

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS (ToBRFV)'ÜN TOHUM ÜZERİNDE
TAŞINMA ORANI, TAŞINMA YERİ VE ERADİKASYON İŞLEMLERİ***

Damla ULUSOY

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2022

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS (ToBRFV)'ÜN TOHUM ÜZERİNDE
TAŞINMA ORANI, TAŞINMA YERİ VE ERADİKASYON İŞLEMLERİ***

Damla ULUSOY

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2022

ANTALYA

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

***TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS (ToBRFV)'ÜN TOHUM ÜZERİNDE
TAŞINMA ORANI, TAŞINMA YERİ VE ERADİKASYON İŞLEMLERİ***

**Damla ULUSOY
BİTKİ KORUMA
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından FYL-2021-5713 nolu proje ile desteklenmiştir.**

HAZİRAN 2022

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS (ToBRFV)'ÜN TOHUM ÜZERİNDE
TAŞINMA ORANI, TAŞINMA YERİ VE ERADİKASYON İŞLEMLERİ

Damla ULUSOY
BİTKİ KORUMA
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 21/06/2022 tarihinde jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Hakan FİDAN (Danışman)

Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Doç. Dr. Gökmen KOÇ

ÖZET

TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS (ToBRFV)'ÜN TOHUM ÜZERİNDE TAŞINMA ORANI, TAŞINMA YERİ VE ERADİKASYON İŞLEMLERİ

Damla ULUSOY

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hakan FİDAN

Haziran 2022; 48 sayfa

Bu çalışma ile ToBRFV'nin tohumdan arınma olanaklarının araştırılması ve virüsün tohumla taşınma yüzdesinin ve yerinin belirlenmesi hedeflenmektedir. Tez kapsamında laboratuvar çalışmaları 2021-2022 yılları arasında ToBRFV enfekteli bitkiler Akdeniz Üniversitesinde bulunan seralarda yetiştirilmiştir. Bu tez çalışmasında ToBRFV'nin tohumla taşınma oranının yapılan moleküler ve serolojik testler sonucunda % 0.8 olduğu ve bu etmenin tohum kabuğu ve endospermde görüldüğü, embriyoda ise virüsün taşınmadığı ortaya konulmuştur.

Tohumların dezenfekte edilmesinde uygulanan bazı kimyasal ve fiziksel metotlar incelenmiştir. Fiziksel yöntemlerden 20°C'den 72°C'ye kademeli olarak sıcaklık artışı gerçekleştiren, Delta firmasına ait makinede, en az 3 gün 50 rpmde dönerek kalan tohumlarda ToBRFV etmeni % 0.3 oranında tespit edilmiştir ve virüsün virulensliğini yitirdiği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. 254 nm dalga boyundaki UV ışınları 30 dk boyunca uygulanmış, bu uygulamanın virüsü yarı yarıya oranla inaktif hale getirdiği belirlenmiştir. Kimyasal yöntemlerde ise tohumlara yapılan farklı dezenfektan uygulamaları sonucunda ortaya çıkan bilgiler doğrultusunda: %1 Tsunami 100, %1 Biocon A ve %10 TSP uygulamaları tohum kabuğunu virüsten arındırmada %100 başarılı bulunmuştur. Aynı dezenfektanlar endospermde uygulanıp test edildiğinde endospermde %0.7 ve %0.9 oranında olan taşınmanın devam ettiği belirlenmiştir, biyolojik testlemelerde de patojenitenin devam ettiği görülmüştür. Buna göre tohum kabuğundaki virüsü eradike etmede başarılı olan dezenfektanların endospermdeki taşımalarında etkin olmadığı belirlenmiştir. Bu yöntemler tohum eradikasyon başarısının yanında çimlenmeyi de olumsuz yönde etkilememektedir. Virüsün yayılımını sınırlamaya yönelik yapılan bu çalışmalar yerli ve milli tohumculuk adına önemli bir katkı sağlayacaktır.

ANAHTAR KELİMELEER: Domates, Eradikasyon, ToBRFV, Tohum

JÜRİ: Doç. Dr. Hakan FİDAN

Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Doç. Dr. Gökmen KOÇ

ABSTRACT

TRANSMISSION RATE, LOCATION AND ERADICATION PROCESSES OF TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS ON SEED

Damla ULUSOY

MSc Thesis in Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Hakan FİDAN

June 2022; 48 pages

Reasons such as the increase in global seed trade and the facilitation of international transportation ensure the rapid spread of newly emerged viruses and the spread of diseases to clean areas. One of these viruses is Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) disease, which has gained much importance especially in recent years. ToBRFV, It is a member of the Tobamovirus group, which also includes plant viruses such as TMV and ToMV. While ToBRFV is transmitted by seeds over long distances, it can spread very easily by contact between short distances. Active seed trade and the importance of the region we are in in agriculture are the reasons that make the transmission of ToBRFV by seed dangerous. This situation has brought the eradication studies against the viruses found in the seeds to the fore in the fight against ToBRFV.

Within the scope of this thesis, some chemical and physical methods applied in the disinfection of seeds were examined. Of the physical methods, the virus density was found to be the least in seeds subjected to heat treatment at 72 °C for 72 hours. It was found that in the application of heat treatment and UV-C applications (254 nm), the virus loses its pathogenicity. According to the information obtained as a result of different disinfectant applications to seeds: 1% Tsunami 100, 1% Biocon A and 10% TSP have been determined as the optimal methods of combating this virus. In addition to the success of seed eradication, these methods do not adversely affect germination. These studies aimed at limiting the spread of the virus will make an important contribution to domestic and national seed production.

KEYWORDS: Eradication, Seed, ToBRFV, Tomatoes

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Hakan FİDAN

Assoc. Prof. Dr. Özer ÇALIŞ

Assoc. Prof. Dr. Gökmen KOÇ

ÖNSÖZ

Bitki patojeni virüsler, hastalık etmenleri arasında önemli bir yer tutmaktadır. Virüsler, konukçu hücrenin biyosentez mekanizmasını kullanarak hücre içerisinde çoğalabilen nükleoprotein yapısında olan mikroskobik varlıklardır. Virüslerin bu ilginç mekanizmasının yanı sıra virüslerle kimyasal mücadelenin olmaması virüs hastalıkları ile mücadele konusunda oldukça ilgimi çeken bir konu haline gelmiş ve bu çalışmayı yaparken bana gerekli motivasyonu sağlamıştır.

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Moleküler Viroloji laboratuvarında ve bölüm seralarında gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmanın planlanmasında, yürütülmesinde ve sonuçlandırılmasında yol göstericiliği ve deneyimiyle çalışma boyunca benden yardım ve imkanlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Hakan FİDAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez jüri üyelerim olan Doç. Dr. Gökmen KOÇ ve Doç. Dr. Özer ÇALIŞ'a kıymetli görüş ve katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmamda Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu'na, çalışmalarında yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Hande Nur ALBEZİRGAN, Sefanur ÇELİK, Pelin SARIKAYA, Hüseyin Utku ŞİMŞİR, Nur CAYAK, Kübra ZOR, Aılar GONBADİ, TUNCAY KARAKUŞ ve Merve AZLIK'a; yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan, her zaman yanımda olan annem ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. Genel Bilgiler	4
2.2. Domates Kahverengi Buruşukluk Meyve Virüsü (ToBRFV).....	4
2.3. Virüslerin Tohumla Taşınması.....	8
2.4. Tohumların Dezenfeksiyonu ve Eradikasyonu ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	9
3. MATERYAL VE METOT	11
3.1. Materyal.....	11
3.2. Metot	12
3.2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi	12
3.2.2. Mekanik inokulasyon çalışmaları	12
3.2.3. Simptomolojik gözlem ve örneklerin toplanması.....	13
3.2.4. ToBRFV simptomlu meyvelerden tohum çıkarma işlemleri.....	13
3.2.5. ToBRFV'nin tohumla taşınma yüzdesinin belirlenmesi	14
3.2.6. ToBRFV'nin tohumla taşınma yeri ve mekanizmasının belirlenmesi	15
3.2.7. Mücadeleye yönelik çalışmalar	17
3.2.8. DAS-ELISA çalışmaları	20
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	22
4.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	22
4.2. Mekanik İnokulasyon Çalışmaları.....	22
4.3. Simptomolojik Gözlem ve Örneklerin Toplanması	23
4.4. ToBRFV Simptomlu Meyvelerden Tohum Çıkarma İşlemleri.....	24
4.5. ToBRFV'nin Tohumla Taşınma Yüzdesinin Belirlenmesi.....	25
4.6. ToBRFV'nin Tohumda Taşınma Yeri ve Mekanizmasının Belirlenmesi.....	27
4.7. Mücadeleye Yönelik Çalışmalar	30

4.7.1. Isıl işlem uygulaması	30
4.7.2. UV ışık uygulaması	33
4.7.3. Kimyasal uygulamaları	35
4.7.4 Farklı işlemlerin birlikte uygulanması	37
4.8 ELISA Uygulamaları	37
5. SONUÇLAR	40
6. KAYNAKLAR	42
7. EKLER	46
ÖZGEÇMİŞ	



AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Tomato Brown Rugose Fruit Virus (ToBRFV)’ün tohum üzerinde taşınma oranı, taşınma yeri ve eradikasyon işlemleri” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

21/06/2022

Damla ULUSOY



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
nm	: Nanometre

Kısaltmalar

AÜ	: Akdeniz Üniversitesi
Bp	: Baz Çifti
CMV	: <i>Cucumber mosaic virus</i>
DAS-ELISA	: Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked İmmunosorbent 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
HCl	: Hidroklorik Asit
ORF	: Açık Okuma Bölgeleri
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R	: Resistance
RNA	: Ribonükleik Asit
Rpm	: Revolutions er minute (Dakikada dönme sayısı)
RT-PCR	: Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat

TAE	:(Tris-Acetate-EDTA) Elektroforez Buffer
TMV	: <i>Tobacco mosaic virus</i>
ToBRFV	: <i>Tomato brown rugose fruit virus</i>
ToMV	: <i>Tomato mosaic virus</i>
TSP	: Trisodyum Fosfat
TSWV	: <i>Tomato spotted wilt virüs</i>
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
TYLCV	: <i>Tomato yellow leaf curl virus</i>
UV	: Ultra Viole
V	: Volt
vd	: ve diğerleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. TBRFV-Ant-Tom adı ve MT107885 Genbank numarası ile NCBI veritabanına kayıtlı Antalya-ToBRFV domates izololatının Zeiss Leo 906 E TEM (Germany) Elektron mikroskopisi	5
Şekil 2. 2. ToBRFV'nin dünya üzerindeki dağılımını gösteren harita	5
Şekil 2. 3. a) Yaprakta görülen şiddetli mozaik simptomsu; b) Kalikte meydana gelen kahverengileşme simptomsu.....	6
Şekil 2. 4. ToBRFV'nin domates bitkilerinde meyve simptomsu.....	6
Şekil 2. 5. ToBRFV'nin domates bitkilerinde yaprak simptomsu.....	7
Şekil 3. 1. ToBRFV ile bulaşık üretim alanları	12
Şekil 3. 2. Domates bitkilerine uygulanan ToBRFV mekanik inokulasyonu.....	13
Şekil 3. 3. a) ToBRFV enfekteli domates yaprağı; b,c) ToBRFV enfekteli domates meyveleri; d,e) ToBRFV enfekteli meyvelerden tohum çıkarma işlemi ve eldesi.....	14
Şekil 3. 4. a) Tozlanmadan itibaren 28-30 gün sonra meyvelerin toplaması; b,c,d) Tohumun endosperm ve embriyosunu birbirinden ayırma işlemi, e) Elde edilen embriyoların ezilmek üzere eppendorf tüplere aktarımı.....	16
Şekil 3. 5. Kademeli olarak sıcaklık artışı gerçekleştiren ısı işlem makinesi.....	17
Şekil 3. 6. a) UV ışık uygulama makinesi; b) 250'şer olarak gruplandırılan 1000 adet tohumun ezilmesi.....	18
Şekil 3. 7. a) Tohum alma işlemine uygun olarak çıkarılan tohumlar; b,c) Tohumlara dezenfektan uygulaması	19
Şekil 4. 1. Domates fidelerinin araziye dikilmesi.....	22
Şekil 4. 2. ToBRFV izolatlarının fosfat tampon ile ekstraksiyonu.....	23
Şekil 4. 3. ToBRFV enfekteli yaprak simptomsu	24
Şekil 4. 4. ToBRFV enfekteli meyve simptomsu	24
Şekil 4. 5. a) Elde edilen tohumların filtre kağıtlarında kurutulması; b)Tohumların tartılması	25
Şekil 4. 6. RT-PCR sonucu ToBRFV pozitif örnekler	25
Şekil 4. 7. 1000 adet tohumun DNA izolasyon işlemleri	26
Şekil 4. 8. Tozlanma tarihine göre toplanan domatesler.....	27
Şekil 4. 9. Tohum katmanlarının birbirinden ayrılması.....	28
Şekil 4. 10. Tohum katmanlarının ayrıldığı steril ortam.....	28
Şekil 4. 11. a) RT-PCR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesi; b) RT-PCR sonucu pozitif bulunan endosperm örnekleri.....	29
Şekil 4. 12. Domates tohumlarında kuru hava sterilizasyonu.....	31

Şekil 4. 13. Isıl işlem gören tohumların saksı denemesi.....	32
Şekil 4. 14. ISTA kurallarına göre uygulanan çimlenme testler.....	32
Şekil 4. 15. Filtre kağıtlarında çimlendirilen tohumlar.....	33
Şekil 4. 16. Tohum sterilizasyonunda kullanılan UV cihazı	34
Şekil 4. 17. a) DAS-ELISA'da kullanılan bufferlar;	
b) UV uygulamasından sonra elde edilen plate görüntüsü	34
Şekil 4. 18. HCl'nin çimlenme üzerindeki olumsuz etkisi	36
Şekil 4. 19. Tez kapsamında kullanılan bazı dezenfektanlar	37



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. 1. Ülkelerdeki domates üretim miktarları	2
Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan primer çiftleri ve sentezlenecek bölgenin moleküler büyüklüğü	15
Çizelge 3. 2. RT-PCR içeriği	15
Çizelge 3. 3. RT-PCR protokolü.....	15
Çizelge 3. 4. Tohumlara ısıtıl işlem uygulama süreleri	17
Çizelge 3. 5. Tohumlara uygulanan farklı dezenfektanlar ve dozları	19
Çizelge 3. 6. Uygulanan farklı eradikasyon işlemlerinin kombinasyonları.....	20
Çizelge 4. 1. Mekanik inokulasyon uygulama tarihleri.....	23
Çizelge 4. 2. Bazı virüs hastalıklarının tohumla bulaşık olma durumları ve taşıma oranları	29
Çizelge 4. 3. Tsunami 100 dezenfektanı uygulanan tohum kabuklarının DAS-ELISA absorban değerleri.....	38
Çizelge 4. 4. 254 nm UV uygulamasından sonra testlenen tohumların absorban değerleri.....	38

1. GİRİŞ

Domates (*Solanum lycopersicum* L.), yüksek verimliliği ve artan üretim ve tüketim miktarından dolayı ticari öneme sahip en önemli sebze türlerinden biridir. *Solanaceae* familyasında yer alan, anavatanı Güney Amerika'nın orta ve güney kısımları olan domates, Kristof Kolomb'un Amerika'yı keşfiyle Avrupa'ya yayılmıştır. Bolivya, Peru ve Ekvator'dan 16. yüzyılda Avrupa'ya getirilmiş ve yetiştiriciliğine başlanmıştır (Küçükler 1994). Avrupa'da önce İtalya'da yetiştirilmeye başlanmış ve ardından tüm kıtaya yayılmıştır (Aybak ve Kaygısız, 2004; Uniprot 2015).

İtalya'ya ilk gelen domates tiplerinin rengi sarı olduğundan altın elma (pomo d'oro) olarak anılmıştır. Daha sonra aşk elması (poumo d'amor) olarak adlandırılmıştır (Heiser 1973). İtalyanca "pomodoro" adı da buradan gelmektedir.

19. yüzyılın başlarında Fransa'nın güneyinde sebze olarak yetiştirilip tüketilmeye başlandığı, Fransız Devrimi'nden sonra Paris ve kuzeye taşındığı ve daha sonra diğer ülkelere yayıldığı bilinmektedir (Bloch-Dano 2008). Bayraktar (1953) ve Oraman'a (1968) göre Türkiye'de domatesin ortaya çıkışı 1770'lere denk gelir. Domates, önce Akdeniz'e, muhtemelen Adana'ya, ardından İstanbul'a getirilmiş ve daha sonra diğer bölgelere dağılmıştır.

Günümüzde sağlık ve beslenmede önemli bir yer tutan domates, vitamin ve mineraller açısından oldukça zengindir. Özel: C, B1, B2 ve A vitaminlerinin yanı sıra fosfor, kalsiyum ve demir minerallerinin önemli bir besin kaynağıdır. Son yıllarda likopen gibi maddelerin sağlık açısından önemi ortaya çıktıkça fonksiyonel gıda olarak değerlendirilmiştir (Fraser vd. 2009).

Domates meyvesi temel olarak şekerlerden ve organik maddelerden meydana gelmektedir. Kuru madde içeriğinin %60'ını asitler oluşturmaktadır. Olgun domates meyvesinde bulunan başlıca asitler malik ve sitrik, şekerler fruktoz ve glikozdur (Causse, 2004). Lezzet ve besin değerlerini oluşturan ana bileşenler, önemli bir antioksidan olan likopen, C ve A vitaminleridir. İnsanların bağışıklık sisteminin güçlenmesi, göz rahatsızlıklarının önüne geçilebilmesi açısından içeriğinde bulunan A vitamini bakımından önemli bir kaynaktır. Likopen bakımından zengin olması sebebiyle domates tüketimi özellikle kanser ve kardiyovasküler hastalıklara karşı insan vücuduna önemli bir direnç sağlamaktadır (Caicedo ve Peralta, 2013).

