülmüştür. Elde Edilen RT-PCR ürünleri %1,5 lik agaroz jel de

yürütölmüş Ethidium bromide ile boyandıktan sonra Biometra jel görüntöleme cihazında UV altında görüntölenerek kaydedilmiştir.

RT-PCR çalışmaları için Thermo Scientific markasının RT-PCR kiti kullanılmıştır. RT-PCR kit içerikleri Çizelge 3.5’de ve RT-PCR döngüsü Çizelge 3.6’da paylaşılmıştır.

Çizelge 3.5. RT-PCR çalışmasında kullanılan kitin içerikleri

İçerik	Hacim µL	Son Konsantrasyon
Verso Enzim Mix	0.5	
2X-1- Step PCR ReddMix*	12.5	1X
RT Enhanser	1.25	
Forwrd primer (10)	1	200 nM
Reverse primer (10)	1	200 nM
(RNA)	1-2	1 ng
ddH ₂ O	6.75	
Toplam	25	

Çizelge 3.6. PCR çalışmasında kullanılan PCR protokolü

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
Ön Denaturasyon	50	15	1 cDNA yapımı
	95	15	
Denaturasyon	94	1	35
Bağlanma	57-50		
Uzama	72		
Son uzama	72	5	1

3.2.4. TSWV Medium ve Small segmentlerinin dizilimlerinin belirlenmesi

TSWV, yarı küresel zarflı parçacıklardan ve tek iplikçikli üç segmentli RNA genomundan oluşmaktadır. Genomu içeren üç RNA molekülü, L (büyük), M (orta) ve S (küçük) segmentler olarak isimlendirilmektedir. L segmenti (~9 kb), tamamlayıcı iplikçikten RNA’ya bağlı bir RNA polimerazını (RdRp) veya L proteinini kodlamaktadır. M ve S bölümleri, kodlayıcı olmayan intergenik bölgelerde üst üste binen iki zıt polarite transkriptini kodlayan, ambisens (aynı anda hem 3’5’ yönde ve 5’ 3’ yönde okuma yapabilen) yapısına sahiptir. M segmenti (~4.8 kb), hücreden hücreye hareketi ile ilişkili yapısal olmayan bir M proteinini (NSm) kodlamaktadır ve glikoprotein prekürsörü (GP) virüs-thrips etkileşimlerinde yer alan virüsün zarf bölümünü kodlar. S segmenti (3 kb) nükleokapsid proteini (N) ve yapısal olmayan RNA-susturucu süpresör proteinini (NSs) kodlamaktadır. TSWV’nin Sw-5 aracılığı ile sağladığı dayanıklılığın kırılması ile ilgili daha önceki çalışmalarda Large segmenti üzerinde mutasyon noktası saptanamamıştır (Fidan 2016). Bu nedenle mutasyonun Medium ve Small segmentleri üzerinde olabileceği düşünüldüğü için tez çalışması süresince bu alanlar üzerinde yoğunlaşmıştır.

TSWV genomunun Medium ve Small segmentlerine ait RT-PCR çalışmalarında daha sağlıklı sonuçlar elde edebilmek için tasarlanmış Dieanese ve arkadaşlarının ile Zhong ve arkadaşlarının geliştirdikleri iki farklı primer kombinasyonu kullanılmıştır (Hallwass vd. 2014; Zhong vd. 2011). Kullanılan primer dizilimleri Çizelge 3.7 ve Çizelge 3.8’de verilmiştir.

Tüm genomu tek parça ve tek RT-PCR ile çoğaltmak mümkündür ancak dizi analizleri bölümünde büyük parçaların dizi analizleri hizmetini almak hem zor hem de maliyetli olması nedeni ile M ve S segmentleri 700 ile 1200 bp’lik bölgelere ayrılarak çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.7. RT-PCR çalışmalarında kullanılan primer ismi ve dizilimleri

	Primer İsmi	Primer Dizilimi	Pozisyonlar
S	S1 (F)	AGAGCAATTGTGTCATAATTTTATTC	1-26
	S2 (R)	GAACCTGTGCAAAAGATGTGTGAG	1113- 135
	S3 (F)	TCCTGGAAGATAGACTTTGCCAG	1195- 217
	S4 (R)	CCAAATTTGGCCAAAATTGTCCCTTTC	1697- 723
	S5 (F)	ATTTAACACACTAAGCAAGCACAAGC	1898- 923
	S6 (R)	CATTACAGTGAACTCTTAACAAGTTC	2038- 064
	S7 (R)	AGAGCAATTGTGTCAATTTTAT	2895- 916
	S8 (F)	GATCGAGATGTGCTATAATCAAGC	601-624
M	M1 (F)	AGAGCAATCAGTGCATCAGAAATATACCTATTAT A	1-36
	M2 (F)	GTAGATACAAACCATCATATCTCAAACCTGG	365-394
	M3 (R)	TCTTTATCAGCTCTGGGTGAATCAC	771-795
	M4 (F)	CAAGGTGAGACAAATCCATAGGTGGCC	1335-1361
	M5 (R)	TGATGAGTATGCTCATGAAGAACAAC	1638-1663
	M6 (F)	CAGGATCATTCAAGTTTGCAATATTTCAG	2268-2297
	M7 (R)	CTTATTGGGGATGTGAAGAAGCTTGG	2566-2591
	M8 (F)	GATGTAAACCCTAAAGAGCTTCCTG	3029-3053
	M9 (R)	GTCTCAAATGCCCATGTCTATGGCTC	3348-3373
	M10 (F)	GTTATAGGATAATTATCTTGTGTC	4130- 153
	M11 (R)	CCAGAGGTTTATGATGATTCTGCTGAG	4579 4065
	M12 (R)	AGAGCAATCAGTGCAAACAAAACCTTAATCC	4790-4821

Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCRKit ReddyMix kullanılarak 25 µL hacimde tek aşamalı RT-PCR çalışmaları yürütülmüştür. Elde Edilen RT-PCR ürünleri %1.5’lik agaroz jelde yürütülmüş ethidium bromide ile boyandıktan sonra Biometra jel görüntüleme cihazında UV altında görüntülenerek kaydedilmiştir.

TSWV Medium ve Small Segmentlerine moleküler analizler ve soy ağacının oluşturulması aşamasında elde edilen RT-PCR ürünlerinin doğrudan genoma ait dizi analizleri yapılmıştır. Bu sebeple RT-PCR’da 50 µl hacimde çalışılarak 10 µl’lik hacmi

jelde yürütülmüş ve 40 µl'lik kalan kısmı dizi analizi hizmeti almak için gönderilmiştir. Dizi analizi hizmetinde Hibrigen firmasından hizmet alımı gerçekleştirilmiştir. Dizi analizleri sonucunda elde edilen veriler CHROMAS v.2.6.4 (Technelysium Pty. Ltd.), CodonCod, BIOEDIT v.7.2.5 (Hall 1999) ve Mega7 (Kumar vd. 2011) programları kullanılarak düzenlenmiştir. CHROMAS programı ile yaklaşık 1 kb uzunluğunda olan ürünlerin forward ve reverse dizilerinin baş ve son kısımlarındaki okuma kirlilikleri silinmiştir. Daha sonra forward ve reverse dizileri BIOEDIT programında üst üste denk getirilerek okuma doğrulanmış ve olası baz kaymaları düzeltilmiştir. Sonuçta her bir primere ait olan tek bir bütün haline getirilerek düzenlenmiş (contig) dizi analizleri elde edilmiştir. Tüm dizi analizlerinde CodonCod programında birleştirilerek Small ve Medium segmentine ait tek ve bütün bir veri eldesi sağlanmıştır. Çalışmaya ait olan tüm hizalama (alignment) ve filogenetik analizler MEGA7 programı ile yapılmıştır.

Çizelge 3.8. RT-PCR çalışmalarında kullanılan primer ismi ve dizilimleri

Primer İsmi	Primer Dizilimi	Ürün Boyutu
TSWV-M-1F	AGAGCAATCAGTGCATCAGA	955 bp
TSWV-M-1R	CTTCTTCTTCAACTGATCTCTCAAG	
TSWV-M-2F	GCAAGCTGATAATTCCTAAAGG	1351 bp
TSWV-M-2R	AAGGAGATGACATGTCTTGGG	
TSWV-M-3F	CCGCATAGAAGACAGCC	1276 bp
TSWV-M-3R	GTTATAGAAGGTCCTAATGATTGCA	
TSWV-M-4F	GTTAACCCTAAAGAGCTTCCTG	979 bp
TSWV-M-4R	GAGAAGATCATGGGTTATTTGAT	
TSWV-M-5F	CTTATCCAAGAAAAATTGATGC	1051 bp
TSWV-M-5R	AGAGCAATCAGTGCAAACAAAA	
TSWV-S-2F	CTCTGCTTGAACTCACACATC	1097 bp
TSWV-S-2R	AAATGAATGAAGATCAGGTGAAG	
TSWV-S-3F	TCCATAGCAATACTTCCTTTAGC	848 bp
TSWV-S-3R	AGAGCAATTGTGTCAATTTTATTC	
TSWV-S-1F	AGAGCAATTGTGTCATAATTTTATTC	1258 bp
TSWV-S-1R	AGAGCAATTGTGTCATAATTTTATTC	

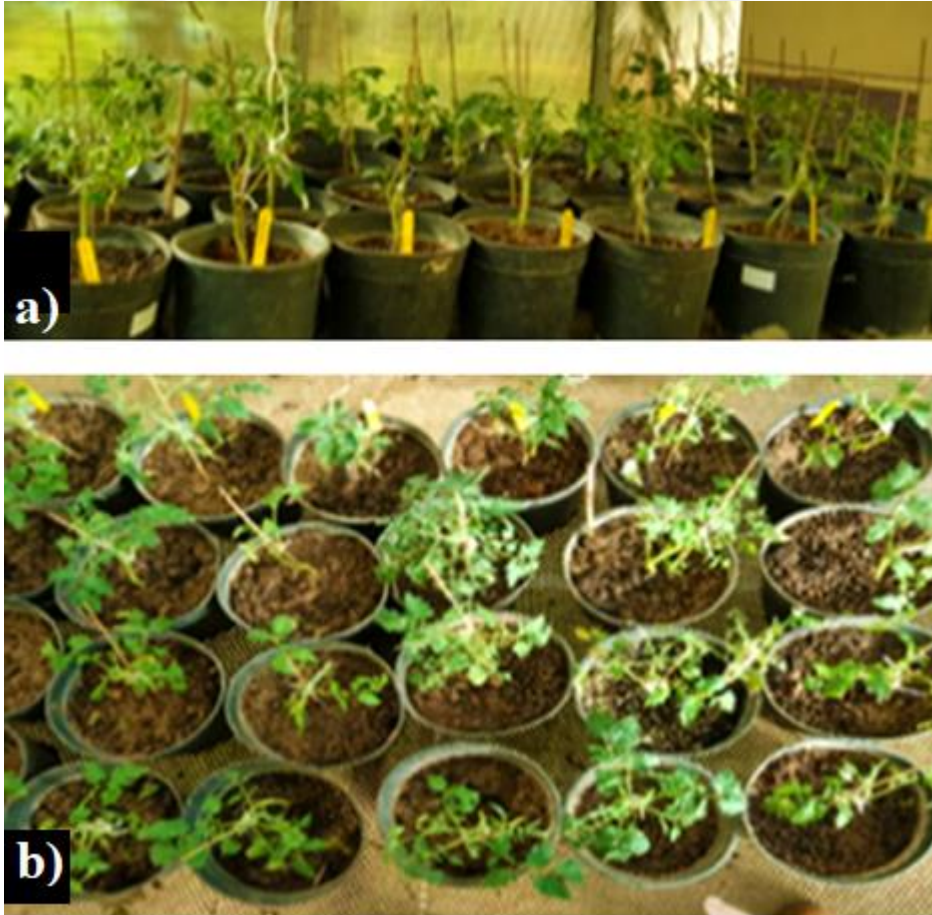
4. BULGULAR

Yapılan tez çalışmasında Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (*Tomato spotted wilt virus*–TSWV) izolatının dayanıklı ve hassas çeşitlere bulaştırılması yoluyla dayanıklılığı kıran izolatın klasik testleme yöntemiyle belirlenmesi, bitkilerde meydana gelen semptomların gözlemlenmesi, dayanıklılığı kıran izolatın tüm genomuna ait dizi analizleri, bu izolatın üzerindeki nokta mutasyonu ve TSWVAntRB izolatının diğer ülke izolatları ile karşılaştırıldığı filogenetik analizleri içermektedir.

Ülkemizde ve dünyada yapılan çalışmalar ile kıyaslanarak dayanıklılığı kıran izolatın (TSWVAntRB) özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır.

4.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Mekanik İnokulasyon

Yapılan tez çalışması kapsamında Sw-5 genini bulunduran (5 adet dayanıklı çeşit) ve Sw-5 genini bulundurmeyen (1 adet hassas çeşit) bitki materyalleri kullanılmıştır. Bölgemizin domates üreticiliğinin yoğun olarak yapıldığı bir üretim sahası olmasından dolayı, bu alan içerisinde üreticiler tarafından en fazla tercih edilen çeşitler bitki materyali olarak seçilmeye özen gösterilmiştir.



Şekil 4.1. a) ;b) Test edilen domates bitkilerinin dikim sonrası görüntüleri

4.2. Bitki Çeşitleri Üzerinde Dayanıklılık Durumunun Belirlenmesi

Yapılan tez çalışması kullanılan bitki örnekleri üzerinde ilk olarak dayanıklılık durumları Dianese vd. (2010) tarafından geliştirilen Sw-5 Co-dominant primerleri kullanılarak belirlenmiştir. Şekil 4.2’de gösterilen jel görüntüsüne göre hassas bitkide 500 bp’lik bant, dayanıklılık kaynağı olan *Solanum peruvianum*’da 574 bp’lik bant ve heterozigot dayanıklı bitkilerde ise çift bant olarak gözlemlenmiştir.



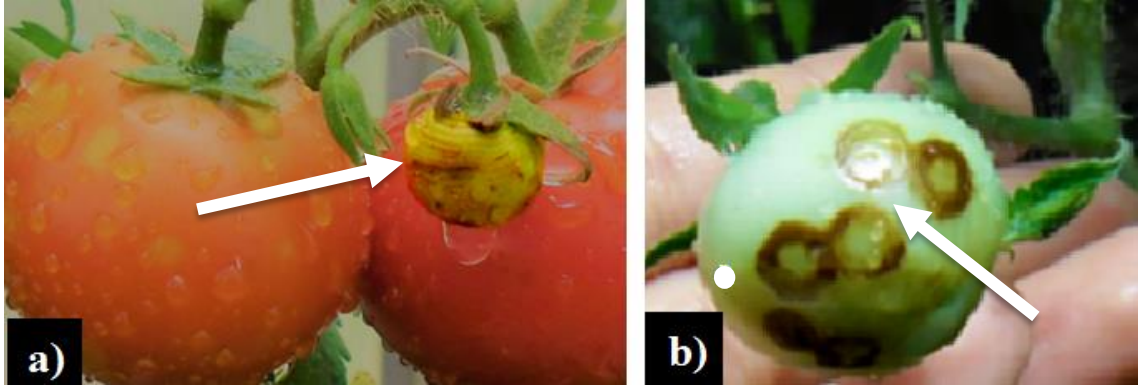
Şekil 4.2. Kullanılan Bitki Materyallerinin Dayanıklılık Durumlarının Belirlenmesi. **M:**Markör, **1 numara** dayanıklılık kaynağı *Solanum peruvianum*, **2, 3, 4 ve 5** numara heterozigot dayanıklı örnek, **6** numara hassas kontrol.

Yapılan tez çalışmasında Sw-5 Co dominant primerleri kullanılarak bitki materyallerinin dayanıklılık karakterleri belirlenmiştir. Buna göre üretici firmaların beyan ettiği çeşitler üzerinde (2, 3, 4, 5) denemede kullanılan materyallerin heterozigot dayanıklılık gösterdiği TSWVAnt05 (1 numaralı çeşit) hassas karakter sergilediği ve *Solanum peruvianum*’un (6 numaralı çeşit) homozigot dayanıklılığa sahip olduğu belirlenmiştir.

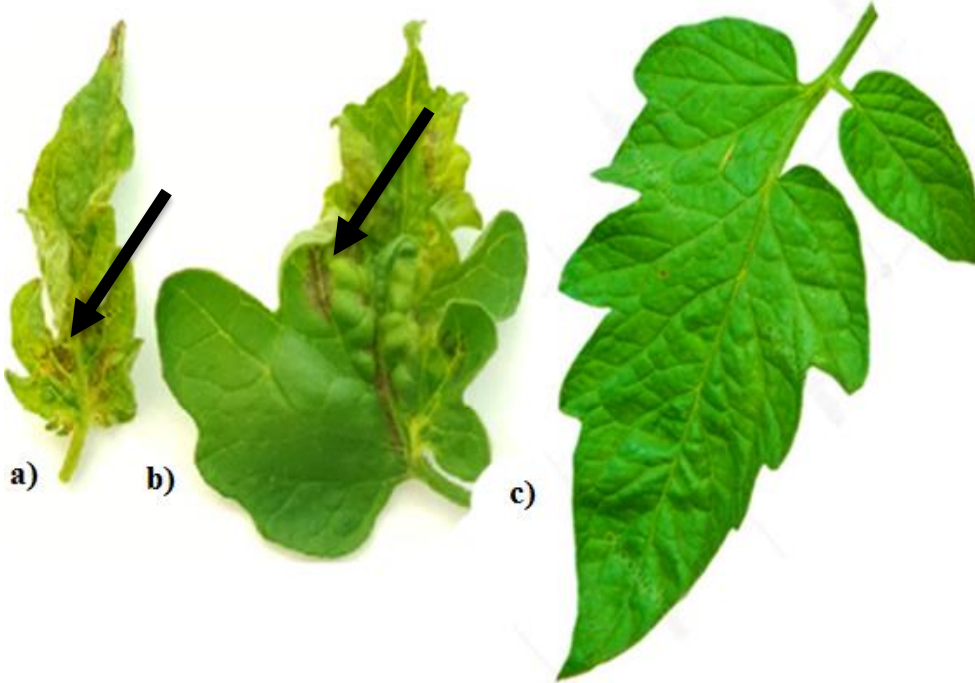
4.3. Bitkilerde Mekanik İnokulasyon Sonrası Simptomlar

Dayanıklılık durumları moleküler işaretleyiciler yardımıyla belirlenen bitki materyallerinin üzerinde gerçekleşecek olan mekanik inokulasyon çalışmalarında en önemli basamağı, inokulasyon sırasında kullanılacak olan materyalin seçimi oluşturmaktadır. Mekanik inokulasyon sırasında kullanılan izolatlar genellikle Sw-5 genine sahip domates çeşitleri üzerinde TSWV (domateste dayanıklılığı kıran izolatlar) enfeksiyonu meydana getirebilen izolatlardır. Tsw genine sahip biber bitkileri üzerinde meydana gelen TSWV (biberde dayanıklılığı kıran izolatlar) enfeksiyonuna sahip izolatlar domates bitkileri üzerinde başarılı bir enfeksiyon meydana getiremediği daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir (Debreczeni vd. 2015). Sonuçlar önceki çalışmalar ile paralellik göstererek TSWV dayanıklılığı kıran biber izolatının domates üzerinde başarılı

bir enfeksiyon meydana getiremezken, domates bitkileri üzerinde başarılı bir enfeksiyon meydana getirdiği yapılan tez çalışması kapsamında belirlenmiştir. Şekil 4.3’de dayanıklı bitkiler üzerinde meydana gelen ilk meyve belirtileri gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Dayanıklı çeşitler üzerinde meyve belirtisi verip yaprak belirtisi vermeyen örnekler a); b); dayanıklı çeşitler üzerinde meydana gelen ilk meyve belirtileri.



Şekil 4.4. Hastalıklı ve sağlıklı bitkiler arasındaki gelişim farkı a) ; b) hastalıklı bitkilere ait yapraklar; c) sağlıklı bitki yaprağı

TSWV enfeksiyonu meydana getiren bitkiler ile sağlıklı bitkiler karşılaştırıldığında büyüme gelişmesinin gerilediği saptanmıştır. Bitkilerde enfeksiyon ile birlikte ciddi bodurlaşmalar, bitkinin gelişimi esnasında gövde belirtileri ve devamında bitkilerde ölümler meydana gelmiştir. Bitkilerdeki enfeksiyonlar generatif faza geçene kadar gizli kalmıştır. Hava sıcaklıklarının artması ile birlikte ilk önce meyvelerde deformasyonlar kendini belli etmiştir. Hemen hemen kullanılan bütün çeşitler üzerinde gövde belirtilerinin meydana geldiği kayıt edilmiştir ve Şekil 4.5’de denemede kullanılan bitkilerde meydana gelen gövde belirtileri paylaşılmıştır.

Dayanıklılığı kıran izolatın ilk önce meyve simptomu verdiği, meyve simptomlarının da büyük iç içe geçmiş halkalar şeklinde olduğu gözlenmiştir. Bu verilerin yanı sıra meyveler üzerinde şekil bozuklukları ve büyüme geriliği oluşturduğu saptanmıştır. Sıcaklık artışı ile simptomların yoğunluğunun birbirine paralel olarak arttığı belirlenmiştir. Domates yaprakları üzerinde TSWV enfeksiyonu genellikle küçük kahverengi nekrozlar şeklinde meydana gelirken bitkilerin gelişim esnasında hava sıcaklığına bağlı olarak ilerleyen dönemlerinde yapraklarda da iç içe geçmiş halkalar şeklinde simptomlar meydana getirdiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.5. Domates üzerinde TSWV'nin gövde simptomları

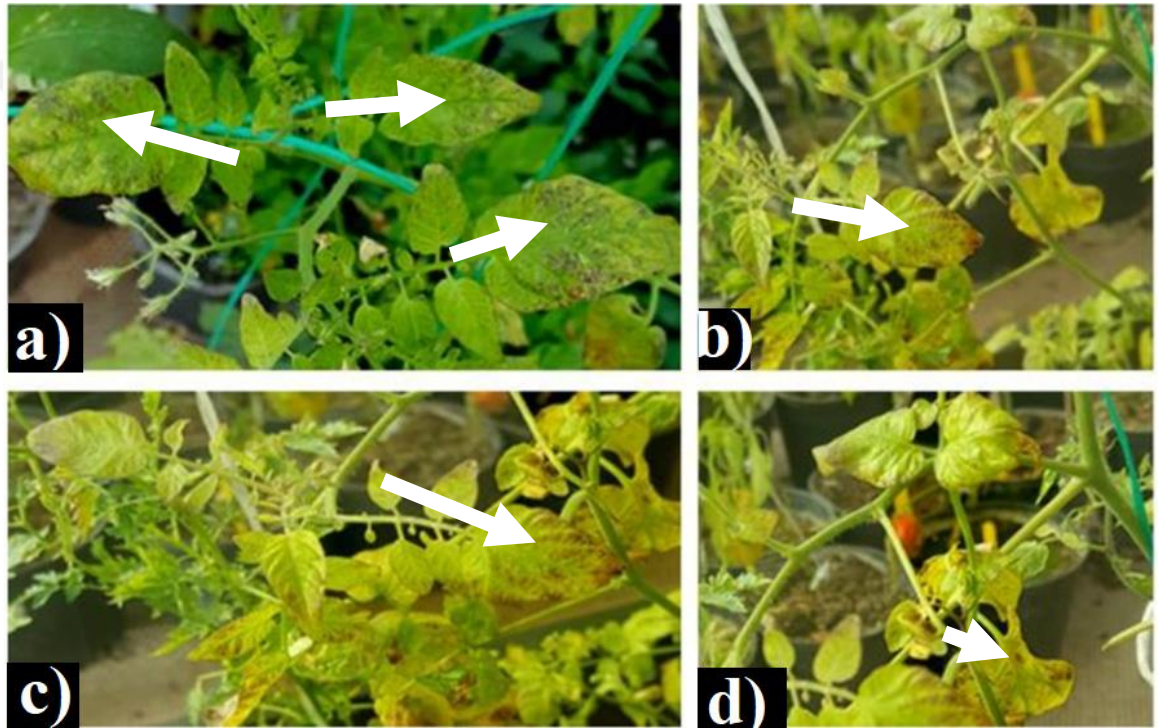
Birinci mekanik inokulasyonu takiben 15 gün içerisinde ilk belirtiler, hassas çeşit olan TSWVAnt05'da gözlemlenmiştir. Dayanıklı çeşitler üzerinde ise ilk belirtiler bazı çeşitlerde 3. bazı çeşitlerde ise 5. mekanik inokulasyondan sonra gözlemlenmiştir. Dayanıklı çeşitler üzerinde belirtilerin gelişmesinde üst üste yapılan inokulasyonların etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ilk mekanik inokulasyondan son inokulasyona kadar olan sıcaklık periyodunda meydana gelen artışın inokulasyonun başarısını etkilediği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak mekanik inokulasyonda dayanıklı çeşitler üzerinde meydana gelen belirtilerin, sıcaklık artışı ve üst üste yapılan inokulasyonlar ile hastalık görülme sıklığını arttırdığı görülmüştür. Çeşitler üzerinde meydana gelen belirtiler, deneme deseni üzerinden elde edilen fotoğraflar ile özetlenmeye çalışılmıştır.

