



T.C.

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tomato spotted wilt virus BİBER İZOLATLARININ
POPÜLASYON ÇEŞİTLİĞİ VE BİBER
GENOTİPLERİNİN REASSORTANT İZOLATLARA
TEPKİSİ

SELİN CEREN BALSAK

DOKTORA TEZİ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2020

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tomato spotted wilt virus BİBER İZOLATLARININ
POPÜLASYON ÇEŞİTLİLİĞİ VE BİBER
GENOTİPLERİNİN REASSORTANT İZOLATLARA
TEPKİSİ

SELİN CEREN BALSAK

Bu tez,
Bitki Koruma Ana Bilim Dalında DOKTORA derecesi
için hazırlanmıştır

KAHRAMANMARAŞ 2020

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, alıntı yapılan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Selin Ceren BALSAK

Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

Proje No:

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

***Tomato spotted wilt virus* BİBER İZOLATLARININ POPÜLASYON ÇEŞİTLİLİĞİ
VE BİBER GENOTİPLERİNİN REASSORTANT İZOLATLARA TEPKİSİ
DOKTORA TEZİ
Selin Ceren BALSAK**

ÖZET

Orthotospovirus (*Tospoviridae*) cinsi üyesi olan *Tomato spotted wilt orthotospovirus* (TSWV), dünyada en yaygın ve çok sayıdaki bitki türünde (domates, biber, patates, yer fıstığı, marul, süs bitkileri vs) ekonomik zarara neden olan virüslerden biridir. Biberde (*Capsicum* spp.) TSWV enfeksiyonu sonucu konukçu genotipine bağlı olarak yaprak, gövde ve meyvede kloroz, nekroz ve halka leke simptomlarına neden olmaktadır. Virüsün şiddetli enfeksiyonları meyvelerin pazar değerinin düşmesine ve bitki ölümlerine yol açmaktadır. Açık alanda birçok trips türüyle (özellikle *Frankliniella occidentalis*) persistent-propagatif yolla taşınan TSWV'nin kontrolü geniş konukçu dizisine sahip olması ve vektörüyle etkili mücadelenin olmaması nedeniyle neredeyse olanaksızdır. Biber kültüründe *Capsicum chinense* hatlarındaki *Tsw* geni tarafından sağlanan monogenik dayanıklılık özelliği, virüse dayanıklı *C. annuum* çeşitleri elde etmek için ıslah çalışmalarında kullanılmıştır. Ancak son yıllarda *Tsw*-dayanıklılık geninin kırıldığı virüsün yaygın olduğu birçok ülkede bildirilmiştir. TSWV ile başarılı mücadele stratejisi için konukçudaki genetik dayanıklılık kaynaklarının kullanılması zorunludur. Yöntemin başarısı ise üretim alanlarında bulaşıklık yapan ve ekonomik kayıplara neden olan virüsün izolatlarının yapısının çok iyi bilinmesiyle mümkün olacaktır. Bu çalışmada, Mersin, Adana ve Kahramanmaraş illerindeki biber alanlarında ekonomik kayıplara neden olan TSWV'nin izolatlarının yapısı, orijinleri ve izolatlar arası ilişkinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Örtü altı ve açık biber üretim alanlarından elde edilen TSWV izolatlarının moleküler ve biyolojik karakterizasyonu yapılmış; izolatların genetik çeşitliliği ve popülasyon yapısı analiz edilmiştir. Reassortant izolatların bulunma durumu araştırılmış ve biber genotiplerinin belirlenen reassortant izolatlara reaksiyonları incelenmiştir. Türk TSWV-biber izolatlarının akrabalık ilişkilerinin ve coğrafi orijinlerinin belirlenmesi için, virüs genomunun L, M ve S RNA bölgelerinin kısmi dizinleri gen bankasında kayıtlı diğer TSWV izolatlarının dizinleriyle çoklu karşılaştırması yapılmıştır.

RdRp gen bölgesi dizinleriyle yapılan filogenetik analizinde izolatların genel olarak coğrafi orijinlerine göre gruplandığı görülmüştür. NSm gen bölgesine göre, Türk TSWV-

biber izolatları, İtalya (HQ830185.1) izolatıyla aynı kladda yer alarak diğer referans izolatlardan ayrı gruplanmıştır. Bazı izolatlar, N gen bölgesinin kısmi dizinlerinin analizine göre Fransa ve İspanya izolatlarıyla ayrı bir grup oluştururken bazılarının ise NSs bölgesine göre ABD, İspanya, Fransa ve Güney Kore izolatlarıyla ayrı bir grup oluşturduğu belirlenmiştir. DAS-ELISA testi sonucu TSWV'nin tekli enfeksiyonunu taşıyan 14 izolatın biyolojik klonları dayanıklı biber genotiplerine mekanik olarak taşınmış ve meydana getirdiği belirtiler gözlemlenmiştir. NSs gen bölgesinin 843 nt uzunluğundaki DNA dizisinden elde edilen 281 amino asit dizinleri karşılaştırıldığında *Tsw* dayanıklılığının kırılmasından sorumlu spesifik bir amino asit değişimi belirlenmemiştir. TSWV'nin genetik yapısını ve bu viral türde varyasyonu şekillendiren potansiyel faktörleri açıklamak için yapılan analizlerde, TSWV'nin gen bölgelerinin negatif seçilimin etkisinde olduğu fakat RdRp ve NSs gen bölgelerinde ise bazı amino asitlerin pozitif seçilim etkisinde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, biberdeki TSWV popülasyonunun şekillenmesinde rekombinasyon ve reassortment olaylarının etkili olduğu belirlenmiştir. Farklı biber genotiplerinin reassortant TSWV-biber izolatlarına karşı dayanıklılık sağlamadığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: TSWV, *Tsw*, popülasyon genetiği, reassortment, rekombinasyon

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nihal BUZKAN

Sayfa: 134

POPULATION DIVERSITY OF *Tomato spotted wilt virus* PEPPER ISOLATES AND RESPONSE OF PEPPER GENOTYPES TO REASSORTANT ISOLATES

PhD THESIS

Selin Ceren BALSAK

ABSTRACT

Tomato spotted wilt orthotospovirus (TSWV), the type member of the genus *Orthotospovirus* (*Tospoviridae*), is one of the most widespread and economically important plant viruses affecting many crops such as tomato, pepper, potato, tobacco, peanut, lettuce, bean, and ornamental species. In pepper (*Capsicum* spp.), symptoms caused by TSWV infection vary depending on host genotype and include stunting of the whole plant, chlorosis and necrosis of the new growth, apical downward leaf curling, mosaic or necrotic lesions on leaves, stems, and fruits. The disease can cause the death of the plant or drastically reduce the marketing value of fruits. Effective control of TSWV is difficult due to the wide host range of both the virus and thrips vectors, its transmissibility by several thrips species in persistent and circulative interaction of TSWV thrips, especially *Frankliniella occidentalis*. Concerning pepper, several *Capsicum chinense* lines possess monogenic resistances conferred by the *Tsw* gene and have been used to breed *C. annuum* cultivars resistant to TSWV. However, the breakdown of *Tsw*-resistance gene has been reported from many countries in where TSWV is widespread. The most efficient way to control the spread of TSWV is the use of genetic resistance available in plant hosts. For that reason, the nature of virus isolates infecting the agricultural areas and causing economic losses in production should be well known. This study, it was aimed to investigate the structure and origin of TSWV isolates, and to reveal the relationship between the isolates in three pepper growing locations; Mersin, Adana, Kahramanmaraş. Molecular and biological characterization of TSWV isolates from the greenhouse and the open field was done and their genetic diversity and population structure have been analyzed. Prevalance of reassortant isolates was studied while their and their interaction with pepper genotypes have been studied.

Partial nucleotide sequences of L, M, and S RNA segments of viral genome were used for multiple comparisons of Turkish and other TSWV isolates in GenBank to

determine the phylogenetic relationship and geographical origin of Turkish TSWV-pepper isolates.

They were grouped according to their geographical origin in the phylogenetic tree made with RdRp sequences. The Turkish TSWV-pepper isolates were in the same clad with the isolate in Italy (HQ830185.1) while grouped separately from other reference isolates based on the sequences of NSm region. According to the N gene region, the isolates formed a separate group with the isolates of France and Spain while some were grouped with the isolates of the USA, Spain, France, and South Korea according to the NSs gene region. Biological clones of fourteen individual TSWV isolates induced various symptoms in resistant pepper genotypes. There was no significant amino acid change responsible for *Tsw*-resistance breakdown according to aminoacid sequence encoded by NSs gene region of 843 nt (281 aa) in length. Based on the analysis to examine the genetic structure of TSWV and explain the potential factors that shape the variation in this viral species, it was determined that negative and positive selection were very efficient in the population structure of TSWV in peppers, as well as recombination and reassortment events. In the last part of the research, none of the pepper genotypes was found to carry resistance to reassortant TSWV-pepper isolates. Besides, the genotypes did not provide resistance to the reassortant TSWV-pepper isolates.

Key Words: TSWV, *Tsw*, population genetics, reassortment, recombination

University of Kahramanmaraş Sutcu Imam
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Nihal BUZKAN
Page Numbers: 134

TEŞEKKÜR

Lisansüstü öğrenimim boyunca bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen, hayatımda kalıcı izler bırakan değerli danışman hocam Prof.Dr. Nihal BUZKAN'a teşekkürlerimi sunarım. Doktora tez aşamamda zaman ve mekan gözetmeksizin bana yön gösteren, tecrübelerini paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Bülent Bekir ARPACI'ya, tez izleme komitesinde destek veren Doç. Dr. Mustafa KÜSEK'e, ayrıca tez savunmamda görüş ve katkılarından dolayı Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ ve Prof. Dr. Ahmet KORKMAZ'a teşekkür ederim.

Arazi çalışmalarında yardımcı olan Zir. Müh. Uğur Can BAKKAYLI'ya ve çalışmada bitkisel materyal desteği veren Hasel tarım ve Yüksel tohumculuk San ve Tic. A.Ş.'ye çok teşekkür ederim.

Son olarak da manevi desteklerini hiç esirgemeyen her daim yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
EKLER DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	6
2.1. TSWV'nin Morfolojisi ve Genom Yapısı	6
2.2. TSWV'nin Epidemiyolojisi	7
2.3. TSWV'nin Coğrafi Dağılımı ve Ekonomik Zararı	9
2.4. TSWV Mücadelesinde <i>Tsw</i> Geni Kullanılması	12
2.5. TSWV İzolatlarının Rekombinasyon ve Reassortment Özelliği ve Popülasyon Yapısı.....	17
3. MATERYAL ve METOT	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Bitkisel materyal toplanması.....	20
3.1.2. Double antibody sandwich-enzyme linked-immunosorbent assay (DAS-ELISA) testinde kullanılan antiserumlar	20
3.1.3. Mekanik inokulasyonda kullanılan test bitkileri	20
3.1.4. TSWV izolatlarının popülasyon yapısının belirlenmesinde kullanılan primerler.....	20
3.2. Metot.....	21
3.2.1. Simptom gözlemleri ve örnekleme çalışmaları	21
3.2.2. DAS-ELISA testi.....	22
3.2.3. TSWV izolatlarının saflaştırılması ve biyolojik karakterizasyonu	23
3.2.3.1. Test bitkilerinin yetiştirilmesi	23
3.2.3.2. Mekanik inokulasyon.....	24
3.2.3.3. TSWV izolatlarının biyolojik klonlarının ayrılması ve biyolojik karakterizasyonu	24
3.2.4. TSWV izolatlarının moleküler karakterizasyonu.....	25
3.2.4.1. Viral RNA izolasyonu	25

3.2.4.2. Tersine transkripsiyon (reverse transcription) ve tamamlayıcı DNA (complementary DNA, cDNA,) sentezi	26
3.2.4.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction, PCR)	26
3.2.4.4. Nükleotid dizin analizi	27
3.2.5. TSWV-biber izolatları popülasyonunun genetik yapısı	28
3.2.5.1. TSWV izolatlarının nükleotid çeşitliliği (P_i , π), mutasyon oranı (Θ_w) ve haplotip çeşitliliği (H_d)	28
3.2.5.2. dN/dS (ω) oranı	29
3.2.5.3. Nötralite (Neutrality) testleri	29
3.2.5.4. Popülasyon farklılığı testi	30
3.2.6. TSWV izolatlarının rekombinasyon ve/veya reassortment ilişkisinin belirlenmesi	30
3.2.7. Biber genotiplerinin reassortant TSWV izolatlarına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	32
4.1. Simptom Gözlemleri ve Örneklem Çalışmaları	32
4.2. TSWV Enfekteli Örneklerin Seçimi	35
4.3. TSWV İzolatlarının Otçu Konukçularda Çoğaltılması	37
4.4. Biyolojik Klonların Biyolojik Karakterizasyonu	39
4.5. NSs Gen Bölgesi Amino Asit Dizinlerinin Karşılaştırılması	50
4.6. TSWV İzolatlarının Filogenetik Analizi	51
4.7. Biber TSWV Popülasyonunun Genetik Yapısı	61
4.7.1. Nükleotid farklılığı (P_i , π), mutasyon oranı (Θ_w), haplotip çeşitliliği (H_d) ..	61
4.7.2. dN/dS (ω) oranının belirlenmesi	63
4.7.3. Nötralite testleri	69
4.7.4. Popülasyon farklılığı testi	69
4.8. Reassortant TSWV-Biber İzolatlarının Belirlenmesi	70
4.9. TSWV Reassortant Biber İzolatlarına Biber Genotiplerinin Dayanıklılık Reaksiyonlarının Belirlenmesi	76
5. TARTIŞMA ve ÖNERİLER	82
KAYNAKLAR	90
EKLER	105
ÖZ GEÇMİŞ	133

SİMGELER VE KISALTMALAR

A.B.D.	Amerika Birleşik Devletleri
aa	Amino asit
bç	Baz çifti
cDNA	complementary DNA (Tamamlayıcı DNA)
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
DIECA	Diethyldithiocarbamic Acid
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
dsRNA	Double-stranded RNA (Çift iplikli RNA)
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunossorbent assay
EtBr	Ethidium bromid
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FEL	Fixed Effects Likelihood
g	Gram
GRSV	<i>Groundnut ringspot virus</i>
HR	Hipersensitif reaksiyon
Kb	Kilo base
M	Molar
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MgCl₂	Magnezyum klorür
mL	Mililitre
mM	Milimolar
NaI	Sodyum iyodür

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NP	Nucleocapsid protein (Nükleokapsid protein)
NSm	Non-structural movement protein (yapısal olmayan hareket proteini)
NSs	Non-structural silencing supressor protein (yapısal olmayan susturmayı baskılayan protein)
nt	Nükleotid
OD	Optical density (Optikal yoğunluk)
ORF	Open Reading Frame (Açık okuma bölgesi)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
pH	Power of hydrogen
PVY	<i>Potato virus Y</i>
R	Resistance
RDP	Recombination Detection Program
RdRp	RNA-dependent-RNA polymerase
RNA	Ribonükleik asit
RT	Reverse transcription (Tersine Transkripsiyon)
SLAC	Single-Likelihood Ancestor Counting
sn	Saniye
ssRNA	Single-stranded RNA (Tek iplikli RNA)
TAE	Tris -Acetic Acid- Edta
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCSV	<i>Tomato chlorotic spot virus</i>
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
TNA	Toplam nükleik asit
TSWV	<i>Tomato spotted wilt orthospovirus</i>
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu

TYLCV *Tomato yellow leaf curl virus*

UV Ultraviole

V Volt

µl Mikrolitre



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. TSWV'nin morfolojik yapısı	6
Şekil 2.2. TSWV'nin genomik organizasyonu (L: büyük (large) RNA, RdRp: RNA-dependent-RNA polimeraz, M: orta (medium) RNA, NSm: yapısal olmayan protein, Gn/Gc: glikoproteinleri, S: küçük (small) RNA, NSs: yapısal olmayan protein, N: nükleokapsid proteini).....	7
Şekil 2.3. Domates (a,b), biber (c,d) ve yerbıstığı (e,f) bitkilerindeki TSWV belirtileri.....	10
Şekil 2.4. TSWV'nin yayılış alanı (https://www.eppo.int)	11
Şekil 3.1. Mekanik inokulasyon için yetiştirilen test bitkileri.....	24
Şekil 4.1. Biber (<i>C. annuum</i>) bitkilerinin yapraklarında gözlenen TSWV benzeri belirtiler: iç içe geçmiş dairesel lezyonlar (b, c, d, f), yapraklarda renk açılması, yaprak kıvrılması, yaprak deformasyonu, açık ve koyu yeşil çizgi belirtisi (a, b, e)	33
Şekil 4.2. Biber (<i>C. annuum</i>) bitkilerinin yapraklarında TSWV-benzeri belirtiler. Meyve deformasyonu ve iç içe geçmiş dairesel lezyonlar (a, b, d, f), nekrotik lekeler (c), meyvede çizgisel belirtisi oluşumu (d), sarı-kırmızı alan oluşumu (a, b, e, f)	34
Şekil 4.3. Testlenen örneklerde TSWV tanısı konmuş örneklerin illere göre dağılım oranları.....	36
Şekil 4.4. Biber örneklerinin TSWV, CMY, TMV ve PVY ile bulaşıklık durumu	36
Şekil 4.5. TSWV izolatlarının <i>N. benthamiana</i> bitkilerinde meydana getirdiği belirtiler: genel kloroz ve yaprak kıvrılması (a), mozaik lekeler (b), şiddetli kloroz ve bitki ölümü (c, d)	38
Şekil 4.6. TSWV izolatlarının enfekteli <i>N. tabacum</i> cv. Samsun NN bitkilerinde meydana getirdiği belirtiler: klorotik halka lekeler (a, b, c), damarlarda renk açılması (c), nekrotik halka lekeler (d).....	38
Şekil 4.7. TSWV izolatlarının <i>V. unguiculata</i> bitkilerinde neden olduğu lokal lezyonlar	39
Şekil 4.8. TRpep-47 izolatının biyolojik klonlarının <i>N. tabacum</i> cv. Samsun NN bitkilerinde meydana getirdiği belirtiler.....	40
Şekil 4.9. TRpep-67 izolatının biyolojik klonlarının <i>N. tabacum</i> cv. Samsun NN bitkilerinde meydana getirdiği belirtiler.....	41