Domates yetiştiriciliği bakımından ülkemizin iklim şartlarının uygunluğu, dünya domates üretiminde üst sıralara yerleşmemize olanak sağlamıştır. FAO'nun 2020 yılı üretim verilerine bakıldığında Türkiye'nin 3. sırada yer almıştır. Dünyada domates üretimi yapan ülkeler ve bunların üretim (t) miktarları Çizelge 1.1'de verilmiştir.

2020 yılı verilerine göre dünya domates üretimi yaklaşık 252 milyon tondur. Bu üretim miktarının 64.865.807 tonu dünyanın en büyük domates üreticisi Çin tarafından yapılmaktadır. Domates üretiminde Hindistan 20.573.000 ton ile 2., Türkiye 13.204.015 tonluk üretim payı ile 3., ABD 12.227.402 ton ile 4., Mısır ise 6.731.220 tonluk üretimle 5. sırada yer almaktadır (FAO, 2020).

Çizelge 1. 1. Ülkelerdeki domates üretim miktarları (FAO, 2020)

Ülke	Üretimi (t)
Çin	64.865.807
Hindistan	20.573.000
Türkiye	13.204.015
Amerika Birleşik Devletleri	12.227.402
Mısır	6.731.220

TÜİK 2021 istatistiklerine göre ülkemizde üretilen 13 milyon ton domatesin 4,4 milyon tonu örtü altı, 8,6 milyon tonu açık tarla üretiminden elde edilmiştir. Domates, 2019 yılında 12.841.990 ton üretilirken 2020 yılında 13.204.015 ton üretilmiştir. 2019 ve 2020 yılı verileri karşılaştırıldığında ülkemizde domatesin üretim miktarı bir önceki yıla oranla %2,8 oranında arttığı görülmektedir. Antalya 2.565.735 tonluk üretimle 2020 yılı verilerine göre ülkemizde sofralık domates üretimini en fazla yapan iller arasında ilk sırada yer almaktadır. Antalya'yı 930.128 tonluk üretimle Mersin, 658.567 ton üretimle ise Muğla takip etmektedir (TÜİK, 2021).

Domates, ülkemizde yetiştirilme alanları göz önünde bulundurulduğunda yüksek veriminden dolayı üreticiler arasında en çok tercih edilen kültür bitkilerinden biridir. Domates yetiştiriciliğini verim ve kalite açısından etkileyen pek çok biyotik ve abiyotik faktör bulunmaktadır. Biyotik faktörler içerisinde en önemli tehditlerden biri viral hastalık etmenleridir. Virüs hastalıkları, domates tarımını yetiştiriciliğinin yapıldığı her bölgede ciddi bir şekilde etkilemektedir. Domates üretiminde geçmişten günümüze kadar sorun olan başlıca virüs hastalıkları içinde *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) ve *Tobacco mosaic virus* (TMV) gibi virüsler yer almaktadır.

Dünyanın yaşadığı iklim değişiklikleri, ortaya yeni çıkan virüslerin hızlı bir şekilde yayılmasına neden olmaktadır. Bu virüslerden biri de ilk olarak 2014 yılında İsrail'de tespit edilen *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV)'tür. 2019 yılında ülkemizde domates yaprak ve meyve örneklerinde ilk raporu yayınlanmıştır (Fidan vd. 2019). Tobamovirus cinsi içinde yer alan ToBRFV, seralar ve üretim alanlarında yeni ortaya çıkmış ve oldukça geniş yayılım göstermiş bir virüs hastalığıdır ve kısa zamanda dünya çapında büyük önem kazanmıştır.

Yapılan çalışmalarda Tobamovirus cinsindeki virüslerin birçoğunun mekanik olarak taşınabilen ve tohum kaynaklı stabil virüsler oldukları saptanmıştır. Viral patojenler ilk olarak tohum kabuğuna tutunmaktadır (Broadbent 1965). ToBRFV de tohum kaynaklı bir virüs olup uzak mesafelere enfekteli tohumlar ile taşınmaktadır. Tohumla taşınmasını tehlikeli kılan bir sebep de ekiminden sonra sera içinde inokulum kaynağı oluşturmastır.

ToBRFV bir kez seranın içerisine girdiğinde serada yapılan çalışmalar esnasında temasla mekanik olarak yayılabilir ve sağlıklı bitkileri de enfekte edebilir. Bu virüs,

bitkisel üretimi, ana konukçusu olduğu domates ve biberin pazar değerini önemli ölçüde etkilemektedir.

ToBRFV'nin tohumla taşındığı bilindiği halde tohumun hangi katmanında bulunduğu ile ilgili kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Türkiye'de virüsün tohumda taşınma yüzdesi ve tohumda taşınma yeri ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma ile virüsün tohumda taşınma yüzdesi ve yeri belirlenerek bilimsel bir gerçeklik kazandırılacak ve enfekteli tohumların eradikasyon yöntemi belirlenmiştir.



2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Genel Bilgiler

Uygun çevre koşullarının etkisiyle duyarlı bir konukçu ve patojenin etkileşimleri sonucu hastalık olgusu ortaya çıkmaktadır. Bir hastalık etmeninin ortaya çıkması için patojen, konukçu ve çevreden oluşan üç temel faktör gereklidir ve buna hastalık üçgeni denilmektedir. Bu etmenler arasında bitki patojeni virüsler önemli bir yer tutmaktadır.

Domates (*Solanum lycopersicum L.*), dünyada ekonomik açıdan en gerekli sebzelerdendir. Dünya domates üretimi 5,03 milyon hektarlık bir alanda 180 milyon tonun üzerindedir (FAO, 2021). Yetiştirilen domatesin önemli ekonomik kayıplara neden olabilen funguslar, nematodlar, bakteriler ve virüsler dahil 200'den fazla hastalığa duyarlılığı nedeniyle domates üretimi biyotik streslerden etkilenmektedir (Singh vd. 2017; Fidan 2021).

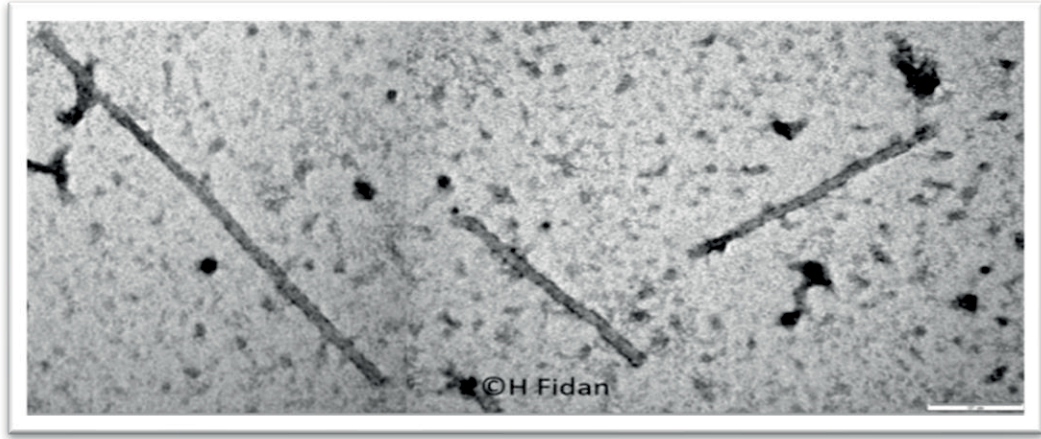
Seralarda veya tarlada yetiştirilen domates bitkileri, özellikle mekanik ve tohum kaynaklı virüsler olan Tobamovirüs tarafından oldukça bulaşıcıdır. Uluslararası Virüs Taksonomisi Komisyonu'nun (International Committee on Taxonomy of Viruses-ICTV) 2015 baskısına göre, Tobamovirus Virgaviridae familyasının yedi cinsinin 35 türüyle en büyük cinstir (Adams vd. 2009; King vd. 2012). Bitkilerinin üretiminde sorun haline gelen en önemli problemlerden biri, Tobamovirus cinsine bağlı viral etmenler olarak belirtilmektedir (Madhisidhan vd. 2005).

2.2. Domates Kahverengi Buruşukluk Meyve Virüsü (ToBRFV)

Virüsler ışık mikroskopunda dahi görülemeyecek kadar küçüktürler yalnızca elektron mikroskopuyla görülebilmektedirler. Şekilleri küresel, çubuk, uzun iplikli veya çok yüzeyli polyhedral yapıdadır. ToBRFV ise çubuk şekilli bir virüstür; bu özelliği bakımından diğer Tobamovirus'lere benzemektedir. Bu sebeple, elektron mikroskobu ile ayırt edilmesi oldukça zordur.

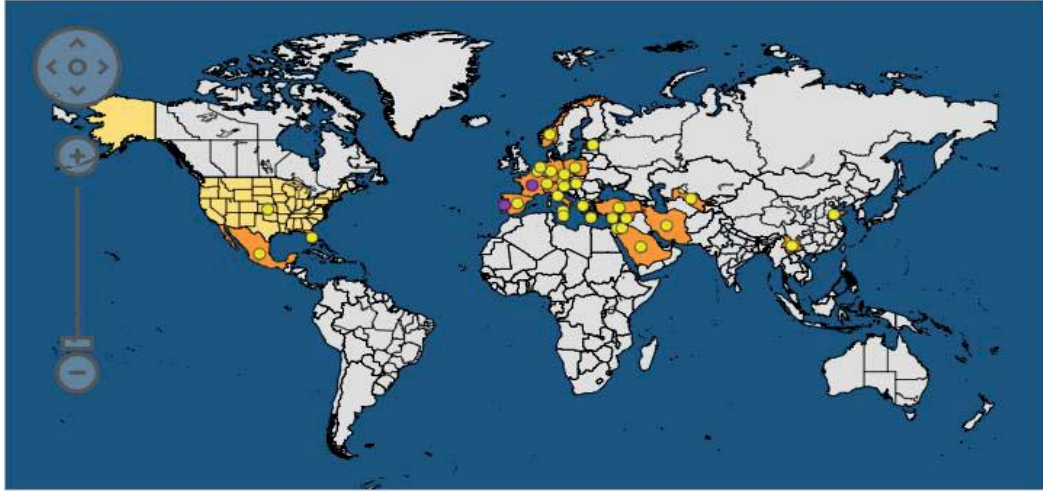
Tobamovirus'ler, 4 adet ORF (Open reading frame)'yi kodlayan yaklaşık 6.4 kb boyutunda tek sarmallı RNA (+ssRNA) bir virüstür. Bir stop kodonu ile ORF1 ve ORF2 ayrılır ve yapısal olmayan replikaz kompleksini oluşturan proteinleri kodlamaktadır. Yapısal olmayan hareket proteinini (Movement protein-MP) ORF3 bölgesi kodlar. ORF4 ise yaklaşık 18 kDa'lık kılıf proteinini (Coat protein-CP) kodlamaktadır (Domingo ve Holland 1997).

ToBRFV ilk olarak 2014 yılında İsrail'de görülmeye başlanmıştır. 2016 yılında Ürdün'den ilk raporu bildirilmiştir. Hastalık etmeni bu bildirimden 7 ay sonra İsrail'in Ramat Negev Bölgesinde tespit edilmiştir. Epidemiyolojik çalışmalar, hastalığın bir yıl içinde ülkenin domates yetiştiriciliği yapılan çeşitli alanlarda yayıldığını ortaya koymaktadır. (Salem vd. 2016; Luria vd. 2017).

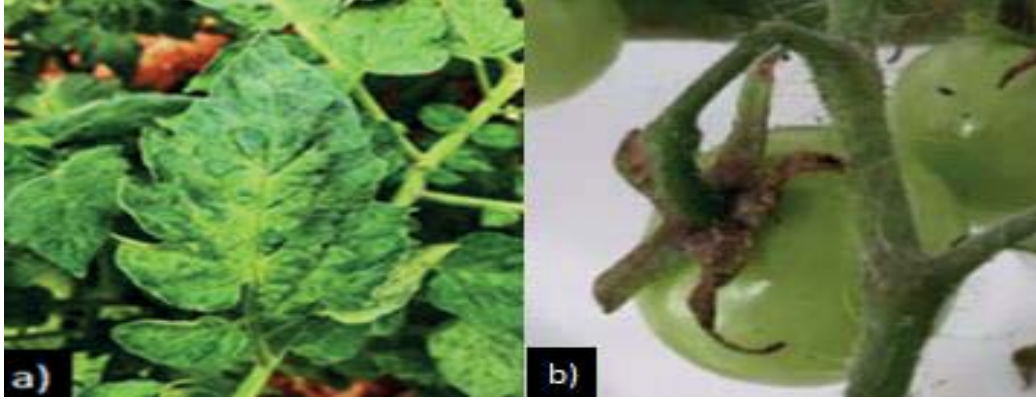


Şekil 2. 1. TBRFV-Ant-Tom adı ve MT107885 Genbank numarası ile NCBI veritabanına kayıtlı Antalya-ToBRFV domates izololatının Zeiss Leo 906 E TEM (Germany) Elektron mikroskopisi (Fidan 2020)

2018 yılında domates bitkisinde Kaliforniya’da (ABD) (Chitambar 2018), 2018’de İtalya Sicilya’da domates bitkilerinde görülmüştür (Panno vd. 2019). Çin’den (Yan vd. 2019), Filistin’den (Alkowni vd. 2019) ve İngiltere’den (Skelton vd. 2019)’den de raporlar bildirilmiştir. Hastalık, Ürdün, Meksika, ABD, Çin, Fransa, Almanya, Hollanda, İtalya, İspanya gibi pek çok ülkede görülmektedir. 2019 yılında Türkiye’de ilk olarak domates bitkilerinin yaprak ve meyve örneklerinde varlığı raporlanmıştır. (Fidan vd. 2019). 2020 yılında Kıbrıs (NPPO 2020), Hindistan, Tayland gibi ülkelere kayıtlar bildirilmeye devam etmektedir.



Şekil 2. 2. ToBRFV'nin dünya üzerindeki dağılımını gösteren harita (EPPO 2022)



Şekil 2. 3. a) Yaprakta görülen şiddetli mozaik simptomsu; **b)**Kalikste meydana gelen kahverengileşme simptomsu

Ülkemizde yapılan çalışmalarda ToBRFV'nin domatesteki simptomsunun domatesin türüne göre farklılık gösterdiği dikkat çekmiştir. Bunlardan birincisi bazı domates çeşitlerinde yapraklarda şiddetli mozaikler oluşurken; bazı çeşitlerde ise meyve olgunlaşınca kadar yaprak simptomsu görülmemiştir. Bu enfeksiyonun tespiti ancak meyvelerde simptom verdiğinde anlaşılmıştır. Domates bitkisinin yapraklarında mozaikler, deformasyonlar ve buruşma; Tm2² dayanımı bulunduran çeşitlerin meyvelerinde düzensiz, sarı renkli halkalar meydana gelmiştir. Tm2² dayanımı olmayan çeşitlerde ise kahverengi buruşukluk (rugose) lekeleri oluşmaktadır. Tm-2² dayanımı taşıyan beef (iri domates) tipi domates yapraklarında uzama ve iplikleşme şeklinde belirti gözlemlenmektedir. İklim koşulları ise simptomsu etkileyen bir diğer durum olarak gözlemlenmiştir (Fidan 2020). ToBRFV'nin tipik simptomsu bu tez çalışmasında da görülmektedir. Yapraklarda klorotik mozaikler, buruşma ve deformasyonlar meydana gelirken bazı çeşitlerde kalikste kahverengileşme gözlemlenmiştir.



Şekil 2. 4. ToBRFV'nin domates bitkilerinde meyve simptomsu



Şekil 2. 5. ToBRFV'nin domates bitkilerinde yaprak belirtileri

ToBRFV'yi, diğer Tobamovirus üyelerinden ayırt eden bazı belirtiler gözlemlenmiştir. Domateste görülen belirtilerini yapraklarda yoğun mozaik belirtileri gösterenler ve meyve oluşuncaya kadar yaprak belirtisi göstermeyen çeşitler olarak iki gruba ayırmak mümkün olmuştur. Bu sebeple virüsün bitkideki varlığı, ancak meyvedeki belirtiler ile ayırt edilebilmektedir. Domates yapraklarında klorotik mozaikler, buruşma ve deformasyonlar; Tm² dayanıklılık geni bulunduran çeşitlerde meyvede sarı renkli halkalar meydana gelirken; dayanıklılık geni olmayan çeşitlerde kahverengi ve buruşuk lekeler görülmektedir. ToBRFV, tohumla taşınan bir virüs hastalığı olmasına rağmen; bazı çeşitlerde meyve oluşup renk değişimi oluncaya kadar yaprak belirtisi vermediği bilinmektedir (Fidan ve Sarıkaya 2020). Bazı çeşitler incelendiğinde ise uygun iklim koşullarında enfeksiyondan sonra ilk bir ay içinde belirtiler gözlemlenebilmektedir. Bunun sebebinin, çeşidin ıslah backgroundu ile alakalı düşünülmektedir. Bu özellik dikkate alındığında dayanıklılık çalışmalarında, meyvede renk dönüşümüne kadar simptomolojik belirtilerin gözlenmesi detaylı şekilde gerekmektedir.

Tobamoviruslerin en belirgin özelliklerinden biri bitkiden bitkiye taşınımının oldukça kolay olmasıdır. Etmenin aktarımını gerçekleştiren herhangi bir vektörün olmadığı bilinmektedir. Ancak özellikle genç bitkilerde mekanik olarak kolayca bulaşabildiği bildirilmiştir (Ozaslan vd. 2006). Etmenin mekanik taşınımı çok önemli bir konudur. Yapılan çalışmalarda Tobamovirus'lerin insan eli, üretimde kullanılan alet ve ekipmanlar (Matsunaga vd. 2003), ayrıca sulama suyu (Choi vd. 2004) ile kolaylıkla taşınabildiği raporlanmıştır.