4.3.1. *Solanum peruvianum* çeşidine ait gözlemler

Dayanıklılık kaynağı olarak belirtilen *Solanum peruvianum* üzerinde meydana gelen simptomların yoğun olarak yaprak nekrozları şeklinde olduğu gözlemlenmiştir.

TWSV'e ait yaprak simptomlarının yaprağın iki kenarında koyu kahverengi küçük nekrozlar halinde meydana geldiği saptanmıştır. *S.peruvianum* üzerinde meydana gelen simptomlar incelendiğinde yaprağın orta kısmından uçlarına doğru yoğun nekroz şeklinde belirtiler oluşturduğu ve virüse ait simptomlarının ağırlıklı olarak yapraklar üzerinde meydana geldiği gözlemlenmiştir. Şekil 4.6'de meydana gelen belirtiler paylaşılmıştır.

S.peruvianum üzerinde meydana gelen simptomlar incelendiğinde yaprağın orta kısmından uçlarına doğru yoğun nekroz şeklinde belirtiler oluşturduğu gözlemlenmiştir.



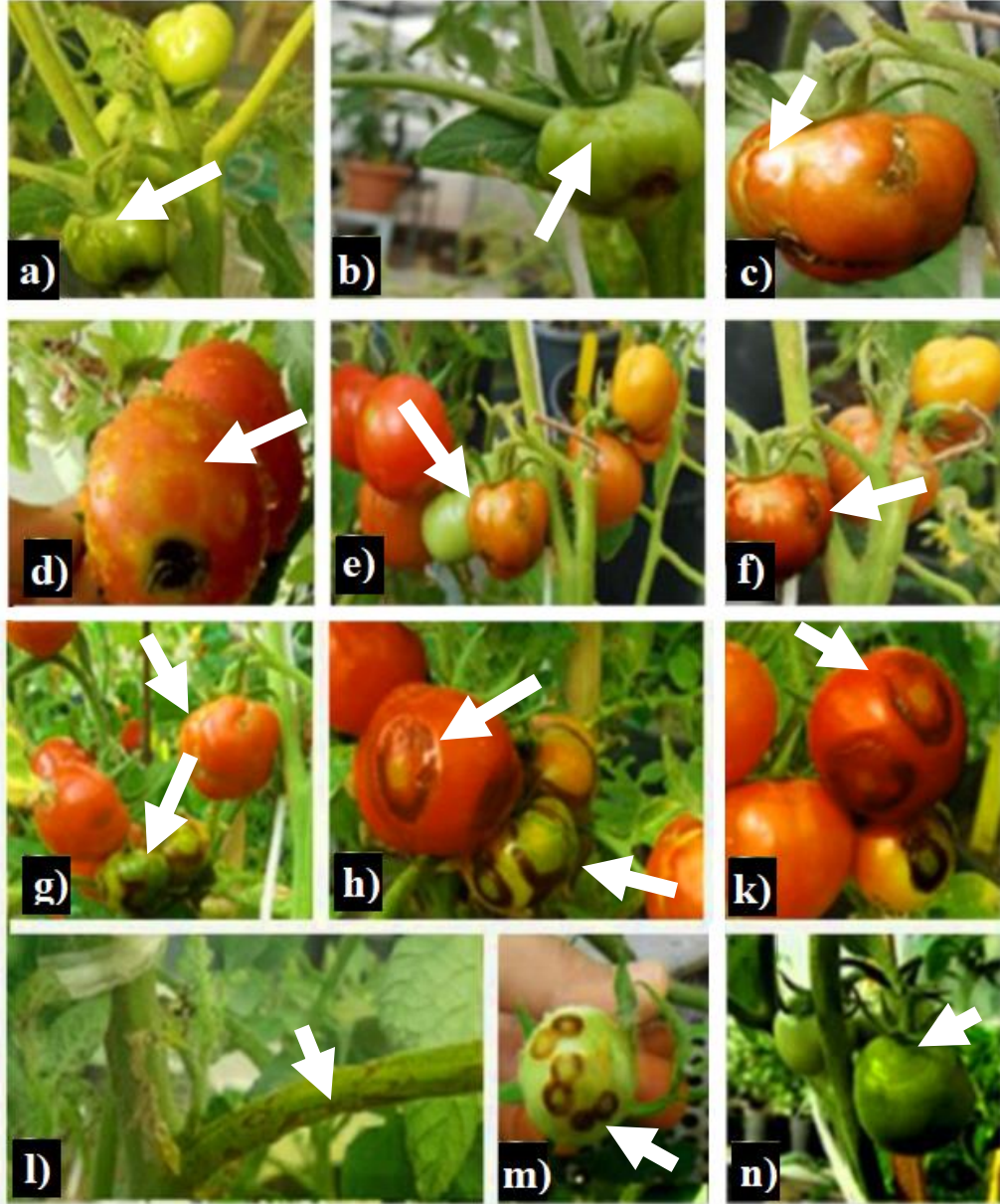
Şekil 4.6. *Solanum peruvianum*'da meydana gelen yaprak simptomları a); b); c) ;d) *Solanum peruvianum*'a ait yaprak örnekleri

4.3.2. TSWVAnt01 çeşidine ait gözlemler

Piyasada Sw-5 dayanımı olduğu bilinen çeşitler içerisinde en fazla tercih edilen çeşitlerin başında TSWVAnt01 gelmektedir. Son zamanlara kadar bu gen aracılığı ile dayanıklılık sağlanır iken dayanıklılığı kıran izolatın varlığı ile bu gen işlevini kaybetmektedir. Yeni izolatın özellikle meyve üzerinde meydana getirdiği yoğun deformasyonlar nedeniyle domates tarımının neredeyse yapılamamasına neden olmaktadır. Bölgede özellikle yayla kesimlerinde, ilkbahar ve sonbaharda örtü altı tarım yapılan alanlarda sıkça tercih edilen bir çeşit olmasına rağmen artık yeni izolatın

varlığı ile domates tarımı yapılan alanlarda verimi etkileyen önemli bir parametre olarak karşımıza çıkmaktadır.

Meyve üzerinde eski izolata nazaran daha büyük koyu kalkalar ile sınırlandırılmış iç içe geçmiş halkalar şeklinde meyvede renk ve şekil bozuklukları meydana getirdiği yapılan gözlemler sonucunda ortaya konulmuştur. TSWVAnt01 ve diğer dayanıklı çeşitler üzerinde saptanan en belirgin özellik ilk simptomlarını genellikle meyve tutumuna kadar gizli kalmasıdır. Sıcaklığa bağlı olarakda simptomların artış kazandığı saptanmıştır.

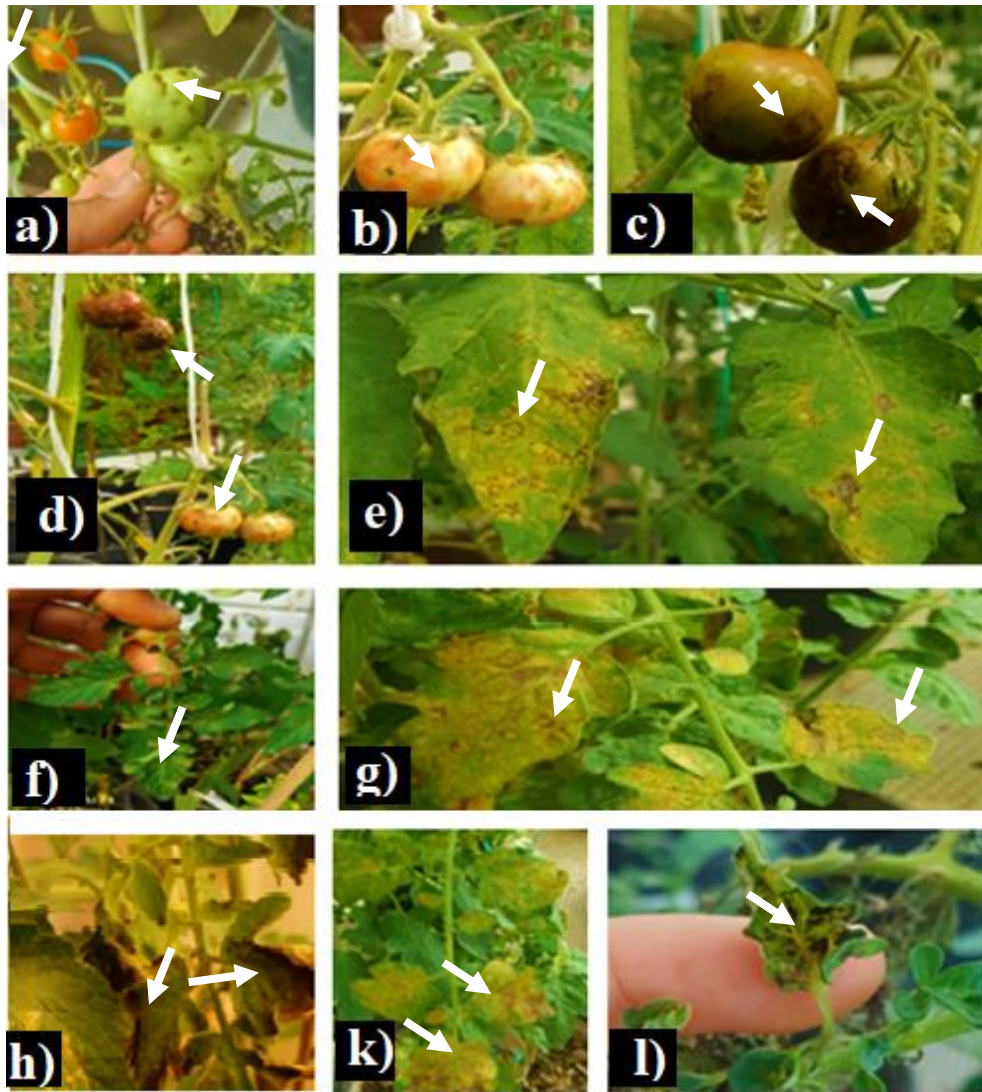


Şekil 4.7. a); b); c); d); e) ;f) ;h), k); ,l); m); n) TSWVAnt01 domates bitkisinde mekanik inokulasyondan sonra meydana gelen meyve ve yaprak simptomları.

Yeni izolatın özellikle meyve üzerinde meydana getirdiği belirtiler nedeniyle ürünün pazar değeri düşmektedir. Aşağıda gösterildiği gibi Şekil 4.7’de TSWV’ye ait belirtilerin fotoğrafları verilmiştir.

4.3.3. TSWVAnt02 çeşidine ait gözlemler

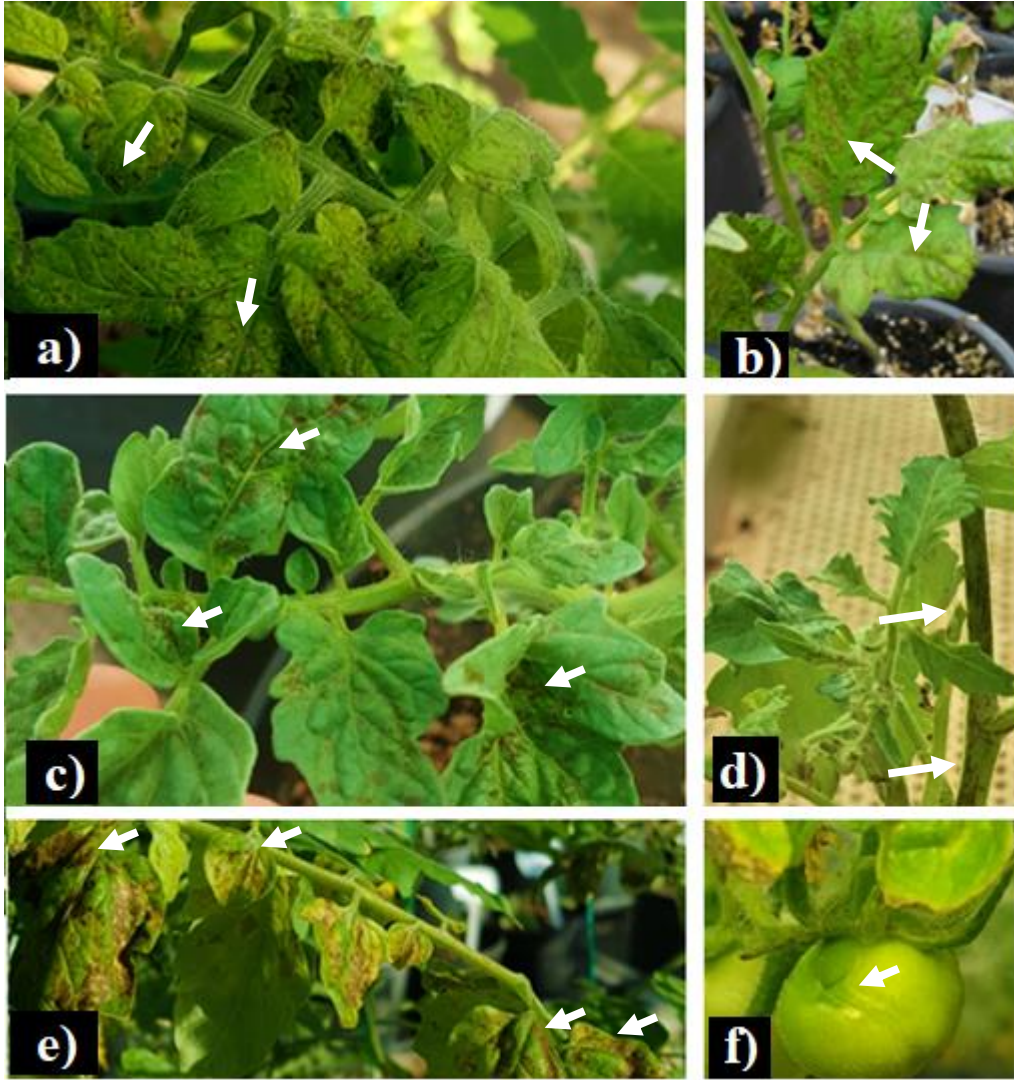
TSWVAnt02 üzerinde meydana gelen belirtiler Şekil.4.9’da özetlenmeye çalışılmıştır. Hassas çeşit üzerinde ilk bulaştırmadan sonra belirtiler kendini göstermeye başlar iken dayanıklı çeşitlerde bu sayının, üçüncü veya beşinci inokulasyon sonunda meydana geldiği tespit edilmiştir. Dayanıklı çeşitlerin üzerinde TSWV enfeksiyonunun meydana gelmesinde üst üste yapılan inokulasyonların hastalığın bulaşmasında başarıyı artırdığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.8. a); b); c); d); e); f); g); h); k); l); TSWVAnt02 domates bitkisinde mekanik inokulasyondan sonra meydana gelen meyve ve yaprak belirtileri.

4.3.4. TSWVAnt03 çeşidine ait gözlemler

TSWVAnt03’de meydana gelen simptomların diğer çeşitler üzerinde meydana gelen simptomlar gibi bitki üzerinde meyvede deformasyonlar, meyve tutumunda azalmalar, küçük meyve gelişimi şeklinde simptomlar oluşturduğu belirlenmiştir. Dayanıklılığı kıran izolatin meyve üzerinde verim kaybı ile birlikte bitkilerde bodurlaşma yaprakların şeklinde bozulmalar meydana geldiği gözlemlenmiştir. Şekil 4.9’de TSWV ait belirtilerin fotoğrafları paylaşılmıştır.



Şekil 4.9. a); b); c); d); e); f) TSWVAnt03 domates bitkisinde mekanik inokulasyondan sonra meydana gelen meyve ve yaprak simptomları.

Denemede kullanılan diğer dayanıklı çeşitlere nazaran TSWVAnt03’de yaprak belirtilerinde farklılıklar gözlemlenmiştir. Dayanıklılığı kıran izolatin belirtilerinde hava sıcaklığının simptomların görülme şiddetini etkilediği belirlenmiştir. Hava sıcaklığına bağlı olarak dayanıklılığı kıran izolatin yapraklarda farklı simptomlar oluşturduğu gözlemlenmiştir. Biber bitkilerinin yapraklarında TSWV’e ait simptomlar iç içe geçmiş halkalar şeklinde belirti gösterirken, domates yaprakları üzerinde kahverengi nekrozlar şeklinde olduğu bilinmektedir. Yeni izolatin ise hava sıcaklığına bağlı olarak biber

yapraklarında olduğu gibi domates yaprakları üzerinde de iç içe geçmiş halkalar şeklinde belirtiler oluşturduğu gözlemlenmiştir.

4.3.5. TSWVAnt04 çeşidine ait gözlemler

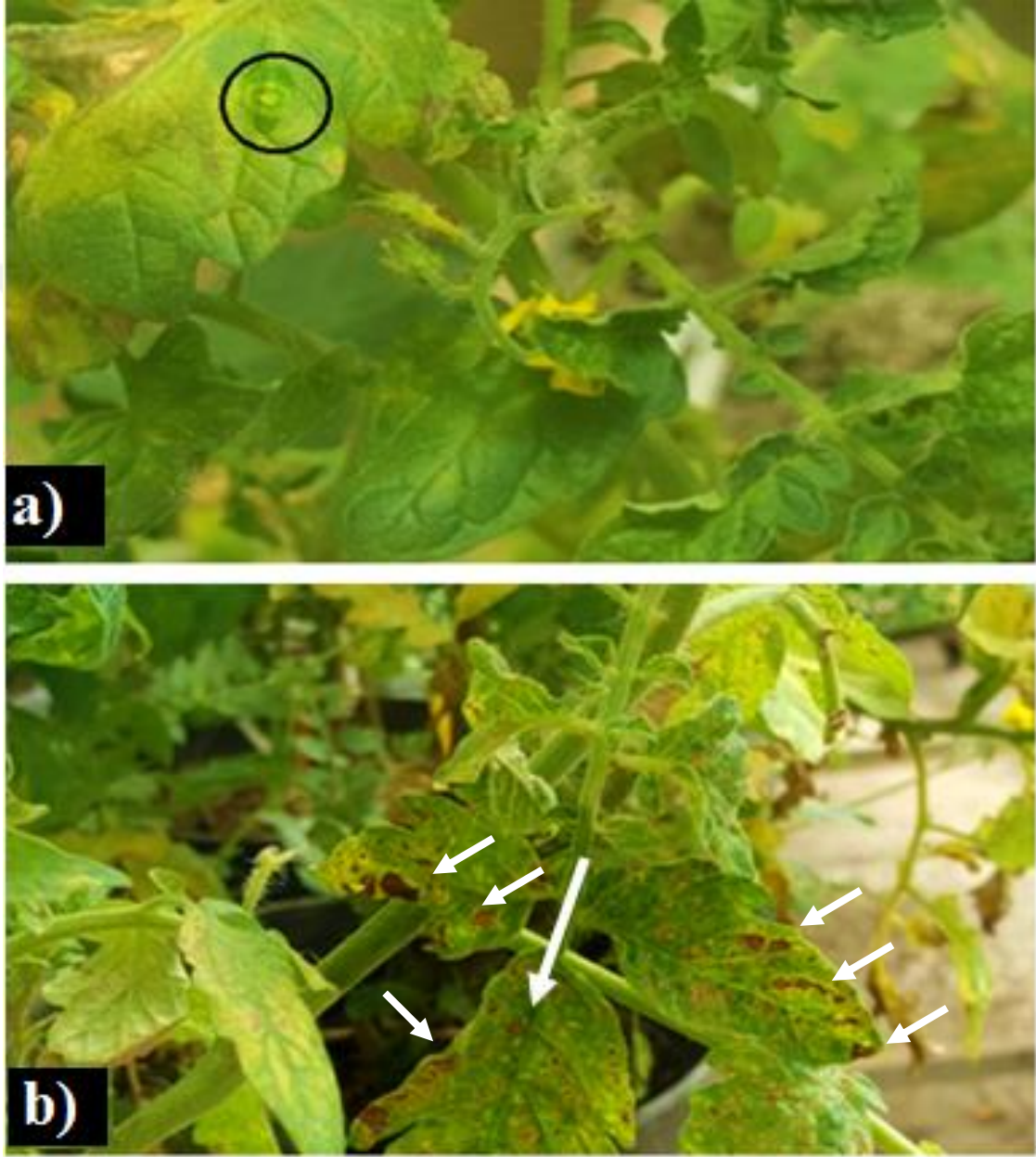
TSWVAnt04 çeşidi üzerinde diğer çeşitlerden farklı olarak ilk belirtiler gövde ve meyveler üzerinde gözlemlenmiş bunu takiben yapraklarda küçük nekrotik lekeler şeklinde başlayan halkalar büyüyerek geniş nekrotik lekeler dönüşmüştür Şekil 4.10'de TSWV'e ait TSWVAnt04 üzerinde meydana getirdiği belirtiler gösterilmiştir.



Şekil 4.10. a); b); c); d); e) TSWVAnt04 domates bitkisinde mekanik inokulasyondan sonra meydana gelen meyve ve yaprak belirtileri.

Dayanıklılığı kıran izolat üzerinde yapılan gözlemler neticesinde yapraklar üzerinde hava sıcaklığına bağlı olarak biber bitkisi üzerinde olduğu gibi iç içe geçmiş halkalar şeklinde kendini göstermiştir. TSWVAnt04'e ait diğer belirtiler. Şekil 4.11'de TSWV ait belirtilerin fotoğraflar paylaşılmıştır.