Şekil 4.10. TRpep-67 izolatının biyolojik klonlarının <i>N. benthamiana</i> bitkilerinde meydana getirdiği simptomlar	41
Şekil 4.11. TRpep-146 izolatının biyolojik klonlarının <i>N. tabacum</i> cv. Samsun NN bitkilerinde meydana getirdiği simptomlar.....	42
Şekil 4.12. TRpep-150 izolatının biyolojik klonlarının <i>N. tabacum</i> cv. Samsun NN bitkilerinde meydana getirdiği simptomlar.....	43
Şekil 4.13. TRpep-154 izolatının bazı biyolojik klonlarının <i>N. tabacum</i> cv. Samsun NN bitkilerinde meydana getirdiği simptomlar.....	43
Şekil 4.14. TRpep-171 izolatının bazı biyolojik klonlarının <i>N. tabacum</i> cv. Samsun NN bitkilerinde meydana getirdiği simptomlar.....	44
Şekil 4.15. TRpep-209 izolatının bazı biyolojik klonlarının <i>N. tabacum</i> cv. Samsun NN bitkilerinde meydana getirdiği simptomlar.....	44
Şekil 4.16. TRpep-219 izolatının biyolojik klonlarının <i>N. tabacum</i> cv. Samsun NN bitkilerinde meydana getirdiği simptomlar.....	45
Şekil 4.17. Biyolojik klonların duyarlı biber (<i>C. annuum</i> cv. Naz F ₁) bitkilerinde meydana getirdiği simptomlar	47
Şekil 4.18. TRpep-209/3 klonunun PI 152225’de meydana getirdiği aşırı duyarlılık reaksiyonu.....	47
Şekil 4.19. Biyolojik TSWV klonlarının mekanik inokulasyonu sonucu <i>Tsw</i> geni taşıyan biber bitkilerinde (<i>C. annuum</i> ^{Tsw} , PI 152225) inokulasyon yapılan yapraklarda oluşan lokal nekrotik lezyonlar	48
Şekil 4.20. TRpep-67/2 ve TRpep-154/8 klonlarının mekanik inokulasyonu sonucu <i>Tsw</i> geni taşıyan (<i>C. annuum</i> ^{Tsw} , PI 152225) biber bitkilerinde meydana gelen kloroz, yaprak küçülmesi ve kıvrılması simptomları.....	48
Şekil 4.21. Biyolojik TSWV klonlarının mekanik inokulasyonu sonucu <i>Tsw</i> geni taşıyan (<i>C. annuum</i> ^{Tsw} , PI 152225) biber bitkilerinde meydana gelen sistemik enfeksiyon sonucu oluşan simptomlar	49
Şekil 4.22. TRpep-209/3 klonunun PI 152225 bitkisinin genç yapraklarında neden olduğu nekrotik lezyon	49
Şekil 4.23. TRpep-150/7, TRpep-47/17 ve TRpep-47/9 TSWV klonlarının mekanik inokulasyonu sonucu PI 152225 bitkilerindeki sistemik nekroz sonucu bitki ölümü.....	50
Şekil 4.24. TSWV biyolojik klonlarının 12. aa pozisyonundaki değişimin gösterilmesi.....	51

Şekil 4.25. TSWV biyolojik klonlarının 203. ve 273. aa pozisyonundaki değişimin gösterilmesi.....	51
Şekil 4.26. Türk TSWV-biber izolatlarıyla NCBI’da kayıtlı diğer TSWV izolatlarının RdRp gen bölgesine göre filogenetik analizi.....	54
Şekil 4.27. Türk TSWV-biber izolatlarıyla NCBI’da kayıtlı diğer TSWV izolatlarının M RNA segmentinin kodladığı NSm gen bölgesine göre filogenetik analizi	56
Şekil 4.28. Türk TSWV-biber izolatlarıyla NCBI’da kayıtlı diğer TSWV izolatlarının S RNA segmentinin kodladığı N gen bölgesine göre filogenetik analizi.....	58
Çizelge 4.6. S RNA segmentinin kodladığı NSs gen bölgesinin filogenetik analizinde kullanılan izolatlar	59
Şekil 4.29. Türk TSWV-biber izolatlarıyla NCBI’da kayıtlı diğer TSWV izolatlarının S RNA segmentinin kodladığı NSs gen bölgesine göre filogenetik analizi	60
Çizelge 4.7. Türk TSWV-biber izolatlarının L, M ve S RNA bölgelerinin genetik çeşitliliği ile ilgili istatistiki değerlendirme	61
Şekil 4.30. RdRp, NSm, N ve NSs gen bölgelerinin baz başına nükleotid çeşitliliği	62
Şekil 4.31. RdRp proteinin pozitif veya negatif seleksiyon altındaki kodon veya amino asit bölgeleri, SLAC analizi (www.datamonkey.org)	65
Şekil 4.32. NSm proteinin pozitif veya negatif seleksiyon altındaki kodon veya amino asit bölgeleri, SLAC analizi (www.datamonkey.org)	66
Şekil 4.33. N proteinin pozitif veya negatif seleksiyon altındaki kodon veya amino asit bölgeleri, SLAC analizi (www.datamonkey.org)	67
Şekil 4.34. NSs proteinin pozitif veya negatif seleksiyon altındaki kodon veya amino asit bölgeleri, SLAC analizi (www.datamonkey.org)	68
Şekil 4.35. İzolatların dizin karşılaştırması a: Genom bölgelerine ait filogenetik ağaç b: rekombinasyon veya kırılma noktalarının SimPlot programı kullanılarak Bootscan metoduyla gösterimi	72
Şekil 4.36. İzolatların dizin karşılaştırması a: Genom bölgelerine ait filogenetik ağaç b: rekombinasyon veya kırılma noktalarının SimPlot programı kullanılarak Bootscan metoduyla gösterimi	73
Şekil 4.37. Reassortant izolatların kırılma noktalarının gösterimi	74
Şekil 4.38. TSWV izolatlarının PM 815 Er Fu Tou genotipinde oluşturduğu simptomlar.....	77

Şekil 4.39. TSWV izolatlarının Maraş 19 genotipinde oluşturduğu simptomlar	78
Şekil 4.40. TSWV izolatlarının PI 439381 genotipinde oluşturduğu simptomlar.....	78
Şekil 4.41. TSWV izolatlarının Maraş 6 genotipinde oluşturduğu simptomlar	79
Şekil 4.42. TSWV izolatlarının PM 702/Criollo de Morelos 334 (CM334) genotipinde oluşturduğu simptomlar	80
Şekil 4.43. TSWV biyolojik klonlarının biber genotiplerine yapılan mekanik inokulasyon sonucu inokulasyon yapılmayan yaprakların DAS-ELISA ile testlenmesi sonucu elde edilen ortalama absorbans değerleri	81



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. TSWV genomunun L, M ve S RNA bölgelerini çoğaltan primer dizinleri	21
Çizelge 3.2. Biber örneklerinin toplandığı il/ilçeler ve örnek sayıları	22
Çizelge 3.3. TSWV genom organizasyonuna göre L, M, S RNA bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan PCR reaksiyon profili	27
Çizelge 3.4. Reassortant izolatların mekanik olarak taşındığı biber genotipleri	31
Çizelge 4.1. Tekli TSWV enfeksiyonu taşıyan örnek sayısı	37
Çizelge 4.2. TSWV izolatlarının biyolojik klonlarının virülensliği	46
Çizelge 4.3. L RNA segmentinin kodladığı RdRp gen bölgesinin filogenetik analizinde kullanılan izolatlar	52
Çizelge 4.4. M RNA segmentinin kodladığı NSm gen bölgesinin filogenetik analizinde kullanılan izolatlar	55
Çizelge 4.5. S RNA segmentinin kodladığı N gen bölgesinin filogenetik analizinde kullanılan izolatlar	57
Çizelge 4.8. Nötralite Testlerinin Değerleri	69
Çizelge 4.9. Coğrafi izolatlar arasındaki gene özgü popülasyon farklılığını belirlemek amacıyla yapılan istatistik testlerinin değerleri	70
Çizelge 4.10. TSWV-biber biyolojik klonları arasındaki rekombinasyon ilişkisinin RDP yazılım programında farklı metodlarla belirlenmesi	75

EKLER DİZİNİ

Sayfa No

Ek 1. L RNA segmentinin RdRp gen bölgesinde belirlenen haplotiplere ait nükleotid değişimleri	105
Ek 2. M RNA Segmentinin NSm gen bölgesinde belirlenen haplotiplere ait nükleotid değişimleri	110
Ek 3. S RNA Segmentinin N gen bölgesinde belirlenen haplotiplere ait nükleotid değişimleri	115
Ek 4. S RNA Segmentinin NSs gen bölgesinde belirlenen haplotiplere ait nükleotid değişimleri	120
Ek 5. ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler	126
Ek 6. 0.03 M Fosfat Tamponunun Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasallar (pH 7, 100 mL)	126
Ek 7. Biyolojik Klonların <i>C.annuum</i> (Naz F1), <i>C.annuum</i> ^{Tsw} ve PI 152225 (<i>C.chinense</i>) bitkilerinde meydana getirdiği belirtiler	127

1.GİRİŞ

Biber (*Capsicum* spp.) (acı veya tatlı biber) dünyada önemi sürekli artan baharat ve sebze türüdür (Gniffke ve ark., 2013). Anavatanı tropikal Orta ve Güney Amerika olan *Capsicum* cinsi, bitkiler aleminin en büyük familyası olan *Solanaceae* familyasının üyesidir (Hunziker, 2001). Bu cinste 41 tür bulunurken (Barboza ve ark., 2020), bunlardan sadece 5 türün (*Capsicum annuum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* L., *C. pubescens* Ruiz ve Pavón) kültürü yapılmaktadır. Bunlar içerisinde pazar taleplerine uygun meyve tipleri çeşitliliğiyle *Capsicum annuum*, ticari olarak en fazla yetiştirilen türdür (Wang ve Bosland, 2006). Dünyada 2018 yılında 1.776.334 ha alandan 4.164.594 ton/yıl kuru biber, 1.990.423 ha alandan 36.771.482 ton/yıl yaş biber üretimi yapılmıştır (FAO, erişim tarihi 01.06.2020). Türkiye, yaklaşık 2.625.669 ton (TÜİK, 2019. Erişim tarihi 01.06.2020) yıllık biber üretimiyle dünyada üçüncü sırada, Akdeniz havzasında bulunan diğer ülkeler içerisinde ise en önemli üretici durumunda bulunmaktadır.

Hastalık ve zararlılar, tüm dünyada biber yetiştiriciliğini önemli ölçüde sınırlamaktadır. Bazı bölgelerde hastalık ve zararlıların kontrolü için yapılan masraflar üretim girdilerinin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Son 30 yılda tropik ve subtropik bölgelerdeki biber üretim alanlarında enfeksiyon yapan virüs türleri sayısı ve yaygınlıkları dikkate değer düzeyde artış göstermiştir. Buna neden olan faktörler arasında, bu bölgelerde biber üretim alanlarının genişlemesiyle birlikte biber yetiştiriciliğinin yoğunluğunun artması, taze tüketim ürünlerinin ticaret hacminin ve hızının artmasıyla virüs ve vektör taşıyan ürünlerin yeni lokasyonlara taşınması ve iklim değişikliğinin virüs ve vektörleri için uygun coğrafya aralığını genişletmesi sayılabilmektedir. Farklı virüs türlerinin artan yaygınlıkları, aynı bitki üzerinde iki veya daha fazla virüs türünün birlikte enfeksiyon yapma riskini de arttırmaktadır. Virüs türleri arasındaki sinerjik ilişkiden kaynaklı semptom şiddetinin artması ve konukçu dayanıklılığının zayıflaması yanında, genetik rekombinasyon ve genom parçalarının birbirleri arasındaki değişimi de virüs türlerinin saldırganlığının ve vektörle taşınabilirliğinin artışına da neden olmaktadır.

Dünyada biber yetiştiriciliğini sınırlayan önemli faktörler arasında viral hastalıklar yer almaktadır (Martelli ve Quacquarelli, 1983; Yoon ve ark., 1989; Florini ve Zitter, 1987; Green ve Kim, 1991). Biberde 70'den fazla virüsün enfeksiyon yaptığı rapor edilirken (Kenyon ve ark., 2014), Akdeniz havzasında 15 farklı taksonomik grupta yer alan

20 kadar virüs türünün biber yetiştiriciliğinde ekonomik olarak zarar meydana getirdiği bildirilmiştir (Moury ve Verdin, 2012).

Bu virüsler içerisinde en önemli olanları tohumla taşınan tobamovirüsler, *Potyvirus* üyesi olan ve yaprak bitleriyle taşınan *Potato virus Y* (PVY) ve *Tobacco etch virus* (TEV), *Cucumovirus* cinsinde yer alan *Cucumber mosaic virus* (CMV) ve tripsle taşınan tospovirüslerdir (Moury ve Verdin, 2012). Mekanik olarak taşınan tobamovirüsler örtü altı yetiştiricilik alanlarında, vektör böcekle taşınan potyvirüsler, cucumovirüsler ve tospovirüsler açık alanlarda daha yaygındır. Bu havzada ortaya çıkan en önemli virüs, *Tomato spotted wilt orthospovirus* (TSWV)'dur. TSWV, *Tospoviridae* familyası içindeki tek bitki virüs grubu olan *Orthospovirus* cinsinin temsilci üyesidir. TSWV, uzun yıllar bu cinste bilinen tek virüs olurken, 1990'lı yıllardan itibaren virüsün erken semptomlarına dayalı yapılan teşhisler aslında başka orhotospovirüslerin de olduğunu göstermiştir. Buna rağmen TSWV, tospovirüsler içerisinde dünyada en yaygın olanıdır. Yirminci yüzyılın başında ilk kez rapor edilmesinden sonra (Brittlebank, 1919; Samuel ve ark., 1930), TSWV'nin yayılışında 1940-1980 yılları arasında düşüş izlenirken, TSWV'nin tüm dünyada yeniden yayılması 1980'den itibaren Kuzey Amerika'da, 1987'de Batı Avrupa'da ve 1993'de Avustralya'da başlamıştır (Allen ve Broadbent, 1986; Greenough ve ark., 1985; Dietzgen ve ark., 2005; Kirk ve Terry, 2003). Dünyadaki en önemli bitki virüsleri listesinde ikinci sırada yer alan TSWV'nin yıllık 1 milyar dolardan fazla zarara neden olduğu bildirilmiştir (Adkins, 2000; Scholthof ve ark., 2011).

TSWV'nin konukçu dizisi içerisinde yabancı otlar, süs bitkileri, biber ve domates gibi bahçe bitkilerinin de yer aldığı 1000'den fazla bitki türü bulunmaktadır (Parella ve ark., 2003; Persley ve ark., 2006; Pappu ve ark., 2009; Hanssen ve ark., 2010). TSWV genel olarak konukçularında kloroz, nekroz, halka leke, bodurluk, yaprak, gövde ve meyvelerde çizgi, halkalı leke gibi belirtilere neden olmaktadır. Özellikle olgun meyvelerde meydana getirdiği klorotik ve nekrotik halka lekeler meyvenin pazar değerini düşürmektedir (German ve ark., 1992; Mumfod ve ark., 1996; Chiemsombat ve Adkins, 2006). Türkiye'de TSWV enfeksiyonu ilk kez Tekinel ve ark. (1969) tarafından marulda tanılanırken, daha sonra tütün (Azeri, 1981), domates (Tekinel, 1973; Azeri, 1994; Arlı-Sökmen ve ark., 2005; 2006), biber (Yurtmen, 1998; Arlı-Sökmen ve ark., 2005; Deligöz ve ark., 2014; Bozdoğan ve Kamberoğlu, 2015; Keleş-Öztürk ve Baloğlu, 2019; Güneş ve Gümüş, 2019), kabak (Yardımcı ve Çulal-Kılıç, 2009), patlıcan (Kamberoğlu ve ark.,

2009), ıspanak (Sertkaya, 2015) ve *Anthurium* sp. (Fidan ve ark., 2016) bitkilerinde de rapor edilmiştir.

Virüs, doğal olarak *Frankliniella* ve *Thrips* türleriyle (*Thysanoptera: Thripidae*) persistent ve propagatif yolla taşınmaktadır (Ullman ve ark., 1993; Prins ve Goldbach, 1998). Tohumla taşınmayan TSWV'nin üretim alanlarında yayılmasında enfekteli yabancı ot türleri virüs kaynağı olarak önemli rol oynar (Reddy ve Wightman, 1988). Virüs kaynakları vektör böceklerin konukçuları oldukları zaman, TSWV'nin yayılmasında ilk odakları oluşturmaktadır (Duffus, 1971; Thresh, 1981). Tospovirüslerin yayılımını engellemek amacıyla üretim alanındaki yabancı ot mücadelesi, trips popülasyon takibi amacıyla mavi veya sarı yapışkan tuzak kullanımı, üretim alanındaki bitki kontrolünün sürekli yapılması ve enfekteli bitkilerin üretim alanından uzaklaştırılması gibi önlemler virüsün yayılmasını kısmen önlemektedir. Fakat, tospovirüslerin geniş konukçu dizinine sahip olması, hastalığın kontrolünü zorlaştırmaktadır (Matteson ve Terry, 1992; Roditakis ve ark, 2001). Ayrıca, TSWV'nin taşınmasında önemli rolü olan tripslerin, yumurtasını bitki dokusunun içerisine bırakması, toprakta pupa olması, larva ve erginlerinin çiçeklerin içinde bulunmasından dolayı mücadeleleri oldukça güçtür (Robb ve Parella, 1995). Geniş konukçu dizinine sahip olan tripslerin döl sayılarının fazla olması ve bazı kimyasallara direnç geliştirmiş olması bu zararlıya karşı yapılan kimyasal mücadeleyi etkisiz kılmaktadır (Espinosa ve ark., 2002; Dağlı ve Tunç, 2006). TSWV'nin geniş konukçu dizisine sahip olması, izolatlarının popülasyon yapısının çeşitliliği ve vektörleriyle etkili şekilde taşınması nedeniyle, koruyucu yollarla mücadelesi olanaksızdır.