Tobamovirüsler ile mücadele için önceden test edilmiş, sertifikalı virüsten ari tohumların ekilmesi önemlidir. Tobamovirüslerin bilinen bir böcek vektörü yoktur. Bombus arıları ile taşınabildikleri bilinmektedir. Tobamovirüs, bir üretim alanına veya seraya girdikten sonra, tarım aletleri ve makineleri, sulama suyu ve kontamine bitki artıkları gibi kirli yüzeylerde birkaç yıl boyunca bulaşıcı olarak kalabilir. Sağlıklı bitkiler, kontamine eller, kesici aletler, kirli giysilerle temas yoluyla kolayca enfekte olabilir (Chanda vd. 2021).

Domateslerde TMV ve ToMV etmenlerine karşı dayanıklılık sağlayan genlerin sırasıyla Tm-2 ve Tm-2² R genleri olduğu bilinmektedir. Bu dayanıklılık genleri, avirulens protein (Avr) olarak viral hareket proteinini paylaşmaktadır. Tm-2² geninin, dayanımı kırılmış olan Tm-2'den daha dayanıklı olduğu bilinmektedir. Domatesleri enfekte eden yeni Tobamovirusler tanımlandığından dolayı, Tm-2² dayanımının etkinliği tartışılmaktadır. Tm-2² dayanıklılık geninin üstesinden gelebilen *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) Meksika'da ve ToBRFV Ürdün'den bildirilmiştir (Fidan, 2020). Dayanıklı bir çeşidin olmaması, kimyasal mücadelesinin olmaması, virüsü tanımaya ve mücadele yöntemlerinde farklı alternatiflere yönelik çalışmaları ön plana çıkarmaktadır.

2.3. Virüslerin Tohumla Taşınması

Ülkeler arası ticaretin ve ulaşım olanaklarının artması sonucunda dünyada tohum endüstrisi önemli gelişmeler göstermiştir. Tohumun kalitesi ve verimi kaliteli ürün elde edilmesini sağlayan faktörlerdendir. Tohum kaynaklı patojenlerin neden olduğu ürün kayıplarını en düşük düzeye indirebilmek ve yayılmalarını önlemek için, tohumda patojenlerin hastalık oluşturdıkları veya bulaştığı kısımlar ve tohumla taşınmayı etkileyen faktörler gibi konularda bilgi sahibi olmak gerekmektedir.

19. yüzyılda virüs hastalıkların tohumla taşınabilmeleri hakkındaki ilk düşünceler paylaşılmıştır. Mayer'in 1886 yılında tütün bitkileri ile yürüttüğü bir çalışmada, *Tobacco mosaic virus*'ünün taşınabilir olduğunu ve mozaik belirtilerine sebep olan etmenin bakteri ve fungustan farklı bir etmen olduğunu tespit etmiştir. 1910 yılında ise Westerdijk domates bitkilerinde Tütün mozaik virüsü'nün tohum ile taşınabileceği ihtimalini ortaya atmıştır (Bos, 1977).

Tohumla taşınan ve önemli ekonomik kayıplara sebep olabilen virüsler, bazı özellikleri sayesinde tamamen özgün patojenlerdir. Protein sentezi mekanizması olmayan virüsler çoğalmak için tamamen konukçu hücrelere ihtiyaç duyarlar (Hull, 2002). Virüsler, bakteri ya da funguslar gibi gelişmiş canlılar değildir. Sadece canlı konukçu hücre varlığında çoğalabilmelerinden dolayı canlılık özelliği kazanan obligat parazitler olarak adlandırılmaktadır.

Agrios (2005), tarafından yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda 100'den fazla virüsün az ya da çok miktarlarda tohum ile taşınabildiği belirtilmiştir. Tohumla taşınmada virüs etmeni ile enfekteli bitki dokularından elde edilen tohumların küçük bir yüzdesinin (%1-30) virüsü taşıdığı bilinmektedir. Fakat, bazı virüs etmeni-konukçu bitki interaksiyonlarında tohumların büyük bir kısmının ya da tamamının bulaşık olduğu durumlar da görülmektedir. Virüsün taşınması, konukçu bitkinin patojenle enfekte olduğu zamana ve konukçu-virüs kombinasyonlarına bağlı bir şekilde farklılık gösterebilmektedir.

Tohum ile taşınmada üç adet önemli durum bulunmaktadır. Birincisi bulaşık tohumların ekilmesi, bu tohumların miktar olarak az olsa bile, inokulum kaynağında rastgele yayılım göstermekte ve böylece konukçuda vektörler ile sekonder olarak yayılımı arttırabilmektedir. İkincisi, viral inokulum kaynağının bir

sonraki üretim dönemlerinde de görülmesidir. Üçüncü durum ise, enfeksiyon tespit edilememiş veya analizi yapılmamış enfekteli tohumların, uluslararası tohum ticareti ile dünya çapında dağılım göstermeye devam etmektedir (Albrechtsen, 2006).

Virüsün taşınımı, temel olarak fidelerin şaşırtılması zamanında köklerde oluşan yaralar sırasında enfekteli tohum kabuğundan mekanik olarak gerçekleşir. Tobamoviruslerin tohumlara geçiş yolu ise çok net anlaşılamamıştır. Tohum kabuğu (testa) enfeksiyonu materyal kaynaklı, endosperm enfeksiyonu döllenme sonucu ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, yapılan çalışmalarda Tobamoviruslerin enfeksiyöz özelliklerinin bitki artıklarında, bulaşık toprakta uzun yıllar süresince stabilitesini koruduğu belirlenmiştir (Roberts, 2014; Dombrovsky ve Smith, 2017).

Hıyar yeşil benekli mozaik virüsü (CGMMV) gibi tobamovirüsler çoğunlukla tohum kabuğunu ve endospermi enfekte eder. Bu çalışma, ToBRFV'nin tohumun dışında (tohum kabuğu) lokalize olduğunu öne sürse de bulaşma gibi bazı durumlarda önemli bir rol oynayan viral birikime bağlı olarak virüsün endospermde de bulunduğu görülmektedir. Buna ek olarak fideye bulaşmanın, çimlenme ve ilk büyüme aşamalarında oluşan mikro lezyonlar yoluyla gerçekleştiği ileri sürülmektedir (Davino vd. 2020).

2.4. Tohumların Dezenfeksiyonu ve Eradikasyonu ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Sebze tohumlarının kalite ve kantitesini önemli ölçüde etkileyen tohum kaynaklı virüslerin mücadelesi oldukça önem taşımaktadır. Bu nedenle de tohumlardaki viral etmenlerin inaktifleştirilmesi için kimyasal uygulamaları, ısıtma işlemi uygulaması, UV ışık uygulamaları gibi daha önce yapılan çalışmalar aşağıda belirtilmektedir.

Tohumların dezenfeksiyon yöntemleri kimyasal ve fiziksel dezenfeksiyon olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Bu yöntemlerin uygulama süresi, uygulanan sıcaklık vb. gibi her duruma özgü parametreler için optimize etmek gerekir. Bu uygulamaların tohum çimlenmesinde azaltıcı etkisi olabilmektedir. Kimyasal uygulamalara alternatif olarak fiziksel uygulamalar karşımıza çıkmaktadır ve gelişen tohum pazarı için daha iyi bir alternatif olarak değerlendirilmektedir (Afzal vd. 2016; Atmaca ve Akdemir 2020).

ToBRFV ve CGMMV'nin mekanik bulaşmasına karşı yapılan bir çalışmada 16 farklı dezenfektanın etkinliği değerlendirilmiştir. İki farklı tobamovirüse karşı geniş spektrumlu etkilere sahip dört dezenfektan belirlenmiştir. Her iki tobamovirüs için de % 90-100 etkililiğe sahip bu dezenfektanlar: % 0,5 Lactoferrin, % 2 Virocid ve % 10 Clorox ve CGMMV'ye karşı % 2 Virkon ve ToBRFV'ye karşı % 3 Virkon olarak belirlenmiştir (Chanda vd. 2021).

Rafikova vd. (2004), tarafından yapılan bir çalışmada düşük dozdaki sodium dodecylsulfate konsantrasyonlarının 52°C'de TMV kılıf proteininde düzensiz bir şekilde birikime neden olarak TMV'yi engellediği görülmüştür. Daha yüksek dozlarda ise oda sıcaklığında bile TMV kılıf proteininin yapısını tamamen bozmaktadır.

Alkol bazlı kimyasallar çoğunlukla sağlık sisteminde dezenfektan amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle SARS-CoV-2 gibi son yıllarda tüm dünyayı etkisi altına alan virüsler için %70'lik alkol kullanımı bitki virüsleirinde de böyle bir çalışmaya yol açmıştır. Aktif bileşen olarak %70 alkol içeren üç alkol bazlı kimyasal test edilmiştir. Bunlar proteacteav, purell ve etanoldür. Hiçbiri ne CGMMV'yi ne de ToBRFV'yi devre dışı bırakmada etkili bulunmamıştır. %60 veya daha fazla alkol içeren bir dezenfektan, lipid membranı olan koronavirüsleri etkisiz hale getirebilken Tobamovirüsler için, RNA molekülleri kaplama proteinleri ve lipid membranın olmaması sebebi ile ToBRFV üzerinde etkinlik sağlanamamaktadır. Bu durum etanol bazlı kimyasalların ToBRFV ve CGMMV gibi virüslere karşı neden etkili olmadığını ortaya koymaktadır (Chanda vd. 2021).

ToBRFV ile enfekteli tohumlara dört farklı termal işlem uygulanmıştır ve her deney için 100 parti tohum kullanılmıştır. 80 °C'de 24 saat bekletilen tohumların %60'ı pozitif, 75°C'de 48 saat ısıtılma gören tohumların %80'i pozitif, 70°C'de 96 saat ve 65 °C'de 120 saat süreyle ısıtılma uygulanan tohumların ise %100'ünün pozitif olduğu belirtilmiştir. (Davino 2020)

UV-C+US uygulamasında domates ve hıyar tohumları 10 dakika boyunca ultrason cihazında bekletilmiş ve daha sonra 30 dakika boyunca UV-C ışık uygulaması yapılmıştır. Araştırmadan elde edilen bulgular incelendiğinde UVC, US ve UV-C+US uygulamalarının domateste Falcon çeşidinde klorofil miktarı dışında yer alan tüm fide büyüme parametrelerini önemli ölçüde artırdığı görülmüştür. Sonuç olarak, UV-C ve US çalışmalarının uygulanabilir olduğu ortaya konulmuştur (Kibar 2020). Ultraviyole-C ışınlarının tohum ile taşınan mikroorganizmalara da etkisi olduğu bilinmektedir. Bu tez çalışmasında UV-C ışınlarının virüs enfekteli tohumlar üzerindeki etkileri de belirlenecektir.

Tohum kökenli patojenler bitkisel üretimde farklı yollarla etkin olurken önemli verim kayıplarına sebep olabilmektedir. Bu nedenle tohumun fizyolojik yapısını olumsuz yönde etkilemeyecek çeşitli yöntemler uygulanmalıdır. Uygulanan bazı yöntemler, tohum canlılığına zarar vermeden çimlenmede artış sağlarken; bazı uygulamalar ise çimlenmeyi olumsuz yönde etkilemektedir. Tohumlara uygulanan eradikasyon yöntemini seçilirken tohum kalitesini ve çimlenmeyi göz önünde bulundurmak önemlidir.

3. MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışmasına ait laboratuvar çalışmaları Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Moleküler Viroloji Laboratuvarında yürütülmüştür. ToBRFV enfekteli bitkiler Akdeniz Üniversitesinde bulunan seralarda yetiştirilmiştir.

3.1. Materyal

Çalışmanın ana materyalini, moleküler yöntemlerle ToBRFV teşhisi konulan dane domates çeşidinden alınan tohumlar oluşturmaktadır. Bu amaçla çalışmada kullanılan 600 adet dane domates çeşidine ait fideler bölgemizde bulunan tohum üreticisi firmalardan temin edilmiştir. Enfekteli domates meyvelerinden elde edilen tohumlar, farklı büyüklükteki plastik tüpler içinde buzdolabında 4°C’de muhafaza edilmiştir.

Domates Kahverengi Meyve Buruşukluk Virüsü’nün (ToBRFV) mekanik inokulasyon aşamasında kullanılacak olan 'ToBRFV-Ant-Tom: MT107885' izolatu Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Laboratuvarından temin edilmiştir.

Serolojik tanı amacıyla yapılan DAS-ELISA testlemelerinde kullanmak için ticari olarak temin edilen LOEWE markasına ait ELISA antiserum kitleri, ELISA plateleri, ELISA-reader (Tecan Trading AG, Switzerland) kullanılmıştır. ELISA okuyucularında test sonuçlarının değerlendirilmesinde, 405 nm dalga boyuna sahip filtreler kullanılmıştır.

Moleküler tanı amacıyla yapılan olan PCR çalışmalarında BIO-RAD firmasının T100 Thermal Cycler cihazı ve Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD) firmasından alınan spesifik primerler, Dream Taq Green Buffer, Verso 1-step RT-PCR kiti, 100bp DNA Ladder kullanılmıştır.

Thermo Fisher Scientific firmasının yatay elektroforez tankı, BioDocAnalyze firmasının Biometra cihazı, Etidium bromide, Sigma firmasına ait Agaroz elektroforez ve jel görüntüleme işlemlerinde kullanılmıştır. Laboratuvardaki çalışmalarda hassas terazi, Vortex-GENE2, plastik ve cam malzemeler kullanılmıştır.

ToBRFV enfekteli bitkilerin yetiştirilmesi için serada, damla sulama sistemi, yaprak gübreleri, organik sıvı gübreler, çeşitli hastalık ve zararlılarla mücadele için tarım ilaçları kullanılmıştır. Enfekteli örnekler üzerinden bitki özsuvarı elde edilmesinde porselen havan ve havanelleri kullanılmıştır.

Tohumlara ısı işlem uygulama aşamasında Delta firmasına ait makine kullanılmıştır.

Tohumlara UV uygulaması sırasında Kechaoda markasına ait taşınabilir UV sterilizasyon cihazı kullanılmıştır.

Bu tez kapsamında, hidroklorik asit, asetik asit, ozon ve hidrojen peroksit gibi etken maddelere sahip dezenfektanlar kullanılmıştır. Kimyasalların uygulama dozları Tablo 1’de detaylı olarak verilmiştir.

Tüm bunlara ek olarak moleküler çalışmalarda kullanılan; SDS, NaCl, Tris, EDTA, alkol, parafilm, alimünyum folyo, otoklav, etüv, steril cam malzeme vb. diğer laboratuvar araç gereçleri çeşitli firmalardan temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi

Akdeniz Üniversitesi uygulama seralarına daha önceden hassas olduğu bilinen dane domates çeşidine ait fideler dikilmiştir. Sağlıklı bir domatesten ortalama 70-80 adet tohum alınmaktadır, yetiştirilecek dane domates çeşidi ise virüs enfekteli olacağından daha az tohum tutabileceği göz önünde bulundurulmuştur. Bu tez kapsamında tohumlara uygulanacak çalışmalar için en az 20.000 tohum gerekmektedir. Bu nedenle seraya yaklaşık 600 adet domates bitkisi, sıra arası 40 ve sıra üzeri mesafeleri 70 cm olacak şekilde dikilmiştir.



Şekil 3. 1. ToBRFV ile bulaşık üretim alanları

3.2.2. Mekanik inokulasyon çalışmaları

ToBRFV enfekteli yapraklar 1/10 (g/v) oranında alınarak, 0,02 M Fosfat tampon (pH:7) çözeltisi + %0,1'lik 2-mercaptoethanol eklenerek ezilmiştir. Domatesler gerçek iki yapraklı döneme geldiğinde elimizde bulunan ‘‘ToBRFV-Ant-Tom: MT107885’’ izolatlarıyla belli aralıklarla bu bitkilere ‘‘soft sponge pad’’ yöntemi ile mekanik inokulasyon yapılmıştır. Bu noktada süngerin pürüzlü tarafı ile bitkinin yapraklarında açılan mikro düzeydeki yaraların derin olmamasına ve doku ölümü gerçekleşmemesine dikkat edilmiştir.



Şekil 3. 2. Domates bitkilerine uygulanan ToBRFV mekanik inokulasyonu

3.2.3. Simptomolojik gözlem ve örneklerin toplanması

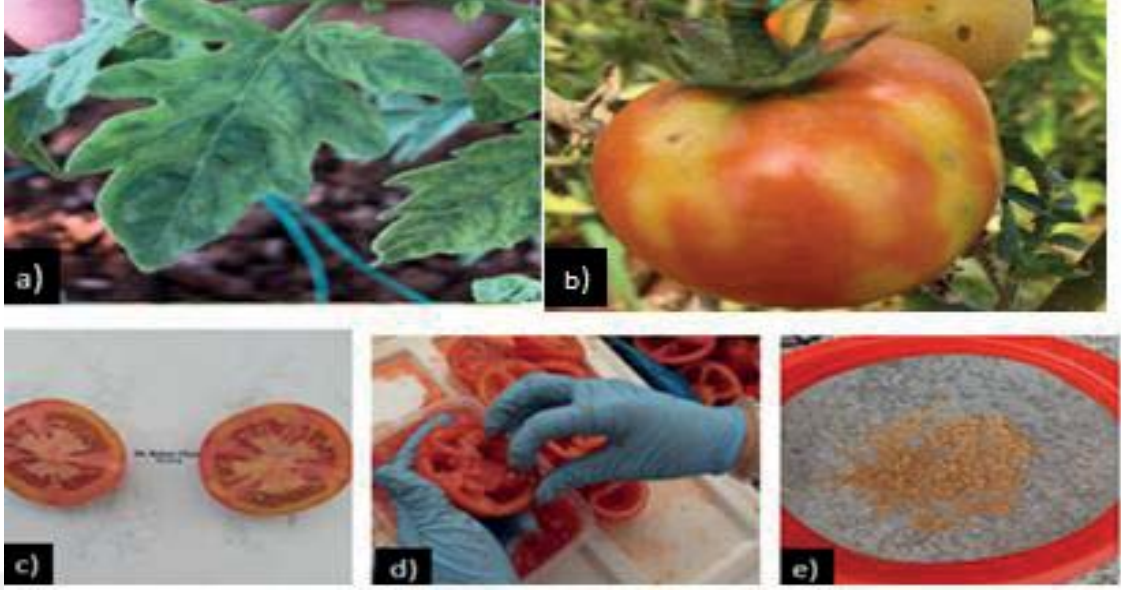
ToBRFV etmeni domates bitkisinde yaprakta ve meyvede aynı anda simptom göstermesinin yanında, bazı durumlarda yaprakta gösterirken meyve göstermemekte, bazı durumlarda ise yaprakta simptom göstermiyorken sadece meyvede göstermektedir.