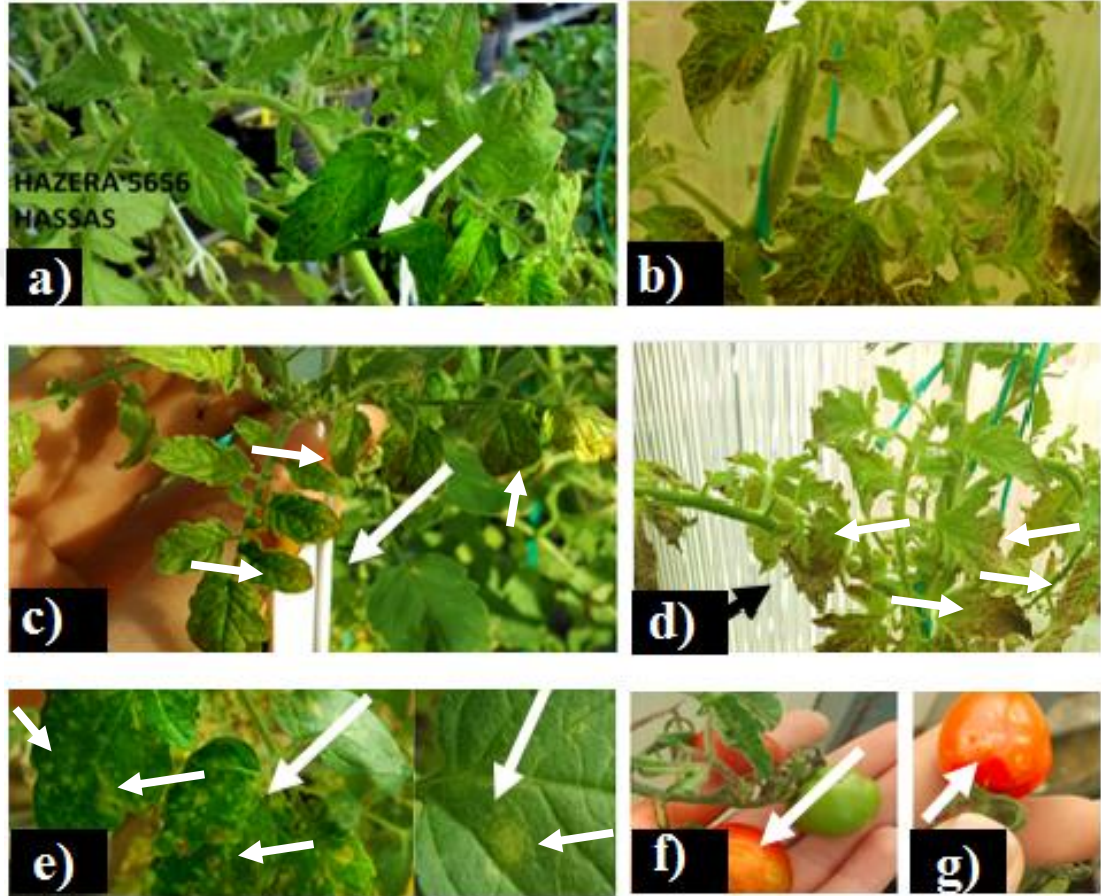
Dayanıklılığı kıran izolatin genel özelliklerine bakıldığı zaman eski izolata göre meyve üzerinde kalın nekrozla birleşmiş halkalı lekeler meydana getirdiği ve simptomların oluşması sırasında hava sıcaklığının ürünün verimi üzerinde önemli bir parametre olduğu belirlenmiştir. Yapraklar üzerinde de eski izolata göre farklılıklar saptanmıştır. Bu saptanan farklılar eski izolata göre daha yoğun nekrozlar, yaprak ve meyve üzerinde halkalı lekeler meydana geldiği deneme esnasında çeşitler üzerinde gözlemlenmiştir.



Şekil 4.11. a); b) TSWVAnt04 domates bitkisinde mekanik inokulasyondan sonra meydana gelen meyve ve yaprak simptomları

4.3.6. TSWVAnt05 çeşidine ait gözlemler

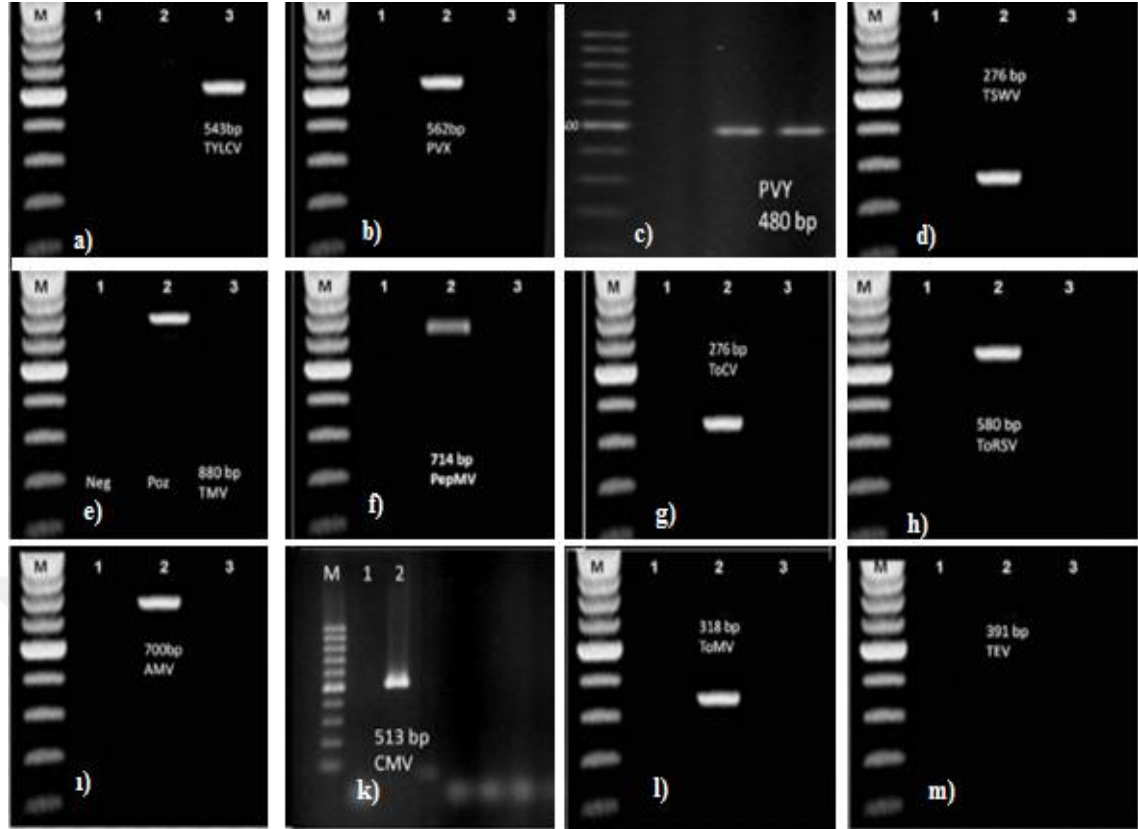
İlk belirtiler hassas çeşit olarak seçilen TSWVAnt05’da gözlemlenmiştir. Yapraklarda yoğun nekrozlar ile birlikte meyve üzerinde deformasyonlar meydana gelmiş; meyve gelişiminin azaldığı ve hava sıcaklığı ile belirtilerin gittikçe arttığı gözlemlenmiştir. Domates üzerinde TSWV belirtileri nekrozlar şeklinde olurken ilerleyen dönemlerde domates yaprakları üzerinde iç içe geçmiş halkalı lekelerde gözlemlenmiştir. Şekil 4.12’de TSWV belirtilerine ait fotoğraflar paylaşılmıştır.



Şekil 4.12. a); b); c); f); g); h) d); e) TSWVAnt05 domates bitkisinde mekanik inokulasyondan sonra meydana gelen meyve ve yaprak belirtileri

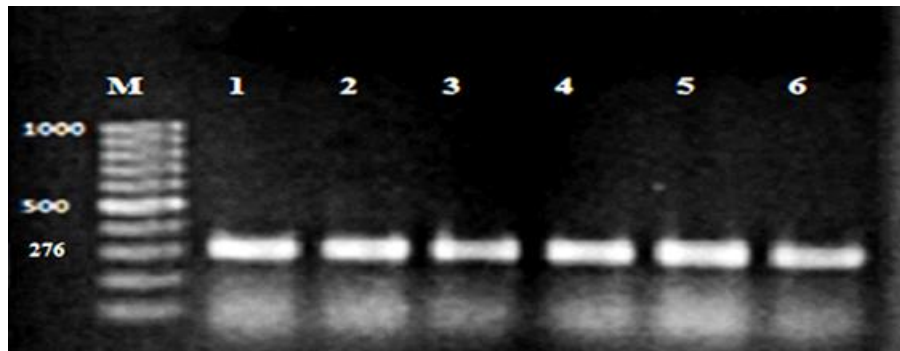
4.4. Bitkiler Üzerinde TSWV Varlığının Moleküler Analizler ile Belirlenmesi

Yapılan tez çalışması kapsamında Sw-5 geni bulunan ve bulunmayan domates çeşitleri üzerinde TSWV inokulasyonları meydana getirilmiştir. Tipik TSWV belirtisini sergileyen domates çeşitleri üzerinden örnekler toplanarak domates yetiştirilen alanlarda yaygın olarak görülen 12 adet virüs hastalığına karşı RT-PCR çalışmaları yapılmıştır ve Şekil 4.13’de gösterilmeye çalışılmıştır. Sadece TSWV ile bulaşık olduğu özellikli primerler kullanılarak tespit edilen bitki materyalleri tüm genom çalışmaları için kullanılmıştır.



Şekil 4.13. TSWV ve diğer virüslere karşı moleküler analizler. Türkiyede tespit edilen ekonomik öneme sahip, domateste görülen virüs hastalıklarının pozitif kontroller ile yapılan optimizasyon çalışması. **a)**TYLCV'e ait jel görüntüsü; **b)** PVX; **c)** PVY; **d)** TSWV; **e)** AMV; **f)** PepMV ; **g)** ToCV ; **h)** ToRSV ; **i)** TMV; **k)** CMV; **l)** ToMV; **m)** TEV'e ait jel görüntüsü.

Domateste yaygın olarak görülen virüs hastalıklarına karşı yapılan RT-PCR sonuçlarına göre bitkilerin sadece TSWV ile bulaşık olduğu Şekil 4.14'de gösterilmiştir.



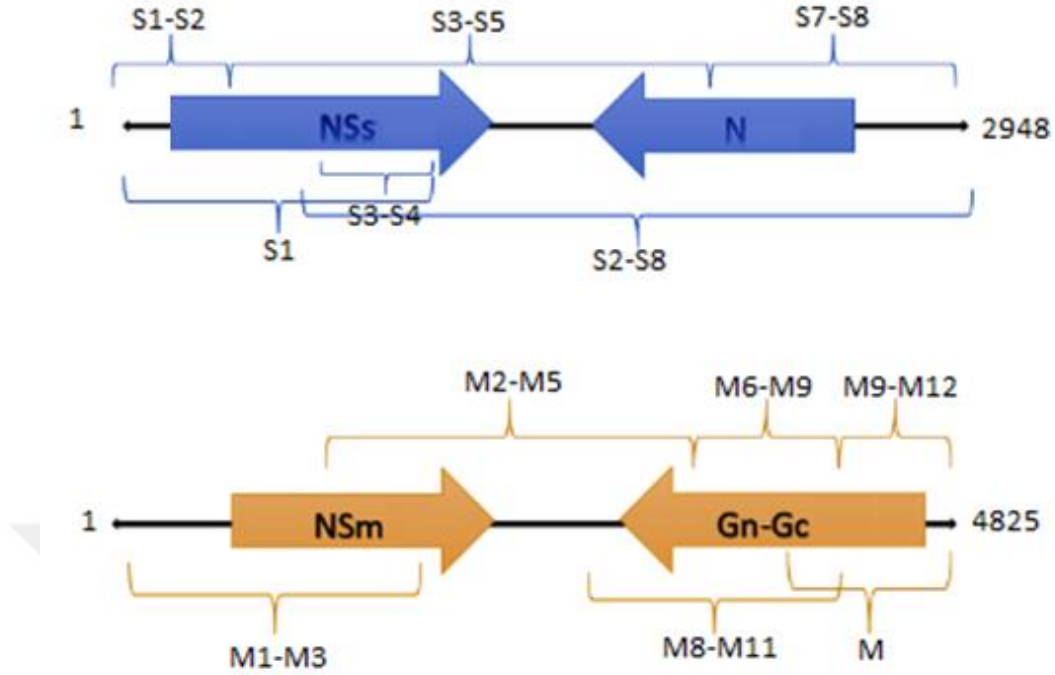
Şekil 4.14. TSWV'ye özgü L1TSWVR ve L1TSWVF primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. TSWV kılıf proteinine özgü primerler ile 276 bp deki jel görüntüsü. **M:** Markör. **1 numara** Hassas kontrol TSWVAnt05, **2 numara** dayanıklılık kaynağı *Solanum peruvianum*, **3 numara** TSWVAnt01, **4 numara** TSWVAnt02, **5 numara** TSWVAnt02 ve **6 numara** TSWVAnt04

L1TSWVR ve L1TSWVF primerleri kullanılarak yapılan moleküler analizlerde denemede kullanılan çeşitlerin TSWV ile bulaşık olduğu belirlenmiştir.

4.5. TSWV'ye Ait Medium Ve Small Primerleri ile Genom Amplifikasyonlarının Elde Edilmesi

TSWV genomu bilindiği üzere large, medium ve small segmentlerinden oluşmaktadır; L RNA (8,9 kb), M RNA (4,8 kb) ve S RNA (2,9 kb) olarak isimlendirilmektedir. L RNA; virüs ile bulaşık hücrelerde replikasyondan sorumlu RdRp (RNA bağlı RNA polimeraz) enzimini kodlamaktadır (Chapman vd. 2003; Whitfield vd. 2005). Large segmenti virüsün yapısal özelliklerinden meydana gelmesinden dolayı mutasyonun Medium ve Small segmenti üzerinde olduğu düşünülmektedir. Ayrıca ülkemizde Large segmenti çalışılıp burada mutasyon bulunamamasından dolayı (Fidan 2016) ve dünyada yapılan TSWV'nin dayanıklılığı kıran izolatının (Aramburu ve Marti 2003) tüm genom çalışmalarındaki bulguların bu bilgileri doğrular nitelikte olmasından dolayı yapılan tez çalışması Medium ve Small segmentleri üzerindeki analizler ile yürütülmüştür. M RNA; negatif kutuplu RNA segmenti NSm (+) proteinini kodlamaktadır. Bu protein virüs parçacıkların hücreden hücreye taşınmasında rol oynamaktadır (Bargen vd. 2001). Pozitif kutupta komplementer cRNA, *Orthospovirus*lerin thripsler ile taşınmasında etkili olan G1(GC) ve G2(GN) proteinlerini (Glikosilat Proteini) kodlamaktadır (Snippe vd. 2007). S RNA; negatif kutbundaki viral RNA segmenti NSs (+) proteinini kodlamakta ve cRNA Nükleoprotein (N) yani kılıf proteininin sentezlenmesini sağlamaktadır (Uhrig vd. 1999; Tsompana vd. 2005).

Yapılan tez çalışmasında Sw-5 genine sahip bitkiler üzerinde enfeksiyonlar meydana getiren TSWV dayanıklılığı kıran izolatın Medium ve Small segmentlerinde hangi protein üzerinde mutasyon meydana getirdiği bulunmaya çalışılmıştır. Bu amaç doğrultusunda Medium ve Small segmentleri üzerinde iç içe geçmiş şekilde tasarlanan primer çiftleri kullanılmıştır. Araştırmanın doğruluğu açısından iki farklı primer kombinasyonu seçilmiştir. Primerler seçilirken forward ve reverse primerlerinin baş ve son kısımlarında meydana gelen gürültülerden dizileri temizlemek için iç içe geçmiş primerler tercih edilmiştir. Dizi analizlerinin sonuçlarının temiz gelmesini sağlamak için genom üzerinde yaklaşık 700 bp-1 kb uzunluğunda tasarlanmış primer çiftleri kullanılmıştır Şekil 4.15'de gösterilmeye çalışılmıştır.

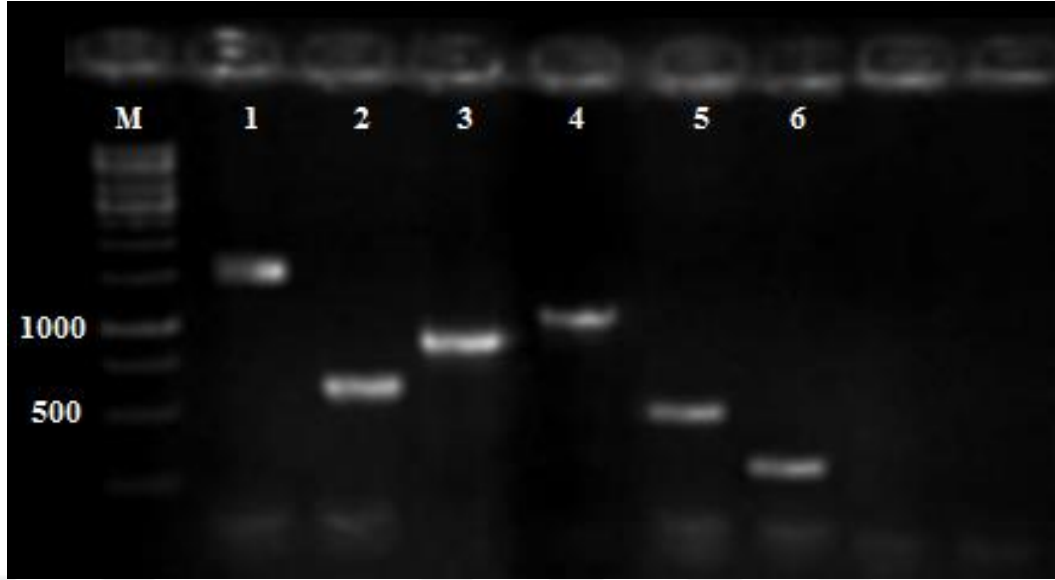


Şekil 4.15. TSWV genomu üzerinde Small (S1 ve S8 arası) ve Medium (M1 ve M12 arası) primerlerinin kullanılarak çoğaltılan lokasyonlar.

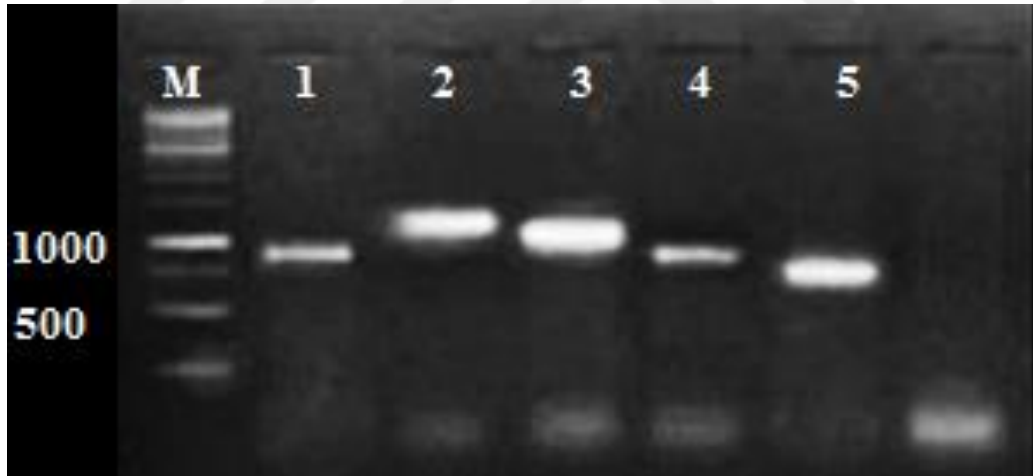
Dizi analizleri için kullanılan primer dizilimleri, oluşturdukları bant büyüklükleri. Çizelge 4.1’de ve primerlere ait jel görüntüleri Şekil 4.16’da ve Şekil 4.17’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Primer Dizilimleri

No	Primer Adı	Ürün Boyutu	Bağlanma Sıcaklığı
1	S1	1258	56
2	S8-S2	541 bp	60
3	S3-S4	506 bp	60
4	S3-S6	847 bp	60
5	S5-S6	141 bp	60
6	S5-S7	933 bp	60
7	M1-M3	759 bp	60
8	M2-M5	1269 bp	60
9	M4-M7	1230 bp	60
10	M6-M9	1082 bp	60
11	M	1051 bp	53



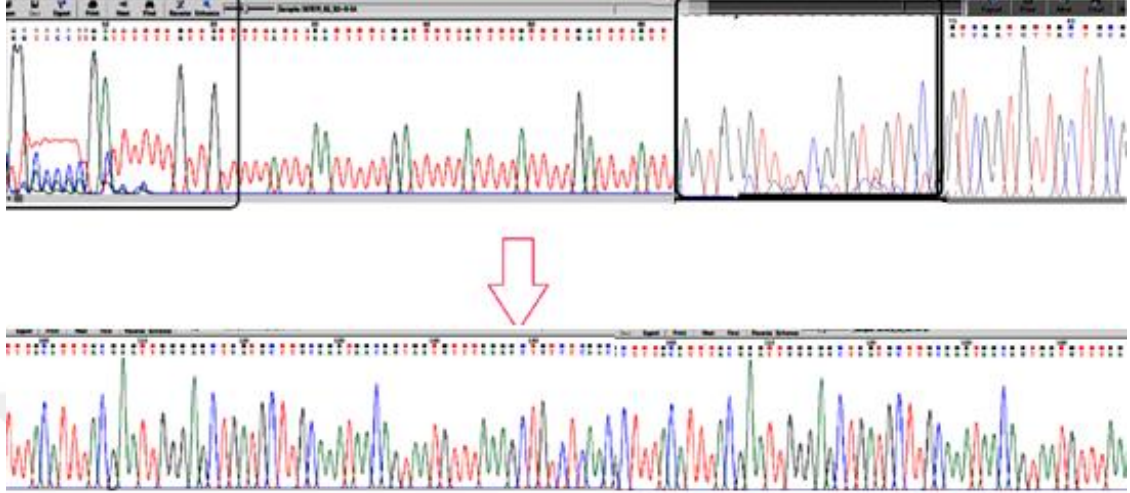
Şekil 4.16. TSWV genomu Small segmentine ait primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. **M:** Markör, **1** numara S1 alanını çoğaltan primerlere ait görüntü, **2** numara S8-S2 arasını çoğaltan primerlere ait görüntü, **3** numara S3-S6 arasını çoğaltan primerler ait görüntü, **4** numara S5-S7 alanını çoğaltan primerlere ait görüntü, **5** numara S3-S4 arasını çoğaltan primerlere ait bant görüntüsü, **6** numara S5-S6 arasını çoğaltan primere ait görüntülerdir.



Şekil 4.17. TSWV genomu Medium segmentine ait primerler kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü **M:**markör, **1** numara M1-M3 alanını çoğaltan primerlere ait görüntü, **2** numara M2-M5 arasını çoğaltan primerlere ait görüntü, **3** numara M4-M7 alanı çoğaltan primerlere ait görüntü, **4** numara M6-M9 alanı çoğaltan primerlere ait görüntü, **5** M (M10-M11-M12) alanını tanıyan primerlere ait görüntü.