Virüsün yayılmasını kontrol etmek için en etkili mücadele yöntemi, konukçuda virüse karşı mevcut genetik dayanıklılık kaynağının kullanılmasıdır. *Solanum peruvianum*'da *Sw-5*, *Capsicum chinense* Jacq.'de *Tsw* genleri TSWV dayanıklılığı kazandıran baskın genlerdir (Pappu ve ark., 2009). *Tsw* geni birçok ticari çeşide ıslah yoluyla aktarılmış ve etmene dayanıklı birçok biber çeşidinin geliştirilmesini sağlamıştır. Bugüne kadar *C. chinense*'de bulunan *Tsw* lokusunda farklı bir dayanıklılık alleli (Boiteux, 1995) ya da *Capsicum* spp. türlerinde bir başka dayanıklılık lokusu (Boiteux, 1995; Moury ve ark., 1997) bulunmamıştır. Dayanıklı bitkilerde virüs enfeksiyonları sonrasında aşırı duyarlılık (hypersensitivity, HR) reaksiyonu meydana gelmekte ve lokal nekrotik lezyonlar oluşmaktadır.

Ancak son yıllarda *Tsw*-dayanıklılık geninin kırıldığı rapor edilmektedir. Bunun nedenleri arasında konukçunun erken dönemde (2-4 gerçek yapraklı dönem) virüsle

enfektelenmesi ve gelişme dönemleri süresince yüksek sıcaklıklara (28-33 °C) maruz kalması (Moury ve ark., 1998; Soler ve ark., 1998; 1999) ve en önemlisi TSWV'nin farklı coğrafyalara adaptasyonu nedeniyle dayanıklılığı kıran yeni izolatların ortaya çıkması yer almaktadır (Tsompana ve ark., 2005; López ve ark., 2011; Tentchev ve ark., 2011). Bu durum biber tarımında büyük ekonomik kayıplara neden olurken, acil yeni dayanıklılık kaynaklarının belirlenmesi ihtiyacı doğmuştur.

Virüs genomu sırasıyla “large” (L), “medium” (M), “small” (S) olarak isimlendirilen tek iplikli üç parçalı RNA segmentinden meydana gelmiştir (Whitfield ve ark., 2005). TSWV'nin üç parçalı genom yapısı, aynı bitki üzerinde virüsün izolatlarının çoklu enfeksiyonlarında RNA segmentlerinin tamamının birbirleri arasında değiştirmek suretiyle yeni varyantlarının meydana gelmesine neden olmaktadır. TSWV'nin popülasyon çeşitliliği üzerine yapılan araştırmalarda, izolatlar arası akrabalık ilişkileri ve orijinleri bakımından çok sayıda grupların oluştuğu gözlenmektedir. Virüsün çok sayıda coğrafi olarak birbirinden çok uzak izolatları, TSWV'nin uzak coğrafyalara taşınması ve adaptasyonunda reassortment ve rekombinasyon mekanizmasının etkili olduğunu göstermektedir (Tentchev ve ark., 2011; Lian ve ark., 2013). Patojenlerin ortaya çıkması, yeni konukçulara genetik adaptasyonu ve sonraki yayılımı konukçu popülasyonlarında varlığını sürdürmesiyle gerçekleşir. Patojenlerin ortaya çıkmasında rol oynayan evrimsel süreçlerin ve dışsal ekolojik faktörlerin her birinin rolünün anlaşılması için dayanıklılık kırılması çalışmaları, patojen popülasyonlarının genetik analizleriyle birlikte yürütülmesi zorunludur.

TSWV ile mücadelede sürdürülebilir dayanıklılık için kullanılacak en etkili yöntem, konukçuda genetik dayanıklılık kaynaklarının belirlenmesidir. Bu nedenle öncelikle, lokasyona özgü izolat ve/veya reassortantların karakterize edilmesi ve *Tsw* geni dışında farklı dayanıklılık gen kaynaklarının belirlenmesi gereklidir.

Türkiye'de, reassortant (yeni tasnif edilmiş) izolatların varlığı bilinmemektedir. Türkiye'de *Capsicum* spp. türlerindeki TSWV izolatlarının orijinleri, virülanslıkları ve çoğunlukla virüse dayanıklılık geni içeren biber konukçularındaki dayanıklılık genleriyle olan ilişkileri incelenmemiştir. Tarım alanlarında TSWV izolatlarının tüm dünyada olduğu gibi reassortment ve/veya rekombinasyon gibi süreçten geçmiş olma ihtimali olmasına karşın, virüs izolatlarının kendi aralarındaki rekombinasyon ve reassortment potansiyelleri bilinmemektedir. Yapılan araştırmada bu sorulara karşılık bulmak amacıyla

Kahramanmaraş, Mersin ve Adana’da örtü altı ve açıktaki biber alanlarından elde edilen TSWV izolatlarının;

- i. moleküler ve biyolojik özelliklerinin incelenmesi,
- ii. genetik çeşitliliğinin ve popülasyon yapısının incelenmesi,
- iii. izolatlar arası reassortment ve/veya rekombinasyon ilişkisinin belirlenmesi,
- iv. olası reassortant izolatlara, bazı biber genotiplerinin reaksiyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

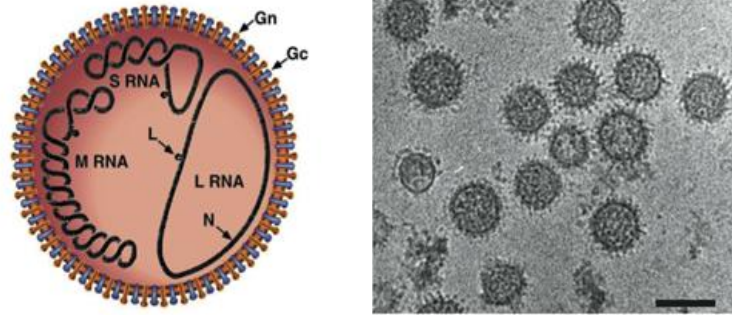


2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. TSWV'nin Morfolojisi ve Genom Yapısı

Orthospovirus şu ana kadar *Tospoviridae* familyasında sınıflandırılan tek cinstir ve 26 virüs türünden oluşur. TSWV, *Orthospovirus* cinsini temsil eden üyesidir (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Bu cinste yer alan virüsler bitki ve böcekleri enfektelemesinin yanı sıra her iki konukçusunda da çoğalma yeteneğine sahiptirler. Bu cins *Bunyavirales* sınıfında bitki patojeni tek cins olma özelliğine sahiptir ancak son zamanlarda farklı familyalarda yer alan bitki patojeni 3 farklı cins (*Tenuivirus*, *Emaravirus* ve *Coguvirus*) daha bildirilmiştir (Pappu ve ark., 2020).

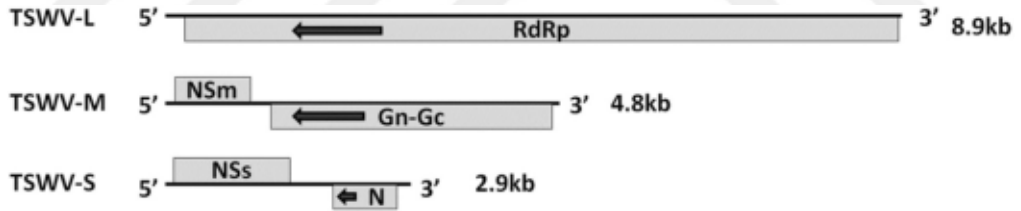
TSWV partikülleri çift katlı lipit membranla çevrili olup, 80-120 nm çapında pleomorfik şekillidir (Şekil 2.1). Virionları, %5 nükleik asit, %70 protein, %20 lipit ve %5 karbonhidrat içermektedir (Adkins 2000; Chen ve ark., 2016).



Şekil 2.1. TSWV'nin morfolojik yapısı (<https://talk.ictvonline.org>)

Virüs genomu bir negatif ve iki ambisense (iki yönlü) duyarlılıkta üç parçalı, tek iplikli RNA (single stranded RNA, ssRNA)'dan oluşmaktadır. RNA parçaları moleküler büyüklüklerine göre sırasıyla büyük (Large: L, 8.9 kb), orta (Medium: M, 4.8 kb) ve küçük (Small: S, 2.9 kb) olarak isimlendirilir (Şekil 2.2) (Goldbach ve Peters, 1996; Cortez ve ark., 2001). Negatif duyarlılığa sahip L RNA, virüs replikasyonunda önemli rol oynayan RNA'ya bağlı RNA polimeraz (RNA-dependent-RNA polymerase, RdRp) kodlamaktadır (de Haan ve ark., 1991). M ve S RNA'ları iki yönde de kodlama yapmaktadır. M RNA, virüsün hücreden hücreye taşınmasını sağlayan yapısal olmayan hareket proteini (Non-structural movement: NSm) (Li ve ark., 2009) ve virüsün vektörüyle taşınmasıyla ilgili iki glikoproteini (Gn/Gc) kodlamaktadır (Sin ve ark., 2005; Naidu ve ark., 2008).

NSm, plasmodesmaya yakın hücre içi lokalizasyonu, plasmodesma modifikasyonu (Prins ve ark., 1997; Storms ve ark., 1998), RNA'ya bağlanma (Soellick ve ark., 2000) ve virüsün hareketini sınırlandıran hücre duvarı ve sitoplazmik membranın yapısını değiştirme (Kormelink ve ark., 1994; Storms ve ark., 1995) gibi bitki virüsü hareket proteinlerinin (movement protein, MP) tipik özelliklerine sahiptir. Gn, virüs bağlanmasında ve tripslerin orta bağırsak hücrelerine girişinde, Gc ise pH'ya bağlı virüs girişinde füzyon proteini olarak rol oynamaktadır (Bandla ve ark., 1998; Medeiros ve ark., 2000; Pappu ve ark., 2020). Glikoproteinlerin, trips proteinleriyle etkileşime girmesi, zarfsız mutantların tripsle taşınma özelliklerini yitirmesi ve tripsle taşınabilen izolatların M RNA reassortantlarının da bu özelliğe sahip olmasının belirlenmesiyle, bu proteinlerin tripslerle taşınmada gerekli olduğu anlaşılmıştır (Nagata ve ark., 2000; Sin ve ark., 2005). S RNA ise yapısal olmayan susturmayı baskılayan protein (non-structural silencing supressor, NSs) (Takede ve ark., 2002) ve nükleokapsid protein (nucleocapsid, NP)'i kodlamaktadır (de Haan ve ark., 1991; Pappu ve ark., 2009). Aynı segment üzerinde iki yönde kodlama stratejisi yapan dizinler, birbirleriyle genler arası bölge (intergenic region, IGR) ile ayrılmıştır (Goldbach ve Peters, 1996) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. TSWV'nin genomik organizasyonu (L: büyük (large) RNA, RdRp: RNA-dependent-RNA polimeraz, M: orta (medium) RNA, NSm: yapısal olmayan protein, Gn/Gc: glikoproteinleri, S: küçük (small) RNA, NSs: yapısal olmayan protein, N: nükleokapsid proteini)

2.2. TSWV'nin Epidemiyolojisi

Orthospovirüslerin bilinen vektörleri *Thripidae* familyasında yer almaktadır ve bu familyada yaklaşık 1710 trips türü bulunmaktadır (Riley ve ark., 2011). Türkiye'de ise *Thysanoptera* takımına ait 193 tür belirlenmiş olup, 66'sı *Thripidae* familyasına aittir (Tunç ve Hastenpflug-Vesmanis, 2016). Tripslerin mevcut tür sayısı, geniş konukçu dizisine sahip olması ve farklı coğrafi bölgelerde yaygın görülmesine rağmen, TSWV'nin sadece 9 türle persistent-propagatif yolla taşındığı bilinmektedir:

Thrips tabaci Lindeman (Wijkamp ve ark., 1995), *T. setosus* Moulton (Tsuda ve ark., 1996), *Frankliniella occidentalis* Pergande (Wijkamp ve ark., 1995; Medeiros ve ark., 2004), *F. schultzei* Trybom (Wijkamp ve ark., 1995), *F. fusca* Hinds (Naidu ve ark., 2001), *F. bispinosa* Morgan (Avila ve ark., 2006), *F. intonsa* Trybom (Wijkamp ve ark., 1995), *F. cephalica* Crawford (Ohnishi ve ark., 2006) ve *F. gemina* Bagnall (de Borbón ve ark., 1999). Bunlar içerisinde virüsün taşınmasında en etkili olanı *F. occidentalis* Pergande'tir (Jones, 2005; Whitfield ve ark., 2005; Persley ve ark., 2006).

Vektör, larva ve ergin dönemlerinde aktif olarak konukçuda beslenir. Birinci larva dönemi virüs kazanımının en etkin olduğu dönemdir ve virüs kazanımı vektör geliştikçe azalır. Larvada viral enfeksiyon orta bağırsakta başlar, çoğaldıktan sonra orta bağırsak boyunca yayılır ve daha sonra orta bağırsağı çevreleyen kas hücrelerini ve tükürük bezlerini enfekte eder. Fakat, ergin bireylerin orta bağırsağının epitel hücrelerindeki farklılaşma nedeniyle virüsün tükürük bezlerine geçişi gerçekleşemez. Bu nedenle tripslerin ergin dönemlerinde virüs kazanımı yoktur. Prepupa ve pupa dönemlerinde bitkide beslenme olmadığından virüs kazanımı ve taşınması gerçekleşmez. Ergin dönemdeki tripsler kanatlı ve oldukça hareketli olduklarından en çok bu dönemde virüs taşınır (Rotenberg ve ark., 2015). Ayrıca, orthospovirüslerde transovarial taşınma görülmez (Whitfield ve ark., 2005; Riley ve ark., 2011). Virüsün vektörüyle taşınma etkinliği larva dönemindeki tripsin TSWV enfekteli konukçu bitkiden kazanmış olduğu virüs miktarı ve bireysel olarak böceklerdeki virüs titrasyonu ile yakın ilişkilidir (Montero-Astua ve ark., 2014). Vektör trips türlerinin etkili virüs vektörü ve zararlı olmasının nedenleri olarak çok sayıda döl vermesi, kısa jenerasyon süresi, hızlı hareket etmeleri, saklı alanları tercih etmeleri ve polifag olmaları gösterilmektedir (Rotenberg ve ark., 2015).

Mekanik olarak kolaylıkla taşınan TSWV'nin tohumla taşınmadığı bildirilmektedir. Çok sayıda yabancı ot türü virüse konukçuluk ederken (Chatzivassiliou ve ark., 2007) TSWV'nin yayılmasındaki etkinlikleri kesinlik kazanmamıştır. Ancak bazı yabancı ot türlerinin tripslere de konukçuluk yapması nedeniyle, vektör tripslerle TSWV'nin yayılmasında başlangıç enfeksiyon kaynağı olarak önemli rol oynamaktadırlar (Reddy ve Wightman, 1988).

2.3. TSWV'nin Coğrafi Dağılımı ve Ekonomik Zararı

TSWV, en zararlı 10 bitki virüsü arasında ikinci sırada gelmektedir (Scholthof ve ark., 2011). Virüs başta yabancı otlar, tütün (*Nicotiana tabacum*), biber (*C. annuum*), domates (*Solanum lycopersicum*), marul (*Lactuca sativa*), patates (*Solanum tuberosum*), yerfıstığı (*Arachis hypogaea*), bezelye (*Pisum sativum*), kereviz (*Apium graveolens*) olmak üzere 1090'dan fazla konukçu dizisine sahiptir (Parrella ve ark., 2003; Pappu ve ark., 2009; Hanssen ve ark., 201; Salamon ve ark., 2012; Li ve ark., 2015).

TSWV'nin meydana getirdiği belirtiler konukçu bitki türü ve çeşidine, enfeksiyonun gerçekleştiği çevre şartlarına, konukçu bitkinin içinde bulunduğu gelişme dönemine ve virüsün ırkına bağlı olarak farklılık göstermektedir (Soler ve ark., 1998; Mandal ve ark., 2006; Díaz-Pérez ve ark., 2007). Virüs konukçularında genel olarak yapraklarda lokal klorotik ve nekrotik lekeler, halka lekeler, nekrotik çizgiler, klorotik çizgiler, beneklenme, bitkide bodurlaşma, solgunluk ve sürgün ucu kurumması gibi belirtilere neden olmaktadır (Şekil 2.3) (Koike ve ark., 2007; Moury ve Verdin, 2012). Biberde (*C. annuum*) konukçu genotipine bağlı olarak yaprak, gövde ve meyvelerde mozaik veya nekrotik lezyon, bitkide bodurlaşma, yeni sürgünlerde kloroz ve nekroz, tepe yapraklarında aşağıya doğru kıvrılma gibi belirtiler meydana getirmektedir (Şekil 2.3). Virüsün şiddetli enfeksiyonlarında bitki ölümleri veya ürün pazar değerinin büyük ölçüde düşmesine neden olur (Boiteux, 1995; Soler ve ark., 1998; Moury ve Verdin, 2012).

TSWV'nin varlığı ilk kez 1915 yılında Avustralya'nın Victoria eyaletinde, Yeni Zelanda'da ise 1934 yılında domates bitkilerinde tespit edilmiştir (Brittlebank, 1919; Adkins, 2000). Taşınmasında etkili vektör olan *F. occidentalis*'in 1993 yılında gelişile, kıtanın diğer bölgelerine yayılarak epidemilere neden olmuştur (Malipatil ve ark., 1993; Latham ve Jones, 1997). Bununla birlikte, 1895 yılında Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde Ohio şehrinde domateste, 1905 yılında Cape Town'daki tütün bitkilerinde benzer belirtiler gözlenmiş ve bilinmeyen hastalık olarak rapor edilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda TSWV'nin farklı konukçularda uzun süredir varlığını sürdürdüğünü ve orijininin belirsiz olduğu belirtilmektedir (Peters, 1998). Avrupa'da TSWV ilk kez Birleşik Krallık'ta 1929 yılında süs bitkisi olan *Solanum pseudocapsicum*'da tespit edilmiş olup, daha sonra domates, biber, tütün ve özellikle güney Avrupa'da süs bitkilerinde ciddi zararlara neden olmuştur (Smith, 1932; Kazinczi ve ark., 2007).