Gözlemlerin devam ettiği erken dönemde, ToBRFV etmeni belirtisi olan kaliks damarlarında belirgin kahverengileşmeler görülmüştür. ToBRFV etmeninin yol açtığı, meyvede kahverengi lezyonlar, yapraklarda şiddetli mozaik simptomlarına rastlanmıştır. Hastalık etmeninin belirtilerinin gözlemlenmesine domates bitkilerinin 6. salkım meyveleri kızarıncaya kadar devam edilmiştir.

Hastalığın domatesteki tipik simptomları olarak yapraklarda mozaik, kalikte kahverengileşme ve meyvelerde düzensiz sarı halkalar şeklinde belirti gösteren domates meyveleri 3.salkımdan itibaren hasat edilmiştir.

3.2.4. ToBRFV simptomlu meyvelerden tohum çıkarma işlemleri

- ToBRFV enfekteli meyvelerden tohum çıkarma işlemi için öncelikle olgunlaşan domates meyveleri hasat edilmiştir.
- Tohum çıkarılacak ortam ve kullanılacak araç-gereçler steril edilmiştir.
- Tohum almak için seçtiğimiz domatesler, bir bıçak vasıtasıyla ortadan ikiye ayrılmıştır.
- Ayrılan tohumlar bir kabın içine kaşık yardımıyla aktarılmıştır.
- Aktarma işlemi bittikten sonra tohumları fermante etmek için serin ve gölge bir yerde kendi suyu içerisinde bir gece bekletilmiştir.
- Fermantasyon için bıraktığımız tohumların üzerinde oluşan tabaka bir kaşık yardımıyla alınıp, tohumlar süzgeçten geçirilmiştir.
- Süzgeçten geçirirken tohumlara zarar vermeyecek şekilde domates kalıntıları temizlenmiştir. Sonrasında tazyikli olmayan suyla tohumlar yıkanmıştır.
- En son işlem olarak tohumlar kuruyana kadar serin ve güneş ışığı almayan bir yerde bekletilmiştir.



Şekil 3. 3. a) ToBRFV enfekteli domates yaprağı; b,c) ToBRFV enfekteli domates meyveleri; d,e) ToBRFV enfekteli meyvelerden tohum çıkarma işlemi ve eldesi

3.2.5. ToBRFV'nin tohumla taşınma yüzdesinin belirlenmesi

Simptom gösteren ve yapılan testlemeler sonucu ToBRFV enfekteli (RT-PCR pozitif) bitkilerin meyveleri belirli olgunluğa ulaştığında toplanmıştır. Moleküler yöntemlerle ToBRFV teşhisi konulan domates bitkilerinin meyvelerinden tohumlar tohum alma işlemine uygun olarak çıkarılmıştır.

Bu çalışmanın ilk aşamasında ToBRFV enfekteli domates meyvelerinden alınan 1000 adet tohumun her biri ayrı örnek kabul edilerek testlenmiştir.

İkinci kısımda ise ToBRFV temasla kolayca yayılabildiğinden bulaş riskini ortadan kaldırmak için enfekteli domates meyvelerinden alınan diğer 1000 adet tohumu yüzey sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. Bu işlem kapsamında tohumlar %10'luk TSP çözeltisinde 3 saat bekletilmiştir ve ardından 5 dakika boyunca su ile yıkanmıştır. Yüzey sterilizasyon işlemi uygulanan tohumlar, her biri ayrı örnekler kabul edilerek, eppendorflara aktararak testlenmiştir. Bu çalışmalar ile virüsün tohumda taşınma yüzdesinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

DNA çıkarma işlemi sırasında total nükleik asit ekstarasyonu yapılmıştır. Bu işlem dellaporta yöntemi ile yapılmıştır (Dellaporta vd. 1983). RNA kökenli bir virüs olan ToBRFV'nin tohumda var olup olmadığını teşhis etmek amacıyla RT-PCR (Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction) ve yöntemiyle testlemeler yapılmıştır. RT-PCR testlemesi sırasında ToBRFV'ye spesifik olarak geliştirilen primer çifti kullanılmıştır. (Fidan vd. 2021). Çizelge 3.1'de primer çifti verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primer çiftleri ve sentezlenecek bölgenin moleküler büyüklüğü

Primer adı	5' –3' Dizilim	Ürün Boyutu	Referans
ToBRFVF1	CTTCCAAACGTGTACGCACC	472 bp	Fidan vd. 2021
ToBRFVR1	ATGCATCTTCCATTGCGCTG		

Çizelge 3. 2. RT-PCR içeriği

Kimyasal maddeler	Miktarları (µL)
Verso Enzim	1
2X 1-Step RT-PCR ReddyMix	25
RT Enhancer	2.5
Forward primer	1
Reverse primer	1
Kalıp RNA	2
Distile su	17.5
TOPLAM HACİM	50

Çizelge 3. 3. RT-PCR protokolü

Aşamalar	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
cDNA Sentezi	50°C	15 dk	1
Verso inaktivasyonu	95°C	2 dk	
Denatürasyon	95°C	20sn	35
Annealing	59°C	30sn	
Extension	72°C	45sn	
Son Uzama	72°C	15 dk	1

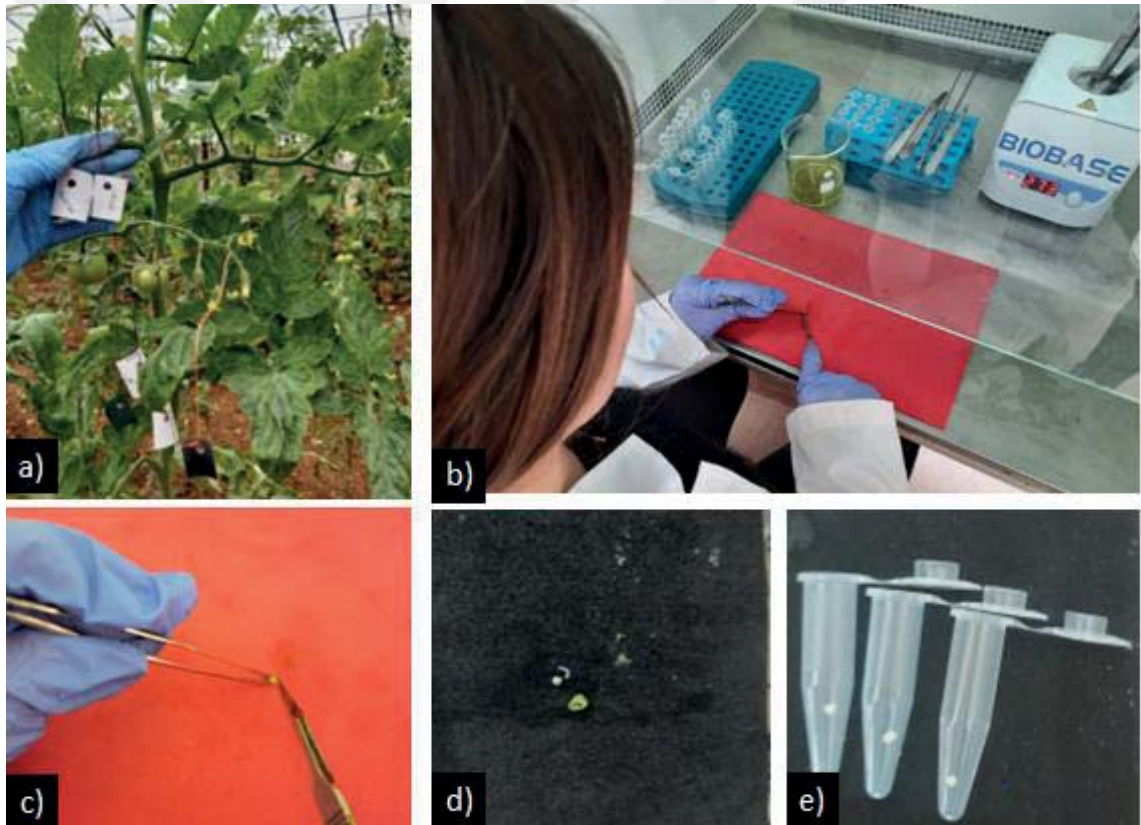
3.2.6. ToBRFV'nin tohumla taşınma yeri ve mekanizmasının belirlenmesi

Tohumla taşınan bitki virüsleri; tohum kabuğunda, embriyosunda veya endosperminde bulunabilir. ToBRFV'nin tohumun hangi katmanında bulunduğunu belirlemek için moleküler yöntemlerle ToBRFV teşhisi konulan domates bitkilerinin meyvelerinden 2000 adet tohum, tohum alma işlemine uygun olarak çıkarılmıştır.

Tohumlardan 1000 tanesine yüzey sterilizasyonu işlemi yapılmış böylece tohum kabuğunda bulunabilecek virüsün tohum kabuğu ve embriyoyu birbirinden ayırma işlemi sırasında embriyoya bulaşmasının engellenmesi amaçlanmıştır. Bu işlem için tohumlar %10'luk TSP çözeltisinde 3 saat bekletilmiştir ve ardından 5 dakika boyunca su ile yıkanmıştır.

Embriyo ve endospermdeki taşınma oranlarını belirlemek için embriyo kurtarma işlemi yapılarak birbirinden ayrılan 1000 adet embriyo ve 1000 adet endosperm RT-PCR yöntemiyle ayrı ayrı test edilmiştir.

Tohumlardan embriyo çıkartmak 32 günü geçiren meyvelerde oldukça güçtür çünkü endosperm katılaşmakta ve embriyo ayrılma aşamasında zarar görmektedir. Embriyo kurtarma işleminde en uygun dönemin tozlanmadan itibaren 28-32 gün olduğu ifade edilmektedir (Ellialtıoğlu ve Abak, 1986). Embriyo ve endosperm zarar vermeden birbirinden ayırmak oldukça zordur. Bunun için yapılan çalışmalar incelenmiş, erken dönemlerde embriyonun tam oluşmadığı görülmüştür. Bu bilgiler ışığında tez çalışmasında tozlanma aşamasından (6-12 Ekim) sonra domateslerin toplanma tarihine dikkat edilmiştir, domateslere etiket takılmış ve etiketlerin üzerine tozlanma yapıldığı günün tarihi yazılmıştır. Embriyo kurtarma işleminde tohum elde edilecek domatesler için bu etiket tarihleri göz önünde bulundurularak tozlanma tarihinden itibaren 28-30 gün (3-5 Kasım) sonra toplanan domateslerden tohum alınmıştır. Bu çalışma ile virüsün embriyoda taşınma oranının belirlenmesi amaçlanmaktadır.



Şekil 3. 4. a) Tozlanmadan itibaren 28-30 gün sonra meyvelerin toplanması; b,c,d) Tohumun endosperm ve embriyosunu birbirinden ayırma işlemi, e) Elde edilen embriyoların ezilmek üzere eppendorf tüplere aktarımı

Elde ettiğimiz diğer 1000 adet tohum kabuğu ise yüzey sterilizasyonu işlemi uygulamadan tohum kabuğu çıkarılarak her biri tek tek olmak şartıyla RT-PCR yöntemiyle test edilmiştir (Çizelge 3.3).

3.2.7. Mücadeleye yönelik çalışmalar

Virüs hastalıklarına karşı dayanıklı çeşidin ve kimyasal mücadelenin olmaması alternatif mücadele yöntemleri arayışına yol açmaktadır. Bu tez çalışması bitkilerde verim ve kaliteyi sekteye uğratan ToBRFV hastalığının tohumla taşınabilirliğinin sınırlandırılması adına çalışmalar yapmaya olanak sağlamaktadır.

3.2.7.1. Isıl işlem uygulaması

ToBRFV ile enfekteli domates meyvelerinden tohum alma işlemiyle elde edilen her grup için 1000 adet tohumu sıcaklık uygulaması yapılmıştır. Tohum partileri işlem süresine göre 3 gruba ayrılmıştır.

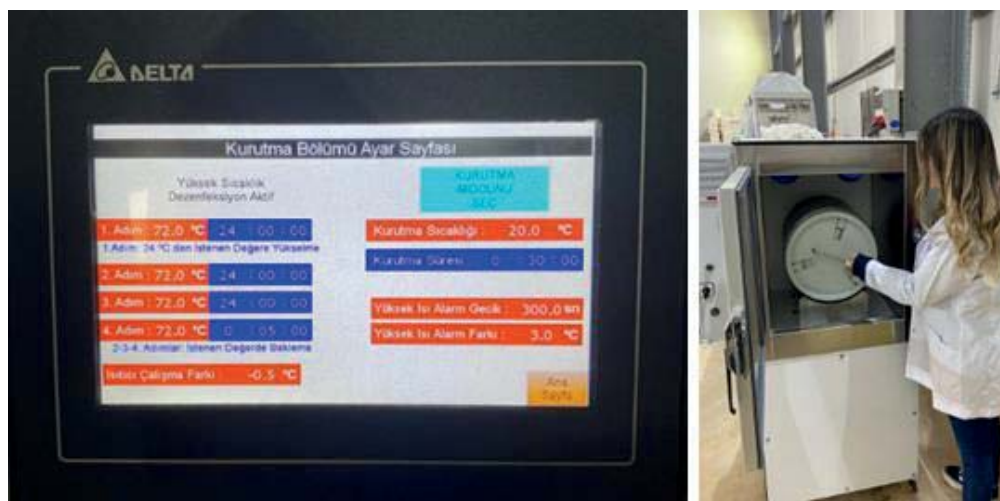
Çizelge 3. 4. Tohumlara ısıl işlem uygulama süreleri

	20°C'den 72°C'ye 24 saat	72°C'de 24 saat	72°C'de 24 saat saat
1. grup	(+)		
2. grup	(+)	(+)	
3. grup	(+)	(+)	(+)

Kademeli olarak 24 saat içerisinde yavaş yavaş 20°C'den 72°C'ye sıcaklık artışı gerçekleştiren makinede keseler içerisine konulan 1000 adet tohum 50 rpm'de döndürülerek kuru hava uygulamasına maruz bırakılmıştır.

İlk grupta 1000 adet tohum, 20°C'den 72°C'ye kademeli olarak sıcaklık artışı olan makinede 24 saat bekletilmiş, 2. grup bu 24 saate ek olarak 24 saat de 72°C'de tutulmuş, 3.grup ise 1.gruba ek olarak 72°C'de 48 saat ısıl işleme tabi tutulmuştur.

Yapılan 3 tekerrürlü çalışmalarla, her gruptaki 1000 adet tohum RT-PCR yöntemiyle test edilirken; kontrol grubu olarak eklenen 400 adet sağlıklı domates tohumunun da çimlenme gücünün sıcaklık uygulamasından olumlu ya da olumsuz etkileri test edilmiştir.

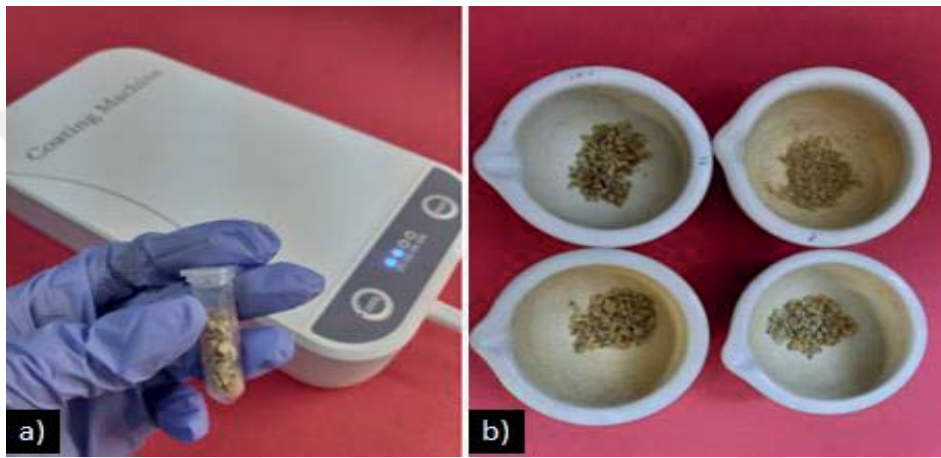


Şekil 3. 5. Kademeli olarak sıcaklık artışı gerçekleştiren ısıl işlem makinesi

3.2.7.2. UV ışık uygulaması

Tezin bu aşamasında UV ışık uygulamalarının tohum sterilizasyonuna etkisi denenmiştir. UV-C radyasyonunu oluşturan 200-280 nm aralığındaki 254 nm değeri ToBRFV enfekteli tohumlara 30 dakika süre ile uygulanmıştır.