Dizi analizlerinin oluşturulması için yapılan moleküler çalışmalarda 50 mikrolitre PCR ürünü elde edilmiştir. Çalışılan PCR ürünlerinin 10 mikrolitresi jel üzerinde görüntülenmiş kalan 40 mikrolitresi de dizi analizine gönderilmiştir. Dizi analizi sonucunda elde edilen iç içe geçmiş primerler Chromas programı kullanılarak başlangıç ve son kısımlarındaki gürültülerden arındırılmıştır ve temiz diziler elde edilmiştir. Bir

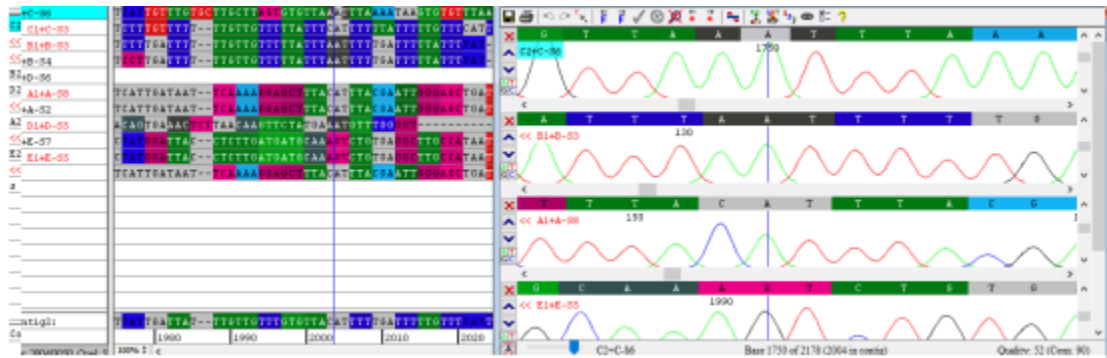
alanı taramak için birden fazla primer kullanıldığından dolayı kirli alanlar dizilerden uzaklaştırılmış ve temiz diziler ile birleştirilerek bütün bir dizi oluşturulmaya çalışılmıştır. Şekil 4.18’de gösterilen kirli pikler kesilerek Şekil 4.19’da. görülen aynı bölgeyi tarayan temiz pikler ile birleştirilmiştir.



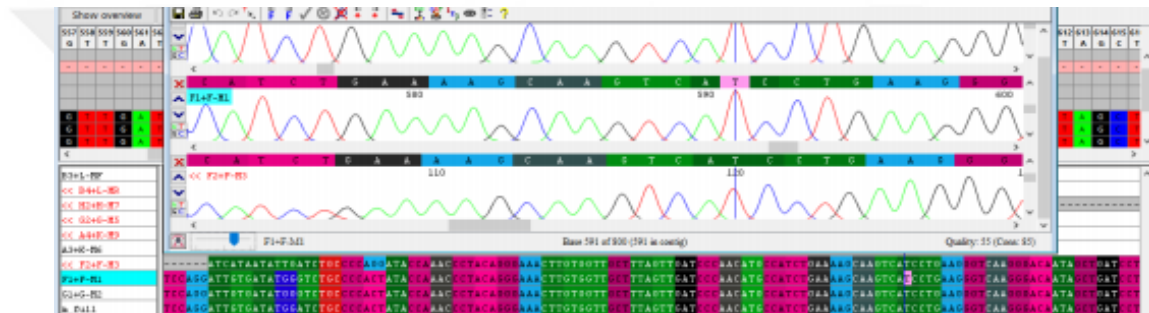
Şekil 4.18. TSWV genomunda Medium (NSm ve GN,GC alanları) ve Small (NSs ve N alanları) segmentine ait kirli dizilerin Chromas programı kullanılarak kesilmesi ve temiz diziler ile birleştirilmesi

Medium ve Small segmentlerine ait temiz diziler oluşturulduktan sonra bu veriler CodonCode programı kullanılarak diziler üst üste çakıştırılmış ve tek bir segment oluşturulmuştur. Medium ve Small segmentlere ait bütün bir genom elde edilmeye çalışılmıştır. Şekil 4.21’de ve Şekil 4.22’de gösterildiği gibi birleştirme işlemleri yapılmıştır.

Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Moleküler Viroloji Laboratuvarından elde edilen TSWVAntRB izolatı özellikleri bakımından Antalyanın doğu-batı ve kuzey-güney olmak üzere geniş bir alandan, dayanıklı çeşitler üzerinden elde edilen TSWV izolatlarını içermektedir. Yapılan tez çalışması esnasında mekanik inokulasyon işlemleri yapılırken bu izolatların hepsinin karıştırılarak ortak bir izolat elde edilmeye çalışılmıştır. Mekanik inokulasyon işlemlerinin ardından RT-PCR çalışmaları ile sadece TSWV ile bulaşık olduğu saptanan izolatın tüm genom çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Dizi analizleri sonucunda elde edilen temiz veriler ilk olarak haplotipe analizine tabi tutulmuştur. Haplotipe analizinde tabi tutulan izolatlar 1 hassas kontrol (TSWVAnt05), 5 adet dayanıklı çeşit (*Solanum peruvianum*, TSWVAnt01, TSWVAnt02, TSWVAnt03, TSWVAnt04, TSWVAnt06) haplotipe analizine tabi tutulmuştur. Haplotipe analizleri yapılırken DnaSP6 programı kullanılmıştır. Haplotipe analizleri sonucunda yapılan tez çalışmasında kullanılan izolatların tek bir haplotipe sahip olduğu belirlenmiştir. Bu izolatın adıda TSWVAntRB olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 4.19. CodonCod programı kullanılarak TSWV genomu Small (NSs ve N alanları) segmentine ait genom parçasının oluşturulması



Şekil 4.20. CodonCod programı kullanılarak TSWV genomu Medium (NSm ve GN, GC) segmentine ait genom parçasının oluşturulması

Medium ve Small segmentlerine ait tek bir dizilim elde edildikten sonra NCBI (National Center for Biotechnology Information)'da Blast (Nükleotid bazında yapılan arama) yapılarak TSWVAntRB izolatının en yakın hangi izolat ile ilişki kurduğu araştırılmıştır.

Dizi analizleri sonucunda elde edilen nükleotid dizilimlerinin birleştirilerek Medium ve Small segmentlerine ait tüm genom bilgileri elde edilmiş ve sonra bu genom parçaları üzerinde filogenetik ilişkiler incelenmiştir.

4.6. Small Segmentinde Yapılan İşlemler

Small segmentine ait nükleotid dizilimleri paylaşılarak ORF (Open Reading Frame – Açık Okuma Alanları) kırmızıya boyanarak gösterilmiştir.

ORF 1-	89..1492
	"Silencing Suppressor - NSs

ORF 2- 2034..2810
"Nucleocapside Protein" - "N"

```

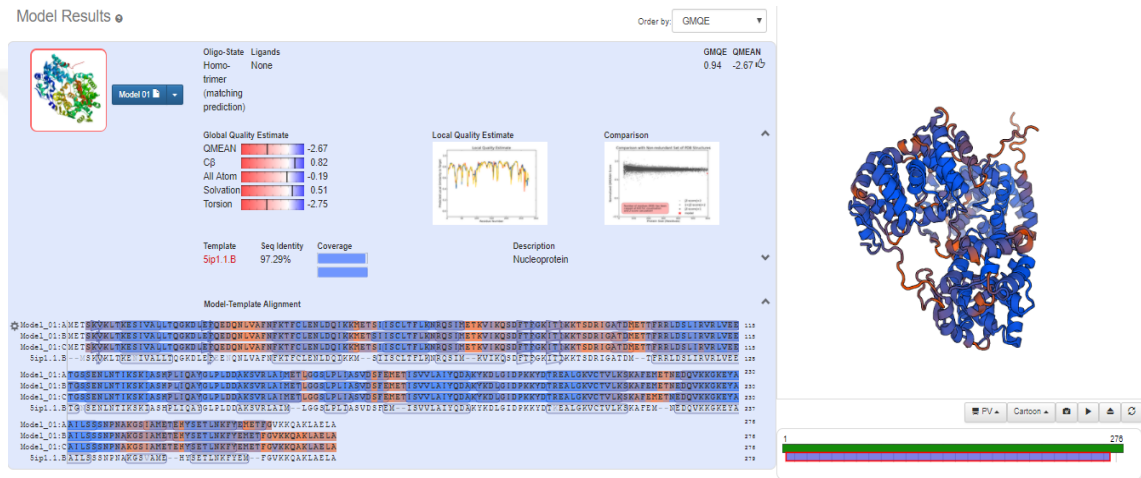
1 agagcaattg tgcataatt ttgttcttaa tcaaacctca cttagaaaat cacaatactg
61 taataagaac acagtaccaa taaccata at gtcttcaagt gtttatgagtcgatcattca
121 gacaagagct tcagtctggg gatcaactgc atctggtaaa gctgtttag atccttactg
181 gattcatgaa cttggcactg gttctccact ggttcaaacc cagctgtatt ctgattcaag
241 aagcaaaagt agctttggct atactgcaaa ggtggggaat cttccctgtg aagaagaaga
301 gattctttct cagcatgtgt atatccctat ttttgatgat attgatttta gcattaatat
361 tgatgactct gttctggcac tatctgtttg ctcaaataca gtcaatacta acggagtga
421 acatcaaggc catttgaaag ttttgtctcc tgctcagctc cactctattg gatctaccat
481 gaacagatct gatattacag accgattcca gcttcaagaa aaagacataa ttcccaatga
541 cagatacatc gaagctgcaa acaaaggctc tttgtcttgt gtcaaaagac atacctataa
601 gatcgagatg tgctataatc aagctttggg caatgtgaat gttttatccc ctaacaggaa
661 tgtccatgaa tggctgtaca gtttcaagcc aaatttcaat caagttgaaa gcaacaacag
721 aactgtaaat tctcttgca gtaaattctc gctcatgtca gcagaaaaca acatctggc
781 taactctcag gcttttgtca aagcttccac tgattctcat ttcaaaactg gcctctggct
841 aagggtccca aaggttctga agcaggctc tattcagaaa ttgttcaaag ttgcaggaga
901 cgaaacgaat aaaacatttt atttatctat tgcttgcaat ccaaaccata acagtgttga
961 gacagcttta aacattttctg ttatttgcaa gcatcagctc ccaattcgta aatgtaaagc
1021 tccttttgaa ttatcaatga tgttttctga tttaaaggag ccttacaaca ttgttcatga
1081 tccttcataat cctcagagga ttgttcatgc tctgcttgaa actcacacat ctttcgcaca
1141 agttctttgc aacaacttac aagaagatgt gatcatctac actttgaaca actatgagct
1201 aactcctgga aagttagatt taggtgaaag aaccttaaat tacagtgaag atatctgcaa
1261 aaggaaatat ttcttttcaa aaacacttga atgtcttcca tctaacacac aaactatgtc
1321 ttacttggac agcatccaaa tcccttctctg gaagatagac tttgccaggg gagaaattaa
1381 gatttctcca caacctgttt cagttgcaaa atctttgtta aagcttgatt taagcgggat
1441 cgaaaagaaa gaatctaaga ttccggaaa atatgcttca ggatcaaaat aatcttgctg
1501 tgtccgggtt ttctaattat gttatgttta ttttctttct ttacttataa ttatctcttt
1561 gttttgtcat ttcttttaag ttcttctgt ttaatagaaa ccataaaaaca agaaataaaa
1621 taaaaataaa atcaaaaatg aaacaaaat caaaaaatga aacaaaaata aaaaaataaa
1681 atgaaataaa aacaacaaaa aaattaaaga acaaaaaccc aaaaaagatc ccgaaaggga
1741 caatcttggc caaatttggg ttttgttttg ttttgttttg ttgttttttg tttttatttt
1801 taattttatt ttattttatt attttatttt attttatttt ttattttgtg tttttatttt
1861 atgttttttg ttgtttttgt tattttgttt atttattaag cataacacac tgaaagcaaa
1921 ctttaattaa acacacttat ttaaatttaa cacactaagc aagcacaagc aataaagata
1981 aagaaagctt tatatatattg taggcttttc cataatttaa cttacagctg actttaagca
2041 agttctgoga gttttgcctg ttttttaacc ccgaacattt catagaactt gttaagagtt
2101 tcaactgtaat gttccatagc aatacttctt ttagcattag gattgctgga gctgagtata
2161 gcagcatact ctttcccttt cttcacctga tottcattca tttcaaagtc tttgcttttc
2221 agcacagtgc aaacttttcc taaggcttct ctggtgtcat acttcttttg gtcaatcccg
2281 aggtctttgt attttgcac ctgatataata gccaaagaca cactgatcat ctcaaagcta
2341 tcaactgaag caataagagg taagctacct cccagcatta tggcaagcct cacagacttt
2401 gcatcatcaa gaggtaatcc ataggcttga atcaaagggt ggggaagcaat cttagatttg
2461 atagtattga gattctcaga actcccagtt tctctacaa gcctaaccct gatcaagcta
2521 tcaagccttc tgaaggctcat gtcagtggct ccaatcctgt ctgaagtttt ctttatggta
2581 attttaccaa aagtaaaatc actttgttta ataaccttca ttatactctg acgattcttc
2641 aggaatgtca gacatgaaat aatgctcatc ttcttgatct ggtcgagggt ttccagacaa
2701 aaagtcttga agttgaatgc taccagattc tgatcttctt gaaactcaag gtctttgcct
2761 tgtgtcaaca aagcaacaat gctttcctta gtgagcttaa ccttagacat gatgattgta
2821 gaagttgtta tatgctttga ccgatgtaa ttcaagggtc aaaagtgcaa ctctgtattc
2881 cgcagctggt tcttaggggt ttaatgtgat gatttgtaag actgagtgtt aaggtttgaa
2941 taaatttgac acaattgctc t

```

4.7. Small Segmenti Üzerinde Üç Boyutlu Protein Modellemesi

Mutasyon meydana gelen bölgelerin yapısal olarak virüs proteini üzerinde meydana getirdiği değişiklikleri yorumlayabilmek için üç boyutlu görüntüsü elde edilmeye çalışılmıştır. TSWVAntRB izolatının Small segmentinin kapsid proteinine ait

üç boyutlu modellemeleri yapılmıştır. Üç boyutlu modellemeler yapılırken Expsy Tool ve Swissmodel web Ara yüzleri ile PyMol programları kullanılmıştır. Expsy Tool kullanılarak 3'-5'yönünde açık okuma bölgesi üzerinde anlamlı alana karşılık gelen protein dizilimleri oluşturmuştur. Elde edilen protein dizilimleri Swissmodel arayüzü kullanılarak protein modellemeleri inşa edilmiştir ve Şekil 4.21'de gösterilmeye çalışılmıştır. Swissmodel arayüzü kullanılarak 3 boyutlu protein modellemesi inşa edilirken dünya çapında yapılan analizler neticesinde 3 boyutlu görüntüsü alınan proteinler baz alınmıştır. Buna göre TSWVAntRB izolatu ile en yüksek benzerlik olan (Seq Identity) % 97.29 'luk oran kabul edilmiştir. Modellemeler protein dizilimlerine göre yapılmış olup Şekil.22'de gösterildiği gibi mavi ile taranan bölgeler birebir benzerliği, turuncu ile taranan alanlar ise düşük benzerlik olarak belirtilmiştir. Bu modelleme kullanılarak Şekil 4.22'de TSWVAntRB izolatının Nükleokapsid proteinine ait 3 boyutlu görüntüsünün ön yüzü olarak paylaşılmıştır.



Şekil 4.21. TSWV genomu Small segmentine ait N protein alanı (kılıf proteini) üç boyutlu protein modellemesi web arayüzü

Dizi analizleri sonucunda nükleotid dizilimi elde edilen verilerin 3 boyutlu protein yapısının web ara yüzlerini kullanarak inşa edilebilmesi için daha öncesinde % 90 veya bu orana yakın bir benzerliğe sahip olan protein görüntüsünün sistem üzerinde var olması gerekmektedir. Mevcut protein modeli üzerinde meydana gelen değişiklikler kısmi bir şekilde yorumlanmaya çalışılarak protein modellemesi elde edilmektedir. Eğer bu yapılar üzerinde bir mutasyon meydana gelseydi bu mutasyonun proteinin yapısında ve kıvrılmasında meydana getirebileceği değişiklikler yorumlanabilecek ve mutasyonun meydana geldiği alan hakkında yorumlar yapılabilecekti ama Small segmentine ait yapılan protein karşılaştırmaları ve 3 boyutlu modellemeler ile bu bölgede mutasyon olmadığı belirlenmiştir. M bölgesi ile ilgili alt yapının olmamasından dolayı mutasyonun olduğu NSm protein bölgesinin 3 boyutlu modellemesi yapılamamıştır.



Şekil 4.22. TSWV genomu Small segmentine ait N protein alanı (kılıf proteinin) üç boyutlu protein modellemesi

4.8. Small Segmentine Ait Filogenetik Analizler

TSWV'nin Small segmenti yaklaşık olarak 2.9 kb uzunluğunda bir yapıya sahiptir. ambisens (Aynı anda 5' 3' ve 3' 5' yönünde okuma yapabilen) karaktere sahip S RNA 52.4 kDa'lık yapısal olmayan bir protein olan (NSs) ve bunun viral tamamlayıcısı 29 kDa büyüklüğünde olan N (Nükleokapsid) proteinini kodlamaktadır.

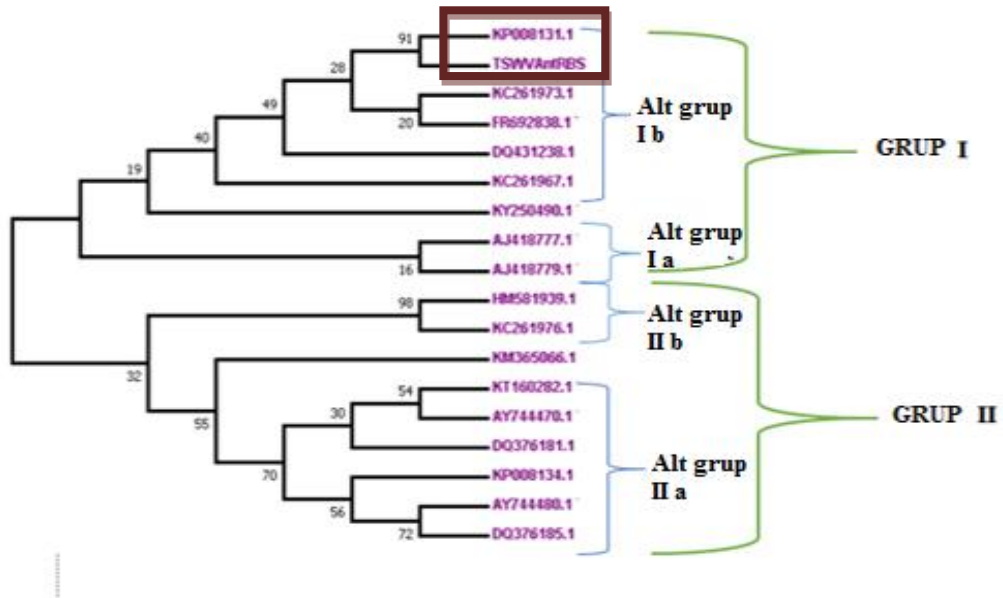
TSWVAntRB'nin Small segmentine ait nükleotid dizilimlerinin saflaştırılmış verileri elde edildikten sonra bünyesinde bulunan NSs ve N protein alanlarının dünya çapında elde edilen izolatlar içerisindeki yeri saptanmış TSWV izotlarının NCBI'daki kayıtları elde edilerek filogenetik analiz Şekil 4.22'de oluşturulmuş ve yorumlanmıştır.

Yapılan filogenetik analizlerde MEGA 7 programı kullanılmıştır. NCBI'dan toplam 22 tane izolat temin edilmiş ve bunların ağırlıklı olarak domates üzerinde saptanan TSWV izolatı olmasına özen gösterilmiştir, ayrıca TSWV'nin ekonomik anlamda en fazla zarar meydana getirdiği biber konukçusu ve yabancı ot konukçuları da filogenetik ağaca dahil edilmiştir. Çizelge 4.2'de TSWVAntRB izolatının kıyaslanmasında kullanılan izolatların konukçu bilgileri, ülkeleri ve NCBI numaraları paylaşılmıştır.

TSWV'e ait dayanıklılığı kırmayan izolatların tüm genomu ait diziler NCBI'da mevcut olmasından dolayı kırmayan izolat çalışmaya alınmamış buradaki veriler kullanılmıştır. NCBI'dan bilgileri alınan 18 tane izolatı kullanılarak oluşturulan filogenetik analiz Şekil 4.22'de verilmiştir. Bu izolatlar arasındaki ilişkiler yorumlanmaya çalışılmıştır.

Çizelge 4.2. TSWV genomu Small segmenti (NSs ve N protein alanları) için oluşturulan filogenetik analizde kullanılan izolatlar

Konukçu	Ülke	NCBI numarası
<i>Solanum lycopersicum</i>	Türkiye-TSWV AntRB	MH367502
<i>Solanum lycopersicum</i>	İspanya	KP008131
<i>Capsicum annuum</i>	USA-Pensilvanya	KT160282
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	USA-Kaliforniya	AY744470
<i>Capsicum annuum</i>	İtalya	DQ376181
<i>Capsicum annuum</i>	İspanya	KP008134
<i>Solanum lycopersicum</i>	İspanya	AY744480
<i>Capsicum annuum</i>	İspanya	DQ376185
<i>Solanum lycopersicum</i>	Avusturalya	KM365066
<i>Capsicum annuum</i>	Güney Kore	HM581939
<i>Virginia tobacco</i>	Bulgaristan	AJ418777
<i>Solanum lycopersicum</i>	Güney Afrika	KY250490
<i>Capsicum annuum</i>	Macaristan	KJ649612
<i>Solanum lycopersicum</i>	Bulgaristan	AJ418779
<i>Stellaria media</i>	Güney Kore	KC261973
<i>Solanum lycopersicum</i>	Fransa	FR692838
<i>Lactuca sativa</i>	Güney Kore	KC261967



Şekil 4.23. TSWV AntRB izolatı ile dünya izolatları arasındaki ilişkiyi gösteren Filogenetik analiz. Neighbor-Joining yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur. Değerlendirmeye alınan 18 izolatın iki grup oluşturduğu belirlenmiş olup Avrupa

izolatları ile aynı dal üzerinde Dayanıklılığı kıran İspanya izolatı ile (KP008131.1) aynı kökende olduğu Maximum Composite Likelihood yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Filogenetik analiz Mega 7 programı kullanılarak oluşturulmuştur.

TSWVAntRB izolatının dünya izolatları içerisindeki yerini görmek için oluşturulan filogenetik analizde TSWV izolatlarının iki ayrı grup oluşturduğu ve TSWVAntRB izolatının Smal segmentine ait filogenetik ağacın grup I içerisinde Avrupa izolarları ile ortak bir alanda birleştiği, grup II'nin ise Asya izolatlarının oluşturduğu görülmüştür.

Oluşturulan filogenetik analizde NCBI'dan kayıtları elde edilen Çin, Güney Kore, Bulgaristan, Afrika, İspanya, Fransa, USA ve Avusturalya örnekleri incelenmiştir. Ağırlıklı olarak domates bitkisi olmak üzere biber bitkisi, yabancı ot ve süs bitkisi üzerinde belirlenen TSWV izolatı S segmentine ait tüm genom bilgileri karşılaştırmada kıyas olarak kullanılmıştır. Türkiye izolatı baz alınarak karşılaştırılma yapıldığı zaman en yakın ilişkiyi İspanya'da domates bitkisi üzerinde dayanıklılığı kıran izolat olarak rapor edilen TSWV izolatı ile ilişki kurduğu belirlenmiştir alt grup a Türkiye izolatı kendine yer bulmuştur.

Güney Kore'ye ait olan izolatlar dikkate alındığında oluşturulan filogenetik analizde iki farklı dalın yer aldığı görülmüştür. 2013 yılında Kore'nin farklı yerlerinden elde edilen TSWV izolatlarına ait moleküler çalışmaları takiben oluşturulan filogenetik analizlerde Kore'de bulunan izolatların iki farklı orijine dayandığı saptanmıştır. Bu bilgilere göre Kore izolatlarının bir kolunun İspanya, İtalya ve Fransa izolatları ile yakın ilişki kurduğu belirlenirken, bir diğer kolunun Çin izolatları ile yakın ilişki kurduğu saptanmıştır. Bu bilgiler ışığında Kore'de yapılan bu çalışmada TSWV izolatının Asya ve Avrupa olmak üzere iki farklı orijinin olduğu düşünülmüştür (Lian vd.2013).