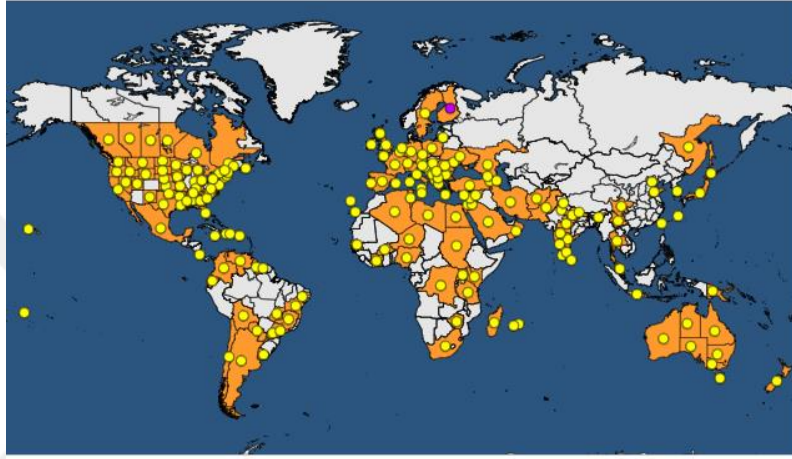
TSWV'nin yayılmasında 1940 ve 1980'li yıllar arasında büyük bir düşüş izlenirken, 1980'li yıllardan sonra Kuzey Amerika'da, 1987 yılında Batı Avrupa'da, 1993 yılında Avustralya'da ve daha birçok yerde hızla yayılmaya başlamıştır (Allen ve Broadbent, 1986; Dietzgen ve ark., 2005; Kirk ve Terry, 2003).



Şekil 2.3. Domates (a,b), biber (c,d) ve yerfıstığı (e,f) bitkilerindeki TSWV belirtileri (a,b: <https://plantpath.ifas.ufl.edu/>; c,d: <https://plantpath.ifas.ufl.edu/>; e,f: <http://nwdistrict.ifas.ufl.edu/>)

Batı Avrupa'da TSWV epidemisi 1980'lerin sonunda Fransa, İtalya, Portekiz ve İspanya gibi ülkelerin süs bitkileri ve sebze endüstrisinde ciddi kayıplara neden olmuştur (Smith, 1957; Peters ve ark., 1996; Pappu ve ark., 2009). TSWV'nin 1987 yılında İspanya'da ortaya çıkmasıyla biber, domates ve kavun üretimi önemli düzeyde düşmüştür

(Cebolla-Cornejo ve ark., 2007). Virüs batı ülkelerinde (Batı Avrupa ve ABD) yaygın durumdayken kademeli olarak ılıman, subtropik ve tropik bölgelere doğru yayılmıştır (Mateus ve ark., 2012). Virüs Ortadoğu ve Asya'da Uzakdoğu ülkelerinde (İran, Japonya, Çin, Güney Kore) de rapor edilmiştir (Mumford ve ark., 1996; Golnaraghi ve ark., 2001; Jones, 2005; Massumi ve ark., 2007; Hu ve ark., 2011; Lian ve ark., 2013). Asya kıtasında bitkilerde şiddetli zarara neden olan 14 *Orthospovirus* üyesi içerisinde TSWV'nin en yaygın ve ekonomik zararı en yüksek tür olduğu bildirilmiştir (Anfoka ve ark., 2006; Massumi ve ark., 2007; Pappu ve ark., 2009).



Şekil 2.4. TSWV'nin yayılış alanı (<https://www.eppo.int>)

Meksika'da *Chrysanthemum* bitkisinde TSWV enfeksiyonu sonucu yaklaşık %90 (Ochoa ve ark., 1999), ABD'de Georgia ve Florida'da tütün, yerbıstığı, biber ve domateste %30-60 ürün kaybının olduğu kaydedilmiştir (Bertrand, 2001; McPherson ve ark., 2003). TSWV enfeksiyonu sonucu Georgia'da 1996-2006 yılları arasında yerbıstığında 12.3 milyon, tütünde 11.3 milyon, domateste 9 milyon ve biberde 326 milyon dolar kayıp olduğu tahmin edilmektedir (Riley ve ark., 2011). Dünyada, TSWV'nin enfeksiyonu sonucu yılda 1 milyar dolardan fazla ekonomik zarara neden olduğu belirtilmiştir (Uhrig ve ark., 1999; Griep ve ark., 2000).

Türkiye'de TSWV'nin varlığı konusunda ilk kayıt Tekinel (1969) tarafından yapılmıştır. Mersin ili çevresindeki bazı sebze (patlıcan, marul, biber, fasulye) alanlarında görülen hastalıkları belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmalarda, marul bitkisinde görülen belirtilerin TSWV olabileceği yönünde bulgular elde etmişlerdir. TSWV'nin neden olduğu hastalık Azeri (1981) tarafından Çanakkale ilinde tütün bitkisinde görülmüş, daha sonra Balıkesir, Manisa, Uşak ve Samsun illerinde rapor edilmiştir. Samsun'da son yıllarda

domates ve biber alanlarında TSWV'nin artan epidemisi Arlı-Sökmen ve ark. (2005) tarafından rapor edilmiş ve virüsün domates bitkilerinde bitki gelişimi ve verimi üzerine etkisini incelemiştir. Birçok yabancı ot türünde TSWV enfeksiyonu belirlenmiş ve yabancı otların biber üretim alanlarında enfeksiyon kaynağı olarak risk oluşturduğunu bildirmiştir. TSWV domateste %42.1 düzeyinde ürün kaybına ve ürünlerin pazar değerinin %95.5 düzeyinde düşmesine neden olmuştur (Şevik ve Arlı-Sökmen, 2012).

Akdeniz Bölgesi'nin batısında sebze üretim alanlarında yapılan araştırmada testlenen tüm örnekler içerisinde biber örneklerinde %67.1, marulda %66.6, domateste %46.9 ve kabakta %16.6 düzeyinde TSWV enfeksiyonu tanılanmıştır (Yardımcı ve Çulal-Kılıç, 2009). Kamberoğlu ve Alan (2010), Adana ve Mersin illerindeki marul alanlarında TSWV'nin yaygınlığını Yardımcı ve Kılıç (2009)'ın bulgularından farklı olarak daha düşük seviyelerde (%1.2) bulmuştur. Kamberoğlu ve Bozdoğan (2015)'nin Antalya Bölgesindeki biber, domates ve marul bitkilerini TSWV poliklonal antiserumu kullanarak ELISA ile testlediklerinde örneklerin % 88.2'sinde TSWV tanısı yapmışlardır. Sertkaya (2015), Hatay ilinde yürüttüğü çalışmada ise marul ve ıspanak bitkisinde TSWV enfeksiyonunu belirlemiştir. Ayrıca bu çalışmada, *Conyza (Erigeron) canadensis* ve *Sonchus oleraceus* bitkilerinde TSWV'nin ilk kez belirlendiği rapor edilmiştir.

2.4. TSWV Mücadelesinde *Tsw* Geni Kullanılması

TSWV, *Solanaceae* (patlıcangiller) familyasındaki türlerde önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Virüsün çok sayıda trips vektörüne sahip olması, vektöründe taşınma şekli ve vektör tripslerin konukçu dizisinin geniş olması, vektörlerle kimyasal mücadelede başarının düşük olması ve tripslerin insektisitlere karşı dayanıklılık kazanması nedenleriyle TSWV mücadelesi başarısız olmaktadır (Ie, 1970; Cho ve ark., 1989; Rice ve ark., 1990; Boiteux ve ark., 1993).

Biberde TSWV'nin neden olduğu hastalığı kontrol etmek ve insektisitlerin çevreye verdiği zararı yok etmek için dayanıklı çeşit kullanılması en etkili mücadele stratejisi olarak önerilmektedir (Boiteux, 1995). Aşırı duyarlılık temeline dayanan TSWV'ye kalıtsal dayanıklılık *C. chinense* Jacq.'nin bazı hatlarında ('PI159236', 'PI 152225', 'CNPH-275', 'C00943', '7204') bulunmuş tek dominant gen olan *Tsw* geniyle kontrol edilmektedir (De Avila 1994; Boiteux, 1995; Moury ve ark., 1997). Dominant karakterdeki *Tsw* geni ticari ıslah programlarında kullanılan, nükleotid-bağlanma bölgesi ve lösince zengin tekrarlı (nucleotide-binding site-leucine-rich repeat, NBS-LRR) bölgelere sahip *R* (Resistance)

genleri sınıfına aittir (de Ronde ve ark., 2013). *C. chinense*'nin bazı PI hatlarındaki mevcut *Tsw* geni, *C. annuum* çeşitlerine aktarılmıştır (Black ve ark., 1991; Boiteux, 1995; Moury ve ark., 1997). Bugüne kadar da *C. chinense*'de *Tsw* lokusunda başka bir dayanıklılık alleli (Boiteux, 1995) veya *Capsicum* spp. türlerinde farklı bir dayanıklılık lokusu bulunmamıştır (Boiteux, 1995; Moury ve ark., 1997). *Tsw* geni 10. kromozomda haritalanmıştır (Jahn ve ark., 2000). Dayanıklı bitkilerde virüs enfeksiyonları sonrasında aşırı duyarlılık reaksiyonuyla birlikte etmenin temas ettiği komşu hücrelerin ölümü gerçekleşmekte ve lokal nekrotik lezyonlar oluşmaktadır. Virüsün enfeksiyonu sırasında konukçuda *Tsw* geniyle meydana gelen HR sonucu, TSWV'nin hücreler arasındaki hareketi sınırlandırılır ve sistemik enfeksiyon engellenir (Black ve ark., 1991; Boiteux, 1995; Soler ve ark., 1999). İslah çalışmalarında moleküler testlemede kullanılmak üzere *Tsw* lokusuna bağlı RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markırı geliştirilmiş ve CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) markırına dönüştürülmüştür (Moury ve ark., 2000).

Son yıllarda *Tsw*-dayanıklılık geninin kırıldığı rapor edilmektedir. Bunun nedenleri olarak konukçunun erken dönemde (2-4 gerçek yapraklı) virüsle enfektelenmesi, gelişme dönemleri süresince yüksek sıcaklıklara maruz kalması (>28 °C) (Pennazio, 1995; Moury ve ark., 1998; Soler ve ark., 1998, 1999; Chung ve ark., 2018) ve en önemlisi TSWV'nin farklı coğrafyalara adaptasyonu nedeniyle dayanıklılığı kıran yeni izolatların ortaya çıkması gösterilmektedir (Tsompana ve ark., 2005; López ve ark., 2011; Tentchev ve ark., 2011).

Soler ve ark. (1998) dayanıklı PI hatlarında ortam sıcaklığının 30/18 °C (gündüz/gece) olduğu durumlarda, bitkinin gelişme dönemine bağlı olmaksızın tüm bitkilerde TSWV'nin sistemik enfeksiyonunun geliştiğini belirtmiştir.

Ancak daha düşük ortam sıcaklıklarında (25/18 °C, gündüz/gece) bitkinin 2 gerçek yapraklı döneminde yapılan inokulasyon sonrasında bitkilerde sistemik enfeksiyon gelişirken, 4 gerçek yapraklı dönemlerinde virüs inokulasyonu sonrası bitkilerde sistemik enfeksiyon oluşmadığı, inokulasyon yapılan yapraklarda nekrotik lekelerin oluştuğunu belirtmiştir. Soler ve ark. (1999) dayanıklı biber hatları (PI 152225, PI 159236) ve duyarlı biber çeşidinde (*C. annuum* "Negral") farklı sıcaklıklarda (25 ve 30 °C) virüsün bitkideki hareketini incelemiştir. Her iki sıcaklık ortamında Negral çeşidinin 2 ve 4 yapraklı döneminde yapılan inokulasyonda, ilk belirtiler inokulasyondan 3 gün sonra görülmeye başlamıştır. TSWV'nin duyarlı ve dayanıklı biber bitkilerindeki hareketini izlemek için inokulasyondan 7 gün sonra bitkilerin farklı bölgelerinden (inokulasyon yapılan kısım,

yaprak ucu ve yaprak sapı) alınan dokular DAS-ELISA ile testlenmiştir. PI 152225 ve PI 159236 hatlarında 25 °C sıcaklıktaki ortamda bitkilerin iki yapraklı döneminde yapılan inokulasyon sonucu, duyarlı bitkilere kıyasla virüs, inokulasyon yapılan bölgede ve yaprak ucunda çok düşük oranda tespit edilmiştir. Bitkilerin dört yapraklı dönemlerinde ise sadece inokulasyon yapılan bölgede tanılanmıştır. PI 152225, PI 159236 hatlarında 30 °C sıcaklıkta yapılan inokulasyon sonucu bitki gelişim dönemlerinde sistemik enfeksiyon meydana geldiği saptanmıştır.

TSWV'ye yeni dayanıklılık kaynakları araştırmak için yapılan çalışmada 6 *Capsicum* türüne ait 486 tip ve 30 ticari F₁ hibritlerinin, TSWVpap izolatına dayanıklılığı test edilmiştir. *C. chinense*'nin 'AC09-207' tipi yeni dayanıklılık kaynağı olarak tanımlanmıştır. Dayanıklılığın tek gen tarafından sağlandığı belirlenmiştir. AC09-207'de oluşan nekrotik semptomların 'PI 152225' hattında meydana gelenlerle benzerlik gösterdiği fakat inokulasyon yapılan kotiledonlar ve yeni oluşan yapraklarda gözlenen semptomların dayanıklılık kaynağı olan PI 152225 ve 'PI159236'da olanlardan önemli oranda farklılık gösterdiği belirlenmiştir. *Tsw* ve yeni dayanıklılık geninin lokasyonlarını karşılaştırmak için allelizm testi yapılmıştır. Yeni dayanıklılık kaynağı ve bilinen dayanıklılık kaynakları (PI 152225, PI159236, ve PI159234)'ndan oluşturulan F₁, F₂ ve resiprokal geri melez popülasyonlarında rekombinasyon belirlenmemiştir. Yeni dayanıklılık geninin *Tsw* lokusundaki tek allel veya *Tsw*'ye bağlı farklı gen tarafından kontrol edildiği belirtilmiştir (Hoang ve ark., 2013).

Bitkideki dayanıklılık genleri virüs enfeksiyonu için gerekli olan korunmuş motifleri tanımak ve dayanıklılığı kıran mutantların oluşumunu en aza indirmek için evrim geçirmiştir (Janzac ve ark., 2009).

Fakat, üretim alanlarında dayanıklı çeşitlerin çok yaygın kullanımı hedef patojen popülasyonlarında güçlü seçim baskısı oluşturur ve dayanıklılığın kırılmasına yol açar. Dayanıklılığın kırılması; patojenin avirülens (*avr*) geninde meydana gelen mutasyon ve/veya rekombinasyon olayları virüent varyantlarının ortaya çıkması ve bu virüent varyantların uyumu ile bitki popülasyonunda bulunma ve agroekosistemde yayılmasının artması sonucu gerçekleşir (Leach ve ark., 2001).

Boiteux ve Nagata (1993) ilk kez TSWV izolatlarının *C. chinense*'de (PI 159236) sistemik enfeksiyona (genel nekroz ve bodurlaşma) neden olduğunu bildirmiştir. Hobby ve ark. (1994) Louisiana'da domatesten izole edilen ırkların 'PI 152225' ve 'PI 159236'

hatlarında sistemik enfeksiyon oluşturduğunu bildirmiştir. Bunu takiben, son yıllarda *Tsw* dayanıklılık genini kıran izolatların varlığı: İtalya (Roggero ve ark., 2002; Margaria ve ark., 2007), İspanya (Margaria ve ark., 2004), Avustralya (Thomas-Carroll ve Jones, 2003; Sharman ve Persley, 2006), Kore (Chung ve ark., 2012; Hoang ve ark., 2013), Macaristan (Almasi ve ark., 2015) ve Türkiye (Deligöz ve ark., 2014; Almasi ve ark., 2020) gibi birçok ülkede rapor edilmiştir.

TSWV izolatlarının popülasyon çeşitliliği çalışmalarında, üç izolat biyotipinin olduğu ortaya çıkmıştır: dayanıklı domates ve biber bitkilerini enfekteleyemeyen yabani izolat (wild type: WT), sadece dayanıklı domates bitkilerini enfekteleyen ancak dayanıklı biberleri enfekteleyemeyen *Sw-5* dayanıklılık kıran (*Sw-5* resistance breaking: SBR), dayanıklı biberleri enfekteleyen ancak dayanıklı domatesleri enfektelemeyen *Tsw* dayanıklılık kıran (*Tsw* resistance breaking, TBR) izolatlar. Bunun dışında biberde *Tsw* veya domateste *Sw-5* genleri taşıyan biber ve domates bitkilerinde hastalık yapan doğal TSWV izolatı bulunmamaktadır (Debreczeni ve ark., 2015). WT ve SBR biyotipindeki izolatların M segmentinin nükleotid ve amino asit dizinlerinin karşılaştırılması sonucu NSm proteininin 118. (C→Y) veya 120. (T→N) amino asitlerdeki değişimin *Sw-5* dayanıklılığının kırılmasından sorumlu olduğu belirlenmiştir (Lopez ve ark., 2011). Fidan ve Sarı (2019) Antalya'daki seralardan toplanan domates bitkilerinden elde ettiği dayanıklılığı kıran izolatların hücreden hücreye geçişten sorumlu olan NSm proteininin amino asit dizininde meydana gelen bir mutasyonun (C118Y) *Sw-5* geninini sağladığı dayanıklılığın kırılmasından sorumlu olduğunu belirtmiştir.

NSs proteininin konukçu bitkinin gen susturma mekanizmasını baskılayan protein olduğu ve bitkinin dayanıklılığının kırılmasından sorumlu olduğu bilinmektedir (Takeda ve ark., 2002; de Ronde ve ark., 2014).

NSs proteini, küçük RNA'lara (mikroRNA/siRNA) ve uzun dsRNA'lara bağlanıp RNA susturmasını baskılamaktadır (RNA silencing suppressor, RSS) (Schnettler ve ark., 2010). *Tsw* dayanıklılık geni için *avr* protein olarak rol oynayan NSs proteininin amino asit dizinleri incelendiğinde, dayanıklılığı kıran TSWV izolatlarının tamamında spesifik tek nokta mutasyonunun olmadığı, çeşitli amino asit pozisyonlarında farklılıklar gösterdiği belirtilmiştir (Tsompana ve ark., 2005; Margaria ve ark., 2007; Almasi ve ark., 2015; 2017). RSS ve *avr* özellikte olan NSs proteininin N-terminal ucundaki (1-113 aa) tüm mutasyonların HR oluşturma yeteneğini kaybetmesine neden olduğu ve N-terminal ucunun NSs'nin *avr* aktivitesi için önemli olduğu vurgulanmıştır (de Ronde ve ark., 2014).