UV ışık uygulaması yapılan 1000 adet tohum 250'şerli 4 gruba ayrılarak ezilmiştir ve DAS-ELISA (Double Antibody Sandwiches Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Clark ve Adams (1977), Erkan (1998)) testlemesi ile tohumlarda virüs olup olmadığı belirlenmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Bulgularda 3 tekerrürlü sonuçların ortalaması verilmiştir.

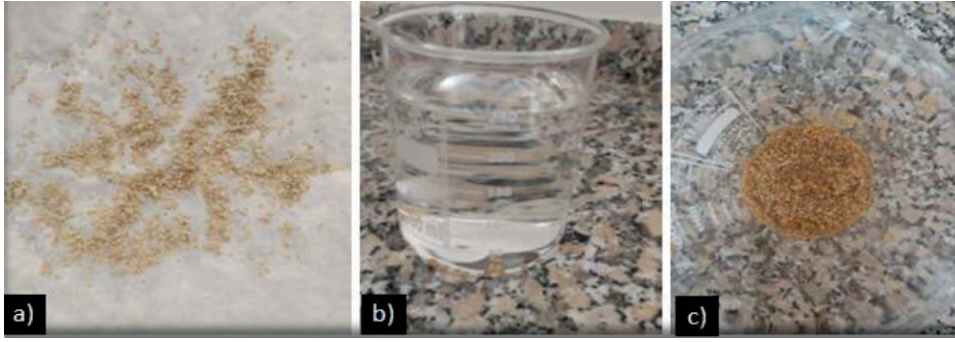


Şekil 3. 6. a) UV ışık uygulama makinesi; b) 250'şer olarak gruplandırılan 1000 adet tohumun ezilmesi

3.2.7.3. Kimyasal uygulamaları

ToBRFV teşhisi konulan domates bitkilerinin meyvelerinden tohumlar, tohum alma işlemine uygun olarak çıkarılmıştır. 1000 adet tohum başlangıç materyali olmak üzere her biri için;

Kullanılan 6 farklı dezenfektan, belirlenen oranda su ile seyreltildikten sonra tohuma uygulanmıştır. Dezenfektan uygulanan her 1000 tohum kendi içinde 250'şerli olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır.



Şekil 3. 7. a) Tohum alma işlemine uygun olarak çıkarılan tohumlar; **b,c)** Tohumlara dezenfektan uygulaması

Sonrasında ise DAS-ELISA testlemesi yapılmıştır. Çıkan sonuçlara göre dezenfektanların etkinliği ortaya konulmuştur.

Çizelge 3. 5. Tohumlara uygulanan farklı dezenfektanlar ve dozları

Dezenfektan	Uygulama Oranı	Aktif İçerik	Uygulanan Mataryel	Uygulama Süresi
Tsunami 100	%1	%30-60 Asetik asit %15,2 Peroksiasetik asit %11,2 Hidrojen peroksit	1000 adet enfekteli tohum	30 dk
Biocon A	%1	%50 Potasyum peroksimonopersülfanat	1000 adet enfekteli tohum	30 dk
Desy clean	%1	Hidrojen peroksit Sorbik asit, Perasetikasit ve Sodyum Benzoat vb.	1000 adet enfekteli tohum	20 dk
Bioxi	%1	Ozon (O ₃)	1000 adet enfekteli tohum	30 dk
HCl (Tuz Ruhı)	%2	%18 (±2) Hidroklorik Asit (Cas No:7647-01-0) Ve Deiyonize Su	1000 adet enfekteli tohum	30 dk
TSP	%10	Trisodyum fosfat	1000 adet enfekteli tohum	3 saat

3.2.7.4. Farklı işlemlerin birlikte uygulanması

Tüm değişkenlerin farklı kombinasyonlarla birlikte uygulandığı aşamadır.

Çizelge 3. 6. Uygulanan farklı eradikasyon işlemlerinin kombinasyonları

Materyal	Kimyasal	UV
300 adet ısıt işlem uygulanmış tohum	(+)	(-)
300 adet ısıt işlem uygulanmış tohum	(-)	(+)
300 adet ısıt işlem uygulanmış tohum	(+)	(+)

300 adet enfekteli tohuma ısıt işlem uyguladıktan sonra ilk olarak ısıt işlem+kimyasal, daha sonra ısıt işlem+UV ve en sonunda üç yöntem (ısıt+ kimyasal+UV) birlikte denenmiştir. Böylece ToBRFV'nin tohumda eradikasyonuna yönelik kullandığımız yöntemlerin bir arada kullanıldığındaki başarısı gözlemlenmiştir.

3.2.8. DAS-ELISA çalışmaları

Tamamlanan bu tez çalışmasındaki tohum örnekleri, ToBRFV etmeninin tespit edilmesi amacıyla, ticari tanı kitleri ve reagentlar kullanılarak DAS-ELISA yöntemi ile test edilmiştir. DAS-ELISA testleri ToBRFV'nin teşhisine yönelik üretilen ticari antiserum kitleri (LOEWE® Biochemia, Almanya) ile yürütülmüştür.

1. Virüse spesifik antibody (IgG) ile kaplama tamponu (coating) protokolde belirtilen oranda (1/200) seyreltilmiştir ve ELISA plate'nin her kuyucuğuna 200 µl konularak 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir.
2. ELISA plate'i yıkama bufferi ile 8 kez yıkanmış ve her yıkamada, kuyucuklara yıkama bufferi eklendikten sonra 1 dakika beklenmiştir.
3. Çıkarılan tohum örnekleri, 1/5 oranında ekstraksiyon tamponu ile ezilerek ekstraktları hazırlanmış, pozitif ve negatif kontroller de eklenerek 4°C'de bir gece inkübe edilmiştir.
4. 4°C'den alınan plate için 2. aşamada belirtilen şekilde yıkama işlemi tekrarlanmıştır.
5. Enzimle işaretli IgG antibody ve konjugate tamponu (1/200) oranında seyreltilerek her bir çukura 200µl eklendi ve elisa plate'i 37°C de 4 saat inkübasyona bırakıldı.
6. 2.aşamada belirtilen şekilde yıkama işlemi tekrar edilmiştir.
7. Para nitrofenilfosfat, substrat tamponuna 1mg/ml olacak şekilde eklenmiş ve çözelti her bir kuyucuğa 200 µl eklenmiştir. Enzimatik tepkime için oda sıcaklığında ve karanlıkta 1-2 saat inkübasyona bırakılmıştır.

8. Plate ukurlarındaki renk değişimine dayalı lmlerin somut verilerle değerlendirilebilmesi için ELISA Reader cihazında 405 nm'lik dalga boyunda okunmuştur.



şekil 3. 8. DAS-ELISA testlemelerinde kullanılan zeltiller

Çok sayıda örneğin aynı zamanda test edilmesine olanak sağlayan bu yöntem kapsamında ISTA'ya uygun şekilde tohum örnekleri hazırlanmıştır. İki tekerrürlü olarak 500 tane tohum alınarak, DAS-ELISA metoduyla test edilmiştir (ISTA, 2007; ISF, 2012; ISF, 2013).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışması verim ve kaliteyi sekteye uğratan ToBRFV'nin tohumla taşınabilirliğinin sınırlandırılması adına çalışmalar yapmaya olanak sağlamaktadır. Türkiye'de bu virüsün tohumda taşınma yüzdesi ve tohumda taşınma yeri ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma ile etmenin tohumda taşınma yüzdesi, yeri ve enfekteli tohumların eradikasyon yöntemi ile ilgili bulgular aşağıdaki gibi tartışılmıştır.

4.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Akdeniz Üniversitesi uygulama seralarına ToBRFV açısından temiz olan 600 adet dane domates fidesi 7 Eylül 2021 tarihinde dikilmiştir. 6-12 Ekim tarihleri arasında bitkilerin tozlanma işlemi gerçekleştirilmiştir. Antalya ilinde domates üreticiliği aktif bir şekilde üretim sahası olduğundan, üreticilerin en çok tercih ettiği gübreler ve en sık karşılaşılan hastalıklarla ilgili ilaç uygulamaları yapılmıştır. Serada görülen yabancı otlarla, zararlılarla (beyaz sinek, tuta, galeri böceği vb), bakteri ve funguslarla kültürel ve kimyasal yollarla mücadele edilmiştir.



Şekil 4. 1. Domates fidelerinin araziye dikilmesi

4.2. Mekanik İnokulasyon Çalışmaları

Domates Kahverengi Meyve Buruşukluk Virüsünün (ToBRFV) bulaştırma işleminde kullanılan 'ToBRFV-Ant-Tom: MT107885'' izolatı Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Laboratuvarından temin edilmiştir. Elde edilen izolat, Soft sponge pad yöntemiyle bitkilerin 3. ve 4. gerçek yapraklarına inokule edilmiştir. Seraya dikilen fidelere ilk olarak 14 Eylül tarihinde mekanik inokulasyon işlemi uygulanmıştır. İlk bulaştırma işleminden 3 gün sonra ikinci bulaştırma yapılmış, bu işlem ardından 7 gün aralıklara 3 kez daha inokulasyon işlemi tekrar edilmiştir. Domates fidelerine toplamda 5 kez mekanik inokulasyon işlemi yapılmıştır ve bu işlemlerin, domates bitkilerinde enfeksiyonu başarılı bir şekilde oluşturduğu yapılan butez çalışmasında ortaya konmuştur.



Şekil 4. 2. ToBRFV izolatlarının fosfat tampon ile ekstraksiyonu

Çizelge 4. 1. Mekanik inokulasyon uygulama tarihleri

İnokulasyon sayısı	Uygulama tarihleri
1.	14.09.2021
2.	17.09.2021
3.	24.09.2021
4.	1.10.2021
5.	08.10.2021

4.3. Simptomolojik Gözlem ve Örneklerin Toplanması

İlk bulaştırmayı takip eden 21. günde yaprak belirtileri gözlemlenmiştir. ToBRFV'in tipik belirtileri bu tez çalışmasında da görülmektedir. Yapraklarda klorotik mozaikler, buruşma ve deformasyonlar meydana gelirken bazı çeşitlerde kalikste kahverengileşme gözlemlenmiştir. Mekanik inokulasyon uygulaması yapıldıktan sonra sonra elde edilen bitki örnekleri üzerinde semptom gösteren ve yapılan testlemeler sonucu ToBRFV enfekteli (RT-PCR pozitif) olan bitkilerin meyveleri, meyveler 3. salkıma geldiğinde yaklaşık 500 adet domates meyvesi toplanmıştır.



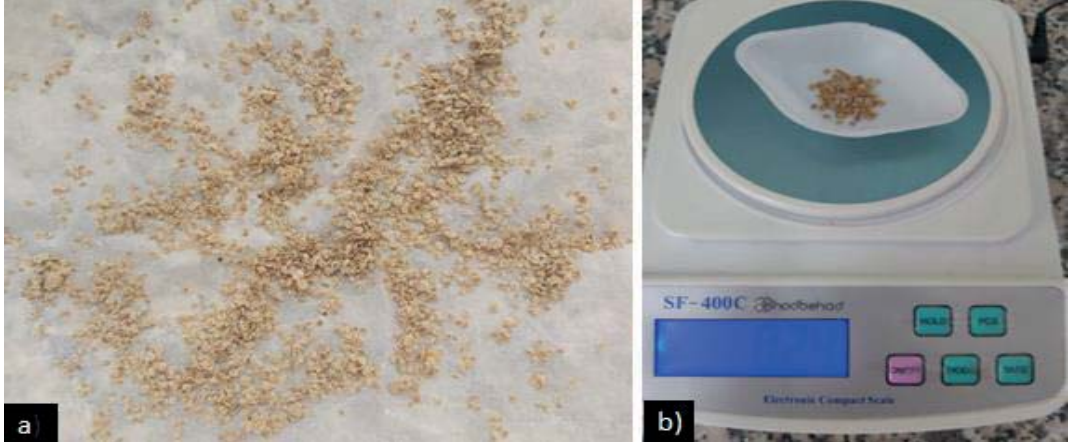
Şekil 4. 3. ToBRFV enfekteli yaprak belirtileri



Şekil 4. 4. ToBRFV enfekteli meyve belirtileri

4.4. ToBRFV Belirtilili Meyvelerden Tohum Çıkarma İşlemleri

Hasat edilen ToBRFV enfekteli meyvelerden tohum çıkarma işlemi sırasında öncelikle, olgunlaşan domates meyveleri ortadan ikiye ayrılarak daha önce belirtilen şekilde tohumlar çıkarılmıştır. Elde edilen tohumlardan 100 adeti sayılmış ve tartılmıştır. 100 adet tartılan tohum 0,24 gram gelmiştir. Daha sonra çıkarılan tohumlar bu tartıma göre 100'erli paketlenmiştir. İşlem sonunda stoğumuzda 218 adet tohum paketi bulunmuştur. Bu sonuçlara göre elimizde 21.800 adet ToBRFV enfekteli tohum bulunmaktadır.



Şekil 4. 5. a) Elde edilen tohumların filtre kağıtlarında kurutulması; **b)**Tohumların tartılması

4.5. ToBRFV'nin Tohumla Taşınma Yüzdesinin Belirlenmesi

Bu çalışmanın ilk aşamasında ToBRFV enfekteli domates meyvelerinden alınan 1000 tane tohumun her biri ayrı örnek kabul edilerek RT-PCR yöntemi ile testlenmiştir. 1000 adet tohum tek tek eppendorf tüplere alınmıştır ve tohumlara Della Porta yöntemi ile (Dellaporta vd. 1983) total nükleik asit izolasyonu uygulanmıştır. DNA çıkarıldıktan sonra ToBRFV'e özgü primer ile (Çizelge 3.1.) belirlenen protokole göre (Çizelge 3.3) RT-PCR işlemi uygulanmıştır.

Bu aşamada yapılan moleküler çalışmalar sonucunda, tüm tohumlarda ilgili virüs etmenine rastlanmıştır. Tohumlarda %100 oranında kontaminasyon görülmesinin sebebi, domateslere uygulanan bulaştırma işleminin döllenme döneminden önce yapılmasından kaynaklanmaktadır. Erken dönemde yapılan bulaştırma inokulum miktarını artırmıştır ve bu durum tarafımızca beklenen bir sonuçtur. ToBRFV etmeni, enfekteli meyvelerden temasla kolaylıkla tohumlara geçmiştir. Sonucun handikapı herhangi bir dezenfeksiyon işlemi uygulamadan tohumların testlenmesi olarak saptanmıştır. Bu durumun ortadan kaldırılması için ikinci bir çalışma yapılmıştır.



Şekil 4. 6. RT-PCR sonucu ToBRFV pozitif örnekler



Şekil 4. 7. 1000 adet tohumun DNA izolasyon işlemleri

Çalışmanın ikinci aşamasında ise ToBRFV etmeni temasla kolayca yayılabildiğinden bulaş riskini ortadan kaldırmak için enfekteli domates meyvelerinden alınan diğer 1000 adet tohumu yüzey sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. ToBRFV ile enfekte olmuş meyvelerden ekstrakte edilen tohumlar, 3 saat süreyle %10 trisodyum fosfat ile muamele edilmiştir. İlk aşamada uygulanan aynı yöntemler tekrar edilerek her bir tohum ayrı bir örnek olarak kabul edilmiş ve RT-PCR yöntemiyle 1000 tohum moleküler testlere tabi tutulmuştur.

Testleme sonucu elde edilen RT-PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra UV ışık altında değerlendirilmiştir. Virüse spesifik primerler kullanılarak hedef bölge çoğaltılarak beklenen büyüklükte (bp) bant veren örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir. Yapılan testlemelerde 1000 örnekten 992 tanesi negatif olarak bulunmuş, 8 tanesi ise 475 bp'da bant vererek ToBRFV etmeni yönünden pozitif bulunmuştur. Jel elektroforezinde görülen bantlar, tohumların ToBRFV ile enfekteli olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlara göre ToBRFV'nin %100 kontaminasyon oranı yapılan dezenfeksiyon işlemleriyle giderilerek etmenin tohumda taşınma yüzdesi ortaya konulmuştur ve bu sonuç %0,8 olarak belirlenmiştir. Bu taşınmanın tohumun hangi katmanında olduğunu belirlemek için tezin bir sonraki adımında tohumun katmanları birbirinden ayrılarak testlenecektir.

ToBRFV'nin tohumla taşınma oranı düşük bulunmuş olsa da etmenin virulensliği oldukça yüksektir. Bu durum çok fazla enfeksiyon yaratabilir ve epideminin oluşması için ciddi bir sorun oluşturabilir.

Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) kabakgillerde görülen ToBRFV kadar tehlikeli ve etkin bir virüstür. Bu virüsün hıyar tohum kabuğunda %100'e kadar kontaminasyona ulaştığı ve virüsün tohumda taşınma oranı %0,9 olarak belirtilmektedir. (Cordoba-Selle vd. 2017). Bizim çalışmamızda da dezenfeksiyon işlemi uygulanmadan testlenen tohumlarda %100 oranında ilgili etmene rastlanmıştır ve etmenin tohumda taşınma oranı %0,8 olarak bulunmuştur, bulduğumuz sonuçlar literatür verileri ile paralellik göstermektedir.

4.6. ToBRFV'nin Tohumda Taşınma Yeri ve Mekanizmasının Belirlenmesi

Tez kapsamında ToBRFV'nin tohumda taşınma yerinin belirlenmesi için embriyo ve endospermi birbirinden ayırmak amacıyla, embriyo kurtarma işlemi yapılmıştır. Tohumlardan 1000 tanesine yüzey sterilizasyonu işlemi uygulanmış böylece tohum kabuğunda bulanabilecek virüsün tohum kabuğu ve embriyoyu birbirinden ayırma işlemi sırasında embriyoya bulaşmasının engellenmesi amaçlanmıştır. Birbirinden ayrılan 1000 adet embriyo ve 1000 adet endosperm serolojik ve moleküler yöntemlerle ayrı ayrı test edilmiştir.