4.9. Medium Segmentine Ait Filogenetik İşlemler

Medium segmentine ait dizilimlerin Chromas programı ile temizlenip, CodonCode programı kullanılarak birleştirildikten sonra mediuma ait tüm genom bilgileri elde edilmiştir ve ORF alanları maviye boyanarak gösterilmiştir.

ORF 1 101..1009

"putative movement protein" - "Nsm"

ORF 2 1334..4741

"precursor of glycoproteins Gn and Gc" - "glycoprotein precursor"

```

1 agagcaatca gtgcacaga aatataccta ttatacactt tgctaagaat caatcaacta
61 cattacacaa gctcctctac cttaggctgt tgaactcaaa atggtgactt atggtgactc
121 ttttcggtaa caagaggcct tctaagctcg ccggaagga tgaaggctct ttagtttcac
181 ttgctaataa taatggcaat gttgaagtct caaaaccatg gtcttcttct gatgaaaagc
241 ttgctttaac caaagccatg gacgcaccca aaggaaagat actggtgaac actgagggaa
301 catcttctct tggaacctat gaatctgatt ctatcacaga atcagagggt tatgatcttt
361 ctgctagaat gatagtagat acaaaccatc atatctcaaa ctggaaaaat gatctttttg
421 ttggcaacgg aaagcaaaat gctaataagg ttatcaggat ctatccaact tgggacagca
481 gaaaacaata catgatgatt tccaggattg tgatatgggt atgccccact ataccaaacc
541 ctacagggaa acttgtggtt gctttagttg atcccaacat gccatctgaa aagcaagtca
601 tcctgaaggg tcaagggaca ataactgata ctatctgctt tgttttttat ctgaactggt

```

661	ctatttcgaa	gatgaacaac	accccagaaa	actggttgcca	gctgcatttg	atgtgcaacc
721	aagaatacaa	gaaaggggtt	tcttttggtg	gtgtcatgta	ttcttggaca	aaagagtttt
781	gcgattccac	cagagctgat	aaagacaaaa	gttgtatggt	tatacctcta	aacagggcca
841	ttagagctag	gtctcaagca	ttcattgaag	cctgcaagct	gataattcct	aaaggaaaca
901	gcgagaagca	gattaaaaaa	cagcttaaaag	aattgagctc	aagtcttgag	agatcagttg
961	aagaagaaga	ggaaggggatt	tctgacagtg	ttgctcagtt	atcctttgat	gaaatataga
1021	cacttatttta	agcttaaatt	tctgtctatt	ttgcattttct	aatccaaaaa	actaaaacaa
1081	aaaacaaaaa	caaaaaaaga	aaaacaaaca	aaaaaatcaa	accaaaaaac	aaaaacaaaa
1141	taaggctgaa	aagccaaact	ttggtccgaa	gactcttttt	gttgtttttt	gtttatttgt
1201	attttttggt	tggtgttttt	tgtttatttc	atatttgctt	tttattagtc	aatgattgat
1261	tctaaagatt	tttatatata	taaaatcttg	ctaatataga	agattgaatc	aaattttaatc
1321	tgtgacaagc	atcctcagac	aagggtgagag	aaatccatag	gtggccttcg	tctcgtcatt
1381	gtatctttca	ttaacatagg	ggcctttgatc	tcaagttcat	catcatcctc	tatcttggat
1441	ctagattttat	aagattttatg	ctttacatat	cctttacaaa	tggtgttcag	aatagaacag
1501	aaataaatca	caaggaaaat	gaatgcaata	agcagtgcca	ctctgatagt	atcaaaaaat
1561	gagccaaagt	aacttgcaat	gaaattgaat	ggacttttaa	tataatccca	gaaaccccat
1621	gcagaagaat	cagaattata	ttgctgttct	tcatgagcat	actcatcatt	ttgatctatt
1681	atattctctg	gttcttctat	aataacatta	ttaaccaaaa	tttccacaga	tatatccgga
1741	ttgccttctg	gatacagtg	catttccttc	ttgtccgggt	tggtgaaaca	aaacattggt
1801	atattgtatt	tattagatcc	ttttttaaca	gccagctgat	aagtagatag	agagcaagcg
1861	tctatagaaa	ttgcagtaga	aaatgtcaaa	tctgagaaaa	attctaaaat	gcaagataaa
1921	ccttggccgc	atagaagaca	gccgttgcaa	tttaagcttg	ttgaagttat	ggaaggtttt
1981	ttaggaacaa	ctttaaaaag	atcagatgga	agatcaacta	caattttcag	tttccctaaa
2041	ctaaaagatt	tttccaggaa	aaaactagag	aaatctttga	aactaacagg	aatatctgat
2101	atttgcctca	aaccagatct	aaacctgtat	gtgtcatatc	cacatgtttt	aatagtgcact
2161	gatttttttc	ctattgctgc	acaatcccaa	gacatgtcat	ctccttctag	agttttctta
2221	gtaaaaatag	gcactccatc	atgggtcaat	tgccgatgac	caaacatttt	cacaggatca
2281	ttcaagtttg	caatattttcc	agagtaaata	tggtgttcag	gtccatgagc	tattagtcca
2341	cctatagtga	taccattatt	atgcaaatct	gcctgtatat	cagcttgaaa	caatgtattt
2401	tcataaggaa	cttcttcagt	aatccttgag	cattgacctc	ccaaaatacc	agaaatacaa
2461	acatctgtca	ctatagttga	tttgagcact	gaataaaattc	tatatgattt	gtccatgtca
2521	taaaatatttc	gacagaatcc	gcattgtagca	ccctcattaa	ttgcaaaaaca	ccaagcttct
2581	tcacatcccc	aataagaagt	tggtgttata	caaaaatcct	ggaaaacctgt	taaagcttga
2641	tttttctctg	aagtgtcgca	gtttcctgta	caagtggaaat	aaaaatccgt	atgggtgctt
2701	tggtatgggag	ctgttgtata	tttttctgac	acttcataat	gaatccccac	acttttgaca
2761	taaatcacaa	attttttggc	tgtttctgag	gtcttgtcat	ttagcatgaa	tatagtctct
2821	cctcctccca	aaagagattg	ttctatcata	tatctatatt	tcccgctctac	aacagaatca
2881	aagattaatg	attgcctggg	caggatcttc	tctgctatgc	ttgtttcatt	tttgtctgaa
2941	ctgtctcctg	caatcattcc	agaaattttg	tctgtacgat	tataggagtc	tattatacca
3001	tttctcaatc	tcttagcctc	atacagacca	actgatgtta	atcctaaaga	gcttcctgta
3061	taatccgaaa	accatttgta	caaagggttg	ttctgaaata	aatctaggta	ttcgcaacct
3121	aatctgcatt	ttataagatt	atcaatagat	gggcgtgcaa	tgcaattctg	gttctctatg
3181	caatcattag	gaccttctat	aacaatatta	gtgccaaaaga	tactttctat	gatcttgtct
3241	tctttttacat	tgcagtaaca	ttgatctttt	tcagggcatt	tctcaaattt	gtttgtaacc
3301	aaaaatggac	agcctggaac	ataaaagcat	ccactcaaac	attgggttgt	ttgagccata
3361	ggcatgggca	tctgagacaa	aatgactaaa	cctatcaaaa	tttcggtcac	aaatttttagc
3421	aaactcaagc	tcagcttagt	gttcactatt	agatggaacc	attccatgct	agtccactta
3481	tgtttggtgt	agtcatgac	tgccctcttg	gacaatatgg	gacactctga	agaatgtctc
3541	tttgaagctt	tgcttttggt	gcaaatgcag	actttagtac	actcatgtgt	gactatgcac
3601	aaattgccgc	agttagaaca	tttaaatggg	aaatatattcc	ataagcaatt	tatgagcaat
3661	aagacagggg	atgtgatcaa	gcccataaga	tcataaccaga	gaaagagagg	tttagtcgtc
3721	ttgttcacta	accatcggat	agggaaatag	atcaacaaaag	ctatcaatat	caatcttatac
3781	caagaaaaat	tgatgcaggc	tgtttgctta	taaatacttt	ttgaatatatt	gattatgcaa
3841	tctctgactc	ttttgtttgc	ttttggattt	ttagctgatt	tgtcaccgca	caagagattg
3901	tgttcaccat	ccaacatttc	ctcggtaaaa	gtgatacttg	ctgatccaga	aaaagctata
3961	accttgtgtt	ccacattttc	accagggtttt	tttatcaaat	aacctatgat	cttctcaggg
4021	ctagtgatgc	tcacagtata	gggatttgca	aagtttgatt	tagttatttt	gcagtcacca
4081	gataacctta	cagtttgtaa	tgatactggt	ccattagtgg	gggtatgagtt	gtaagttata
4141	ggataattat	cttgtgtcag	gctttctgaa	atgaagaatt	ttgttcctac	tgaaaaatgt

```

4201 cttttgttgt caagtttggg aataggaata actgggactt tggagaatct ctttggcaaa
4261 tttaaagaat tatcacattt ttctaaacct tctgctgaat cagaaacaca ggaatatatg
4321 acaccattgt tttcaacttg ataataaaca ttataagtag ataccctttt tatctcacat
4381 tttaatgagg aagcattcaa gcagttgttg ggaagatcca aaacagagat tgttttttgc
4441 gttgctggct cagtggaaat agggatgggt gatttttctt ctcgtatctg gcgggttcca
4501 agagtccgag attctagcat cagattagtt aaagtctcca agatagcttc gcgttgaatc
4561 gatgcagcag tgggtacctc attctcagca gaatcatcat aaatctcagg atgatctcca
4621 cgaattatth ctacttttagc atctgtgggt ctgaagatca agaagtgcaa caaacagaa
4681 ctcagggcaa ttgtgaaaag actcactttt accactagtt ctagtagttt tagaattctc
4741 atcttagatg tctaccaga ttacaatggg tgtgtgatta atttcaagat gtctggatta
4801 aggtttttgt ttgcactgat tgctct

```

Dünya genelinde yapılan çalışmalar domates üzerinde TSWV dayanıklılığını kıran izolatın M segmentine ait NSm proteini üzerinde olduğunu belirtmektedir. Yapılan tez çalışması bulduğumuz sonuçlar dünya genelinde TSWV'ye ait bulunan sonuçlar ile paralellik göstermektedir. NSm segmenti üzerinde meydana gelen mutasyonları belirlemek için Jalview programı kullanılmıştır.

Yapılan analizler neticesinde NSm proteini üzerinde C118Y noktasında mutasyon meydana geldiği tespit edilmiştir. Analizler yapılırken TSWVAntRB izolatı ile en yüksek benzerliği gösteren İspanya-TSWV dayanımını kıran izolat ile, TSWV dayanımı olmayan izolat ölçüt kabul edilerek eşleşme yapılmış ve Şekil 4.24'da mutasyon noktası gösterilmeye çalışılmıştır.

4.10. Medium Segmenti Üzerinde Protein Bazında Yapılan Karşılaştırmalar

TSWV'ye ait dünya genelinde yapılan çalışmalar Sw-5 geni vasıtasıyla meydana gelen dayanıklılığın kırılmasında neden olan etmenin Medium segmenti üzerinde NSm proteininde yani virüsün hücreden hücreye geçişinde meydana gelen bir mutasyon ile kırıldığına işaret etmektedir. Bu çalışma esnasında Small ve Medium segmentleri üzerinde yapılan protein bazında karşılaştırmalarda Small segmenti üzerinde mutasyona neden olabilecek bir farklılığın saptanmadığı tespit edilmiştir. TSWVAntRB izolatının Medium segmentine ait nükleotid, aminoasit ve protein bazında yapılan eşleştirmelerde bu izolatın NSm alanı üzerinde C118Y noktasında bir mutasyon meydana geldiği ve bu mutasyon sebebiyle de dayanıklılık durumunun ortadan kalktığı belirlenmiştir.

Mutasyon alanı belirlenirken NSm proteini üzerinde anlamlı bölgeye denk gelen 5'3'yönü açık okuma bölgesi 1 üzerinde protein dizilimlerine ait bilgiyi elde etmek için Expassy Arayüzü Şekil 4.24'de gösterildiği gibi kullanılmıştır.

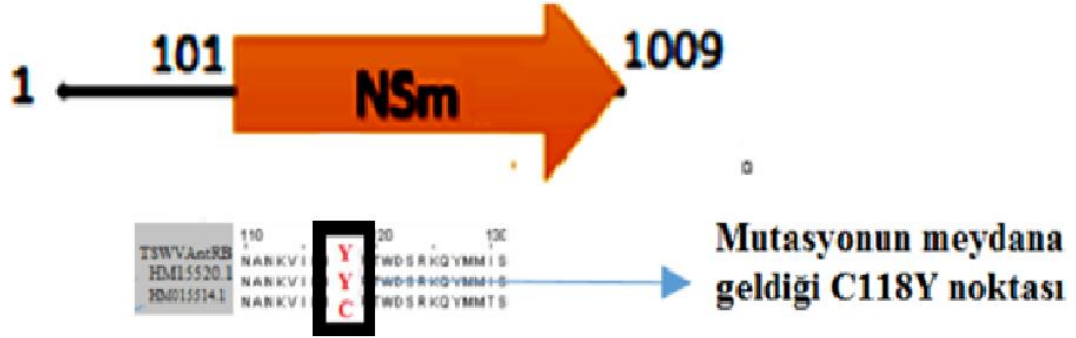
```

Met L T L F G N K R P S K S A G K D E G P L V S L A K H N G N V E V S K P W S S S D E K L A L T K A Met D A
S K G K I L L N T E G T S S F G T C E D S I T E S E G Y D L S A R Met I V D T N H H I S N W K N D L F V G N
G K Q N A N K V I R I Y P T W D S R K Q Y Met Met I S R I V I W C P T I P N P T G K L V V A L V D P N Met P S
E K Q V I L K G Q G T I T D P I C F V F Y L N W S I P K Met N N T P E N C C Q L H L Met C N Q E Y K K G V S F
G S V Met Y S W T K E F C D S P R A D K D K S C Met V I P L N R A I R A R S Q A F I E A C K L I I P K G N S E K
Q I K K Q L K E L S S S L E R S V E E E E E G I S D S V A Q L S F D E I

```

Şekil 4.24. TSWVAntRB izolatının Medium segmenti NSm proteinine ait açık okuma bölgeleri

Expasy Tool aracılığı ile elde edilen protein dizilimleri üzerinde meydana gelen mutasyonun hangi noktada meydana geldiğini saptamak için JalView isimli program kullanılmıştır. Bu eşleştirmeler yapılırken TSWVAntRB izolatının en yüksek benzerlik gösterdiği dayanıklılığı kıran İspanya izolatı ile dayanıklılığı kırmayan bir adet İspanya izolatı Şekil 4.26'da gösterildiği gibi alt alta karşılaştırılmış ve mutasyon bölgesi saptanmaya çalışılmıştır. Şekil 4.26'da mutasyon alanı şematize edilmeye çalışılmıştır.



Şekil 4.25. TSWVAntRB izolatının Medium Segmentinin NSm protein alanı (ORF-Açık Okuma Bölgeleri) içerisindeki mutasyon noktası.

TSWVAntRB izolatı üzerinde mutasyon alanı aranırken filogenetik analiz üzerinde ortak grublandığı İspanya'da dayanıklılığı kıran izolar olarak kayıt edilen HM15520.1 izolatı ile dayanıklı olmadığı bilinen HM015514 izolatı protein alanları karşılaştırılarak değişiklikler aranmaya çalışılmıştır. Genomun 118. noktası üzerinde dayanıklılığı kırmayan izolata ait C (Sistein) aminoasitinin yerine Y (Trozin) olarak değişmesi sonucunda (Şekil 4.24) bir nokta mutasyonun meydana geldiği belirlenmiştir. Bu C118Y noktasının NSm hareket proteini üzerinde olması Sw-5 genin sağladığı HR yanıtlarının oluşmasını engelleyen bir mutasyon olduğu belirlenmiştir.

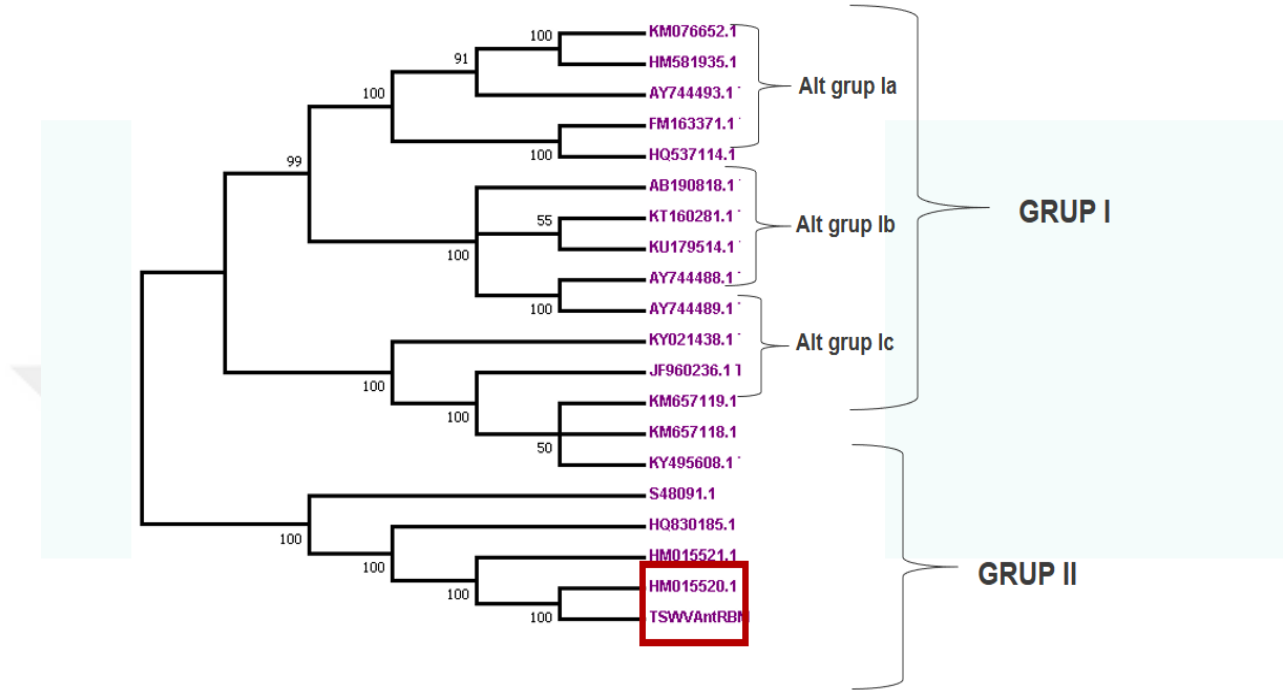
4.11. Medium Segmentine Ait Filogenetik Analizler

Domates Lekeli Solgunluk Virüsü bitki üzerinde oluşturduğu zarar ve ekonomik olarak meydana getirdiği kayıplardan dolayı yetiştirilme alanlarının en büyük problemleri arasında yer almaktadır. TSWV virüsü dünya çapında çok geniş bir konukçu dizilimine sahip olması ve yaygın olarak görülmesinden dolayı epidemiyolojisi ve evrimsel karakterini yorumlayabilmek için üzerinde filogenetik ve moleküler analizlerin yoğun olarak yapıldığı bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır.

TSWVAntRB izolatlarının Medium segmentine ait bilgilerin dünya içerisindeki yerini görmek dayanıklılığı kıran izolatlar arasında karşılaştırma yapabilmek için filogenetik ağacın yorumlanması gerekmektedir. Medium segmentine ait verilerin NCBI Blast segmesi kullanılarak TSWVAntRB izolatıyla ilişkilendirilen genom dizilerinin FASTA formatında kayıt edilerek Mega 7. Programı Neighbor joining özelliği kullanılarak filogenetik analiz oluşturulmuştur.

Medium ve Small segmentlerinin NCBI kullanılarak Blast yapılması sonucunda en yakın ilişkiyi İspanya-RB izolatı adıyla NCBI'da kaydı bulunan izolat olduğu belirlenmiştir. Bu segment kullanılarak ağırlıklı domates bitkileri üzerinde kaydı bulunan

izolatlar olmak üzere farklı konukçularda dikkat edilerek genom dizilimleri seçilmiştir. Filogenetik analiz oluşturulurken seçilen izolatlar Çizelge 4.1’de paylaşılmıştır. Çizelge 3’de belirtilen 21 izolat kullanılarak Şekil 4.26’da gösterilen filogenetik analiz oluşturulmuştur.



Şekil 4.26. Mega 7 Programı kullanılarak oluşturulan TSWVRntRB izolatına ait filogenetik analiz. Filogenetik analiz Neighbor-Joining yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur. Değerlendirmeye alınan 21 izolatın iki grup oluşturduğu belirlenmiş olup Avrupa izolatları ile aynı dal üzerinde dayanıklılığı kıran İspanya izolatıyla (HM15520) aynı kökende olduğu Maximum Composite Likelihood yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Filogenetik ağaç Mega 7 programında oluşturulmuştur.

Filogenetik analiz oluştururken seçilen izolatlar Güney Kore, İspanya, ABD, Çin, İtalya örnekleri seçilmiş ve ağırlıklı olarak domates bitkisi üzerinde saptanan TSWV izolatlarından oluşturulmuştur. TSWVAntRB izolatı temel alınarak yapılan incelemelerde dayanıklılığı kıran izolat olarak kayıt edilen İspanya izolatı ile aynı dal üzerinde yer aldığı gözlemlenmiştir.

Filogenetik analiz için seçilen izolatların iki ayrı grup oluşturduğu ve TSWVAntRB izolatının grup II’de yer aldığı belirlenmiştir. Grup II’deki izolatların ortak özelliğinin dayanıklılığı kıran Avrupa izolatları olarak kayıtlarının oluşturulmasıdır. Grup I izolatlarının özellikleri ise Asya kökenine sahip izolatlar olduğu görülmüştür. Filogenetik ağacın sonuçlarına bakılarak en yakın ilişkiyi kuran izolatın dayanıklılığı kıran İspanya izolatı olarak NCBI’da kayıdı bulunan ve Sw-5 geni sahip çeşitlerde enfeksiyon meydana getirmeyen izolat ile TSWVAntRB izolatı kullanılarak mutasyon noktası aranmaya çalışılmıştır. TSWVAntRB izolatı üzerinde meydana gelen mutasyonları anlamak ve yorumlamak için kıyaslamalarda İspanya izolatının

seçilmesinin en önemli nedeni TSWV izolatına ait dayanıklılığı kıran veya kırmayan özellikteki izolatlara ait herhangi bir tüm genom çalışması yapılmamış olmasından dolayı ve ilk yapılan çalışmanın TSWV AntRB izolatı olmasından dolayı tercih edilmiştir.