Margaria ve ark. (2007) yabancı izolat (wild type: WT) ve *Tsw* dayanıklılık genini kıran izolatlarının (Resistance breaking, RB) S RNA nükleotid dizinlerini karşılaştırdıklarında, 5' ve 3' translayonu yapılmayan terminal bölgelerde (Untranslated region, UTR) farklılık olmadığını bildirmiştir. Buna karşın WT ve RB izolatlarının genler arası bölgelerinin (Intergenic region, IGR) aynı dizini taşıyabildiği gibi bazı RB izolatları ile farklılık gösterebildiği belirlenmiş olup, bu gen bölgelerinin *Tsw* geninin kırılmasından sorumlu olmadığını rapor etmişlerdir. WT ve RB izolatlarının NSs geninin amino asit dizinleri karşılaştırıldığında, birkaç amino asit farklılıklarının görüldüğü fakat tüm RB izolatlarında ortak gözlenen bir mutasyonun olmadığı belirtilmiştir. Farklı NSs dizinlerine sahip olan WT ve RB izolatlarının protein yapıları karşılaştırıldığında, aralarında önemli sayılabilecek bir farklılığın gözlenmediğini bildirmişlerdir. Dayanıklılığı kıran izolatlarda amino asit değişikliğine neden olan mutasyonların, *Tsw* geninin seçim baskısı sonucunda olduğu sonucuna ulaşamadıklarını rapor etmişlerdir. Ayrıca, RB izolatının NSs genini taşıyan ekspresyon vektörleri agro-infiltrasyon yöntemiyle 16C transgenik *N. benthamiana* yapraklarına muamele edilmiş ve yeşil floransan protein (green fluorescent protein, GFP) ekspresyon testi ile TSWV'nin NSs geninin transkripsiyon sonrası gen baskılamada (post-transcriptional gene silencing, PTGS) rol oynadığını saptamıştır.

Aramburu ve ark. (2015) İspanya'da ticari biber üretim yapılan alanlardan kloroz, bodurlaşma ve uç yapraklarda sistemik nekroz gibi belirtilere sahip *Tsw* geni taşıyan dayanıklı biber bitkilerinden saflaştırılan biyolojik klonların, *Tsw* geni taşıyan dayanıklı biberlerdeki biyolojik karakterizasyonu çalışmalarında (i) dayanıklılığı kıran izolatların tipik semptomu olan kloroz ve bodurlaşma ve (ii) şiddetli sistemik nekroz olmak üzere iki farklı semptom oluşturduğunu belirlemişlerdir.

Aynı virüsün farklı ırklarının sinerjik etkileşimiyle dayanıklılığı kırmayan izolatların, dayanıklılığı kıran izolatlarla karışık enfeksiyonlarında *Tsw* geni taşıyan biberlerde enfeksiyona neden olabileceğini belirtmiştir.

Almasi ve ark. (2017) Macaristan'da biber bitkilerinden izole edilen WT ve RB izolatlarının NSs geninin amino asit dizinlerinin iki amino asitinin (104aa, 461aa) farklı olduğunu belirlemişlerdir. Bu çeşitlilik göz önünde bulundurularak dört mutant klon (WT-T104A, WT-T461A, RB-A104T, RB-A461T) oluşturulmuştur. Geçici protein ekspresyonun belirlenmesi amacıyla WT, RB ve oluşturulan NSs proteininin nokta mutantları *C. annuum* cv. Brendon bitkilerine agro-infiltrasyon yöntemiyle aktarılmıştır. Macaristan TSWV izolatlarında belirlenen tek bir amino asit değişikliğinin (T104A) RB

fenotipinin oluşmasına neden olduğunu rapor etmişlerdir. Agro-infiltrasyon yöntemiyle 16C GFP transgenik *N. benthamiana* bitkilerinde WT ve RB izolatlarının NSs proteinlerinin geçici ekspresyonu gerçekleştirilmiş ve gen susturmayı baskılama özelliklerinde önemli bir farklılık olmadığını göstermişlerdir.

2.5. TSWV İzolatlarının Rekombinasyon ve Reassortment Özelliği ve Popülasyon Yapısı

Diğer bitki virüslerinden farklı olarak TSWV'nin üç parçalı RNA yapısı nedeniyle, izolatlarının aynı konukçu üzerinde karışık enfeksiyonları sonucu aralarında genetik materyal alışverişi meydana gelerek konukçu dayanıklılığını kıran yeni izolatların meydana gelme riski yüksektir. Virüsün izolatlarının çoklu enfeksiyonlarında genomik segmentlerinin tamamını birbirleri arasında değiştirmek suretiyle yeni varyantlarının meydana gelmesi "reassortment" olarak adlandırılmaktadır (Simon-Loriere ve Holmes, 2011). Reassortment mekanizması ilk kez Best (1961) tarafından çalışılmıştır. Genetik değişimin farklı bir formu olan çoğunlukla pozitif duyarlı ssRNA genomlarında kolaylıkla meydana gelen "rekombinasyon" ise iki virüs izolatının nükleotid dizinlerini içeren RNA molekülünün oluşmasıyla sonuçlanır. Rekombinasyon, RNA molekülünün her tarafında (başı, ortası veya sonu) gerçekleşebilir. Bu nedenle, rekombinasyon, genin açık okuma çerçevesinde (Open Reading Frame, ORF) ve bu bölgelerden kodlanan proteinlerin işlevsel değişimine neden olurken, reassortment ORF'lerde ve proteinin işlevinde bir değişikliğe neden olmaz (McDonald ve ark., 2016).

TSWV'nin popülasyon çeşitliliği üzerine yapılan araştırmalarda, izolatlar arası akrabalık ilişkileri ve orijinleri bakımından çok sayıda grupların oluştuğu gözlenmektedir.

Virüsün çok sayıda ve coğrafi olarak birbirinden çok uzak izolatlarının olmasının, TSWV'nin uzak coğrafyalara taşınması ve adaptasyonunda reassortment ve rekombinasyon mekanizmasının etkili olduğunu göstermektedir. TSWV'nin genetik çeşitliliği, popülasyon yapısı ve doğal izolatlarda belirlenen rekombinant ve reassortant izolatlarının varlığı hakkında yürütülen çalışmalardan bazıları aşağıda verilmiştir.

Tentchev ve ark., (2011) çoğunluğu domates ve biber olmak üzere farklı konukçu türlerinden aldıkları TSWV izolatlarıyla, virüsün popülasyon yapısını incelemiştir. Virüs genomunun üç RNA segmentine göre yapılan analizde, izolatların %83'ünün coğrafi orijinine göre gruplandığı, geriye kalan izolatların (%17) RNA segmentlerinin ise farklı

gruplarda yer aldığını belirlemişlerdir. İspanya, Fransa ve İtalya'dan alınan izolatlarda reassortment olayının yaygın bulunduğu ve bu mekanizmanın TSWV'nin ortaya çıkması ve epidemilere neden olmasında önemli rol oynadığı belirtilmiştir.

Lian ve ark. (2013) Kore'de farklı konukçulardan izole ettikleri 13 TSWV izolatının tüm genom dizini ve diğer ülkelerin TSWV izolatlarının RNA segmentlerine göre yaptıkları filogenetik ve rekombinasyon analizi sonucunda, Kore izolatlarının L ve M RNA segmentlerinin Batı Avrupa ve Kuzey Amerika, S RNA segmentlerinin ise Çin ve Japonya orijinli olabileceğini belirtmişlerdir. İzolatların rekombinasyon analizinde ise izolatlar arasında 12; Kore izolatlarında ise 5 rekombinasyon olayı saptanmıştır. Belirlenen rekombinantların üçünün tüm L RNA segmentini içermesinden dolayı rekombinasyondan ziyade reassortment olayı sonucunda meydana gelmiş olabileceği sonucuna varmışlardır.

Margaria ve ark. (2014) İtalya'da biberden izole ettikleri iki TSWV izolatının (p105 ve p202/3WT) tüm genom dizinini elde etmek amacıyla yürüttükleri çalışmada, izolatların RdRp bölgelerinin %97.9, Gn/Gc bölgelerinin %95.9 oranında nükleotid dizin benzerliğine sahip olduğunu gözlemişlerdir. İzolatlarla oluşturulan filogenetik ağaçta ise İtalyan izolatları farklı gruplarda yer almıştır. p105 izolatının S RNA segmentinin, Kore izolatlarıyla rekombinasyonu sonucu meydana geldiği belirlenmiştir. Ayrıca Kore izolatlarında L RNA segmentinde belirlenen rekombinasyonda, p202/3WT izolatı minör ebeveyn olarak belirlenmiştir. İzolatların filogenetik ve rekombinasyon analizi sonucu; Asya ve p202/3WT izolatları arasındaki reassortment olayının yeni izolatların ortaya çıkmasında veya Kore izolatlarının p202/3WT izolatlarının görülmesinde önemli rolünün olabileceğini bildirmişlerdir.

Timmerman-Vaughan ve ark. (2014) Yeni Zelanda'daki TSWV izolatlarının coğrafi orijinleri üzerine yürüttükleri çalışmada 1992-2009 yılları arasında farklı bölge ve konukçulardan elde ettikleri 23 TSWV izolatını kullanmıştır. İzolatların filogenetik akrabalık ilişkilerini incelemek için yapılan filogenetik ağaçta L ve M RNA segmentlerine göre 2 izolat (MAF0 ve PFR04) Kore, Japonya ve Çin izolatlarıyla geriye kalan 21 izolattan farklı bir grup oluşturmuştur. N genine ait dizinlerle yapılan filogenetik ağaçta 4 grup oluşmuş, 3 izolat (MAF04, PFR04 ve MAF02) Japonya ve Kore izolatlarıyla, 20 izolat ise ABD, Batı Avrupa, Güney Amerika, Brezilya ve Hollanda izolatlarından oluşan gruplarda yer almıştır. Filogenetik ağaçta çok sayıda denizaşırı izolatın farklılık derecelerinin karmaşıklığından dolayı doğrudan karşılaştırma yapılamadığı belirtilmiştir. MAF02 izolatı olası reassortant izolat olarak değerlendirilmiştir. Rekombinasyon veya

reassortment olaylarının Yeni Zelanda TSWV izolatlarının genom kompozisyonunu şekillendirdiği öngörülmüştür. Ayrıca N geninde dört amino asit bölgesinin negatif seçim etkisinde olduğu tespit edilmiştir.

Margaria ve ark. (2015) 2012 yılında İtalya'nın çoğunlukla tatlı biber yetiştirilen Carmagnola şehrinde TSWV enfeksiyonunun görülmeye başladığını ve bu bölgede TSWV'ye dayanıklı çeşitlerin çok yaygın olmadığını belirtmişlerdir. *Tsw* geni taşıyan biberden izole edilen p331 arazi izolatının RdRp, NSm, Gn/Gc, NSs ve N proteinin kodlandığı bölgelerin dizinleri kullanılarak, karakterizasyonu daha önceden yapılmış, p105 ve p202/3WT izolatları (Margaria ve ark., 2014) ile rekombinasyon analizi gerçekleştirilmiştir. İzolatların filogenetik analizinde p331 ve p202/3WT izolatları L ve S RNA segmentlerine göre beraber gruplanırken, p331 izolatının p105 ile M RNA segmentine göre gruplandığı tespit edilmiştir. p331 izolatının, farklı TSWV izolatlarının aralarındaki reassortment ilişkisi sonucu ortaya çıktığı rapor edilmiştir. Ayrıca, p331 izolatı *C. chinense*'de sistemik enfeksiyona neden olurken ebeveyn izolatların ise *Tsw* dayanıklılığını kıramadığı belirtilmiştir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkisel materyal toplanması

Tez çalışmasının materyalini oluşturan biber örnekleri (yaprak ve meyve) 2017-2019 yılları arasında biber yetiştiriciliğinin yaygın olduğu Adana, Mersin, Kahramanmaraş illerinde örtü altı (Nisan-Haziran) ve açıkta yapılan biber üretim alanlarından (Haziran-Ağustos) toplanmıştır.

3.1.2. Double antibody sandwich-enzyme linked-immunosorbent assay (DAS-ELISA) testinde kullanılan antiserumlar

TSWV, CMV, PVY ve *Tobacco mosaic virus* (TMV)'lerin tanısında kullanılan poliklonal antiserumlar Loewe Biochemica (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

3.1.3. Mekanik inokulasyonda kullanılan test bitkileri

Enfeksiyon kaynağı oluşturmak, virüs titrasyonunu arttırmak ve TSWV izolatlarının biyolojik klonlarını saflaştırmak amacıyla *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN ve *Vigna unguiculata* indikatör bitkileri kullanılmıştır. *Nicotiana* spp. tohumları KSÜ-Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünden temin edilmiştir. *V. unguiculata* tohumları ise ticari firmadan alınmıştır. TSWV izolatlarının biyolojik karakterizasyonu *Tsw* geni taşımayan (Naz F₁, Eastern seeds) ve *Tsw* geni taşıyan (Mertcan F₁, Yüksel tohumculuk) ticari çeşitler, özel firmalardan temin edilmiştir. *C. chinense* (PI 152225, dayanıklı) biber hattı, PM hatları olarak kodlanan genotipler INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) Fransa Ulusal Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden, Maraş 6 ve Maraş 19 hatları Dr.Öğr. Üyesi Bekir Bülent Arpacı tarafından temin edilmiş olup, PI 439381 (*C. baccatum*) hattı ise Prof. Dr. Nihal Buzkan tarafından United States of Agriculture (USDA), Plant Genetic Resources Conservation Unit araştırma kuruluşundan temin edilmiştir.

3.1.4. TSWV izolatlarının popülasyon yapısının belirlenmesinde kullanılan primerler

TSWV biber izolatlarının popülasyon yapısı, virüs genomunun L, M, S RNA bölgelerinden hazırlanmış primer dizinleri (Çizelge 3.1) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction, PCR) yöntemiyle incelenmiştir.

Çizelge 3.1. TSWV genomunun L, M ve S RNA bölgelerini çoğaltan primer dizinleri (Tentchev ve ark., 2011; Debreczeni, 2015)

Bölge	Primer dizisi (5' ten 3' e)	DNA bç
L RNA –replikaz geni (kısmi)		
Df	GATAGACGAGGATGCTGTTT	983
Dr	CAGCAGTGTCCAGTATTTTC	
M RNA -NSm geni (kısmi)		
NSmFwd	ACATTACACAAGCTCCTCTACC	826
NSmRev	CCTTTAGGRATTATCAGCTTGC	
S RNA NSs geni		
NSsfinF	TGATTTRAAGGAGCCTTACAAC	684
NSsmilF	ARGCTTTRGGCAAAGTGAATG	
NSsfinR	AACAAAHCYCAAATTTGGCC	1111
S RNA NP geni		
NdebF	AGCAAACCTTAAATTAACACAC	984
NfinR	CCTAACAAACGACTGCGG	

3.2. Metot

3.2.1. Simptom gözlemleri ve örnekleme çalışmaları

Açıkta ve örtü altında yetişen biber bitkilerinin genel görünümünde şekil bozukluğu, klorotik veya nekrotik halka leke, yapraklarda sararma, meyvelerde açık ve koyu sarı/kırmızı alanlar taşıyan bitkilerden yaprak (Şekil 4.1) ve meyve örnekleri (Şekil 4.2) toplanmıştır. Örnek alınacak araziler tesadüfi olarak seçilmiş olup, 5 dekardan küçük arazilerden 1-5 adet; 5 dekardan büyük olan arazilerden ise 5-10 adet örnek toplanmıştır. Saha çalışması sonucunda Adana, Mersin ve Kahramanmaraş illerinden 300 biber meyve ve/veya yaprak örneği toplanmıştır (Çizelge 3.2). Örnekler şeffaf plastik torbalar içerisine alınıp, torbaların üzerine örneklerin alındığı lokasyon, tarih bilgileri yazılarak soğutulmuş termos kaplarında laboratuvara getirilmiştir.

Çizelge 3.2. Biber örneklerinin toplandığı il/ilçeler ve örnek sayıları

İller	İlçeler	Açık/Örtü altı Örnek Sayısı	Toplam
Adana	Seyhan	42/76	118
	Yüreğir		
Mersin	Karataş	26/65	91
	Akdeniz		
Kahramanmaraş	Tarsus	61/30	91
	Türkoğlu		
	Pazarcık		
			300

3.2.2. DAS-ELISA testi

TSWV'nin tekli enfeksiyonlarını taşıyan biber örneklerini seçmek üzere, araştırmada toplanan bütün örnekler TSWV yanısıra Akdeniz havzasında biber alanlarında yaygın olan CMV, PVY ve TMV (Moury ve ark., 2012) için de testlenmiştir. Virüslerin tanısı, poliklonal antiserumlar (Loewe Biochemical, Almanya) kullanılarak DAS-ELISA (Clark ve Adams, 1977) yöntemiyle yapılmıştır. Yaprak veya meyve örneklerinden 0.1 g tartılıp, örnek ezme torbalarına konularak 1:10 (ağırlık/hacim) oranında örnek ezme tamponuyla (Ek 5) ezilmiştir. Örnekler testleme işlemi gerçekleştirilinceye kadar +4 °C'de bekletilmiştir. TSWV TMV, CMV ve PVY için firmadan temin edilen pozitif ve negatif kontroller kullanılmıştır. ELISA testi firmanın kullanım önerisine göre:

- Kaplama tamponu (EK 5) içerisinde 1:200 oranında seyreltilmiş poliklonal antiserum ile plakalar 200 µl/çukur olacak şekilde kaplanmıştır. Plakalar 37 °C'de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- Plakalar 3 defa 3 dk aralıkla yıkama tamponu (Ek 5) ile yıkanmıştır.
- Örnek ezme tamponuyla hazırlanmış test örnekleri, plakalara 200 µl/çukur olacak şekilde, iki tekerrürlü olarak eklenmiştir. Plakalar +4 °C'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- Plakalar 3 defa 3 dk aralıkla yıkama tamponu ile yıkanmıştır.
- Enzimle işaretlenmiş virüs antiserumları, konjugat tamponu (Ek 5) içerisinde 1:200 oranında seyreltilmiş ve plakalara 200 µl/çukur olacak şekilde dağıtılmıştır. Plakalar 37 °C'de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- Plakalar 3 defa 3dk aralıklarla yıkama tamponu ile yıkanmıştır.

- Substrat tamponu içerisinde 1 mg/ml *p*-nitrophenylphosphatase hazırlanmış ve 200 µl/çukur olacak şekilde eklenmiştir ve oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır.
- ELISA plaka okuyucusunda (SEAC SIRIOS) 405 nm dalga boyunda 1-2 saatlik sürelerde plakaların okuması yapılmıştır.