Embriyo kurtarma işlemi oldukça güçtür, tozlanmadan itibaren gün geçtikçe endosperm katılaşmakta ve embriyo ayrılma aşamasında zarar görmektedir. Bunun için yapılan çalışmalar incelenmiş Ellialtıoğlu ve Abak (1986)'a göre embriyo kurtarma işleminde en uygun dönemin tozlanmadan itibaren 28-32 gün olduğu belirlenmiştir. Bu tez kapsamında da bu bilgiler ışığında embriyo ve endosperme zarar vermeden birbirinden ayırmak için en uygun zamanın tozlanmadan itibaren 28-30 gün olduğu belirlenmiştir.

Tamamlanan tez çalışmasında domateslerin tozlanma aşamasından sonra toplanma tarihine dikkat edilmiştir, Domateslere tozlanma yapıldığı günün tarihi domates meyvelerinin üzerine takılan etiketlere not edilmiştir. Embriyo kurtarma işleminde tohum elde edilecek domatesler için bu etiket tarihleri göz önünde bulundurularak tozlanma tarihinden itibaren 28-30 gün sonra hasat edilen domateslerden tohum alınmıştır.



Şekil 4. 8. Tozlanma tarihine göre toplanan domatesler



Şekil 4. 9. Tohum katmanlarının birbirinden ayrılması

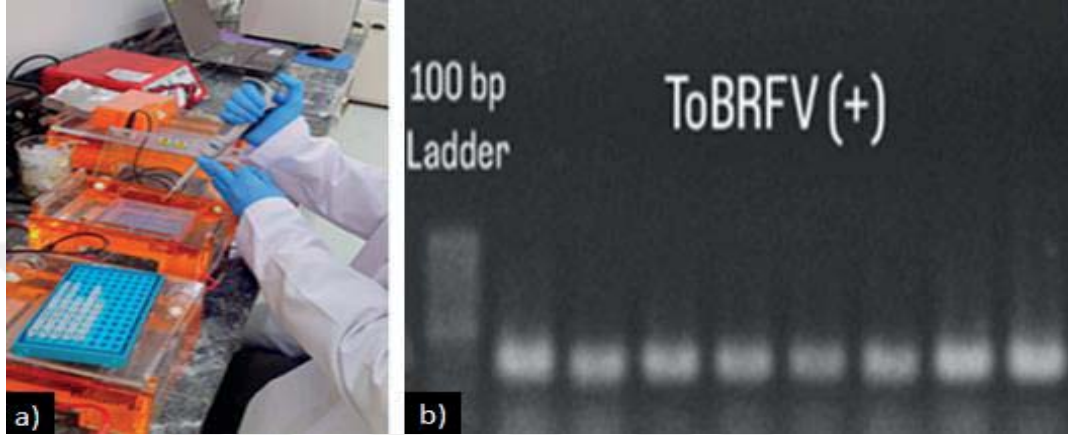


Şekil 4. 10. Tohum katmanlarının ayrıldığı steril ortam

Örnek sayısı fazla olduğu için öncelikle DAS-ELISA testleriyle etmenin varlığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 405 nm dalga boyunda okunan değerler için negatif kontrol örneğinin iki katından fazla değere sahip örnekler ve platedeki kuyucuklarda sarı renk oluşumu gözlenen örnekler enfekteli olarak kabul edilmiştir.

Çalışmamız kapsamında tohumda taşınma oranlarının belirlenmesinde hata payını minimuma düşürmek ve elde edilen sonuçlardan emin olmak amacıyla yapılan testlemelerde moleküler ve serolojik yöntemler bir arada kullanılmıştır. DAS-ELISA testlerinde pozitif bulunan örnekler ve rastgele seçilmiş 10 örnek moleküler olarak da teste tabi tutulmuştur. Elde edilen total RNA'lar ToBRFV'ye özgü spesifik primeler ile Verso 1-Step RT-PCR Reddy Mix Kit kullanılarak RT-PCR işlemi uygulanmıştır. RT-PCR işleminden sonra elde edilen ürünler %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüştür ve son olarak UV altında görüntülenmiştir. İki yöntemden elde edilen veriler incelendiğinde ELISA reader sonuçlarına göre pozitif olan örnekler, RT-PCR işleminden sonra jel görüntüsünde 475 bp'da bant vererek pozitif olarak bulunmuştur.

Tozlanma işlemini takiben 28. gün embriyo kurtarma işlemi yapıldığında yaptığımız 4 tekerrürlü çalışmalar neticesinde, embriyoda ilgili etmene rastlanmadığı; endospermde ise virüsün taşınma oranları incelendiğinde ilk çalışmada %0,7, ikinci %0,8, üçüncü %0,9 ve dördüncü çalışmada ise %0,8 olarak bulunmuştur. Bu durumda dört çalışmanın ortalaması alındığında ToBRFV'nin 1000 tohumdan 8 tanesinde pozitif bulunduğu ve taşınmanın %0,8 oranında endospermde lokalize olduğu bu çalışma kapsamında tespit edilmiştir.



Şekil 4. 11. a) RT-PCR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesi; **b)** RT-PCR sonucu pozitif bulunan endosperm örnekleri

Salem vd. 2022 yılında biyolojik, moleküler ve serolojik çalışmalar sonucu ToBRFV'nin domates tohumlarındaki lokalizasyonunun sadece tohum kabuğunda (testa) olduğunu ileri sürmektedir. Virüsün tohumdan fideye geçiş oranını %0.8 olduğunu belirtmiştir.

Tobamovirüsler tohum kaynaklı, mekanik olarak taşınan virüslerdir; çoğunlukla tohum kabuğunu ve endospermi enfekte eder. Albrechtsen (2006)'a göre, tobamovirüslerin tohumla taşınması %1-20 aralığındadır. ToBRFV etmenine nadiren endospermde rastlandığı, etmenin asıl olarak tohum kabuğunda taşındığı ve embriyoda görülmediği belirtilmektedir. Enfekteli tohumlardan bitkilere geçiş, çimlenme esnasında mikro lezyonlar yoluyla gerçekleşmektedir. ToBRFV'nin tohum aktarım oranı kotiledonlarda % 2.8 ve üçüncü gerçek yaprakta % 1.8 olarak bulunmuştur (Salvatore Davino vd. 2020). Yürütülen bu çalışma ile diğer çalışmalar arasında paralel sonuçlar elde edilmiştir. Bizim araştırmalarımız neticesinde de ToBRFV etmeninin tohum kabuğunda ve endospermde taşındığı, embriyoda ise etmenin görülmediği saptanmıştır.

Çizelge 4. 2. Bazı virüs hastalıklarının tohumla bulaşık olma durumları ve taşınma oranları

Virüs	Konukçu	Kontaminasyon	Taşınma	Referans
<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> (CGMMV)	<i>Cucurbitaceae</i>	+ (%84)	+ (%2)	Shargil vd. 2017
		+ (95%)	+(> %1)	Reingold vd. 2015
		+ 100%)	+ %0,9)	Cordoba-Selle vd. 2017
<i>Tomato brown rugose fruit virus</i> (ToBRFV)	<i>Solanaceae</i> Domates		% 0.8	Salem vd. 2022
<i>Tomato brown rugose fruit virus</i> (ToBRFV)	<i>Solanaceae</i> Domates		% 0.8	Bu tez çalışması kapsamında

4.7. Mücadeleye Yönelik Çalışmalar

4.7.1. Isıl işlem uygulaması

Kimyasal kontrolün yetersiz kaldığı durumlarda tohum kaynaklı virüslerin kontrolü için termoterapi işlemlerine başvurulmaktadır.

Tohumların dezenfeksiyon yöntemleri kimyasal ve fiziksel dezenfeksiyon olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Bu yöntemlerin uygulanması sıcaklık, uygulama süresi gibi her duruma özgü parametrelerin optimizasyonunu gerektirmektedir. Bu uygulamaların tohum çimlenmesini azaltıcı etkisi olabilmektedir. Kimyasal uygulamalara alternatif olarak fiziksel uygulamalar karşımıza çıkmaktadır ve gelişen tohumculuk sektörü için daha iyi bir alternatif olarak değerlendirilmektedir (Afzal vd. 2016; Atmaca ve Akdemir 2020).

Bu tez çalışmasında da yüzey sterilizasyonu işlemini takiben kuru hava üfleyen 50 rpm de dönen 20°C 'den 72°C 'ye bir günde yavaş yavaş yükselerek kademeli olarak sıcaklık artışı gerçekleştiren makinedeki tohumlar, uygulama sonrası test edilmiştir. Tohumda taşınma oranı %0.8 olan ToBRFV'nin bir günlük ısıtma uygulamasından sonra %0.5 seviyelerine düştüğü görülmüştür ve bu bir günlük uygulamayı takiben de 72°C de 2 gün boyunca dönerek üç günlük kuru hava işlemlerinden geçen tohumlar moleküler yöntemlerle test edildiğinde ToBRFV'nin %0,8 olan tohumda taşınma oranının %0,3'e düştüğü (RT-PCR, PCR ve RT-qPCR) testleriyle ortaya konulmuştur. Isıtma uygulaması ToBRFV 'yi çok az bir oranda elimine etmesine rağmen, tüm tohumlarda virüsü eradike edememiştir. Ortaya çıkan sonuçların literatürle paralellik gösterdiği saptanmıştır.

Daha önceki çalışmalar incelendiğinde tohumla taşınan bir virüs olan PepMV'a yönelik mücadele yöntemleri belirlenmiştir. Bu virüs ile enfekteli tohumlar 3 saat boyunca %10 trisodyum fosfat solüsyonunda bekletilmesiyle büyük ölçüde yok edilmiştir. 80°C'de 24 saat ve 74°C'de 48 saat uygulanan ısıtma işlemler PepMV'yi elimine etmesine rağmen, bu işlemler tüm tohumlarda virüsü yok etmemiştir. Yapılan üç uygulamanın da tohum çimlenmesini üzerinde olumsuz bir etkisi

görülmemektedir. Sonuçlar, çimlenmeyi engellemeden domates tohumunda PepMV'yi yok etmek için trisodyum fosfatın kullanılabileceğini göstermektedir (Cordoba-Selles, 2007).



Şekil 4. 12. Domates tohumlarında kuru hava sterilizasyonu

Bir başka çalışmada, ToBRFV ile enfekteli tohumlara dört farklı sıcaklık uygulaması yapılmış ve her deney için 100 parti tohum kullanılmıştır. 80 °C'de 24 saat bekletilen tohumların %60'ı pozitif, 75°C'de 48 saat ısıtılma işlemi gören tohumların %80'i pozitif, 70°C'de 96 saat ve 65°C'de 120 saat boyunca ısıtılma işlemi uygulanan tohumların ise %100'nün pozitif olduğu belirtilmiştir. Yapılan analizler sonucunda virüsün ısıtılma işleminden sonra da görüldüğü ancak bulaşıcı olmadığı ileri sürülmektedir. (Davino, S. 2020). Tamamlanan bu tez kapsamında da ısıtılma işlemi uygulamaları yapılmıştır. ToBRFV'nin tohumda taşınma oranının literatürde yer alan bilgiler ve bu tezin ilk aşamasında yapılan çalışmalarla %0,8 olmasından dolayı enfekteli tohumlara ısıtılma işlemi uygulaması bizim çalışmamızda 1000 tohum üzerinden devam etmiştir. Davino vd. (2020) yapılan çalışmanın 100 tohum üzerinden değerlendirilmesi güven verici sonuçlar içermemektedir.

Tezin bir diğer aşamasında, tohumlara uygulanan uzun ısıtılma işlemleri virüs hastalıklarının patojenitesini (hastalık yapma yeteneğini) kaybetmesine neden olacağından bu tohumlar çimlendirilip hastalık gözlemleri yapılarak tekrar test edilmiştir. 3 günlük kuru hava üfleme sonucunda 1000 tohumdan 3 tanesi pozitif bulunan bitkilerin, virüs patojenitesini test etmek amacıyla 1000 bitki uygulama seralarında dikilerek gözlemlenmiştir. 7, 14, 21, 28 ve 45. güne kadar testlemeler yapılmış ve örnekler negatif bulunmuştur. 45. günde bitkilerin hepsi ToBRFV açısından temiz çıktığı için ısıtılma işleminden sonra yapılan moleküler testlemelerde %0,3 oranında pozitif bulunmuş olmasına rağmen, işlem görmüş tohumları çimlendirip RT-PCR yöntemiyle testlediğimizde bitkilerin negatif olduğu belirlenmiştir. Bu deneyden elde edilen bilgilerle virüsün termoterapi uygulamalarıyla virulensliğini kaybederek enfeksiyon yapamaz hale geldiği, bulunan %0,3 oranının RT-PCR yönteminin hassaslığından dolayı yakalandığı, böylece mücadele ısıtılma işlemi yönteminin başarıyla sağlandığı ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar Davino vd. (2020) ile örtüşür niteliktedir.



Şekil 4. 13. Isıl işlem gören tohumların saksı denemesi

Çimlenme testlerinde farklı laboratuvarlar arasında birliktelik sağlamak amacıyla 20. yüzyılın ilk çeyreğinden itibaren faaliyet gösteren, dünya çapındaki kuruluş Uluslararası Tohum Test Birliği (International Seed Testing Association-ISTA)'dır. Bugün dünya çapında 70'in üzerindeki ülkede 200'den fazla laboratuvar ISTA kuruluşunun üyesidir ve bu üyelerden 120 tanesi ISTA tarafından akredite edilmiştir (ISTA, 2011).

Çalışmamızda uyguladığımız çimlenme testleri de ISTA'ya uygun olup çimlendirme testlerinde kullanılan tohum numunelerinden tesadüfi olarak seçilen 400 adet tohum alınmıştır. Testte kullanılacak tohumlar, çimlendirme ortamına bağlı olarak 4 ya da 8 tekerrüre ayrılır (4×100 tohum = 400 tohum = 8×50 tohum). Bu tezde rastgele seçilen 400 tohum 4 gruba ayrılmıştır. Filtre kağıtları ıslatılarak 100'er tohum Şekil 4.11.'de belirtildiği gibi 10 yatay, 10 dikey yönde olmak üzere eşit aralıklarla dizilmiştir. Filtre kağıtları katlanarak dikey bir şekilde plastik kaplara yerleştirilmiş ve çimlenme kabinine bırakılmıştır. Çimlendirme testinin başından itibaren ihtiyaca göre su verilerek ortamın nemli tutulması gerekmektedir. Çimlenme kabininde ISTA kurallarında belirtilen çimlendirme testi süresince sabit tutulan 25°C sıcaklık uygulaması seçilmiştir. İlk sayım belirtildiği üzere 5. günün sonunda, son sayım ise çimlendirme testinin tamamlandığı 9. günün sonunda yapılmıştır.



Şekil 4. 14. ISTA kurallarına göre uygulanan çimlenme testleri



Şekil 4. 15. Filtre kağıtlarında çimlendirilen tohumlar

Tobamovirüslerin termal inaktivasyon noktasının 90°C'nin üzerinde olduğu ve bu sıcaklıkların çimlenme üzerinde olumsuz etkisi olacağı bilinmektedir. Bu nedenden dolayı çalışmamızda sıcaklık düşürülüp süre uzatılarak ısı işlem uygulamaları yapılmış ve virüsün eliminasyonu sağlanmıştır. Bu hipotemizin de başarılı olduğu çalışmada ortaya çıkan sonuçlar ile görülmüştür. Uygulanan ısı işlem çalışmalarının çimlenme üzerindeki etkisini belirlemek için ISTA kuralları çerçevesinde çimlenme testleri uygulanan 400 tohum 9 günün sonunda sayılmıştır. 400 tohumun 384 tanesinin çimlendiği, 16 tanesinde ise bir çimlenme gerçekleşmediği kaydedilmiştir. Çimlenme testi sonuçlarına göre tohumların çimlenmesi %96-%98 oranında başarı göstermiştir. Bu durum sıcaklık uygulamalarının çimlenmede negatif yönde bir etkisi olmadığını ortaya koymaktadır.

4.7.2. UV ışık uygulaması

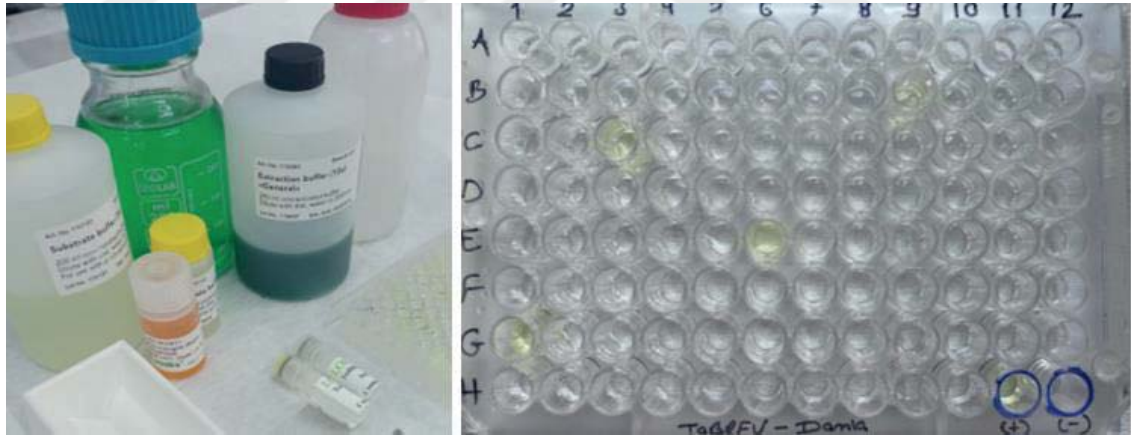
Kibar'ın (2020) yaptığı bir çalışma hem dünyada hem de ülkemizde yüksek oranda üretilen ve tüketilen sebze türleri arasında yer alan domates ve hıyarda UV-C ve ultrason uygulamalarının fide gelişimi üzerine etkilerini araştırmak amacıyla yürütülmüştür. Araştırmadan elde edilen sonuçlara göre UVC, US ve UV-C+US uygulamalarının domateste Falcon çeşidinde klorofil miktarı dışında incelenen tüm fide büyüme parametrelerini, H-2274 çeşidinde ise kök uzunluğu ve yaprak sayısı haricinde incelenen tüm fide büyüme parametrelerini kontrol grubuna göre önemli oranda artırdığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada UV-C'nin tohum patojenlerine etkisi üzerine herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Tamamlanan tez kapsamında UV'nin etkinliğinin belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır.