Çizelge 4.3. TSWV genomu Medium segmenti (NSm ve GN, GC protein alanları) için kullanılan izolatlar

Konukçu	Bölge	Ncbi
<i>Solanum lycopersicum</i>	Türkiye-TSWV AntRB	MH367503
<i>Solanum lycopersicum</i>	İspanya-Barselona	HM01520
<i>Solanum lycopersicum</i>	İspanya	AY744493
<i>Solanum lycopersicum</i>	İspanya	FM163371
<i>Capsicum Annuum</i>	İspanya-Murcia	HQ537114
<i>Solanum lycopersicum</i>	Güney Kore	HM581935
<i>Leonurus sibiricus</i>	Güney Kore	KM076652
<i>Capsicum Annuum</i>	İtalya	HQ830185
<i>Solanum lycopersicum</i>	İspanya-Barselona	HM01521
<i>Nicotiana tabacum</i>	Usa-Karolina	AY744488
<i>Capsicum Annuum</i>	Usa-Karolina	AY744489
<i>Capsicum Annuum</i>	Kore	AB190818
<i>Capsicum Annuum</i>	Usa Penisilvanya	KT16028
<i>Ocimum basilicum</i>	Usa Washington	KU179514
<i>Capsicum Annuum</i>	Güney Kore	KY021438
<i>Solanum lycopersicum</i>	Çin	JF960236
<i>Nicotiana tabacum</i>	Çin	KM657118
<i>Solanum indicum</i>	Çin	KY495608
<i>Capsicum Annuum</i>	Çin	KM657119
<i>Nicotiana tabacum</i>	Brezilya	S48091

Kıyaslamada kullanılan HM15520.1 izolatı İspanya’da domates izolatları üzerinden elde edilen Sw-5 Resistance Breaking izolatı, HM015514.1 İspanya izolatı ise Sw-5 dayanımı olan domates bitkileri üzerinde enfeksiyon oluşturmamayan ve bu nedenle de dayanıklılığı kırmayan izolat olarak bilinen dizilimlerdir. Dayanıklılığı kıran izolatlar ortak bir bir dizilime sahip iken eski izolat da farklılıklar meydana geldiği belirlenmiştir.

Medium ve Small segmentlerine ait filogenetik analizleri birlikte değerlendirildiğinde; Ülkemizde özellikle de bölgemizin yayla kesimlerinde ilkbahar ve sonbahar örtü altında serin iklimlerde yetiştirilme periyodu içerisinde domates ve biber tarımı yapılmaktadır. Söz konusu bu alanlarda TSWV’nün meydana getirdiği salgınların ekonomik boyutlarının ciddi rakamlara ulaşmasından dolayı virüsün bu saldırganlığının nedenlerinin anlaşılması bu hastalık ile mücadelede en önemli bir yer tutmaktadır. Bu amaç için de ilk adım olarak domates bitkileri üzerinde Sw-5 dayanıklılık durumunun

belirlenmesi ile başlayan ve bu adımları takip eden moleküler analizler ve bu izolatın dünya izolatları arasındaki filogenetik ilişkilerini yorumlanması gerekmektedir.

Yapılan tez çalışması kapsamında Medium ve Small segmentleri üzerinde yapılan moleküler analizler ile birlikte dayanıklılığı kıran izolatın dünya izolatları ile ilişkisini anlamak ve yorumlayabilmek için NCBI’da kayıtlı dünya izolatları ile hem medium hemde Small segmentlerine ait filogenetik analizler elde edilmiştir. TSWVAntRB izolatı için oluşturulan filogenetik analizde NCBI’den kayıtları elde edilen Çin, Güney Kore, Bulgaristan, Afrika, İspanya, Fransa, ABD ve Avusturalya örnekleri başta olmak üzere incelenmiştir. Ağırlıklı olarak domates bitkisi üzerinde meydana gelen izolatlar ile bir diğer en önemli konukçusu olan biber izolatı ve yetiştirilme alanları yakınlarında bulunan ve bu virüse konukçuluk edebilen yabancı otlarda filogenetik analizlerde yerini bulmuştur.

Small ve Medium segmentine ait analizlerin ortak özelliklerine bakıldığında zaman her iki ağacın da İspanya’da belirlenen dayanıklılığı kıran izolat ile aynı dalda yer aldığı görülmektedir. Bu da Türkiye’de saptanan izolatın Avrupa izolatları arasında yer aldığı yorumunu yaptırmaktadır. TSWVAntRB izolatının ortak grublandığı izolatların özellikleri incelendiğinde zaman bu izolatların dayanıklılığı kıran izolat olarak rapor edilen izolatlar olduğu ve ortak noktaların Medium segmenti üzerinde NSm protein alanı içerisinde C118Y bölgesinde nokta mutasyonu meydana getirdiği belirlenmiştir.

İspanya’da yapılan TSWV dayanımını kıran izolatların filogenetik ve moleküler analizlerini inceleyen bir araştırmada Sw-5 genin TSWV’de dahil olmak üzere 5 adet *Orthospovirüs*e karşı dayanıklılık sağladığı ve ayrıca bu gen aracılığı ile sağlanan dayanıklılığın Medium segmentine ait NSm proteini üzerinde C118 ve T120 noktaları üzerinde meydana gelen değişimler aracılığı ile ortadan kalktığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada ek olarak da TSWV dayanımının sağlayan Sw-5 geni için C118Y noktasındaki tek bir mutasyonun meydana gelmesi ile bitkilerde dayanıklılık yanıtlarının meydana gelmediği vurgulanmıştır (Lopez vd. 2011) bizim yaptığımız çalışmada da M segmentinde C118Y bölgesinde mutasyon gözükürken araştırmacıların tespit ettiği diğer mutasyon T120 bölgesindeki mutasyon bizde tespit edilememiştir. Bu da diğer çalışmalardan farklı olarak Türkiye’deki izolatlar da sadece C yerine Y olan proteinde mutasyon olduğu tespit edilmiştir.

TSWVAntRB izolatı ile çok yakın dallarında grublanan İspanya ve Avusturya izolatlarıdır ve bu izolatların ortak özellikleri incelendiğinde ise bu izolatların NSm proteinleri üzerinde C118Y bölgesinde tek nokta mutasyonuna sahip oldukları belirlenmiştir. Bu alan üzerinde meydana gelen nokta mutasyonlarının Sw-5 geni vasıtasıyla dayanıklılık cevaplarının üretilmediği ve TSWV enfeksiyonlarının meydana geldiği belirtilmiştir.

Filogenetik analizler genel olarak incelendiğinde zaman TSWVAntRB izolatının Avrupa izolatları arasında tek bir nokta mutasyonundan meydana gelen dayanıklılığı kıran izolatlar içerisinde kendine yer bulduğu görülmüştür.

5. TARTIŞMA

Dayanıklılığı kıran TSWV izolatını belirlemeye yönelik ilk adım olarak çalışmamızda dayanıklı ve hassas domatesler üzerinde TWSV izolatlarının mekanik inokulasyon çalışması yapılmıştır. TSWV'nin domates bitkisi üzerinde mekanik inokulasyonu için izolatın hangi bitki üzerinden elde edildiğinin çok önemli olduğu belirlenmiştir.

İspanya'da yapılan bir çalışmada TSWV'nin dayanımı kıran izolatın domates ve biber bitkileri üzerinden mekanik inokulasyonu için alınan örneğin hangi bitkiden temin edildiğinin mekanik inokulasyonun başarısını etkilediği vurgulanmıştır (Hispana, 2015). Yapılan tez çalışması kapsamında da benzer sonuçlara varılmıştır. Domates bitkisi üzerinde yapılacak olan mekanik inokulasyonda seçilen izolat domates bitkisinden elde edilmiş TSWV izolatının bulaştırmada daha başarılı olduğu gözlemlenmiştir. Biber bitkileri üzerinden elde edilen izolatın domates bitkileri üzerinde başarılı bir enfeksiyon meydana getirememiştir. Bunun nedenin biber bitkisinde bulunan bol miktardaki fenolik bileşiklere bağlanabilir. Ayrıca domates bitkisi üzerinde mekanik inokulasyon sırasında hazırlanan fosfat tamponun içerisine eklenen DIECA'nin 2-Mercaptoethanol'e göre inokulasyonda daha başarılı olduğu belirlenmiştir.

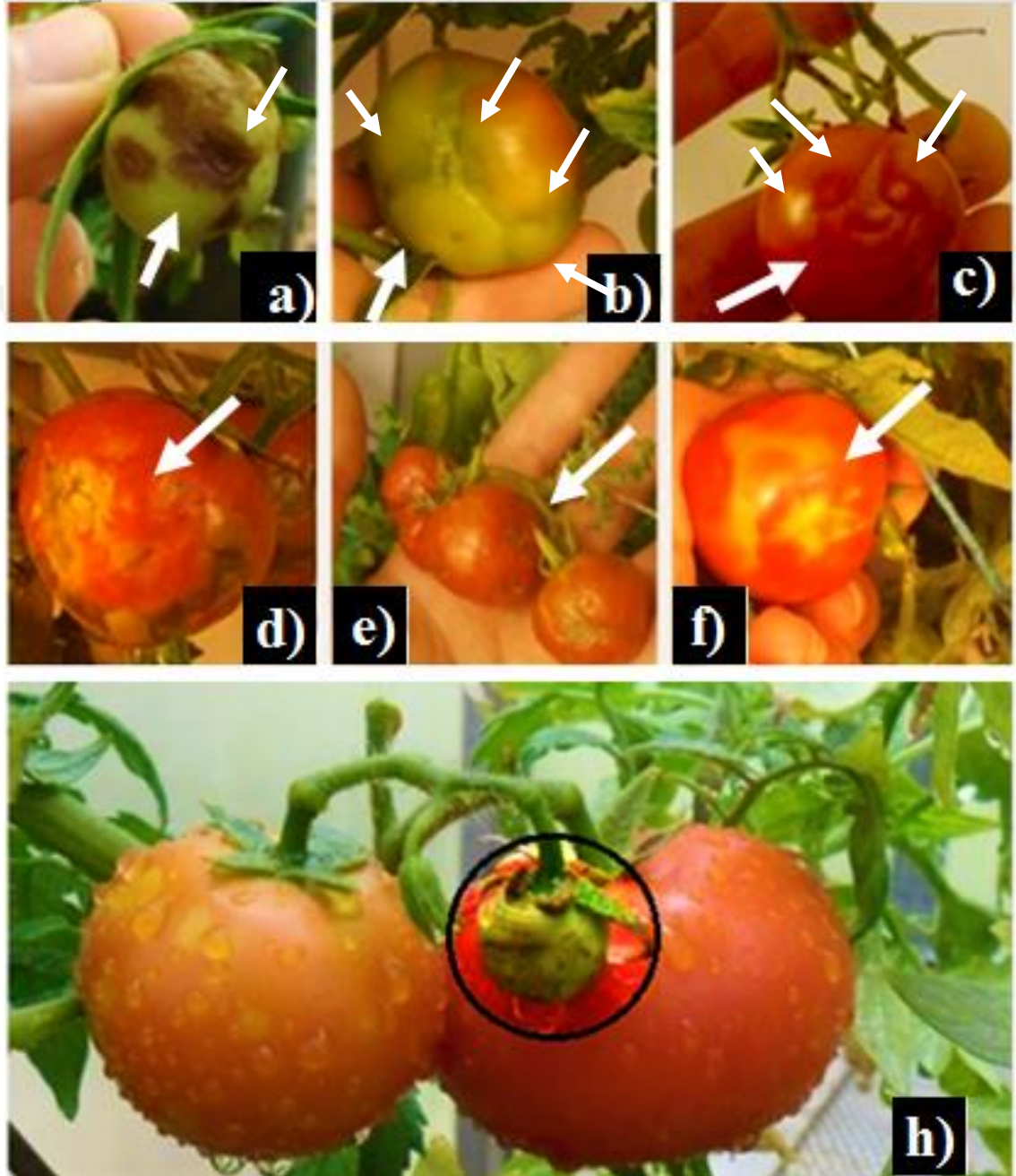
Mekanik inokulasyonun bitkilerin erken döneminde yapılması enfeksiyonun başarısını da artırmıştır. Bitkilerin ilk bulaştırması kotiledon dönemindeyken ufak yaralanmalar şeklinde yapılmıştır. Yapılan tez çalışması esnasında yapılan gözlemlere göre de erken dönemlerde meydana gelen enfeksiyonların daha yıkıcı olduğunu göstermiştir. Ayrıca birden fazla art arda yapılan inokulasyonların dayanıklı çeşitler üzerinde enfeksiyonun meydana gelmesinde başarıyı artıran bir parametre olduğunu göstermektedir.

Mekanik inokulasyonu takip eden süreç içerisinde bitkinin gelişim periyodu boyunca uygulama serasının sıcaklıkları 23-25 °C arasında değişmiş olduğu kayıt edilmiştir. Çalışma süresince dayanıklılığı kıran izolatın devamlılığını sağlamak amacıyla inokulasyonlara devam edilmiştir. Sıcaklık değişimlerine bağlı olarak virüs belirtilerinde de değişiklikler meydana geldiği yapılan gözlemler ile belirlenmiştir. Çünkü yetiştirilme dönemi içerisindeki sıcaklık değişimlerinin bitkilerin yetiştirilme döneminde biyolojik süreçlerin önemini ortaya koymaktadır.

Bu parametreler bitkilerin yetiştirilme dönemlerinde virüslerden kaynaklı ekonomik zarar boyutlarını, belirtilerin belirginleştiği dönem içerisinde saptanmalıdır. Bu süre içerisinde sıcaklık arttıkça TSWV enfeksiyonuna ait belirtilerin artışının sıcaklıkla doğru orantılı artışı belirlenmiştir.

Önceki çalışmalarda da belirttiği gibi sıcaklık arttıkça TSWV enfeksiyonun arttığı rapor edilmiştir (Chung vd. 2018). TSWV'nin dayanıklılığı kıran izolatı arasında yüksek sıcaklıkların belirleyici bir faktör olabileceği düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında TSWV'nin dayanıklılığı kıran izolatının sıcaklığın yüksek olduğu bölgelerde başta domates ve biber bitkilerinin yetişmesini olumsuz etkileyerek, bu alanlarda domates tarımının yapılmasını imkânsız hale getirdiği belirtilmiştir. Sıcaklığın yüksek olduğu alanlarda domates ve biber gibi konukçuların üretim periyodu içerisinde tercih edilmemesi, bu ürünler yerine başka konukçu olmayan ürünlerin tercih edilmesi TSWV

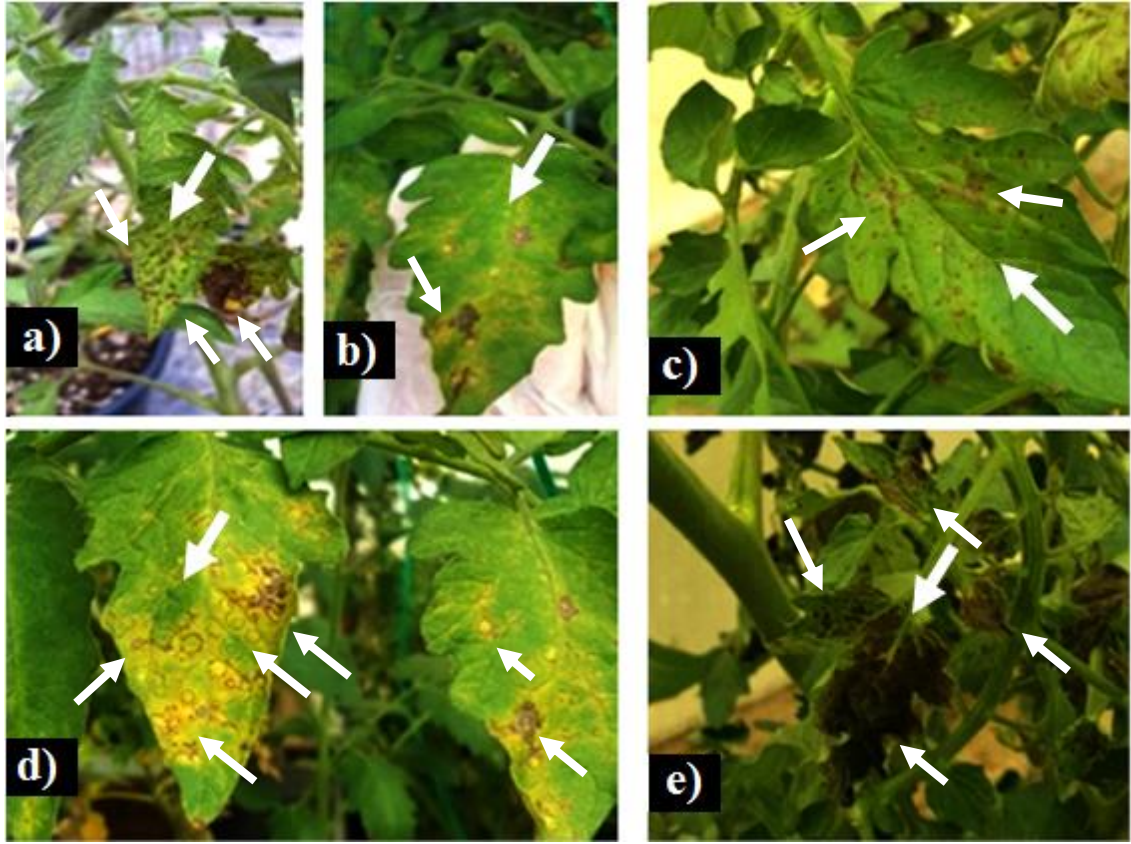
ile mücadelede önemli bir adım atılmasını sağlayabilir. Türkiye’de domatesin ilk dayanıklılığı kıran izolatin Antalya ili ve çevresinde dayanıklı bitkiler üzerinde saptanması (Fidan 2016) bu izolatin sıcak bölgelerde salgın hale gelmesi ile açıklanabilmektedir. Ülkemizin iç kısımlarında domates bitkileri üzerinde dayanıklılığı kıran izolata ait bir rapor elde edilmemiştir. Bu da domates ve biber tarımının ülkemizin iç kısımlarında yetiştiriciliğinin daha elverişli olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 5.1. Meyve üzerinde TSWV’ye ait farklı semptomlara ait gözlemlerin resmi. **h)** bitkinin ilk enfeksiyon döneminde sadece bir meyve üzerinde semptom meydana getirirken diğer meyvelerin oldukça sağlıklı olduğu görülmekte, diğer fotoğraflarda ise **a); b); c); d); e); f)** meyvelerin gelişim süreci içerisinde halkalı lekelenmeler ile birlikte

meyve etinde çöküntü lekeleri ve kabarıklıklar kahverengi lekeler ve meyve renginde açılmalar şeklinde kendini gösterdiği belirtilmeye çalışılmıştır.

Mekanik inokulasyon sırasında ilk belirtilerin meyveler üzerinde koyu çöküntülü halkalar şeklinde olduğu gözlemlenmiştir. İlk enfeksiyonlar tek bir meyve üzerinde meydana gelirken sıcaklığın yükseldiği dönem boyunca bütün meyvelerde kendini göstermiş olup bulaşıklığın şiddetinde de artışlar meydana gelmiştir. İlk enfeksiyonlarda koyu halkalı lekeler şeklinde kendini belli ederken ilerleyen dönemlerde alacalı renk oluşumu, çöküntüler, küçük meyve oluşumu şeklinde meydana geldiği gözlemlenmiştir. Şekil 5.1’de ve Şekil 5.2’de denemede kullanılan domatesler üzerinde meydana gelen belirtiler paylaşılmıştır.



Şekil 5.2. Domates yaprakları üzerinde TSWV’nin neden olduğu farklı belirtilere ait gözlemler **a); c); e)** yaprak üzerinde küçük nekroz lekeler şeklindeki belirtiler, **d); b)** yaprak üzerinde meydana gelen halkalı lekelenmeler

Hastalığın incelenmesinin patojen, konukçu ve çevre faktörlerinin etkisi göz önüne alınarak yapılması önemlidir. Virüsün kalıtımını incelemek ve mutasyonları belirlemek için meydana geldiği bölgenin iklim özellikleri, taşıyıcı vektörleri ve konukçuları çok önemli bir yer tutmaktadır. TSWV enfeksiyonun meydana gelmesinde en büyük etkenlerden birisi de thrips vektörlerinin aktif ve yoğun popülasyonlarından meydana gelmektedir. Bu vektör ile mücadele TSWV’nin kontrol altına alınmasında en önemli ayrıntıyı oluşturmaktadır. Thrips vektörlerine karşı kullanılabilecek kimyasalların da kısıtlı olması TSWV enfeksiyonunun meydana gelmesine neden olmaktadır. Ayrıca içerisinde yabancı otların da bulunduğu çok geniş bir konukçu yelpazesi içerisinde yer

alması bu hastalığın epidemiyolojisini etkilemektedir. Bu faktörler göz önüne alındığı zaman TSWV'nin genomik bilgilerinin elde edilmesi gelecekte yapılacak olan çalışmalara öncülük etmeyi de hedeflemektedir. TSWV, yüksek düzeyde biyolojik çeşitlilik ve diğer bitki virüslerine göre büyük bir evrim ve adaptasyon yeteneği sergilemektedir (Qiu ve Moyer 1999; Tsompana vd. 2005). Birkaç yıl öncesine kadar domates ve biber üzerinde dayanıklı çeşitler kullanılırken TSWV'nin yeni ırkı bu konukçular üzerinde hastalanmalar meydana gelmesine neden olmuştur. Daha önce İspanya'da yapılan bir çalışmada dayanıklılığı kıran domates izolatında NSm- hareket proteini üzerinde benzeri olmayan özellikli nükleotidlerin değişmesi ile meydana geldiği rapor edilmiştir (Lopez vd. 2011). Ortamda ergin thrips vektörlerinin bulunmasının TSWV'nin yayılımı ile pozitif bir korelasyona sahip olduğu belirtilmiştir (Rotenberg vd. 2009). Bunun nedeninin ergin thripslerin daha fazla hareket yeteneğine sahip olmasından dolayı meydana geldiği düşünülmektedir. Ancak dişi ve erkek bireylerin TSWV dağılımında farklı etkinliğe sahip olduğu belirtilmiştir (Nagata vd. 2002; Rotenberg vd. 2009; Stafford vd. 2011). Bu sonuçlara rağmen İspanya'da dayanıklılığı kıran izolatların ortaya çıkışı ve salgın hale gelmesinin yapılan analizler doğrultusunda thrips vektörlerine bağlı olmadığı vurgulanmıştır (Lopez vd. 2015).

Domates izolatları arasında yapılan önceki çalışmalarda medium segmentinde nokta mutasyonları meydana gelebileceği belirtilmiştir. Yapılan tez çalışması esnasında yapılan çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz veriler doğrultusunda virüsün medium segmentinde NSm- hareket proteini üzerinde nokta mutasyonları meydana getirmesinden dolayı dayanıklılığı kıran izolatın ortaya çıktığı belirlenmiştir. Medium segmenti üzerinde Gc-Gn- bölgesi thrips vektörleri ile taşınma proteini üzerinde önemli bir mutasyona saptanmaması bu izolatların thripsler tarafından TSWV'nin iletim veriminde etkili olmadığını düşündürmektedir.

Sw-5 geninin, *Orthospovirüs*lerde HR yanıtları aracılığı ile dayanıklılık sağladığı bilinmektedir. Bitkilerde bir enfeksiyon meydana geldiği zaman bu gen aracılığı ile hızlı bir şekilde hücre ölümleri gerçekleşmekte ve virüs bu ölü hücreler içerisinde hapsolmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda *Orthospovirüs*lerin NSm proteinleri üzerinde meydana gelen nokta mutasyonlarının bu gen aracılığı ile sağlanan HR yanıtlarının başlamasını tetiklemediği ve dolayısıyla da bitkilerde virüs enfeksiyonlarının başladığı rapor edilmektedir (Leastro vd. 2015).

NSm proteini, bitkilerde *Orthospovirüs*lerin, plasmodemata yoluyla zarfsız nükleokapsitlerin hücreden hücreye hareketi ile yayılmasını kolaylaştıran yapısal olmayan bir proteindir (Kormelink vd. 1994; Storms vd. 1995). Bu nedenle NSm proteini plasmodemata yoluyla komşu sağlıklı hücrelere yayılma imkânı bulabilmektedir. Sw-5 geni aracılığı ile komşu hücrelere yayılma imkânı bulmadan ölü hücreler içerisinde virüs hapsolmaktaydı. Son zamanlarda ortaya çıkan dayanıklılığı kıran izolatların varlığı ile TSWV'nin hücreden hücreye taşınmasında etkili olan protein üzerinde mutasyonlar meydana getirerek komşu sağlıklı hücrelere yayılma imkânı bulabilmektedir.