Negatif örneklerden elde edilen OD (optical density) değerinin en az 2 katı absorbans değerine sahip olan örnekler pozitif kabul edilmiştir.

3.2.3. TSWV izolatlarının saflaştırılması ve biyolojik karakterizasyonu

DAS-ELISA testlerinde TSWV'nin tekli enfeksiyonunu taşıyan virüs izolatları *N. benthamiana*, *N. tabacum* cv. Samsun NN indikatör bitkilerine mekanik inokülasyon yoluyla taşınarak izolatların titrasyonu artırılmıştır. TSWV izolatları *V. unguiculata* üzerine mekanik olarak taşınarak izolatları biyolojik klonlarının saflaştırması yapılmıştır. Bu biyolojik klonlar *N. tabacum* cv. Samsun NN, *N. benthamiana*, dayanıklı (*C. chinense*, PI 152225; *C. annuum* cv. Mertcan F₁) ve duyarlı (*C. annuum* cv. Naz F₁) biber bitkilerine mekanik olarak taşınmış ve biyolojik karakterizasyonu yapılmıştır.

3.2.3.1. Test bitkilerinin yetiştirilmesi

Mekanik inokulasyonda kullanılacak *N. tabacum* cv. Samsun NN, *N. benthamiana* ve biber tohumları tohumları steril torf ve perlit içeren tohum ekim kabına, *V. unguiculata* bitkilerinin tohumları ise saksılara ekilmiş ve 16/8 saat (ışık/karanlık), 25 °C sıcaklık, %60 oransal nem bulunan iklim odasına yerleştirilmiştir (Şekil 3.1). *Nicotiana* spp. fideleri 2 yapraklı döneme geldiklerinde plastik bardaklara, biber bitkileri ise saksılara tekli olarak şaşırtılmıştır. İklim odası ve yetiştirilen bitkiler zararlı ve hastalık gelişmesinin önlenmesi amacıyla düzenli olarak kontrol edilmiştir.



Şekil 3.1. Mekanik inokulasyon için yetiştirilen test bitkileri

3.2.3.2. Mekanik inokulasyon

Mekanik inokulasyon için enfeksiyon kaynağı yaprak ve/veya meyve örneklerinin 1:4 (ağırlık/hacim) oranında ezme tamponu [0.03 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) (Ek 6), %2 (ağırlık/hacim) diethyldithiocarbamate (DIECA), 20 mg/ml aktif kömür, 20 mg/ml karborandum] ile ezilmesiyle hazırlanmıştır. Mekanik inokulasyon tütün bitkilerine 2-4 yapraklı, biber bitkilerine ise 4 gerçek yapraklı dönemde yapılmıştır. Negatif kontroller, indikatör bitkilere sadece fosfat tamponu uygulayarak elde edilmiştir (Moury ve ark., 2004). Test bitkileri 16/8 saat (ışık/karanlık), 25 °C sıcaklık, %60 oransal neme sahip iklim odasına konularak simptom gelişmesi gözlenmiştir. Mekanik inokulasyon yapılmış örneklerin zarar görmesi veya tekrarlanması gerektiği koşullar düşünülerek, yaprak ve meyve örnekleri, susuz kalsiyum klorür bulunan petri kaplarına konularak +4 °C'de saklanmıştır.

3.2.3.3. TSWV izolatlarının biyolojik klonlarının ayrılması ve biyolojik karakterizasyonu

Nicotiana spp. bitkileri üzerinde çoğaltılan TSWV izolatları, *V. unguiculata* bitkilerine 3.2.3.2'de belirtildiği şekliyle mekanik olarak taşınmıştır. *V. unguiculata* bitkilerinde sistemik yayılmayan ve lokal lezyonlar meydana getiren (Moury ve ark., 1997; Bananej ve ark., 1998) TSWV izolatlarının biyolojik klonları ayrılmıştır. CMV ve TMV, *V. unguiculata*'da sistemik olarak yayılırken, PVY'nin konukçusu değildir (Thottappilly ve Rossel, 1997; Salaudeen, 2016).

Mekanik inokulasyon sonrası *V. unguiculata* üzerinde meydana gelen lokal lezyonlar bistüri yardımıyla kesilip (en az 10 lezyon/bitki), *N. benthamiana* bitkilerine mekanik olarak tekrar taşınarak titrasyonları artırılmıştır. *N. benthamiana* bitkilerinde sistemik olarak yayılan biyolojik klonlar *N. tabacum* cv Samsun NN, dayanıklı (*C. chinense*, PI 152225; *C. annuum* cv. Mertcan F₁) ve duyarlı (*C. annuum* cv. Naz F₁) biber bitkilerine mekanik olarak taşınarak (bkz. 3.2.3.2), biyolojik karakterizasyonu yapılmıştır. İzolatların biyolojik klonları tütün bitkilerine 2-4 yapraklı, biber bitkilerine ise 4 gerçek yapraklı dönemde mekanik olarak taşınmıştır (bkz. 3.2.3.2.). Her biyolojik klonların konukçu bitkilere inokulasyonu üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Denemelerde negatif kontroller, duyarlı ve dayanıklı biber genotiplerine sodyum fosfat tamponunun mekanik inokulasyonu ile hazırlanmıştır. Test bitkileri 16/8 saat (ışık/karanlık), 25 °C sabit sıcaklık ve %60 oransal nem bulunan iklim odalarına konulmuş ve günlük olarak gözlemler yapılmıştır.

Inokulasyonu takiben test bitkilerinde TSWV-nedenli ilk belirtilerin gözlenmeye başladığı 15. ve daha sonra 30. günlerde, test bitkilerinin inokulasyon yapılan (simptomlu) ve yeni çıkan yaprakları (inokulasyon yapılmayan) DAS-ELISA (bkz. 3.2.2.) ile testlenmiştir. Negatif kontrol bitkilerinden elde edilen absorbans değerinin en az 2 katı absorbans değerine sahip olan örnekler pozitif kabul edilmiştir. Bitkilerdeki oluşan belirtiler inokulasyon yapıldıktan sonraki 4 hafta boyunca gözlenmiştir.

3.2.4. TSWV izolatlarının moleküler karakterizasyonu

TSWV ile bulaşık olduğu belirlenen izolatların moleküler karakterizasyonu virüs genomunun üç bölgesine (L, M, S RNA) göre RT-PCR ile yapılmıştır.

3.2.4.1. Viral RNA izolasyonu

Biber örneklerinden ve indikatör bitkilerde titrasyonu artırılmış TSWV izolatlarından viral RNA izolasyonu Trizol kullanılarak yapılmıştır. Steril ve soğutulmuş havan içerisindeki yaprak ve/veya meyve örnekleri 1:10 oranında (ağırlık/hacim) Trizol eklenerek ezilmiştir. Karışım mikrosantrifüj tüplere aktararak 10 dk boyunca vorteks yapılmıştır. Üzerine kloroform eklenerek (0.2 hacim) 10 dk vorteks yapılmıştır. Örnekler 14.000 devir/dk'da 15 dk oda ısısında santrifüj edildikten sonra üstte kalan kısım yeni tüplere aktarılmıştır. Üzerine isopropanol (0.5 hacim) eklenmiş ve bir gece -20 °C'de bekletilmiştir. Karışım 14.000 devir/dk'da 10 dk santrifüj edilmiş ve RNA'ların mikrosantrifüj tüplerinin tabanında toplanması sağlanmıştır.

RNA çökeltisi 1ml %70'lik etil alkol kullanılarak, 10.000 devir/dk'da 10 dk santrifüj edilerek yıkanmıştır. Çökelti üzerine 30 µl steril saf su eklenerek homojenize edilmiş, -20 °C'de muhafaza edilmiştir. İzole edilen RNA'ların saflık ve konsantrasyon ölçümleri spektrofotometrede (Bio-Rad) A260/A280 dalga boylarında yapılan ölçümler sonrasında belirlenmiştir.

3.2.4.2. Tersine transkripsiyon (reverse transcription) ve tamamlayıcı DNA (complementary DNA, cDNA,) sentezi

RNA'nın tersine transkripsiyonu için yaklaşık 2 µg toplam RNA ve virüs RNA segmentlerinin çoğaltılması için hazırlanmış 10 pmol heterolog primerlerle (Çizelge 3.1) hazırlanan karışım 70°C'de 5 dk bekletilerek RNA denatürasyonu sağlanmıştır. Karışıma 4 °C'de 5 dk şok soğutma yapılmıştır. cDNA sentezi 20 µl içerisinde 5X tersine transkripsiyon tamponu (250 mM Tris-HCl, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 10 mM dNTP ve 200 U RevertAid Reverse Transcriptase enzimi (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak 42°C'de 1 saat sürede gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction, PCR)

PCR reaksiyon karışımı 25 µl hacim içerisinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı 4 µl cDNA, 1X PCR thermal reaksiyon tamponu, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.2 pmol virüs spesifik homolog ve heterolog primerler (Çizelge 3.1), 1U DNA *Taq* polymerase (Thermo Scientific, ABD) ile hazırlanmıştır. cDNA içermeyen reaksiyon karışımı negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Virüs genomu RNA segmentlerini çoğaltmak için kullanılan reaksiyon profili Çizelge 3.3'de verildiği şekilde uygulanmıştır. cDNA'larından elde edilen PCR ampikonların elektroforetik analizi %1'lik agaroz jel üzerinde 1XTAE (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA, pH 8.0) tamponu kullanılarak yapılmıştır. Agaroz jel 0.1 mg/ml etidium bromid ile boyandıktan sonra UV transilluminator üzerinde gözlenmiş, jel fotoğrafları "GelDoc-It imaging system" ile çekilmiştir.

Çizelge 3.3. TSWV genom organizasyonuna göre L, M, S RNA bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan PCR reaksiyon profili

Genom	PCR program
L (Df/Dr)	94 °C'de 45 sn
	59 °C'de 1 dk * 40 döngü
	72 °C'de 1 dk
	72 °C'de 7 dk
M (NSmFwd/NSmRev)	95 °C'de 1 dk
	50 °C'de 1dk * 40 döngü
	72 °C'de 1 dk
	72 °C'de 7 dk
S (NDebF/NFinR)	95 °C'de 1 dk
	48 °C'de 1 dk * 40 döngü
	72 °C'de 1dk
	72 °C'de 7 dk
S (NSsFinF/NSsFinR)	95 °C'de 1 dk
	50 °C'de 50 sn * 40 döngü
	72 °C'de 1dk
	72 °C'de 7 dk
NSsmilF/NSsFinR	95 °C'de 1 dk
	48 °C'de 50 sn * 40 döngü
	72 °C'de 1dk
	72 °C'de 7 dk

3.2.4.4. Nükleotid dizin analizi

PCR DNA'larının doğrudan çift yönlü nükleotid dizi analizi, homolog ve heterolog primer dizinleri kullanılarak yaptırılmıştır (MedsanTek, Ankara). Nükleotid dizinleri ChromasPro 2.6.6. kromatogram programı ile karşılaştırılmış ve konsensus dizileri elde edilmiştir. MEGA6 (Tamura ve ark., 2013) programında, Clustal W (Thompson ve ark., 1994) ile hizalanmıştır. NCBI (National Center for Biotechnology Information)'da Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programı kullanılarak gen bankasında kayıtlı diğer izolatlarla nükleotid ve amino asit benzerlik oranları karşılaştırılmıştır.

Filogenetik analiz Neighbor-joining (Saitou ve Nei, 1987) metodu ve Kimura 2 parametre modeli kullanılarak yapılmış, bootstrap değeri 1000 olarak alınmıştır.

3.2.5. TSWV-biber izolatları popülasyonunun genetik yapısı

Popülasyon genetiği, popülasyonu oluşturan bireylerdeki genetik çeşitliliği inceleyerek popülasyonun genetik yapısının farklı coğrafi bölgelerde zaman içerisinde nasıl bir değişim gösterdiğini belirlenmeye çalışır. Virüslerle ilgili popülasyon genetiği çalışmaları virüs izolatlarının virülensliklerindeki değişiklikler, epidemileri ve coğrafi sınırları gibi biyolojik özellikleri hakkında bilgiler sağlamaktadır. Bu bilgiler aynı zamanda virüslerle mücadelede belirlenecek stratejilerinin geliştirilmesinde de önemli rol oynamaktadır.

3.2.5.1. TSWV izolatlarının nükleotid çeşitliliği (P_i , π), mutasyon oranı (Θ_w) ve haplotip çeşitliliği (H_d)

Kahramanmaraş, Mersin, Adana illerindeki açıkta ve örtü altı biber üretim alanlarından 2017-2019 yıllarında toplanan ve TSWV tanısı konmuş semptomlu biber bitkilerinden elde edilen virüs izolatlarının genetik çeşitliliği ve popülasyon yapısı incelenmiştir. TSWV-biber izolatlarının L, M ve S RNA bölgelerinin (kısmi) amplifikasyonu ile elde edilen dizinlerin nükleotid çeşitliliği (P_i , π) (Nei, 1987) (Denklem 3.1), mutasyon oranı (Θ_w) (Watterson, 1975) (Denklem 3.2) ve haplotip çeşitliliği (H_d) DNASp version 5.10.01 (Rozas ve ark., 2010) programı kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\hat{\pi} = \frac{q}{q-1} \sum_{ij} \hat{x}_i \hat{x}_j d_{ij}$$

Denklem 3.1.

q: Toplam örnek sayısı; x_i ve x_j : i. ve j. dizinlerin frekansı; d_{ij} : i ve j. dizinler arasındaki her bir bölgedeki nükleotid farklılığının sayısı

$$\hat{\theta}_w = \frac{S}{\sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}}$$

Denklem 3.2.

S: Segregasyon bölgelerin sayısı (ayırdedici bölge/ polimorfik bölgelerin sayısı); n: toplam örnek sayısı; $\hat{\mu}$: μ mutasyonunun frekansı

3.2.5.2. dN/dS (ω) oranı

DNA dizisindeki nükleotid değişimi amino asit değişimine neden olmuyorsa bu değişimler sinonim (synonymous, dS), amino asit değişimine neden oluyorsa bu değişim sinonim olmayan (non-synonymous, dN), olarak adlandırılmaktadır (Freeman ve Herron, 2007). dN/dS (ω) oranı <1 ise negatif (arındırıcı); $=1$ ise nötral ve >1 olması durumuna göre pozitif (çeşitlendirici) seçilim olduğu yorumu yapılmaktadır (Yang ve Bielawski, 2000a; Yang ve Nielsen, 2000b). Bu oran SLAC (Single Likelihood Ancestor Counting) metoduyla (www.datamonkey.org) hesaplanmıştır.

3.2.5.3. Nötralite (Neutrality) testleri

Kimura (1968)'nin nötral evrim teorisinde göre popülasyondaki çoğu genetik çeşitliliğin mutasyon ve genetik sürüklenmenin etkisi sonucunda olduğunu savunmaktadır (null hypotheses = sıfır hipotezi). Popülasyondaki varyasyonun kaynağının nötr mutasyon (rastgele) veya nötr olmayan mutasyondan (pozitif veya negatif seçilim) kaynaklı olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılan nötralite testlerinde nötral teorisi “sıfır hipotezi” olarak kullanılmaktadır (Hedrick, 2005).

Tajima's D değerinin negatif olması ($D < 0$), popülasyonun dengede olmadığını gösterir. Negatif değer, popülasyonda yararlı mutasyonun yayılması sonucu düşük genetik çeşitliliğin gözlenmesi şeklinde yorumlanırken, pozitif olması ($D > 0$) ise dengeleyici seçilimi işaret eder ve popülasyonda genetik çeşitliliğin varlığını gösterir. Nötralite altında ise değer “0” (sıfır) olması beklenir (Tajima, 1989; Fu, 1996). İstatistiksel olarak anlamlı olmayan ($P > 0.05$) Tajima's D değeri, popülasyonların nötral dengede olduğunu ifade eder (Stephens, 2001). D 'nin çok büyük veya çok düşük değerler ($|D| > 2$) olması sonucu, “sıfır hipotezi” reddedilir (Nielsen, 2001).

Fu ve Li's D^* ve F^* 'in negatif değer alması, popülasyondaki düşük frekanslı polimorfizimlerin yüksek oranlarda bulunduğunu, nadir gözlenen haplotip varlığı, popülasyonun genişlemesi veya arka plan seçilimi olduğu yorumu yapılır. Nötralite testleri arasındaki en güçlü metot olan Fu's F_s testi'nin negatif değer alması yüksek miktarda nadir gözlenen haplotip varlığını ve popülasyon genişlemesini ifade eder (Fu, 1997). Tajima's D (Tajima 1989), Fu ve Li's D^* ve F^* (Fu ve Li 1993) ve Fu's F_s (Fu, 1997) nötralite testleri

DNASp version 5.10.01 (Rozas ve ark., 2010) yazılım programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistik hesaplama sonuçları negatif veya pozitif olma durumlarına göre değerlendirilmiştir.

3.2.5.4. Popülasyon farklılığı testi

TSWV izolatları toplandıkları coğrafi alanlara göre (Adana, Mersin, Kahramanmaraş) 3 alt popülasyona ayrılmıştır. Alt popülasyonlar arasındaki genetik farklılığın belirlenmesi amacıyla K_{ST} , Z , S_{nn} ve F_{ST} istatistik testleri yapılmıştır.

Alt popülasyonlar arasındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesi için kullanılan F_{ST} (S: alt popülasyon, T: toplam popülasyon varyansı) 0 ile +1 arasında değer alır. 0-0.05 arasında ise düşük seviyede, 0.05-0.25 arasında ise orta düzeyde, 0.25'ten yüksek olması ise genetik çeşitliliğin oldukça yüksek olduğu yorumu yapılır (Wright, 1951; Hedrick, 2005).

K_{ST} değerinin sıfıra yakın olması durumunda alt popülasyonlar arasında genetik farklılığın olmadığını kabul eden sıfır hipotezi desteklenirken; K_{ST} değerinin artması ve istatistiki olarak anlamlı olması ($P < 0.05$) durumunda sıfır hipotezi reddedilir (Hudson ve ark., 1992). Z , değerinin çok düşük değer alması ve $P < 0.05$ ' ten küçük olması durumunda sıfır hipotezi reddedilir. S_{nn} (the nearest neighbours of sequences=en yakın komşu dizin) değerinin 1'e yaklaşması popülasyonlar arasında önemli derecede farklılığın olduğunu, ≤ 0.5 olması durumunda ise farklı lokasyonlardaki popülasyonların aynı popülasyonun parçası olduğu yorumu yapılır (Hudson, 2000).