ToBRFV enfekteli tohumlara 254 nm dalga boyundaki UV ışınları 30 dk boyunca uygulanmıştır. İşlem görmeyen 1000 tohumdan 8 tanesi pozitif bulunurken bu uygulamanın sonucunda 1000 tohumun 4 tanesi ToBRFV etmeni yönünden pozitif bulunmuştur. Yapılan çalışmanın virüsü yarı yarıya oranla inaktif hale getirdiği DAS-ELISA testlemeleri sonucunda ortaya konulmuştur. UV uygulamalarından sonra virüsün tohumda taşınma oranı 3 kez tekrarlanan testlemelerle %0,4 olarak belirlenmiştir.

UV-C ışını tohumlara 254 nm dalga boyunda 30 dk uygulandıktan sonra, tohumlar seraya dikilerek hastalık gözlemleri yapılmış ve tekrar test edilmiştir. 45 günün sonunda seraya dikilen bitkilerden yaprak örnekleri alınıp DAS-ELISA metoduyla örnekler testlenmiştir. Yapılan uygulamalar sonucu, kuru hava üflemede görünenin aksine, hastalık etmeninin enfeksiyon yeteneğini kaybetmediği serolojik testlemeler sonucunda doğrulanmıştır. Buna göre UV uygulamalarının virüslerin patojenitesi üzerinde bir etkisi bulunmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4. 16. Tohum sterilizasyonunda kullanılan UV cihazı



Şekil 4. 17. a) DAS-ELISA'da kullanılan bufferlar; **b)** UV uygulamasından sonra elde edilen plate görüntüsü

UV-C uygulamalarının tohumda bulunan virüslere karşı etkin olarak bulunmasının sebebi hastalık etmeninin tohumun dış kısmında (testa) bulunan virüsler üzerinde etkin olması olarak düşünülmektedir. UV uygulamalarının tohumun iç katmanında bulunan endosperm ve embriyo üzerinde etkisi bulunmamaktadır. UV-C ışınları bir bakıma tohum kabuğuna yüzey sterilazasyonu işlemi uygulayarak testadaki virüsü inaktif hale getirmiştir. Bu tezde yapılan çalışmalar neticesinde UV-C'nin tohum kabuğunda taşınan virüsleri eradike etmekte başarılı olduğu belirlenmiştir. Fakat bu çalışmada küçük tohum paketleri üzerinde UV'nin etkinliği ortaya konulmaktadır.

Çalışmada kullandığımız UV cihazının küçük olması, tohumların uygulama sırasında sabit kalması gibi nedenlerin çalışmamız açısından dezavantaj oluşturduğu belirlenmiştir.

4.7.3. Kimyasal uygulamaları

Tohumlarının dezenfeksiyon işlemi için kimyasal kullanımına sıklıkla başvurulmaktadır. %1-9 hidroklorik asit, %1-5 kalsiyum hipoklorit ve %10 trisodyum fosfat (TSP) gibi yüzey dezenfeksiyonu için başarılı kimyasalların kullanımı oldukça yaygın olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu tez kapsamında 6 farklı dezenfektan Çizelge 3.5.'de belirlenen süre ve dozda uygulanmıştır. Uygulanan kimyasal yöntemlerle tohumdaki virüsü yok etme üzerine etkinliği DAS-ELISA testlemeleri ile belirlenmiştir.

Çalışma sonucunda yüzey sterilizasyonunda %1 oranında Tsunami 100 (%30-60 Asetik asit, %15,2 Peroksiasetik asit, %11,2 Hidrojen peroksit) ve %1'lik Biocon A (%50 Potasyum peroksimonopersülfanat) içeren kimyasallar 30 dk ve %10 TSP 3 saat süreyle tohumlarla muamele edilmiştir. Bu üç kimyasal uygulandıktan sonra %100. enfekteli 1000 tohum kabuğunun tamamı ilgili etmen bakımından temiz bulunmuştur. Domates tohum kabuğundaki bulaşıklık tamamen eradike edilmiştir. Sadece virüs hastalıklarında değil literatürde de belirtildiği üzere fungal ve bakteri hastalıklarında da sterilizasyon işlemleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bu işlemler neticesinde çalışmamızda da ortaya koyduğumuz sonuçlara göre, modern tohumculuk sisteminde, dezenfeksiyon uygulamalarının özellikle tohum kabuğundaki etmenlerin eliminasyonuna yardımcı olduğu sonucuna varılabilir.

Kimyasal uygulamaları ile ilgili yapılan çalışmada, tohumlar %2 hidroklorik asit + %1.5 sodyum hipoklorit ile 24 saat boyunca bekletilmiş, işlem gören tohumlara çimlenme testi uygulanmış ve 14 gün sonra sonuçlar incelendiğinde tohumlardan hiç birinin çimlenmediği görülmüştür (Davino, 2020). Bu tez kapsamında da paralel sonuçlar elde edilmiştir. Tohumlar %2'lik HCl çözeltisinde 30 dakika bekletilmiştir. Bu uygulamanın sonucunda virüs eradike edilmiş fakat tohum yüzeylerinde deformasyonlar meydana gelmiştir. Tohumlar petri kaplarına ekilerek çimlenme testleri yapılmış ve HCl'nin çimlenme üzerinde %80 olumsuz etkisi olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 18. HCl'nin çimlenme üzerindeki olumsuz etkisi

Spadaro vd. (2005)'ye göre tohum dezenfeksiyon işlemi sırasında kimyasal kullanım tohumun fizyolojik yapısına zarar vermekte ve tohum çimlenmesini olumsuz yönde etkilemektedir. Kimyasal kullanımı, insan sağlığına zarar vermesinin yanında çevreye zararlı kimyasal kalıntılar bırakarak fitotoksik etki yaratmaktadır. Bu sebeple, artan nüfus sayısına ayak uydurmak ve tohumda çimlenmeyi artırmak için yeni teknolojilerin gelişmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Thirumdas vd. 2017). Bu durumun aksine tamamlanan çalışmamızda yüzey sterilizasyonunda HCl harici kimyasal uygulamaları oldukça başarılı bulunmuştur. Buradaki en önemli sorunlardan biri kimyasalların çimlenme üzerindeki etkisidir. Bu çalışmada ToBRFV ile enfekte olmuş meyvelerden ekstrakte edilen tohumlar 3 saat %10 trisodyum fosfat, 30 dk %1 Tsunami 100'de ve 30 dk %1 Bioan A ile muamele edilmiştir. Bu kimyasallarda bekletilen tohumların işlem görmeyen tohumlara kıyasla tohum kalitesinde iyileşmeler olduğu görülmüş ve çimlenme oranları da %96-%98 olarak belirlenmiştir.

%1 oranında hidrojen peroksit, sorbik asit, perasetikasit, sodyum benzoat vb. gibi etken maddelere sahip Desy clean solüsyonunda 20 dk bekletilen tohumların tohum kabuğundaki virüsü eradike etme başarısı %92; etken maddesi Ozon (O₃) olan %1'lik Bioxi çözeltisinde 30 dk bekletilen tohumların tohum kabuğundaki virüs üzerindeki etkinliği %94 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.19. Tez kapsamında kullanılan bazı dezenfektanlar

4.7.4. Farklı işlemlerin birlikte uygulanması

Enfekteli tohumlara öncelikle ısıl işlem uyguladıktan sonra ilk olarak ısıl işlem+kimyasal, ikinci adımda ısıl işlem ile UV uygulamaları ve son olarak da ısıl işlem, kimyasal ve UV ışın uygulaması olarak üç yöntemin kombinasyonu denenmiştir. Böylece ToBRFV'nin tohum eradikasyonuna yönelik kullandığımız yöntemlerin bir arada kullanıldığındaki başarısı gözlemlenmiştir.

Yapılan çalışmalara göre 10% TSP içerisinde 3 saat bekletilen ve hemen ardından 72 °C'de 72 saat ısıl işleme tabi tutulan tohumlarda virüs yoğunluğu en az bulunmuştur.

4.8. ELISA Uygulamaları

Test edilen örnekler ilgili virüs etmenine spesifik antiserumlar kullanılarak DAS-ELISA yöntemiyle testlenmiştir. ToBRFV için ise LOEWE markasına ait ticari antiserum kiti kullanılmıştır. Antiserumlar, 1/200 (LOEWE® Biochemia, Almanya) oranına göre sulandırılmış, örnek sayısına göre hesaplanmıştır.

Testlemelerde kullanılan ELISA plateleri üzerine pozitif kontrol, negatif kontrol ve buffer kontrollerinin yerleri işaretlenmiştir. DAS-ELISA testi sonuçlarında negatif kontrol pembe pozitif kontrol sarı ve buffer değerleri yeşil renk ile gösterilmiştir. 405 nm dalga boyunda okuma yapılarak ELISA- reader (Tecan Trading AG, Switzerland) cihazında elde edilen absorbans değerleri incelendiğinde; negatif kontrol ve buffer değerlerinin 2 katı ve fazlası değerde olan örnekler Domates Kahverengi Buruşukluk Meyve Virüsü ile enfekteli olarak belirlenmiş ve sarı renk ile işaretlenmiştir.

Çizelge 4. 3. Tsunami 100 dezenfektanı uygulanan tohum kabuklarının DAS-ELISA absorbands değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.155	0.138	0.127	0.132	0.207	0.142	0.208	0.155	0.209	0.120	0.128	0.123
B	0.147	0.143	0.144	0.125	0.128	0.164	0.234	0.121	0.140	0.128	0.150	0.134
C	0.135	0.157	0.131	0.544	0.160	0.135	0.120	0.160	0.125	0.165	0.134	0.135
D	0.105	0.164	0.140	0.160	0.157	0.116	0.165	0.231	0.137	0.121	0.188	0.180
E	0.124	0.129	0.235	0.209	0.121	0.143	0.148	0.234	0.320	0.234	0.267	0.114
F	0.165	0.123	0.128	0.234	0.126	0.106	0.133	0.175	0.287	0.431	0.345	0.133
G	0.128	0.145	0.167	0.140	0.154	0.121	0.179	0.182	0.134	0.345	0.234	0.164
H	0.131	0.126	0.122	0.165	0.138	0.140	0.145	0.141	3.336	0.149	0.164	0.763

ELISA okuyucuda okunan 3.336 değeri pozitif kontroldür. 0.149 olan negatif kontrolün ve 0.164 olan buffer değerinin ortalamasının 2 katının pozitif olarak kabul edilmesi gerekmektedir. 0,313 değerinin üstündeki değerler pozitif olarak kabul edilmektedir. Böyle bir değer olmadığı için elde edilen platede pozitif kontrol dışında pozitif bir örnek bulunmamıştır. Bu durum da %100 kontaminasyonlu ToBRFV tohumlarında Tsunami 100 dezenfektanının başarısını ortaya koymaktadır.

Çizelge 4. 4. 254 nm UV uygulamasından sonra testlenen tohumların absorbands değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.167	0.122	0.138	0.139	0.141	0.135	0.169	0.207	0.155	0.159	0.131	0.143
B	0.158	0.172	0.155	0.145	0.157	0.151	0.165	0.146	0.457	0.139	0.124	0.128
C	0.142	0.164	0.525	0.129	0.142	0.167	0.160	0.134	0.135	0.135	0.136	0.145
D	0.140	0.142	0.142	0.155	0.141	0.168	0.170	0.164	0.138	0.132	0.160	0.165
E	0.142	0.179	0.155	0.143	0.123	0.793	0.141	0.141	0.142	0.134	0.209	0.116
F	0.140	0.151	0.144	0.132	0.132	0.154	0.148	0.129	0.176	0.121	0.157	0.124
G	0.448	0.149	0.659	0.136	0.125	0.105	0.126	0.180	0.187	0.127	0.171	0.140
H	0.147	0.146	0.151	0.129	0.143	0.136	0.128	0.135	3.543	0.138	0.187	0.122

ELISA readerda okunan 3.543 değeri pozitif kontroldür. 0.138 olan negatif kontrolün ve 0.187 olan buffer değerininin ortalamasının 2 katının pozitif olarak kabul edilmesi gerekmektedir. 0,325 değerinin üstündeki değerler pozitif olarak kabul edilmektedir. 0.448, 0.525, 0.793, 0.457 değerleri 0.325 değerinin üzerinde olduğu için pozitif olarak kabul edilmiştir. Pozitif kontrolümüzün dışında 4 tane daha pozitif örnek bulunmuştur. Bu sonuca göre 254 nm dalga boyunda UV uygulamasından sonra ToBRFV'nin %0.8 olan tohumda taşınma oranının %0.4'e düştüğü yapılan serolojik testlemelerle ortaya konulmuştur.



5. SONUÇLAR

Ülkemizde önemli yetiştiricilik alanı bulunan domates ve biberin en önemli sorunlarından biri olan *Tomato brown rugose fruit virus* hastalığı temasla taşınmasının yanı sıra tohumla da taşınabilmektedir. Virüsün tohumla taşınımı özellikle uzak mesafelere ulaşımı kolaylaştırmıştır.

Tohum, bitkisel üretimin temel taşı niteliğinde önemli bir değere sahiptir. Üretimde kullanılan tohumun kalitesi bitkinin gelişiminde ve veriminde olumlu derecede fark yaratmaktadır. Yeni ortaya çıkan bu virüsün tanınmasıyla ilgili sorunlar ortadan kalkmıştır. Son zamanlarda virüsün yayılmasını önlemek için yapılan çalışmalar ön plana çıkmaktadır. ToBRFV'nin dünya genelinde hastalık salgınlarına neden olan epidemiyolojik etkisinde en önemli kaynak etmenin tohumla taşınmasıdır. Bu durumda, virüsün tohum eradikasyonu ile ilgili çalışmalar son derece önemlidir, tamamlanan tez çalışmasında da eradikasyona yönelik yöntemler ortaya konulmuştur.

Çalışmadan elde edilen sonuçların değerlendirilmesi neticesinde;

- Tohum sektöründe hijyen en önemli unsur olarak karşımıza çıkmaktadır. Başlangıç materyalinin hastalıktan arı olması, düzenli kontroller yapılarak test edilmesi gerekmektedir. Temiz tohum kullanımı hem tohum üretici firmalar hem de çiftçiler için büyük ölçüde önem taşımaktadır.
- Bu çalışmanın ilk kısmında elde edilen bilgiler, ToBRFV'nin tohumlarda taşınma oranının yapılan RT-PCR sonuçlarına göre literatürle paralellik gösterdiği ve ortalama %0.8 olduğu belirlemiştir.
- Enfekteli tohum kabuğuna yüzey dezenfeksiyonu işlemi sırasında 30 dk %1 Tsunami 100, 30 dk %1 Biocon A, 20 dk %1 Desy clean, 30 dk %1 Bioxi , 20 dk %2 HCl, 3 saat %10 TSP uygulandığında tohum kabuğunu virüsten arındırmada kullanılan bu dezenfektanlar %100 başarılı bulunmuştur.
- Kabuğu çıkarılan tohumların endospermine 30 dk %1 Tsunami 100, 30 dk %1 Biocon A, 20 dk %1 Desy clean, 30 dk %1 Bioxi , 20 dk %2 HCl, 3 saat %10 TSP uygulanıp test edildiğinde endospermde %0.7 ve %0.9 oranında olan taşınmanın devam ettiği belirlemiştir. Ardından yapılan biyolojik testlemelerde de patojenitenin devam ettiği görülmüştür. Böylece tohum kabuğundaki virüsü eradike etmede başarılı olan dezenfektanların endospermdeki taşımalarda etkin olmadığı belirlenmiştir.
- Yüzey sterilizasyonda kimyasal uygulamaları oldukça başarılı bulunmuştur. Buradaki en büyük handikap kimyasalların çimlenme üzerindeki etkisidir. Bu tez çalışması kapsamında en etkili dezenfektanlar Tsunami 100, Biocon A, TSP ve HCl olarak bulunmuştur. Fakat HCl uygulamasından sonra yapılan çimlenme sonuçları %20 olarak bulunmuştur. Çimlenmeyi olumsuz etkilemesi üzerine çiftçilere ve üreticilere tavsiye edilen en etkili dezenfektanlar %96-%98 çimlenme oranları ile %1 Tsunami 100 ve %1 Bioan A olarak belirlenmiştir.
- TSP uygulamalarıyla yüzey sterilizasyonunu takiben endospermdeki taşımalar

için ısıtma işlem uygulamalarının arındırmada etkili olduğu belirlenmiştir. Bu iki işlemin uygulandığı tohumlarda yapılan RT-PCR çalışmaları ToBRFV etmenine %0,3 oranında ratlanmaktadır. Bu durum moleküler tekniklerin tespitte oldukça hassas olduğunu tekrar ön plana çıkarmıştır.