TSWV'nin dayanıklılığı kıran izolatı çok yeni bir izolat olmasından dolayı TSWV'nin tüm genomuna ait dizi analizi oldukça azdır. Bu çalışma, ülkemizde de ilk defa gerçekleştirilmiş bir çalışma olma niteliğindedir. Dünya genelinde yapılan çalışmalara göre L segmentinde (RdRp) değişiklik olmadığı ve mutasyon alanlarının Medium ve Small segmentleri üzerinde meydana geldiği belirtildiği için çalışmada

Medium ve Small segmentleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu bilgiler doğrultusunda Medium ve Small segmentleri için tasarlanmış primerler ile dizi analizi çalışmaları yapılmış ve filogenetik analize dayalı bilgiler elde edilmiştir. TSWV'nin dünya çapında yapılan çalışmaları doğrultusunda Asya ve Avrupa olmak üzere iki ana gruba ayrıldığı belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlar TSWVAntRB izolatının en yakın ilişkiyi İspanya izolatı ile kurması bu izolatın Avrupa izolatları içerisinde yer aldığını göstermiştir.

Daha önceki çalışmalarda dayanıklılığı kıran ve kırmayan izolatların M segmentleri incelendiğinde 218. ve 220.pozisyonda bir aminoasit ikamesi ile meydana gelmesi sonucunda virüsün hareket proteinini kodlayan NSm geninin C118Y veya T120N mutasyonunun meydana geldiği belirtilmiştir (Lopez vd. 2011).

Tek nokta mutasyonuna bağlı dayanıklılığı kıran TSWV izolatına ait filogenetik ilişkiler incelendiği zaman bu izolatların coğrafik dağılımlarına bakıldığında birbirinden oldukça bağımsız bölgelere dağıldığı görülmüştür. Bunun nedeninin dayanıklı çeşitler üzerinde dayanıklılığı kıran izolatların pozitif bir seleksiyon yaparak birbirinden bağımsız inokulasyonların meydana gelebileceği şeklinde yorumlar yapılmıştır (de Ronde vd. 2014). TSWV'nin pozitif seleksiyonuna ait Sw-5 dayanımının kırılmasından sorumlu olan NSm proteini üzerindeki 118. noktanın ve Tsw geni vasıtasıyla biber bitkileri üzerinde meydana gelen mutasyonun birbirleri ile ilişkilendirilmemesine rağmen, hem biberde hem de domates üzerinde dayanıklılığın kırılmasının pozitif seleksiyona dayandırıldığı rapor edilmiştir (Margaria vd. 2007; Tentchev vd.2011; Lopez vd. 2011).

Bir diğer görüş ise TSWV'nin taşınmasında etkin rol oynayan thrips vektörleri varlığı ile ilişkilendirilmektedir. Dayanıklılığın kırılmasında rol oynayan izolatın thrips vektörleri vasıtasıyla uzak mesafelere taşınması mümkün olabilmektedir. Fakat thrips bünyesinde biriken TSWV izolatının dayanıklılığın kırılmasında bir ilişkilendirme olmadığı belirtilmiştir (Debreczeni vd. 2014). Farklı kıtalardan elde edilen izolatların filogenetik ilişkisinin muhtemelen vektör thripslerin uzun mesafelerde göç yetenekleri ile enfeksiyonun taşınmasında etkili olabileceği savunulmuştur (Lopez vd. 2011).

Thrips vektörlerinin ortamdaki yoğunluğunun TSWV izolatının epidemiyolojik karakterinin değerlendirilmesinde etkili olduğunu belirtmektedir. TSWV'nin yeni konukçular üzerinde adaptasyonu için Medium segmentinde NSm proteini üzerinde C118Y noktasında meydana getirdiği mutasyonlar çok önemli olduğu bir başka çalışmada rapor edilmiştir. Sistein üzerinde meydana gelebilme ihtimali olan bu mutasyonun TSWV'nin evrimsel süreç içerisinde yeni konukçular üzerinde meydana getirdiği adaptasyonlarda kilit bir nokta olduğu düşünülmektedir (Lopez vd. 2011).

Yapılan moleküler ve filogenetik analizlerin sonucu olarak da ülkemizde domates tarımı yapılan alanlar üzerinde salgınlar meydana getiren dayanıklılığı kıran TSWV izolatının Avrupa izolatları içerisinde sınıflandırılarak en yüksek oranda ilişkiyi İspanya izolatı ile kurduğu belirlenmiştir. Bu durumun İspanya ile yaptığımız yoğun sebze ve meyve ithalat–ihracatı sırasında karantina merkezlerinde yapılan denetlemelerden kaçmış olabileceği ihtimalini oluşturmuştur.

6. SONUÇLAR

TSWV'ye Sw-5 geni ve Tsw geni aracılığı ile sağlanan dayanıklılığın kırılması ile meydana gelen izolatin hızlı bir şekilde bölgemizde yayılım göstermesi ve yetiştirme alanlarında ekonomik kayıplara neden olmasından dolayı, Sw-5 dayanımını kıran izolatin üzerinde meydana gelen değişikliklerin saptanması ve yeni dayanıklı çeşitlerin oluşturulabilmesi amacıyla moleküler yöntemler kullanılarak yeni izolatin özellikleri belirlenmiştir.

Bu amaç doğrultusunda yapılan tez çalışması kapsamında TSWV dayanımını kıran izolatin varlığını belirleyebilmek için klasik test yöntemlerinden mekanik inokulasyon yöntemi gerçekleştirilmiştir. Mekanik inokulasyon sonrası gözlemlere göre domatestte dayanıklılığı kıran izolat ilk olarak hassas çeşitlerde gözlemlenmiştir. Dayanıklı çeşitler üzerinde ise meydana gelen belirtiler ilk olarak meyvelerde gözlemlenmiştir. Eski izolata göre hastalık belirtilerinin daha büyük halkalar oluşturduğu ve daha şiddetli belirtiler meydana getirdiği saptanmıştır. TSWV'ye ait dayanıklılığı kıran izolatin sıcaklığa bağlı olarak belirtilerinde artış olduğu saptanmıştır. Yaprak belirtileri ise ilk zamanlarda küçük nokta nekrozlar şeklinde meydana gelirken ilerleyen zamanlarda yaprak üzerinde halkalar şeklinde belirtiler gözlemlenmiştir. Yaprak enfeksiyonları ise eski izolata göre daha yoğun olduğu belirlenmiştir. Yapraktaki ve meyve üzerindeki belirtilerin hava sıcaklığına bağlı olarak artışı saptanmıştır.

Mekanik inokulasyon sonrasında belirti gösteren izolatlar RT-PCR teknikleri ile tüm genom bilgileri elde edilmeye çalışılmıştır. Tüm genom bilgileri elde edildikten sonra NCBI sisteminde bu izolata ait bilgiler Small segmenti için MH367505, Medium Segmenti için MH367503 isimleri ile kaydedilerek bilim dünyasının kullanımına sunulmuştur. TSWVAntRB izolatinın NCBI üzerinde kayıtlı izolatlar ile karşılaştırmaları yapılmıştır ve nükleotid bazında yapılan eşleştirmelerde İspanya (HM01520) izolatu ile en yüksek benzerliği gösterdiği belirlenmiştir. Bu izolatin bilgileri incelendiğinde dayanıklılığı kıran izolat olarak rapor edildiği görülmüştür.

Dizi analizleri sonucunda elde edilen nükleotid dizilimleri ile en yakın benzerlik oranına sahip dayanıklılığı kıran İspanya izolatu ile dayanıklılığı kırmayan TSWV izolatuve TSWVAntRB izolatlarının nükleotid, aminoasit ve protein bazında karşılaştırmalar yapılmıştır. Dayanıklılığı kıran izolatların Medium segmenti üzerinde NSm protein alanında C118Y bölgesinde bir nokta mutasyonu olduğu belirlenmiştir.

TSWV'nin Medium bölgesi üzerinde bulunan NSm protein alanı virüsün hücreden hücreye hareketini sağlayan bölgedir. Eski izolat üzerinde Sw-5 geni ile sağlanan dayanıklılık da HR reaksiyonları aracılığı ile bulaşık dokular içerisinde hızlı ölümler meydana gelerek bu dokular içerisinde virüs hapsolüp yeni dokulara bulaşma imkanı bulamamaktadır. Ama şu anda TSWV'nin dayanımını kıran izolatin NSm yani hücreden hücreye geçiş bölgesinde meydana getirdiği nokta mutasyonu sayesinde Sw-5 geni etkisiz kalıp virüsün enfeksiyonu gerçekleştirebilmekte olduğu görülmüştür.

TSWVAntRB'nin üzerinde meydana gelen mutasyonlar belirlendikten sonra bu izolatinın dünya izolatları arasındaki yerini belirleyebilmek için TSWV'e ait izolatlar seçilmiş ve filogenetik analizler oluşturulmuştur. Medium ve Small segmentleri için oluşturulan filogenetik ağacın ikisinde de İspanya izolatları ile aynı dal içerisinde yer

aldığı belirlenmiştir. Medium bölgesine ait filogenetik ağacın özelliklerine bakıldığı zaman TSWVAntRB izolatı ve İspanya izolatının dahil olduğu grubun NCBI üzerinde dayanıklılığı kıran izolatlar ismi ile kayıt edilen izolatlar olduğu belirlenmiştir. Bölgemizden elde edilen TSWVAntRB izolarının İspanya izolatı ile ortak grublantması bu izolatın Avrupa izolatları içerisinde yer aldığını göstermektedir. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda TSWVAntRB izolatının Avrupa kökenli izolatlar içerisinde yer aldığını göstermiştir.

Tek iplikçi RNA virüsleri için rekombinasyon olaylarının, bir izolatın yeni çevre koşullarına ve konukçulara adaptasyon sağlaması için büyük bir evrimsel süreçte dahil olarak meydana geldiği düşünülmektedir. TSWV gibi çok segmentli yapıya sahip olan ambisens karakterli RNA virüsleri için rekombinasyon olayları ile meydana gelen genetik değişiklikler çok önemli olabilmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda TSWV gibi çok segmentli yapıya sahip olan virüsler üzerinde nokta mutasyonları şeklinde meydana gelen değişiklikler veya iki nükleotid arasında meydana gelen değişimler sayesinde yeni izolatların ortaya çıktığı vurgulanırken TSWVAntRB izolatı üzerinde yapılan tüm genom çalışmasında sadece nükleotid bazında meydana gelen nokta mutasyonları nedeniyle protein bazında değişiklikler meydana geldiği tespit edilmiştir.

Yabani gen kaynaklardan ıslah çalışmaları ile elde edilen TSWV'ye karşı dayanıklılık uzunca bir dönem etkin bir şekilde enfeksiyonların meydana gelmesini önlerken son zamanlarda ortaya çıkan dayanıklılığı kıran izolatın varlığı ile dünyada ve ülkemizde yoğun tarımı yapılan domates, biber gibi bitkilerin üzerinde ciddi ekonomik kayıplara neden olmuştur. Bu nedenle dayanıklılığın üstesinden gelerek hastalıkların ortaya çıkmasındaki evrimsel süreçlerin incelenmesi daha etkili ve daha kalıcı dayanıklılık geliştirmek için oldukça önemli bir adımı oluşturmaktadır. Hastalığın kontrol stratejilerini oluşturabilmek için öncelikli olarak hastalığın epidemiyolojik ve biyolojik olarak yapısını anlamamanın önemi çok büyüktür. Ülkemizde de tüm genom verilerinin elde edilmesine ait çalışmaların eksik olması TSWV'nin tüm genom bilgilerinin elde edilmesine yönelik yürütülen bu çalışmanın önemini artırmaktadır.

Bu çalışma, dünyada ve ülkemizde en önemli üretim ve tüketim ürünlerinden olan domates bitkisi üzerinde meydana gelen TSWV'nin son yıllarda meydana getirdiği ekonomik kayıplardan dolayı yapıma gereği duyulmuştur. Sw-5 geni aracılığı ile sağlanan TSWV'ye karşı uzunca bir dönem dayanıklılık sağlanarak sağlıklı bir üretim gerçekleştirilebilirken son zamanlardaki şikâyetler doğrultusunda virüsün genel yapısı ve dayanıklılığı kıran izolatın özelliklerini öğrenme gerekliliği ortaya çıkmıştır. Dayanıklılığı kıran izolat hakkında elde edilen tüm genom bilgisi ilerleyen çalışmalarda bu virüs için elde edilecek dayanıklı çeşitlerin daha uzun ömürlü olmasını sağlayacaktır.

Virüs popülasyonlarının yapısı ve genetik değişimleri ve bunların evrimi, beş ana evrimsel kuvvetin etkileşimi ile belirlenmektedir: Mutasyon, genetik değişim (genomik segmentlerin rekombinasyonu ve yeniden düzenlenmesi), doğal seleksiyon, genetik sürüklenme ve göç (Moya vd. 2004). Farklı izolatlar arasındaki mutasyon ve genetik değişim, doğal seleksiyon, genetik sürüklenme ve genetik akış limiti genetik çeşitliliğin oluşturucularıdır ve virüs popülasyonların genetik çeşitliliğini oluşturmaktadır. Virüslerin evriminde rol oynayan faktörlerin bilinmesi, moleküler biyoloji ve epidemiyolojide (yeni virüslerin ortaya çıkması dâhil) yer alan süreçleri anlamak ve daha

etkili ve dayanıklı kontrol stratejileri geliştirmek için çok önemlidir (Garcia vd. 2001; Moya vd. 2004).

TSWV izolatının genomuna ait nükleotid dizi analizlerinin belirlenmesi ve dünya izolatları ile filogenetik olarak karşılaştırılması sonucunda TSWV izolatının evrimsel süreç içerisinde mutasyonlar aracılığı ile dayanıklı bitkilerde enfeksiyonlar meydana getirerek kendilerine yaşam alanı sunmaktadır. Virüsün biyolojik yapısının ve evrimsel mekanizmasının nasıl işlediğine ait çalışmalar o virüs hakkında daha uzun ömürlü dayanıklı çeşitlerin sağlanması için oluşturulacak olan bir adımdır.



7. KAYNAKLAR

- Adams, M.J, Lefkowitz, E.J., King, A.M.Q., Harrach, B., Harrison, R.L., Knowles, N.J., Kropinski, A.M., Kuhn, M.K.H., Mushegian, A.R., Nibert, M., vd. 2017. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses, Archives of Virology, 162: 2505–2538.
- Adkins, S., 2000. *Tomato spotted wilt virus*-positive steps towards negative success. Mol Plant Pathol 1:151-157.
- Almasi, A., Csillery, G., Csomor, Z., Nemes, K., Palkovics, L., Salanki, K., Tobias, 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 (1):71-78.
- Anfoka, G., Abhary, M., Haj Ahmad, F., Hussein, A.F., Rezk, A., Akad, F., Abou-Jawdah, Y. M., Lapidot, F., Vidavski, M.K., Nakhla, H., Sobh, H., Atamian, L., Cohen, I., Sobol, H., Mazyad, D.P., Maxwell and Czosnek, H. 2008. Survey Of *Tomato yellow leaf curl disease*-Associated Viruses In The Eastern Mediterranean Basin Journal of Plant Pathology, 90 (2), 311-320.
- Anonim 1 : https://www.tarim.gov.tr/TAGEM/Menu/28/Yayinlar_veriler Son erişim tarihi: 15.05.2018.
- Anonymous 1: <https://www.eppo.int/QUARANTINE/quarantine.htm> Son erişim tarihi: [19.05.2018]
- Anonymous 2 : https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/Tomato_SpottedWilt.aspx Son erişim tarihi: [19.05.2018]
- Aramburu, J., Aos, L. 2001. Incidencia del virus del bronceado del tomate (TSWV) en cultivos de lechuga y pimiento de Cataluña e influencia de las prácticas culturales. Phytoma Espana La revista profesional de sanidad vegetal, 37-41.
- Aramburu, J., Galipienso, L., Soler, S., Rubio, L., Lopez, V. 2015. A severe symptom phenotype in pepper cultivars carrying the *Tsw* resistance gene is caused by a mixed infection between resistance-breaking and non-resistance-breaking isolates of *Tomato spotted wilt virus*. Phytoparasitica, 43(5):597-605.
- Aramburu, J., Marti, M. 2003. The occurrence in north-east Spain of a variant of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the *Sw-5* gene. Plant Pathology, 52:407.
- Arli-Sokmen, M., H, Mennan, M.A. Sevik, Ecevit, O. 2005. Occurrence of Viruses in Field-grown Pepper Crops and Some of Their Reservoir Weed Hosts in Samsun, Turkey. Phytoparasitica, 33 (4): 347-358.
- Arli-Sokmen, M., Sevik, M.A. 2006. Viruses infecting field grown tomatoes in Samsun province, Turkey. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 39: 283-288.

- Azeri, T. 1981. Preliminary report of *Tomato spotted wilt virus* and its epidemy on tobacco in the Çanakkale Region of Turkey. *Journal of 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.
- Bargen., S.V., Salchert, K., Paape, M., Piechulla, B., Kellmann, J.W. 2001. Interactions between the *Tomato spotted wilt virus* movement protein and plant proteins showing homologies to myosin, kinesin and DnaJ-like chaperones. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(12):1083-1093.
- Bozdoğan, V. 2009. Antalya ilinde domates, biber ve marul yetiştirilen alanlarda Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)'nün saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 65
- Briese, T., Calisher, C.H., Higgs, S. 2013. Viruses of the family *Bunyaviridae*: Are all available isolates reassortants?. *Virology*, 446:207-216.
- Brittlebank, C. 1919. A new tomato disease, spotted wilt. *Journal of Agriculture*, 27:231-235.
- Carrillo, J., Davila, R., Pale, S., Ricardo, J., Siclan, S., Lidya M., Cerda, L. 2014. Spatial modelling of eggs of Thrips (*Thysanoptera: Frankliniella occidentalis*) in husk tomatoes through geostatistical techniques. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 46(1):29-44.
- Chapman, E.J., Hilson, P., German, T.L. 2003. Association of L Protein and in vitro *Tomato spotted wilt virus* RNA-Dependent RNA Polymerase Activity. *Intervirology*, 46:177-181.
- Chung, B.N., Lee, J.H., Kang, B.C., Koh, S.W., Joa J.H., Choi, K.S., Ahn, J.J. 2018. HR-Mediated Defense Response is Overcome at High Temperatures in *Capsicum* Species. *Plant Pathology*, 34(1): 71-77.
- Coutts, B.A., Jones, R.A.C. 2003. Suppressing spread of *Tomato spotted wilt virus* by drenching infected source or healthy recipient plants with neonicotinoid insecticides to contro thrips vectors. *Annals of Applied Biology*, 146: 95-103.
- Çelik, İ., Özalp, R., Çelik, N., Polat, İ., Sülü, G. 2017. Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV)'ne dayanıklı sivri biber hatlarının geliştirilmesi. *Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Antalya*. 25(1): 27-36.
- de Haan, P., Kormelink, R., de Oliveira, R., Van Poelwijk, F., Peters, D., Goldbach, R. 1991. *Tomato spotted wilt virus* L RNA encodes a putative RNA polymerase. *Journal of General Virology*, 72:2207-2216.
- de Haan, P., Wagemakers, L., Peters, D., Goldbach, R. 1990. The S RNA segment of *Tomato spotted wilt virus* has an ambisense character. *Journal of General Virology*, 71 (5):10011007.
- de Ronde, D., Butterbach, P., Kormelink, R. 2014. Dominant Resistance Against Plant Viruses Dominant Resistance Against Plant Viruses. *Front. Plant Science*, 5:307.

- Debreczeni, E. D., Lopez, C., Aramburu, J., Darós, J.A., Soler, S., Galipienso, L., Bryce, W., Rubio, F. 2015. Complete Sequence Of Three Different Biotypes Of *Tomato spotted wilt virus* (Wilt Type, Tomato Sw-5 Resistance-Breaking And Pepper Tsw Resistance-Breaking) From Spain. *Archives of Virology*, 160: 2117–2123.
- Debreczeni, D. E., Rubio, L., Aramburu, J., Lopez, C., Galipienso, L., Soler, S., Belliure, B. 2014. Transmission of *Tomato spotted wilt virus* isolates able and unable to overcome tomato or pepper resistance by its vector *Frankliniella occidentalis*. *Annals of Applied Biology*. 164(2): 182-189.
- Debreczeni, D.E. 2015, Caracterización de aislados del virus del bronceado del tomate (TSWV) que superan las resistencias de los genes Sw-5 en tomate y Tsw en pimiento. Identificación de una fuente de tolerancia en pimiento. doi:10.4995/Thesis/10251/51460
- Debreczeni, D.E., Lopez, C. 2015. Complete Sequence Of Three Different Biotypes of *Tomato Spotted Wilt Virus*. *Archives of Virology*. 160(8): 2117-2113.
- Değirmenci, K., Uzunoğulları, N. 2007. Marmara Bölgesinde domates yetiştiricilik alanlarında sorun olan virüslerin belirlenmesi, *Bitki Koruma Bülteni*, 47(1-4): 72-77.
- Deligöz, I. 2014. First report of resistance breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* (*Tospovirus*; *Bunyaviridae*) on resistant sweetpepper cultivars in Turkey. *New Disease Reports*, 30-26.
- Dianese, E.C., Fonseca, M.E.N. 2010. Development of A Locus-Specific, Co-Dominant SCAR Marker for assisted-selection of the Sw-5 (*Tospovirus* Resistance) gene. *Molecular Breeding*, 25: 133-142.
- FAO. 2016. Food and Agricultural organization of the United Nations at <http://www.fao.org/statics/en/> Son erişim tarihi 07.01.2018.
- Fidan H. 2016. Antalya’da Örtü Altı Domates ve Biber Alanlarında Dayanıklılık Kıran *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) İzolatların Genetik Kıyaslanması, VI. Türkiye Bitki Koruma Kongresi KONYA, TÜRKİYE. 560-560.
- Fidan H., Adak N.A., Konuksal A., Akerzurumlu E., Yılmaz M.A. 2011. "Occurrence of *Alfalfa Mosaic Virus* (AMV) Diseases on Potato Crops in Northern Cyprus", 5th Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes, Tirana, Arnavutluk, 960: 341-346.
- Fidan, H., Koç, G., Topçu, T. 2016. Anthurium sp.’de Tomato Spoted Wilt Virus (TSWV) Enfeksiyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. *Alatarım*. 15(2): 28-36.
- Fuchs, M. 2009. Association of *Tobacco ringspot virus*, *Tomato ringspot virus* and *Xiphinema americanum* with a decline of highbush blueberry in New York. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, 15-17.