3.2.6. TSWV izolatlarının rekombinasyon ve/veya reassortment ilişkisinin belirlenmesi

Saflaştırılmış TSWV-biber izolatlarının genom yapısında olabilecek rekombinasyon ve/veya reassortment ilişkisi L, M ve S RNA bölgelerinin kısmi çoğaltılması ile elde edilen nükleotid dizinler RDP4 (Recombination Detection Program 4.16) yazılım programı kullanılarak incelenmiştir (Martin ve Rybicki, 2010).

3.2.7. Biber genotiplerinin reassortant TSWV izolatlarına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi

Bazı biber genotiplerinin reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla T_{sw} -dayanıklılığını kıran (1) ve reassortant olduğu belirlenen (4) biyolojik klonların mekanik inokulasyonu,

dört *C. annuum* (Er Fu Tou, CM334, Maraş 6, Maraş 19) ve bir *C. baccatum* hattına (PI 439381) (Çizelge 3.4) yapılmıştır. Her izolat, dört gerçek yapraklı gelişme dönemindeki her biber genotipleri için 3 bitkiye (bkz 3.1.3) mekanik olarak taşınmıştır (bkz 3.2.3.2). Pozitif kontrol bitkisi olarak kullanılan ‘Naz F₁’ (*C. annuum*, duyarlı) çeşidine her bir izolat 3’er tekerrürlü mekanik inokülasyonu yapılmıştır. Negatif kontrol bitkileri ise genotiplere sodyum fosfat tamponuyla mekanik inokülasyon yapılarak oluşturulmuştur.

Bitkiler iklim odasında 16/8 saat (ışık/karanlık), 25 °C sıcaklık, %60 oransal nem bulunan şartlarda konularak simptom belirmesi için gözlenmiştir. Mekanik inokülasyonu takip eden süreçte, izolatların biber genotiplerinde 15, 30 ve 60. günde meydana getirdiği simptom tipi görsel olarak değerlendirilmiş, konukçu hücrelerinde çoğalması ve yayılması serolojik yöntemler (DAS-ELISA) kullanılarak izlenmiştir.

Çizelge 3.4. Reassortant izolatların mekanik olarak taşındığı biber genotipleri

KOD/Genotip Adı	Bulundurdıkları genler
PM 815 / ER FU TOU	<i>Cmr1</i>
PM 702 / Criollo de Morelos 334 (CM334)	<i>pvr1¹, Pvr4, L²</i>
PI 439381	<i>Cmr1, L²</i>
Maraş 6 (Sena (Ana) X <i>C.chacoense</i> (Baba))	<i>L⁴</i>
Maraş 19 (Maraş 46 (Ana) X <i>C.chacoense</i> (Baba))	<i>L⁴</i>

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Simptom Gözlemleri ve örnekleme alıŐmaları

Açıkta ve örtü altındaki biber yetiŐtiriciliĐi yapılan alanlarda, biber bitkilerinde yapraklarda renk açılması, yaprak kıvrılması, mozaik, i içe geçmiş dairesel lezyonlar, meyve deformasyonu, meyvede sarı ve kırmızı alan oluşumu, nekrotik lekeler gibi belirtiler gözlenmiştir (Şekil 4.1 ve 4.2). Yapılan arazi ziyaretlerinde Mart ayında örtü altındaki biber bitkilerinde simptom gözlenmezken, Nisan ayının baŐlarından itibaren TSWV-benzeri simptomlar gözlenmeye başladığı belirlenmiştir. Sıcakların artmasıyla birlikte (Haziran ortasında) rt altındaki biberlerin neredeyse tamamının virüs-benzeri simptom taşıdığı grlmŐtir. Açıkta alandaki biberlerde ise erken dönemdeki fidelerde virüs-benzeri simptomların görüldüğü kaydedilmiştir. Sıcaklıkların artması ve meyvelerin renklerinin dönmesiyle simptomların çok daha belirgin hale geldiği ve arttığı grlmŐtir.



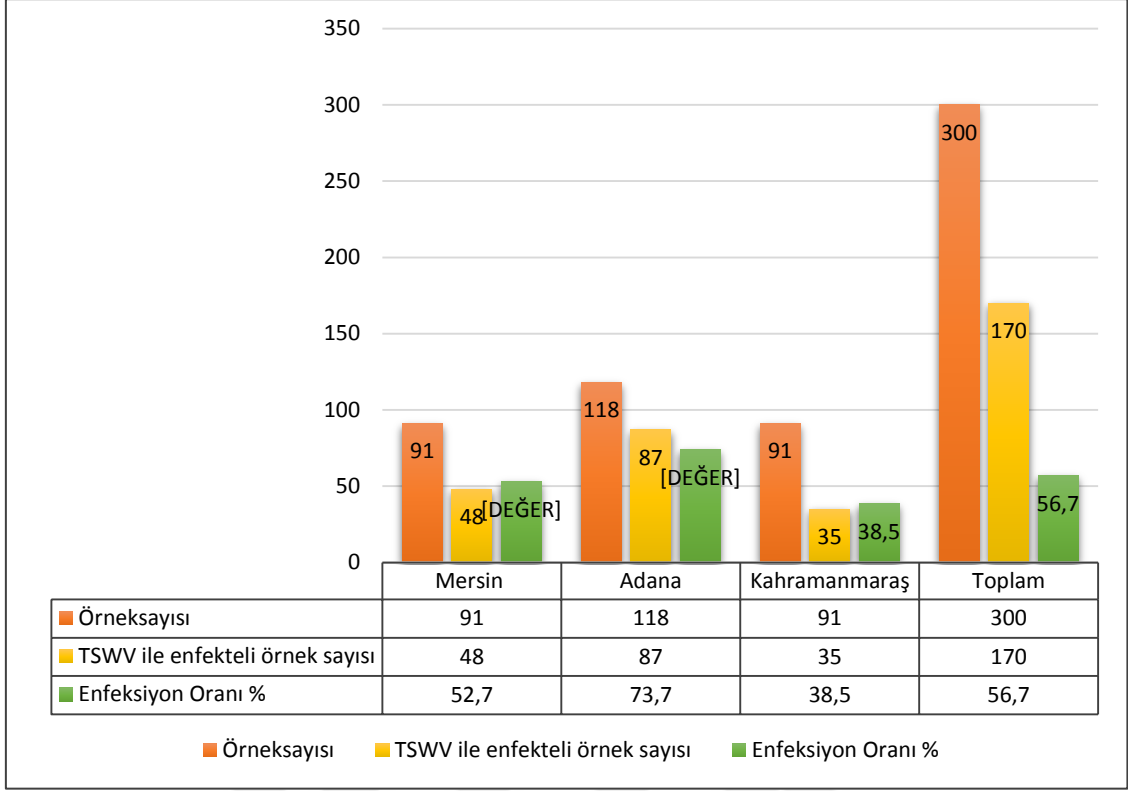
Şekil 4.1. Biber (*C. annuum*) bitkilerinin yapraklarında gözlenen TSWV benzeri belirtiler: iç içe geçmiş dairesel lezyonlar (b, c, d, f), yapraklarda renk açılması, yaprak kıvrılması, yaprak deformasyonu, açık ve koyu yeşil çizgi belirtisi (a, b, e)



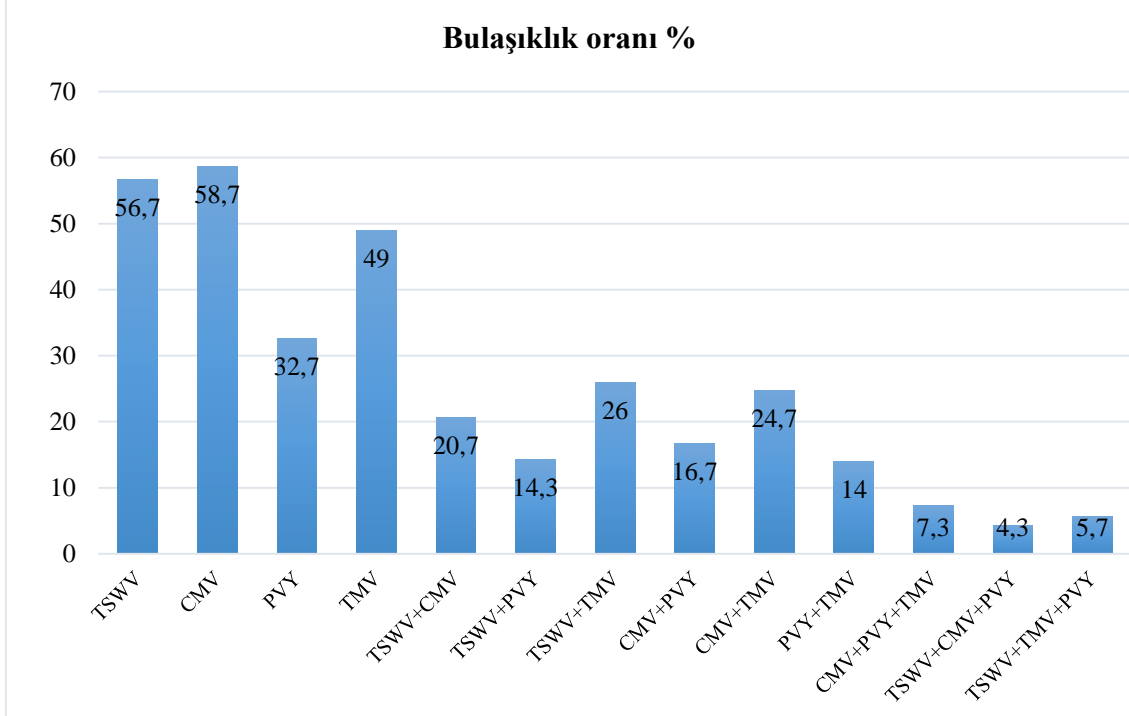
Şekil 4.2. Biber (*C. annuum*) bitkilerinin yapraklarında TSWV-benzeri belirtiler. Meyve deformasyonu ve iç içe geçmiş dairesel lezyonlar (a, b, d, f), nekrotik lekeler (c), meyvede çizgisel belirtiler oluşumu (d), sarı-kırmızı alan oluşumu (a, b, e, f)

4.2. TSWV Enfekteli Örneklerin Seçimi

Adana, Mersin ve Kahramanmaraş illerindeki açıkta ve örtü altındaki biber üretim alanlarından 2017-2019 yıllarında TSWV-benzeri belirtiler taşıyan toplam 300 meyve ve yaprak örneği toplanmıştır. Tüm örneklerin TSWV spesifik poliklonal antiserum kullanılarak DAS-ELISA ile testlenmesi sonucunda örneklerde TSWV ile bulaşıklık düzeyinin %56.7 olduğu bulunmuştur. TSWV enfeksiyonu illere göre değişiklik göstermekle birlikte testlenen tüm örnekler içerisinde TSWV'nin Adana'dan alınan örneklerin % 73.7, Mersin'den alınan örneklerin % 52.7 ve Kahramanmaraş'tan alınan örneklerin ise %38.5'inde bulunduğu teşhis edilmiştir (Şekil 4.3). Araştırma için toplanan tüm örnekler Akdeniz havzasında yaygın olarak bulunan CMV, TMV ve PVY için de virüs-spesifik poliklonal antiserumla testlendiklerinde virüslerin sırasıyla %58.7, % 49 ve % 32.7 düzeyinde yaygın olduğu sonucu elde edilmiştir (Şekil 4.4). TSWV'nin araştırma alanından toplanan örneklerde diğer virüslerle karışık enfeksiyon yapma düzeyleri incelendiğinde en yüksek TSWV+TMV (%26) olarak belirlenirken bunu CMV+TMV (%24.7), TSWV+CMV (% 20.7), CMV+PVY (16.7), TSWV+PVY (%14.3) ve PVY+TMV (%14) olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.4). Üç virüs ile karışık enfeksiyon taşıyan örneklerde ise en fazla CMV+PVY+TMV (%7.3) kombinasyonun olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.3. Testlenen örneklerde TSWV tanısı konmuş örneklerin illere göre dağılım oranları



Şekil 4.4. Biber örneklerinin TSWV, CMY, TMV ve PVY ile bulaşıklık durumu

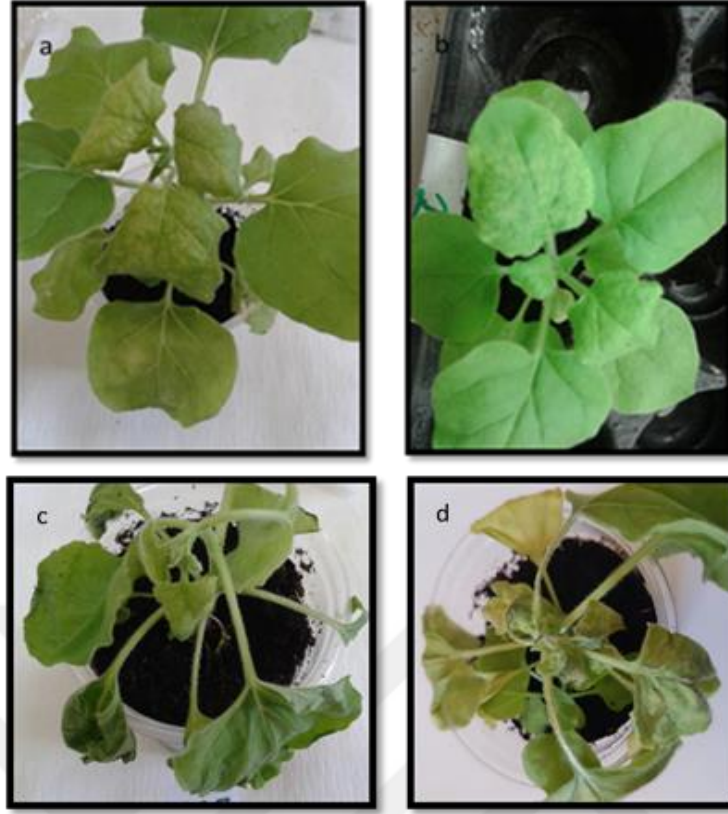
4.3. TSWV İzolatlarının Otçu Konukçularda Çoğaltılması

TSWV'nin tekli enfeksiyonunu taşıyan 14 izolat *N. tabacum* cv. Samsun NN ve *N. benthamiana* bitkilerine mekanik olarak taşınmıştır. İndikatör bitkilerde TSWV'nin neden olduğu simptomlar, inokulasyondan sonra 4-10 gün içerisinde gözlenmiştir. *N. benthamiana* bitkilerinde genel sarılık, mozaik lekeler ve yaprak kıvrılması (Şekil 4.5) gözlenirken; *N. tabacum* cv. Samsun NN bitkilerinde ise lokal nekrotik ve klorotik halka lekeler, helezonik belirti ve yapraklarda kıvrılma (Şekil 4.6) meydana gelmiştir.

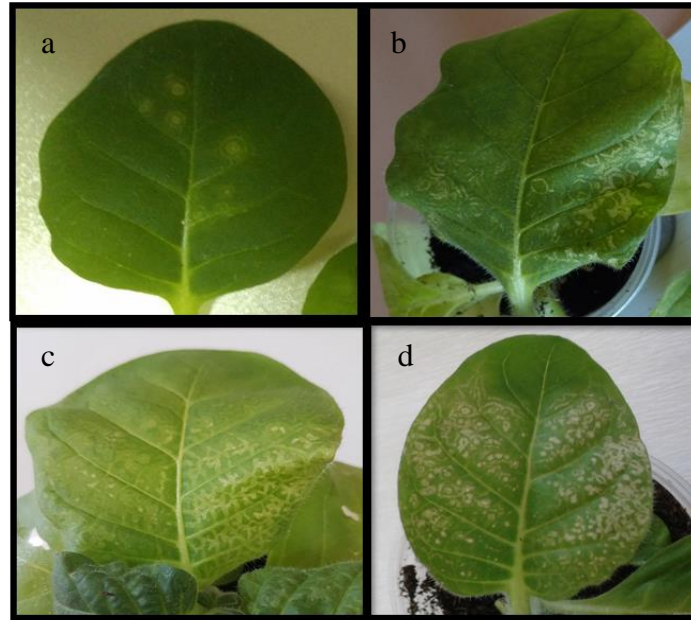
Tekli TSWV enfeksiyonunu taşıdığı belirlenen TRpep-37, TRpep-47, TRpep-59, TRpep-67, TRpep-171 ve TRpep-175 izolatları Mersin ilindeki, TRpep-125, TRpep-146, TRpep-150, TRpep-154 ve TRpep-160 izolatları Adana ilindeki örtü altında yetiştirilen *Tsw* geni taşıyan biber çeşitlerinden elde edilmiştir. TRpep-209 Adana, TRpep-219 Mersin ve TRpep-272 ise Kahramanmaraş ilindeki açıkta yetiştiricilik yapılan alanlardan elde edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Tekli TSWV enfeksiyonu taşıyan örnek sayısı

Tekli TSWV enfeksiyonu/Toplam örnek sayısı	Adana	Mersin	Kahramanmaraş
	6/118	7/91	1/91
		14/300	



Şekil 4.5. TSWV izolatlarının *N. benthamiana* bitkilerinde meydana getirdiği belirtiler: genel kloroz ve yaprak kıvrılması (a), mozaik lekeler (b), şiddetli kloroz ve bitki ölümü (c, d)



Şekil 4.6. TSWV izolatlarının enfekteli *N. tabacum* cv. Samsun NN bitkilerinde meydana getirdiği belirtiler: klorotik halka lekeler (a, b, c), damarlarda renk açılması (c), nekrotik halka lekeler (d)

4.4. Biyolojik Klonların Biyolojik Karakterizasyonu

V. unguiculata üzerine mekanik olarak taşınan TSWV izolatları inokulasyon yapılan yapraklarda inokulasyondan 3-5 gün sonra lokal klorotik lekeler (Şekil 4.7) neden olmuştur. Her bitkiden en az 10 lezyon alınarak *N. benthamiana* ve *N. tabacum* cv. Samsun NN bitkilerine taşınarak saflaştırılmıştır. İnokulasyonda her izolat için üç bitki kullanılmıştır. İnokulasyondan 7-14 gün sonra *N. tabacum* cv. Samsun NN bitkilerinde, izolatlar göre değişen farklı belirtiler olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.8-4.16). İndikatör bitkiler TSWV, CMV, TMV ve PVY için DAS-ELISA ile testlenerek, TSWV izolatlarının virüsün tekli enfeksiyonundan elde edildiği doğrulanmıştır. Saflaştırılan biyolojik klonlar “TR”=Türkiye, “pep”=biber kısaltmaları ve izolat numarası kullanılarak isimlendirilmiştir (Örnek: TRpep-49).