- Isıtma işlem uygulamalarında 20°C'den 72°C'ye kademeli olarak sıcaklık artışında 50 rpmde dönerek en az 3 gün kalan tohumlarda virüs % 0.3 oranında tespit edilmiştir fakat virüsün virulensliğini yitirdiği yapılan çalışmalarla saptanmıştır.
- Tozlanma işlemini takiben 28. gün embriyo kurtarma işlemi yapıldığında virüsün embriyoya geçtiği ile ilgili hipotezlerin olmasına rağmen etmenin embriyoda görülmediği, tohum kabuğu ve endospermde lokalize olduğu bu tez kapsamında tespit edilmiştir.
- ToBRFV enfekteli tohumlara 254 nm dalga boyundaki UV ışınları 30 dk boyunca uygulanmış, bu uygulamanın virüsü yarı yarıya oranla inaktif hale getirdiği belirlenmiştir. Bu tezde yapılan çalışmalar neticesinde UV-C'nin tohumda taşınan virüsleri eradike etmede %50 başarılı olduğu ve bu yöntemin geliştirilmesi gerektiği ortaya konmuştur. Yapılan çalışmada küçük tohum paketleri üzerinde UV'nin etkinliği ortaya çıkmıştır, bu uygulamaların daha da genişletilerek büyük makinelerde ve daha büyük hacimde tohumlarla denenmesi gerekmektedir. Bu uygulamalardan sonra tohumlar dikilip biyolojik testleme yapıldığında virüsün patojenitesini yitirmediği belirlenmiştir.
- Elde edilen bu sonuçlar, Türkiye'de ve dünya genelinde benzer konularda çalışma yürüten bilim insanları ile paylaşarak yeni projelerin üretilmesine katkı sağlanmalıdır.

6. KAYNAKLAR

- Adams, IP, Glover, RH, Monger, WA, Mumford, R., Jackeviciene, E., Navalinskiene, M. and Boonham, N. (2009). Yeni nesil sıralama ve metagenomik analiz: bitki virolojisinde evrensel bir teşhis aracı. *Moleküler bitki patolojisi*, 10 (4), 537-545.
- Afzal, I., Ur Rehman, H., Naveed, M., ve Basra, S. M. A. 2016. New Challenges in Seed Biology- Basic and Translational Research Driving Seed Technology. “Alınmıştır: Recent Advances in Seed Enhancements, (ed) Araujo, S., Balestrazzi A., InTech, Rijeka, Croatia, 47-74.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Elsevier.
- Albrechtsen, S. E. (2006). *Testing methods for seed-transmitted viruses: principles and protocols*. CABI.
- Atmaca, B., Akdemir Evrendilek, G., (2020). “Tohum Dezenfeksiyon Yöntemleri”, Tarım Makinaları Bilimi Dergisi, 16(3): 18-25.
- Aybak, H.Ç. ve Kaygısız, H., 2004. Domates, Hasad Yayıncılık Ltd. Şti., s.280. İstanbul
- Barampuram S, Allen G, Krasnyanski S (2014) Effect of various sterilization procedures on the in vitro germination of cotton seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 118(1): 179–185
- Bayraktar K (1953) Comparative studies on the characteristics and technological values of native and American tomato varieties cultivated in vegetable fields. Ankara University, Faculty of Agriculture 42, Ankara. Work document
- Bloch-Dano, E. (2012). *Sebzeler: Bir Biyografi*. Chicago Üniversitesi Yayınları.
- Bos, G., & Kartapradja, R. (1977). Tomato variety trials on Java [Indonesia] with emphasis on yield potential, adaptability to environment and tolerance to pest and diseases. *Bulletin Penelitian Hortikultura*.
- Broadbent, L. (1965). The epidemiology of tomato mosaic: XI. Seed-transmission of TMV. *Annals of Applied Biology*, 56(2), 177-205.
- Caicedo, A., & Peralta, I. (2013). Basic information about tomatoes and the tomato group. *Genetics, Genomics and Breeding of Tomato*, 1-36.
- Causse, M., Duffe, P., Gomez, M. C., Buret, M., Damidaux, R., Zamir, D. and Rothan, C. (2004). A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. *Journal of Experimental Botany*, 55(403), 1671-1685.
- Clark MF, Adams MJ. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*. 1977;34:475-483
- Chanda, B., Shamimuzzaman, M., Gilliard, A and Ling, K. S. (2021). Effectiveness of disinfectants against the spread of tobamoviruses: Tomato brown rugose fruit virus and Cucumber green mottle mosaic virus. *Virology Journal*, 18(1), 1-12.
- Chitambar, J. J., Westerdahl, B. B. and Subbotin, S. A. (2018). Plant parasitic nematodes in California agriculture. In *Plant parasitic nematodes in sustainable agriculture of North America* (pp. 131-192). Springer, Cham.

- Choi, G.-S., Kim, J.-H., Kim, J.-S. and Kim, H.-R. (2004). Tobamoviruses of green peppers growing on hydroponic systems. *Res. Plant Dis.* 10, 194–197.
- Conlon, L. E., King, R. D., Moran, N. E. and Erdman Jr, J. W. (2012). Coconut oil enhances tomato carotenoid tissue accumulation compared to safflower oil in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(34), 8386-8394.
- Cordoba-Selles, M. D. C., García-Rández, A., Alfaro-Fernández, A. and Jordá-Gutiérrez, C. (2007). Seed transmission of Pepino mosaic virus and efficacy of tomato seed disinfection treatments. *Plant Disease*, 91(10), 1250-1254.
- Davino, S., Caruso, AG, Bertacca, S., Barone, S. ve Panno, S. (2020). Domates kahverengi rugose meyve virüsü: Farklı tohum dezenfeksiyon uygulamalarının tohum bulaşma oranı ve etkinliği. *Bitkiler*, 9 (11), 1615.
- Dellaporta, Stephen L., Jonathan Wood ve James B. Hicks. "Bir bitki DNA minipreparasyonu: versiyon II." *Bitki moleküler biyoloji muhabiri* 1.4 (1983): 19- 21.
- Dombrovsky, A. and Smith, E. (2017). Seed transmission of Tobamoviruses: Aspects of global disease distribution. *Advances in seed biology*, 233-260.
- Domingo E, Holland JJ (1997) RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Review of Microbiology* 51: 151-78.
- Ellialtıoğlu, Ş., Abak, K. 1986. Domates Islahında Embriyo Kültüründen Yararlanma. *Bitki Islahı Sempozyumu*. 15-17 Ekim 1986, İzmir, s:42-52
- FAO, 2021. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (Son erişim: 18.03.2022)
- Fidan H, Sarıkaya P, Calis O, 2019. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* on tomato in Turkey. *New Disease Reports* 39, 18.
- Fidan, H. and Sarıkaya, P. (2020). Tomato chlorosis virus and Tomato yellow leaf curl virus Causing Mixed Infection In Protected Eggplant (*Solanum melongena*) crops in Turkey. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*, 19(5).
- Fraser, P. D., Enfissi, E. M. and Bramley, P. M. (2009). Genetic engineering of carotenoid formation in tomato fruit and the potential application of systems and synthetic biology approaches. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483(2), 196-204.
- Hacking, D., & Hull, J. (2002). Respiratory syncytial virus viral biology and the host response. *Journal of infection*, 45(1), 18-24.
- Heiser, CB (1973). İntrogresyon yeniden incelendi. *Botanik İnceleme* , 39 (4), 347-366.
- Kabaş, A., Fidan, H. and Demirelli, M. B. (2021). Identification of new sources of resistance to resistance-breaking isolates of tomato spotted wilt virus. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(5), 3094-3099.
- Kibar, B. Ultraviyole-C ve Ultrason Uygulamalarının Domates ve Hıyarda Fide Gelişimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi*, 6(3), 423-434.
- ISF, 2012, International Seed Federation. Method for The Detection of Infectious Tobamoviruses on tomato seed. <http://www.worldseed.org/cms/medias/file/TradeIssues/Phytosanitary>

- Matters/SeedHealthTesting/ISHI-Veg/Tomato_Tobamo_Sept_2013.pdf (Access Date: 05.02.2022).
- ISF, 2013, International Seed Federation. Method for The Detection of Infectious Tobamoviruses on pepper seed <https://www.seedtest.org/upload/cms/user/SH-07-028-2014.pdf> (Access Date: 05.02.2022).
- ISTA, 2007, International Seed Testing Association (ISTA), International Rules for Seed Testing. <http://www.seedtest.org/en/home.html> (Erişim tarihi: 24.02.2022).
- Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I. and Dombrovsky, A. (2017). A new Israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-22 resistance genes. *PLoS one*, 12(1), e0170429.
- McDonnell GE (2007) Antisepsis, disinfection, and sterilization : types, action, and resistance. ASM Press, Washington, D.C
- Madhusudhan, K. N., Nalini, M. S., Prakash, H. S. and Shetty, H. S. (2005). Effect of inducers against tobamovirus infection in tomato and bell pepper. *International Journal of botany*, 1(1), 59-61.
- Matsunaga, H., Saito, T., Hirai, M., Nunome, T. And Yoshida, T. (2003). DNA markers linked to Pepper mild mottle virus (PMMoV) resistant locus (L4) in Capsicum. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 72(3), 218-220.
- Maul, J. E., Buyer, J. S., Lehman, R. M., Culman, S., Blackwood, C. B., Roberts, D. P. and Teasdale, J. R. (2014). Microbial community structure and abundance in the rhizosphere and bulk soil of a tomato cropping system that includes cover crops. *Applied Soil Ecology*, 77, 42-50.
- Oraman, MN and Ağaoğlu, YS (1968). İç Anadolu'da yetiştirilen Stokesdale Stake domatesinin meyve ve yeşil bitki ağırlıkları üzerine dikim ve budamanın etkileri üzerine bir deney. *İç Anadolu'da yetiştirilen Stokesdale Stake domatesinin meyve ve yeşil bitki ağırlıkları üzerine dikim ve budamanın etkileri üzerine bir deney*.
- Ozaslan, M., Aytekin, T., Bas, B., Kilic, H., Afacan, I. D. and Dag, D. S. (2006). Virus diseases of cucurbits in Gaziantep, Turkey. *The Plant Pathology Journal*, 5(1), 24-27.
- Panyukov, Y. V., Nemykh, M. A., Dobrov, E. N. and Drachev, V. A., 2008, Surfactant-Induced Amorphous Aggregation of Tobacco Mosaic Virus Coat Protein: A Physical Methods Approach, *Macromol. Biosci.*, 8: 199- 209 pp.
- Rafikova, E. R., Panyukov, Y. V., Arutyunyan, A. M., Yahuzhinsky, L. S., Drachev, V. A. and Dobrov, E. N., 2004, Low Sodium Dodecyl Sulfate Concentrations Inhibit Tobacco Mosaic Virus Coat Protein Amorphous Aggregation and Change the Protein Stability, *Biohimia*, 69(12): 1683- 1690 pp.
- Rast, A. T. B. and Stijger, C. C. M. M. (1987). Disinfection of pepper seed infected with different strains of capsicum mosaic virus by trisodium phosphate and dry heat treatment. *Plant pathology*, 36(4), 583-588.
- Reingold, V., Lachman, O., Blaosov, E. and Dombrovsky, A. (2015). Seed disinfection treatments do not sufficiently eliminate the infectivity of Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) on cucurbit seeds. *Plant Pathology*, 64(2), 245-255.

- Runia, W. T. (1993, September). A review of possibilities for disinfection of recirculation water from soilless cultures. In IV International Symposium on Soil and Substrate Infestation and Disinfestation 382 (pp. 221-229).
- Salem, N. M., Sulaiman, A., Samarah, N., Turina, M. and Vallino, M. (2022). Localization and mechanical transmission of tomato brown rugose fruit virus in tomato seeds. *Plant Disease*, PDIS-11.
- Salem N, Mansour A, Ciuffo M, Falk BW, Turina M (2016) A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Arch Virol* 161:503–506. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2677-7>
- Sarangapani, C., Devi, R. Y., Thirumdas, R., Trimukhe, A. M., Deshmukh, R. R. and Annapure, U. S. (2017). Physico-chemical properties of low-pressure plasma treated black gram. *LWT-food Science and Technology*, 79, 102-110.
- Singh, VK, Singh, AK ve Kumar, A. (2017). PGPB aracılığıyla domates hastalık yönetimi: mevcut eğilimler ve gelecek perspektifi. *3 Biyoteknoloji* , 7 (4), 1-10.
- Spadaro, D. and Gullino, M. L. (2005). Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop protection*, 24(7), 601-613.
- Thirumdes vd. (2017). UV radyasyonu hazırlama: mahsul bitkilerinde abiyotik stres toleransı için doğal potansiyeli artırmanın bir yolu. *Çevresel ve Deneysel Botanik* , 138 , 57-66.
- TUIK, (2021) <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Bitkisel-Uretim-Istatistikleri-2021-37249> (Son erişim:17.03.2022)
- Yan, Z. Y., Ma, H. Y., Han, S. L., Geng, C., Tian, Y. P. and Li, X. D. (2019). First report of tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in China. *Plant Disease*, 103(11), 2973-2973.

7. EKLER

EK.1. Fosfat Tampon Çözeltisi

Tampon çözelti pH değişimlerini önlemeye yarayan kimyasal bazlı solüsyonlardır.

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

% 0.1 Mercaptoethanol eklenir.

EK. 2. Agaroz Jel Elektrophorez Yöntemi

1. Erlen içerisine 0,90 gram agaroz tartılarak üzerine 60 ml 1X TAE buffer ilave edilmiştir. Bu karışım fırında tamamen eriyip agaroz çözünene kadar mikro dalga fırında ısıtılmış, eriyen karışım totalde 100 ml olacak şekilde TAE tampon çözeltisi ile tamamlanmıştır.

2. Jel tankı hazırlanarak taraklar takılmış ve jel elektrophorez tankına dökülmüştür. Oda sıcaklığında bekletilen jel 10-20 dk süresince tamamen donduktan sonra, taraklar bufferın içinde çıkarılarak jel aparatı ile birlikte elektrophorez tankına yerleştirilmiştir.

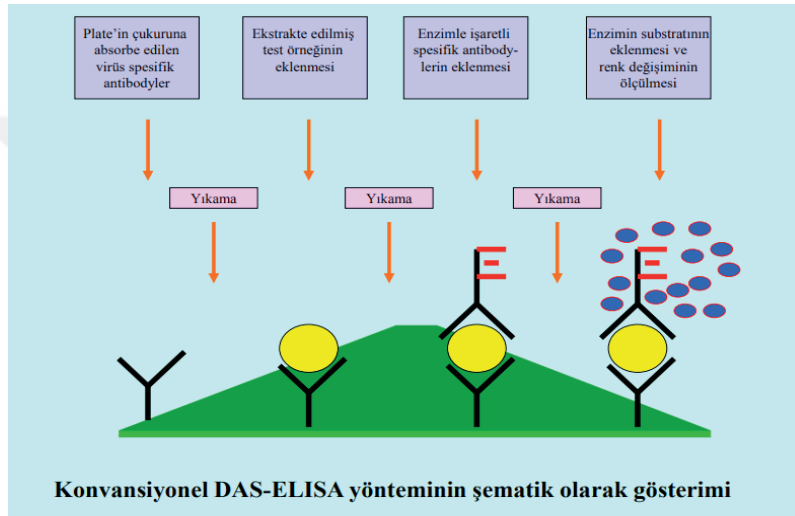
3. 1X TAE tamponu jelin üzerini 1-2 mm kaplayacak şekilde elektrophorez tankının içerisine doldurulmuştur. Örnekler 10 µl olacak şekilde jeldeki kuyucuklara

mikropipetler kullanılarak yerleştirilmiştir. Örnekler yerleştirildikten sonra 5 µl markır en sağdaki ve ortadaki kuyucuklara gelecek şekilde yerleştirilmiştir.

4. Tank kapağı kapatılarak elektroforez güç kaynağı açılmış 70-100 V elektrik ortamında jel koşulmuştur. Markırda yer alan mor bantın jelde en son 1 cm alan kalıncaya kadar ilerlemesi sağlanmış ve bu aşamada işleme son verilmiştir.

5. İşlemin sonunda tanktan alınan jel tehlikeli bir madde olan Ethidium bromide ile oda sıcaklığında boyanmış ve daha sonra UV ışık altında görüntülenmiştir.

EK. 3. DAS-ELISA Yönteminin Şematize Olarak Anlatımı



EK.4. ELISA testinde kullanılan tampon çözeltiler

Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate buffer saline-PBS) 1x, pH 7.4)

NaCl 8.0g, KCl 0.2g, NaN₃ 0.2g, H₂O 1 L, , KH₂PO₄ 0.2g, Na₂HPO₄ 1.15g

Yıkama Tampon Çözeltisi (Washing buffer-W.B, pH 7.4)

Tween-20 0.5ml, PBS1x 1L

Örnek Ezme Tampon Çözeltisi (Extraction buffer-E.B, pH 7.4)

Tween-20 0.5ml, PBS1x 1L, Polyvinilpirolidone 20.0g,

Kaplama Tampon Çözeltisi (Coating buffer-C.B, pH 9.6)

NaHCO₃ 2.93g , Na₂CO₃ 1.59g, , NaN₃ 0.20g, H₂O 1 L

Konjugate Tampon Çözeltisi (Conjugate buffer-Cj.B, pH 7.4)

Bovine serumalbumin 2.0g, PBS1x 1L, Polyvinilpirolidone 20.0g, Tween-20 0.5ml

Substrat Tampon Çözeltisi (Substrate buffer-S.B, pH 9.8)

NaN₃ 0.2g, Diethanolamine 97ml, H₂O 1 L

NOT: Yukarıda yer alan ölçülerin tamamı 1 litre saf suda hazırlanacak şekilde verilmiştir. Çözeltilerin pH'ları HCl veya 0,1 N NaOH kullanılarak ayarlanmıştır



ÖZGEÇMİŞ

Damla ULUSOY

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2019-2022	Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2015-2019	Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antalya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Ziraat Mühendisi	Anamas Tarım Ltd. Şti.
2022-Devam Ediyor	Laboratuvar Sorumlusu