- Garcia-Arenal, F., Fraile, A., Malpica, J. M. 2001. Variability And Genetic Structure Of Plant Virus Populations. Annual Review of Phytopathology, 39: 157-186.
- Ge, B1., Li, Q., Liu, G., Lu, M., Li, S., Wang, H. 2013. Simultaneous detection and identification of four viruses infecting pepino by multiplex RT-PCR. Archives of Virology, 158(6): 1181-1187.
- German, T.L., Ullman, D.E., Moyer, J.W. 1992. *Orthotospoviruses*: Diagnosis, Molecular Biology, Phylogeny and Vector Relationships. Annual Review of Phytopathology, 30: 315-348.
- Goldbach, R. W., Peters, D. 1994. Possible causes of the emergence of Tospoviruses diseases. Seminars in Virology, 5: 113-120.
- Goldbach, R., Bucher, E., Prins, M. 2003. Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. Virus Research, 92: 207-212.
- Gordillo, L.F., Stevens, M.R., Millard, M.A., Geary, B. 2008. Screening two *Lycopersicon peruvianum* collections for resistance to *Tomato spotted wilt virus*. Plant Disease, 92(5): 694-704.
- Granval, N., Gracia, O. 1999. El género *Tospovirus* y su importancia en la horticultura. Avances en Horticultura, 4: 1-22.
- Grieco, F., Alkowni, R., Saponari, M., Savino, V., Martelli, G.P. 2008. Molecular detection of olive viruses. Bulletin OEPP EPPO Bulletin. 40(3-4): 469-473.
- Güldür, M.E., Marchouks, M.G.M., Yurtmen, E., Yılmaz, M.A. 1995. Mersin ve çevresinde yetiştirilen domateslerde zararlı yeni bir virüs *Tomato spotted wilt virus*. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 303-306.
- Güldür, M.E., Marchoux, G., Yurtmen, M., Yılmaz, M.A. 1995. Mersin ve çevresinde yetiştirilen domateslerde zararlı yeni bir virüs: *Tomato spotted wilt virus*. VII: Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 303-305.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Oxford University Press, Nucleic Acids Symposium Series No.41: 95-98.
- Hallwass, M., de Oliveira, A.S., Dianese, E., Lohuis, D., Boiteux, L.S., Nagata, A.K., Resende, R.O., Kormelink, R. 2014. The *Tomato spotted wilt virus* cell-to-cell movement protein (NSM) triggers a hypersensitive response in Sw-5-containing resistant tomato lines and in *Nicotiana benthamiana* transformed with the functional Sw-5b resistance gene copy. Molecular Plant Pathology, 15(9): 871-880.
- Heiser, C.B., Anderson, G. 1999. Perspectives on new crops and new uses: "New" solanums. Alexandria V: ASHS Press, 379-384.

- Kamberoğlu, M.A., Atakan, E., Uygur, S., Çalışkan, A.F., Küçük, B., 2005. Türkiye’de *Ranunculus* spp. Üzerinde *Domates Lekeli Solgunluk Virüsü* (TSWV) enfeksiyonu. *J. Turk Phytopathology*. 34(1-3): 27-29.
- Kamberoğlu, M.A., Çalışkan A.F., Alan, B. 2009. First Report of *Tomato spotted wilt virus* on eggplant in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 91(1): 231-231.
- Karavina, C., Gubba, A. 2017. Detection and characterization of *Tomato spotted wilt virus* infecting field and greenhouse-grown crops in Zimbabwe In: *European Journal of Plant Pathology*. *European Journal of Plant Pathology*, 149(4): 933-944.
- Kikkert, M., Verschoor, A., Kormelink, R., Rottier, P., Goldbach, R. 2001. *Tomato spotted wilt virus* Glycoproteins Exhibit Trafficking and Localization Signals That Are Functional in Mammalian Cells. *Journal of Virology*, 75(2): 004-1012.
- King, A., Lefkowitz, E., Adams, M.J. 2011. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. An Elsevier. 739.
- Kormelink, R., Storms, M., Van, j., Peters, L.D., Goldbach, R. 1994. Expression and Subcellular Location of the NSM Protein of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), a Putative Viral Movement Protein, 200: 56-65.
- Kumar S., Udaya Shankar, A.C., Nayaka, S.C., Lund, O.S., Prakas, H.S. 2011. Detection of *Tobacco mosaic virus* and *Tomato mosaic virus* in pepper and tomato by multiplex RT-PCR. *Letter in applied Microbiology*, 359-363.
- Küçük, B. 2006. Adana ve Mersin illerinde *Domates Lekeli Solgunluk Virüsü* (*Tomato Spotted Wilt Virus*, TSWV)’ nin değişik yöntemlerle saptanması. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Ana Bilimdalı Yüksek Lisans Tezi ADANA. 72.
- Leastro, M.O., Pallas, V., Resende, R.O., Sanchez-Navarro, J.A. 2015. The movement proteins (NSm) of distinct *Tospoviruses* peripherally associate with cellular membranes and interact with homologous and heterologous NSm and nucleocapsid proteins. *Virology*, 478: 39-49.
- Lee, J.-S., Cho, W. K., Choi, H., Kim, K.H. 2011. RT-PCR Detection of Five Quarantine Plant RNA Viruses Belonging to Potyand Tospoviruses. *Plant Pathology*, 27(3): 291-296.
- Lewandowskia, D.J., Adkins, S. 2005. The tubule-forming NSm protein from *Tomato spotted wilt virus* complements cell-to-cell and long-distance movement of *Tobacco mosaic virus* hybrids. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.06.050>.
- Lian, S., Lee, J.S., Cho, W.K., Kim, M.K., Choi, H.S., Kim, K.H. 2013. Phylogenetic and Recombination Analysis of *Tomato spotted wilt virus*. *PLOS ONE*, 8: 1-11.
- Lodos, N. 1982, Türkiye Entomolojisi II. genel, uygulamalı, faunistik. Ege Üniv. Ziraat Fakültesi yayınları no. 429. Bornova-İzmir. 591
- Lodos, N. 1982. Türkiye Entomolojisi, Genel Uygulamalı ve Faunistik, Cilt:II, Ege Üniv. Ziraat Fak. Yayınları: 429, Ders Kitabı, İzmir, 542.

- Lopez, C., Aramburu, J., Galipienso, L., Soler, S., Nuez, F., Rubio, L. 2011. Evolutionary analysis of tomato Sw-5 resistance-breaking isolates of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of General Virology*, 92: 210-215.
- Lopez, C., Rubio, L., Aramburu, J., Galipienso, L., Rubio, L., Soler, S., Lopez, C. 2015. A severe symptom phenotype in pepper cultivars carrying the *Tsw* resistance gene is caused by a mixed infection between resistance-breaking and non-resistance-breaking isolates of *Tomato spotted wilt virus*. *Phytoparasitica*, 43(5): 597-605.
- Macharia, I., Backhouse, D., Wu, S.-B., Ateka, E.M. 2016. Weed species in tomato production and their role as alternate hosts of *Tomato spotted wilt virus* and its vector *Frankliniella occidentalis*. *Annals of Applied Biology*, 169(2): 224-235.
- Mandal, B., Csinos, A.S., Martinez-Ochoa, N., Pappu, H.R. 2001. A rapid and efficient inoculation method for *Tomato spotted wilt tospovirus*. *Journal of Virological Methods*, 149(1): 195-198.
- Margaria, P., Ciuffo, M., Pacifico, D., Turina, M. 2007. Evidence that the nonstructural protein of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the interaction with resistant pepper carrying the *Tsw* gene. *Mol Plant Microbe Interact*, 20: 547-558.
- Margaria, P., Ciuffo, M., Turina, M. 2004. Resistance breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* (*Tospovirus*; *Bunyaviridae*) on resistant pepper cultivars in Almería, Spain. *Plant Pathology*, 53(6): 795.
- Margaria, P., Miozzia, L., Rosab, C., Axtell, M.J., Pappud, R.H., Turina, M. 2015. Small RNA profiles of wilt-type and silencing suppressor-deficient *Tomato Spotted Wilt Virus* infected *Nicotiana benthamiana*, 208: 30-38.
- Martinelli, F., Grillone, G., Sgroi, F. 2014. Proposal of a genome editing system for genetic resistance to *Tomato spotted wilt virus*. *American Journal of Applied Sciences*, 11(11): 1904-1913.
- Mitidieri, M., de Mitidieri, I., Dal Bo, E. 2001. Evaluation of tomato hybrids resistant to tswv under greenhouse conditions in Argentina. *Acta Horti*, 559: 775-779.
- Moritz, G., Kumm, S., Mound, L. 2004. *Tospovirus* transmission depends on thrips ontogeny. *Virus Research*, 100: 143-149.
- Moya, A., Holmes E. C., Gonzalez-Candelas, F. 2004. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 2(4): 279-288.
- Moyle, R., Pretorius, L.S., Morgan, J.D., Persley, D., Schenk, P. 2016. Analysis of the first complete genome sequence of an Australian *Tomato spotted wilt virus* isolate, 45: 509-512.
- Nagata, T., Inoue-Nagata, A.K., van Lent, J., Goldbach, R., Peters, D. 2002. Factors determining vector competence and specificity for transmission of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of General Virology*, 83: 663-671.

- Nagata, T., Peters, D. 2001. An anatomical perspective of *Tospovirus* transmission. In: Harris KF, Smith OP, Duffus JE (eds) *Virus–insect–plant interactions*. Academic Press, New York, 51–67.
- Ogada, P.A., Moualeu, D.P., Poehling, H.M. 2016. Predictive Models for *Tomato spotted wilt virus* Spread Dynamics, Considering *Frankliniella occidentalis* Specific Life Processes as Influenced by the Virus. *PLOS ONE*, 11(5): 1-20.
- Ogada, P.A., Poehling, H.M. 2015. Sex-Specific Influences of *Frankliniella occidentalis* (Western Flower Thrips) in the Transmission of *Tomato spotted wilt virus* (*Tospovirus*) *Journal of Plant Diseases and Protection*, 122(5-6): 264-274
- Oğuz, A., Ellialtıoğlu, Ş.Ş., Çelik, N. , Kabaş ,A., Zengin,S. 2014.Bazı Domates Hatlarının Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (Tswv=*Tomato spotted wilt virus*)’Ne Karşı Reaksiyonlarının Mekanik İnokulasyon Yöntemi İle Belirlenmesi.Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi., 26 (1): 40-50.
- Pappu, H.R., Jones, R.A.C., Jain, R.K. 2009. Global status of *Tospovirus* epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Research*, 141: 219–236.
- Parrella, G., Gognalons, P., Gebre-Selassie, K., Vovlas, C., Marchoux, G. 2003. An Update Of The Host Range Of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of Plant Pathology*. 85(4):227-264.
- Peiro, A., Canizares, M.C., Rubio, L., Lopez, C., Moriones, E., Aramburu, J., Sanchez-Navarro, J. 2014. The movement protein (NSm) of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the tomato Sw-5 gene-based resistance. *Molecular Plant Pathology*, 15: 802-813.
- Peralta, I.E., Spooner, D.M. 2005. Morphological characterization and relationships of wilt tomatoes. (*Solanum L. section Lycopersicon*).*Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 104: 227-257.
- Qiu, W., Moyer, J.W. 1999. *Tomato spotted wilt* Tospovirus adapts to the TSWV N gene-derived resistance by genome reassortment. *Phytopathology*, 89: 575-582.
- Rick, C.M. 1973. Potential Genetic Resources in Tomato Species: Clues from Observations in Native Habitats. In: Srb A.M. (eds) *Genes, Enzymes, and Populations*. *Genes, Enzymes, and Populations*, 225-269.
- Rodriguez, Y., Manso, T.L.D., Salatti, R.C. 2007. El virus del bronceado del tomate. (TSWV) y su incidencia en el cultivo de pimiento. *Temas de Ciencia y Tecnologia*, 32: 33-39.
- Rosello, S., Diez, M.J., Nuez, F. 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. I. The *Tomato spotted wilt virus* - a review. *Scientia Horticulturae*, 67: 117-150.
- Rotenberg, D., Krishna Kumar , N.K., Ullman, D.E., Montero-Astua, M., Willis, D.K., German, T.L., Whitfield, A.E. 2009. Variation in *Tomato spotted wilt virus* Titer

- in *Frankliniella occidentalis* and Its Association with Frequency of Transmission. *Phytopathology*, 99: 404-410.
- Saidi, M., Warade, S.D. 2008. Tomato breeding for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV): An overview of conventional and molecular approaches. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 44: 83-92.
- Saleh, M.A., Amer, M.A. 2013. Biological and Molecular Variability of Alfalfa mosaic virus Affecting Alfalfa Crop in Riyadh Region. *Plant Pathology*, 29(4):410-417.
- Salomone, A., Masenga, V., Minuto, G., Parodi, C., Roggero, P. 2000. First report of *Tomato spotted wilt virus* (*Tospovirus*, *Bunyaviridae*) infecting *Euphorbia eritrea* and *Asclepias curassavica* in Liguria, Italy. *Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2003.00915.x>
- Samuel, G., Bald, J., Pittman, H. 1930. Investigations on spotted wilt of Tomatoes. Australia, Council for Scientific and Industrial Research Bulletin, 44
- Sertkaya, G. 2015. Hatay İli Marul ve Ispanak Alanlarında Bazı Virüslerin Araştırılması. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20(1): 7-12
- Snippea, M., Borst, J.W., Goldbach, R., Kormelink, R. 2007. *Tomato spotted wilt virus* Gc and N proteins interact in vivo. *Virology*, 357(2):115-123.
- Spasova, M.I., Prins, T.W., Folkertsma, R.T., Klein-Lankhorst, R.M., Hile, J., Goldbach, R.W., Prins, M., 2001. The tomato gene Sw-5 is a member of coiled coil, nucleotide binding, leucine rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. *Molecular Breeding*, 7: 151-161.
- Srinivasan, R.A., Culbreath, M.R., Kemerait, A.K., Tubbs, R.C., Monfort, R.S., Pappu, W.S. 2017. Three decades of managing *Tomato spotted wilt virus* in peanut in southeastern United States *Virus Research*, 241: 203.
- Stafford, C.A., Walker, G.P., Ullman, D.E. 2011. Infection with a plant virus modifies vector feeding behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 9350-9355.
- Stevens, M.R., Scott, J.J., Gergerich, R.C. 1992. Inheritance of a gene for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica*, 59: 9-17.
- Storms, M. H., Kormelink, R., Peters, D., Lent, J. W. M. V., Goldbach, R. W. 1995. The Nonstructural NSm Protein of *Tomato spotted wilt virus* Induces Tubular Structures in Plant and Insect Cells, 214: 485-493.
- Sun, X.H., Gao, L.L., Wang, S.L., Wang, C.L., Yang, Y.Y., Wang, X.Y., Zhu, X.P. 2016. First report of *Tomato spotted wilt virus* infecting pumpkin in China. *Journal of Plant Pathology*, 98(3): 687.
- Şevik, M. 2007. Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV)'nün Tarımsal Ürünlerde Meydana Getirdiği Ekonomik Kayıplar. *R.Ü.Z.F. Dergisi*, 15(1): 35-42.
- Şevik, M. 2014. Thrips (Thripidae: *Thysanoptera*) Türleri İle Taşınan Bitki Virüsleri. *DergiPark*, 25(1): 1-11

- Şevik, M.A., Arlı-Sökmen, M. 2007. Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV) nün trips türleri (*Thrips tabaci* Lindeman ve *Frankliniella intonsa* Tryborn) ile yayılış durumunun incelenmesi. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi. 115.
- Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S., Okuno, T. 2002 Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. FEBS Lett., 532: 75-79.
- Taylor, I.B.1986. Biosystematics of the tomato. In: Atherton J.G., Rudich J. (eds) The Tomato Crop. The Tomato Crop (A scientific basis for improvement). Springer, Dordrecht,1-34.
- Tekinel, N., Dolar, M.S., Sağsöz, S., Salcan, Y. 1969. Mersin bölgesinde ekonomik bakımdan önemli bazı sebzelerin virüsleri üzerinde araştırmalar. Bitki Koruma Bülteri, 9: 37-49
- Tentchev, D., Verdin, E., Marchal, C., Jacquet ,M., Aguilar, J.M., Moury, B. 2011. Evolution and structure of *Tomato spotted wilt virus* populations: evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes Journal of General Virology, 92: 961-973.
- Tiberini, A., Tomassoli, L., Barba, M. and Hadidi, A. 2010. Oligonucleotide microarray-based detection and identification of 10 major tomato viruses. Journal of Virological Methods, 168: 133–140.
- Todd, W.,Culbreath, A.K., Chamberlin, J. R., Beshear B. R. J., Mullinix, G. 1995. Colonization and population dynamics of thrips in peanuts in the southern united states. Thrips Biology and Management, 453-460.
- Tsompana, M., Abad, J., Purugganan, M., Moyer, J.W. 2005. The molecular population genetics of the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) genome. Molecular Ecology, 14(1): 53-66.
- Tunç, İ. 1985. On some Thysanoptera from the Middle Black Sea region of Turkey. Türkiye Entomoloji Dergisi, 9(4): 217-224.
- Tunç, İ., Göçmen, H. 1995. Antalya’da bulunan iki sera zararlısı *Polyphagotar latus* (Banks) (Acarina, *Tarsonemidae*) ve *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (*Thysanoptera*, *Thripidae*) üzerine notlar. Türk Entomoloji Dergisi, 19: 101-109.
- TÜİK.Türkiye İstatik Kurumu. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001Son erişim tarihi: 15.05.2018.
- Uhrig, J.F., Soellick, T.R., Minke, C. J., Philipp, C., Kellmann, J.W., Schreier, P. H. 1999. Homotypic interaction and multimerization of nucleocapsid protein of *Tomato spotted wilt tospovirus*: Identification and characterization of two interacting. PNAS, 96(1): 55-60.
- Vural, H., Eşiyok, D. ve Duman, İ. 2000. EkolojikSebze Tarımı: Üretim ve Satış Aşamasında Karşılaşılan Sorunlar ve Çözüm Önerileri. 3.Sebze Tarımı Sempozyumu. 11-13 Eylül,Isparta.

- Whitfield, A.E., Ullman, D.E., German, T.L. 2005. Tospovirus-thrips interactions. Annual Review of Phytopathology, 43: 459-489.
- Yardımcı, N., Çulal-Kılıç H. 2009. *Tomato spotted wilt virus* in vegetable growing areas in the west mediterranean region of Turkey. African Journal of Biotechnology, 8(18): 4539-4541
- Yardımcı, N., Doğan, K., Çulal-Kılıç, H. 2014. Isparta ve Burdur İlleri Üretim Alanlarında Yetiştirilen Domateslerde Domates Lekeli Solgunluk Virüsü'nün Tanılanması. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 8(1): 34-39.
- Yeturu, S., Viera, W., Garrido P., Insuasti M. 2016. First report of *Tomato spotted wilt virus* Infecting tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) in Ecuador. Journal of Plant Pathology, 98(3): 691.
- Zhang, H., Scholl, R., Browse, J., Somerville, C. 1988. Double stranded DNA sequencing as a choice for DNA sequencing. Nucleic Acids Research 16., 1220.
- Zhang, Z., Wang, D., Yu, C., Wang, Z., Dong, J., Shi, K. 2016. Identification of three new isolates of *Tomato spotted wilt virus* from different hosts in China: molecular diversity, phylogenetic and recombination analyses. Virology Journal. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0457-3>
- Zhong-Z. H., Zhi-Ke F., Zhi-Jun Z., Yao-Bin L., Xiao-Rong T. 2011. Complete genome sequence of a *Tomato spotted wilt virus* isolate from China and comparison to other TSWV isolates of different geographic origin. Annotated Sequence Record, 156: 1905–1908.

8. EKLER

EK.1 – Total Nükleik Asit Protokolü

1- 100-400 mg örnek, 1.2 ml ekstraksiyon buffer (100 mM Tris, pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol)'da ezilmiştir.

2- Ezilmiş örnekten 600 µl alınıp 1.5 ml'lik tüplere konulmuştur. Üzerine %10'luk SDS'den 70 µl eklenip 65 °C'de 10 dk bekletilmiştir. Bekleme esnasında tüpler bir veya iki kez karıştırılmıştır.

3-200 µl 5 M potasyum asetat, tüplere eklendikten sonra buzda 10 ila 30 dakika arasında bekletilmiştir.

4- Buzdan alınan örnekler 10 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiş, sıvı kısımdan 600 ml alınarak yeni 1.5 ml'lik tüplere konulmuştur.

5- 300 µl soğuk izopropanol eklenerek 25-30 dk buz içinde bekletilmiştir.

6- 10 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatant (sıvı) dikkatlice ortamdan uzaklaştırılmıştır.

7- -20 °C de saklanan soğuk %70'lik etanol den 750 µl pellete eklenip kibarca karıştırılmıştır.10 dk 10.000 rpm'de santrifüj yapılmıştır.

8- Çökelti üzerinde kalan sıvı, tüplerden dikkatlice uzaklaştırılmış, 15 sn'lik kısa bir santrifüj daha yapıldıktan sonra alkol, pipetle çekilmiştir.

9- Pellet 10 dk kurutulmuş, üzerine 400 µl steril distile su eklenerek karıştırılmıştır.

10- 37 °C'de 15 dk. inkübe edilmiş ve inkübasyon sırasında bir iki kez hafifçe karıştırılmıştır.

11- Elde edilen total nükleik asitten 5-10 µl alınıp elektroforez sonuç kontrolünden sonra -20 °C ya da -80 °C'de saklanmıştır.

Not: Ekstraksiyon çözeltisi kullanmadan kısa bir süre önce ve steril ortamda hazırlanmıştır (Tris, NaCl ve EDTA.)

EK 2 FOSFAT TAMPON ÇÖZELTİSİ;

Değişik PH değerlerinde Kimyasalların aldığı PH Faktörleri

PH değeri	KH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO 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) × Hacim (lt) × Molarite × PH Faktörü

Örnek 0,02 M PH 7.0 1 litre Fosfat Tampon Çözelti Hazırlama

KH₂PO₄ = 136.08 × 1lt × 0,02 × 0,386= 1.1 gr

Na₂HPO₄= 141.96 × 1lt × 0,02 × 0,614= 1,7 gr alınıp

950 mlt saf suda çözünür pH kontrol edilir% 0.1 Mercaptoethanol ilave edilir. 1 lt ye tamamlanır

EK 3 Total Nükleik Analizlerinde Kullanılan Çözelti ve Solusyonlar**1. Ekstraksiyon tamponu**

Aşağıda belirtilen miktardaki kimyasallar 150 ml steril saf su içerisinde manyetik karıştırıcıda çözünmüş ve pH'sı ayarlanarak 200 ml tamamlanmıştır. Daha sonra 1/1000 v/v oranında 2.B.Mercaptoethanol ilave edilmiştir.

(100 mM Tris-HCl (pH: 8.0), 50 mM EDTA (pH:7,0), 500 mM NaCl, 10 mM 2.B.Mercaptoethanol).

Tris- HCl	2.422gr
EDTA	3,722 gr
NaCl	5,844 gr

2. %20 SDS (Sodium Dodecyl Sulphate)

20 gr SDS tartılmış ve 80 ml steril saf su içerisinde ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür. Daha sonra saf su ilave edilerek 100 ml tamamlanmış ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3. 5 M Potasyum Asetat (CH₃COOK)

60 ml steril saf su içerisinde 49,07 gr potasyum asetat çözdürülmüş ve daha sonra 100 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

4. 3M Sodyum Asetat (CH₃COONa)

60 ml steril saf su içerisinde 40,82 gr sodyum asetat çözdürülmüş ve daha sonra 100 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

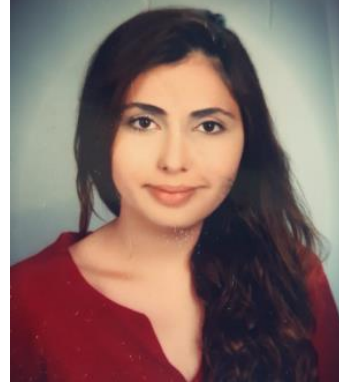
5. %70 lik ETOH

% 99 Ethanol'den 707 ml alınarak 293 ml saf su ilave edilmiş ve hazırlanan bu %70 ETOH +4 °C'de kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir

ÖZGEÇMİŞ

NURAY SARI

nuraysari007@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2015 - 2018	Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antalya
Lisans	Süleyman Demirel Üniversitesi
2011-2015	Ziraat Fakültesi, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme, Isparta