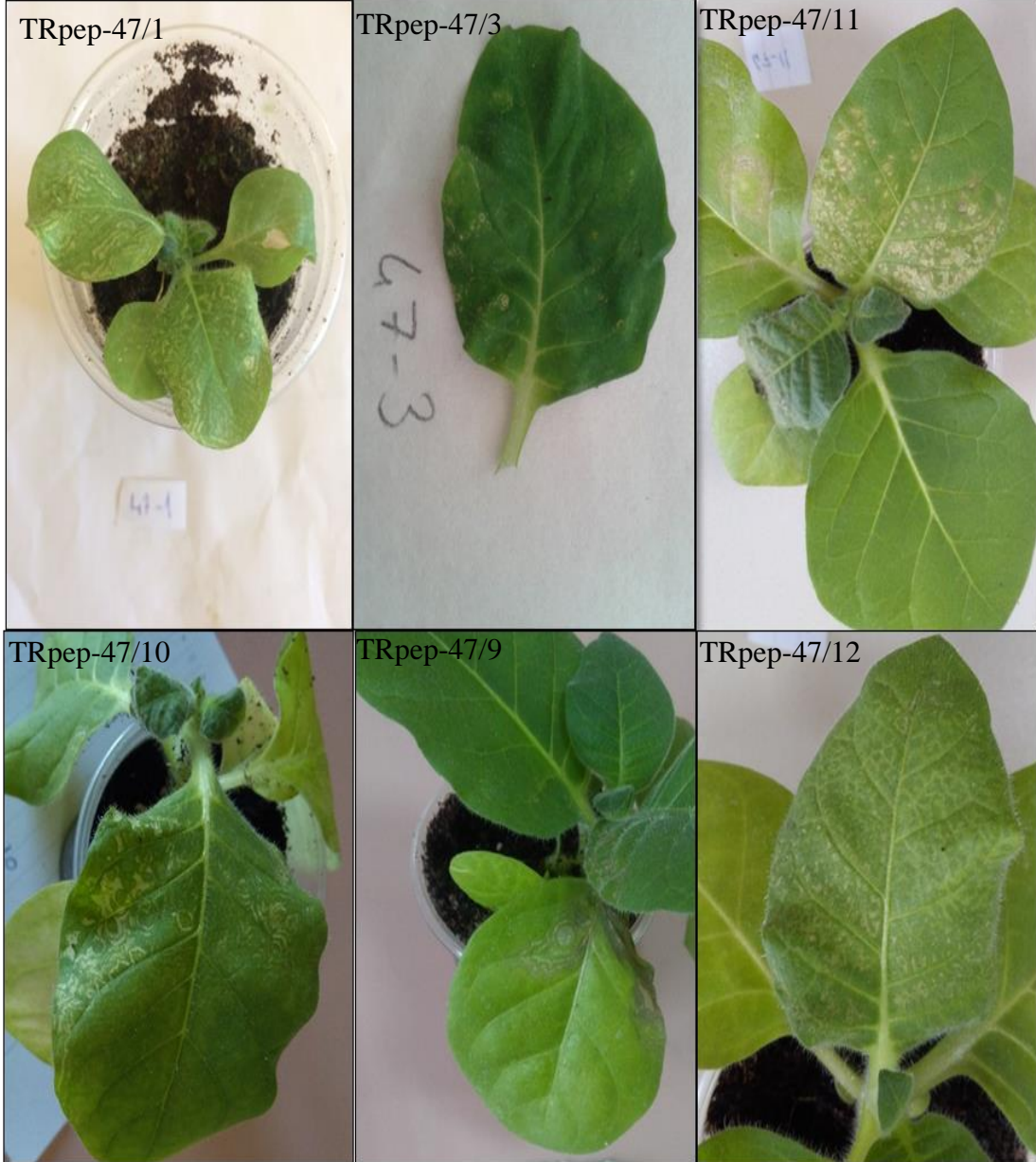


Şekil 4.7. TSWV izolatlarının *V. unguiculata* bitkilerinde neden olduğu lokal lezyonlar

TSWV izolatlarının biyolojik klonları, *N. benthamiana* bitkilerinde genel olarak kloroz, yaprak kıvrılması ve solgunluk belirtilerine neden olmuştur. Aynı biyolojik klonlar *N. tabacum* cv. Samsun NN bitkilerinde ise lokal nekrotik ve klorotik halka lekeler, helezonik belirti ve yapraklarda kıvrılma gibi belirtiler oluşmuştur. *N. tabacum* cv. Samsun NN üzerinde TSWV izolatlarının biyolojik klonlarının belirtiler çeşitliliğine neden olması, açıkta ve örtü altından alınan biber örneklerinde virüsün farklı tipteki izolatlarının karışık enfeksiyon şeklinde bulunduğunu göstermektedir. Mekanik inokulasyon sonucu *N. tabacum* cv. Samsun NN bitkilerinde meydana getirdikleri belirtiler açısından farklılık gösteren bazı izolatların fotoğrafları aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.8-Şekil 4.16).

TRpep-47 izolatının biyolojik klonları *N. benthamiana* bitkilerinde genel olarak kloroz ve yaprak kıvrılmasına neden olmuştur. TRpep-47 izolatlarının biyolojik klonları

ise *N. tabacum* cv Samsun NN bitkilerinde farklı simptomlara neden olmuştur: TRpep-47/1 biyolojik klonu helezonik ve klorotik halka lekeler oluştururken, TRpep-47/3, TRpep-47/10 biyolojik klonu inokulasyon yapılan yapraklarda klorotik halka lekeler oluşturmuştur. TRpep-47/12 biyolojik klonunun bitkide damarlarda renk açılmasına neden olduğu gözlenmiştir. TRpep-47/11 biyolojik klonu yapraklarda nekrotik halka lekelerine neden olmuştur. TRpep-47/9 inokulasyon yapılan yaprakta halka leke oluşturmuş ve kısa süre sonra bu yapraklar ölmüştür (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. TRpep-47 izolatının biyolojik klonlarının *N. tabacum* cv. Samsun NN bitkilerinde meydana getirdiği simptomlar

TRpep-67/1 biyolojik klonu *N. tabacum* cv Samsun NN bitkilerinin inokulasyon yapılan yapraklarında nekrotik halka lekeler, TRpep-67/2 ve TRpep-67/7 biyolojik klonları klorotik halka lekeler oluşturmuştur (Şekil 4.9). TRpep-67 biyolojik klonlarının *N. benthamiana* bitkilerine inokulasyonundan 3 gün sonra şiddetli klorozla birlikte bitki ölümünün gerçekleşmesine neden olduğu görülmüştür (Şekil 4.10).



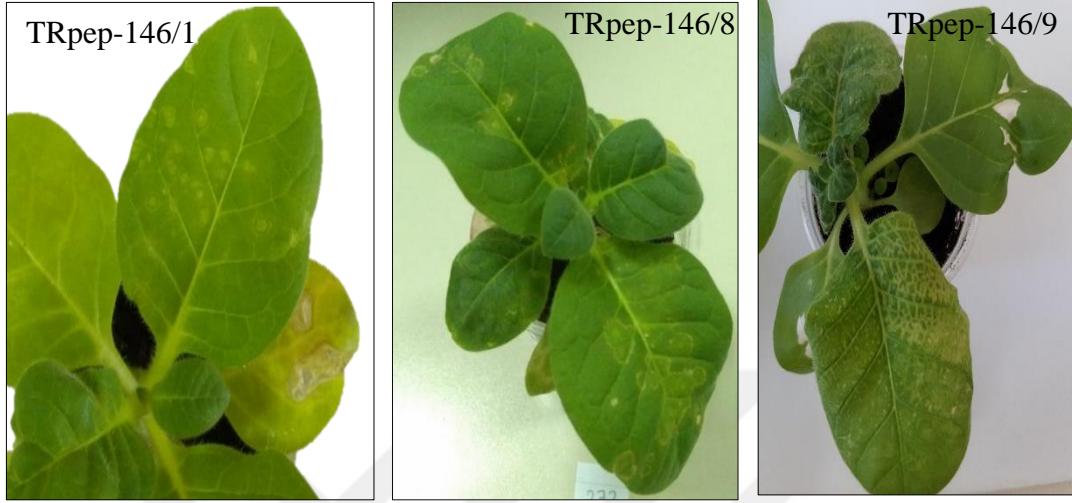
Şekil 4.9. TRpep-67 izolatının biyolojik klonlarının *N. tabacum* cv. Samsun NN bitkilerinde meydana getirdiği belirtiler



Şekil 4.10. TRpep-67 izolatının biyolojik klonlarının *N. benthamiana* bitkilerinde meydana getirdiği belirtiler

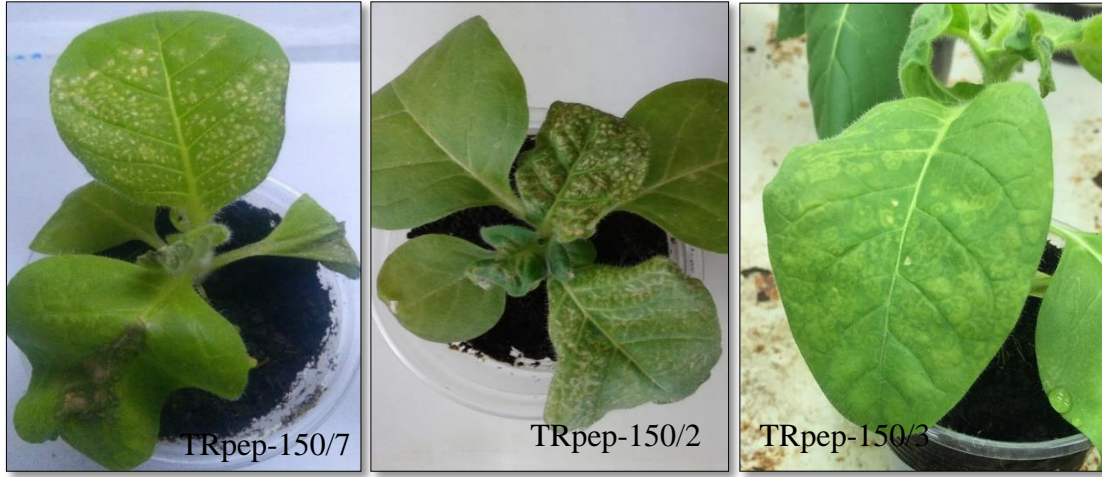
TRpep-146/1 ve TRpep-146/8 biyolojik klonları *N. tabacum* cv. Samsun NN bitkilerinde inokulasyon yapılan yapraklarda klorotik halkasal lekeler oluştururken,

inokulasyon yapılmayan yapraklarda simptom gözlenmemiştir. TRpep-146/9 izolatu ise klorotik halka leke ve damarlarda renk açılmasına neden olmuştur (Şekil 4.11). TRpep-146 izolatının biyolojik klonları *N. benthamiana* bitkilerinde genel olarak kloroz ve yaprak kıvrılmasına neden olmuştur.



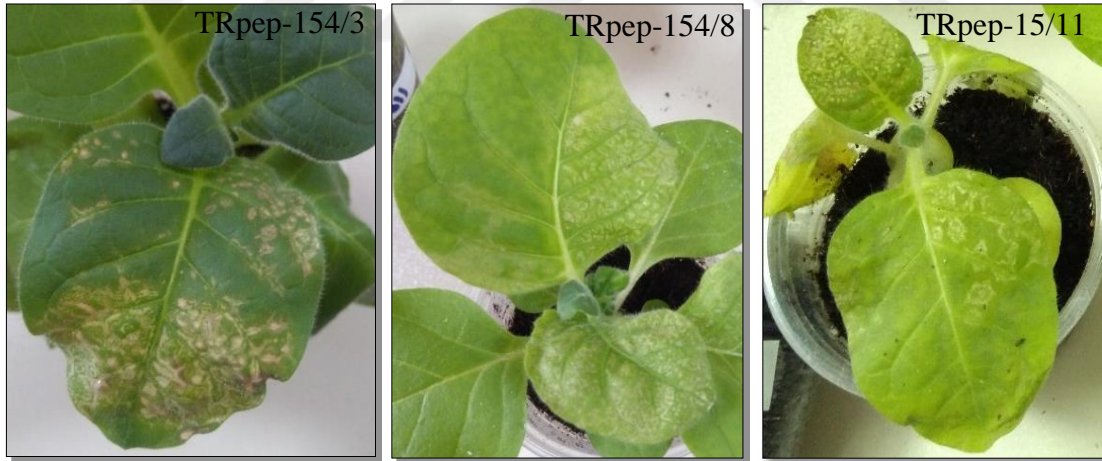
Şekil 4.11. TRpep-146 izolatının biyolojik klonlarının *N. tabacum* cv. Samsun NN bitkilerinde meydana getirdiği belirtiler

TRpep-150/7 biyolojik klonu *N. benthamiana* bitkisinde inokulasyon sonucu bitki ölümüne neden olurken, *N. tabacum* cv. Samsun NN bitkisinde inokulasyon yapılan yapraklarda 3 gün sonra HR belirtileri gösterip, yeni oluşan yapraklarda nekrotik simptom oluşturmuştur (Şekil 4.12). TRpep-150/2 biyolojik klonu inokulasyon yapılan yaprakta damarlarda renk açılması ve yeni çıkan yaprakta ise nekrotik lekelerle neden olmuştur. TRpep-150/3 ise klorotik halka lekeler oluşturmuştur. TRpep-150 izolatının biyolojik klonları *N. benthamiana* bitkilerinde genel olarak kloroz ve yaprak kıvrılmasına neden olmuştur.



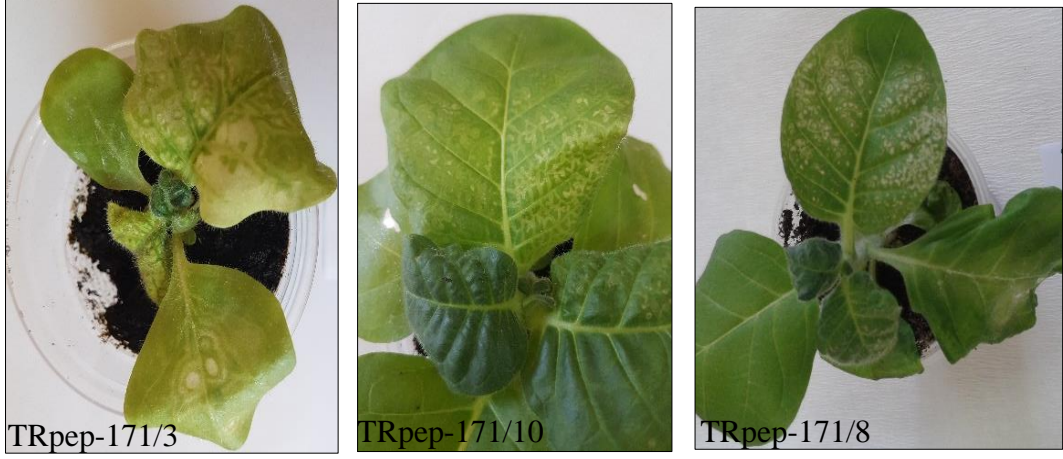
Şekil 4.12. TRpep-150 izolatının biyolojik klonlarının *N. tabacum* cv. Samsun NN bitkilerinde meydana getirdiği belirtiler

TRpep-154/3 biyolojik klonu *N. tabacum* cv. Samsun NN'da nekrotik belirtiler oluşumuna sebep olurken, TRpep-154/8 ve TRpep-154/11 biyolojik klonu ise klorotik halka lekeler oluşturmuştur ve bitkilerde genel sarılık görülmüştür (Şekil 4.13). TRpep-154 izolatının biyolojik klonları *N. benthamiana* bitkilerinde genel olarak kloroz ve yaprak kıvrılmasına neden olmuştur.



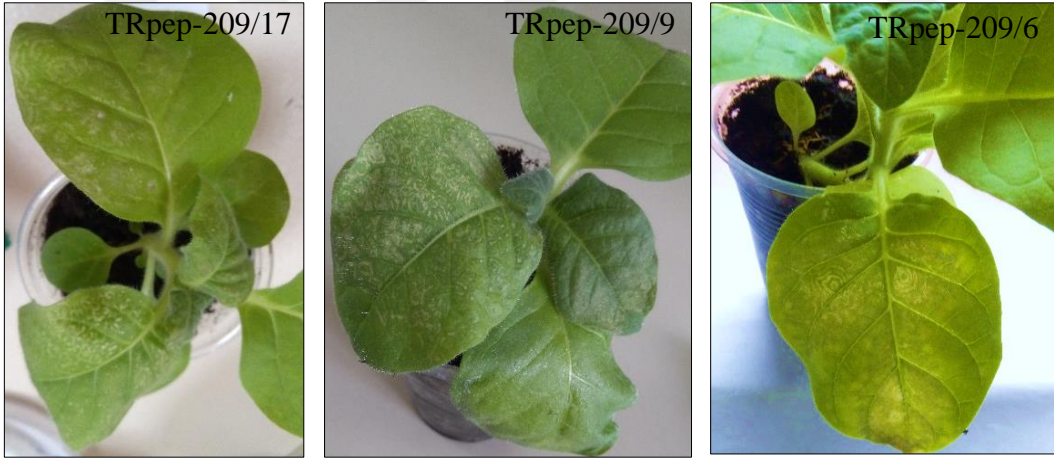
Şekil 4.13. TRpep-154 izolatının bazı biyolojik klonlarının *N. tabacum* cv. Samsun NN bitkilerinde meydana getirdiği belirtiler

TRpep-171/3 ve TRpep-171/10 biyolojik klonları *N. tabacum* cv. Samsun NN'da klorotik halka leke, kloroz ve yaprakta kıvrılmaya, TRpep-171/8 nekrotik belirtiler ve diğer biyolojik klonlar ise damarlarda renk açılmasına ve klorotik halka leke oluşumuna neden olmuştur (Şekil 4.14). TRpep-171 izolatının biyolojik klonları *N. benthamiana* bitkilerinde genel olarak kloroz ve yaprak kıvrılmasına neden olmuştur.



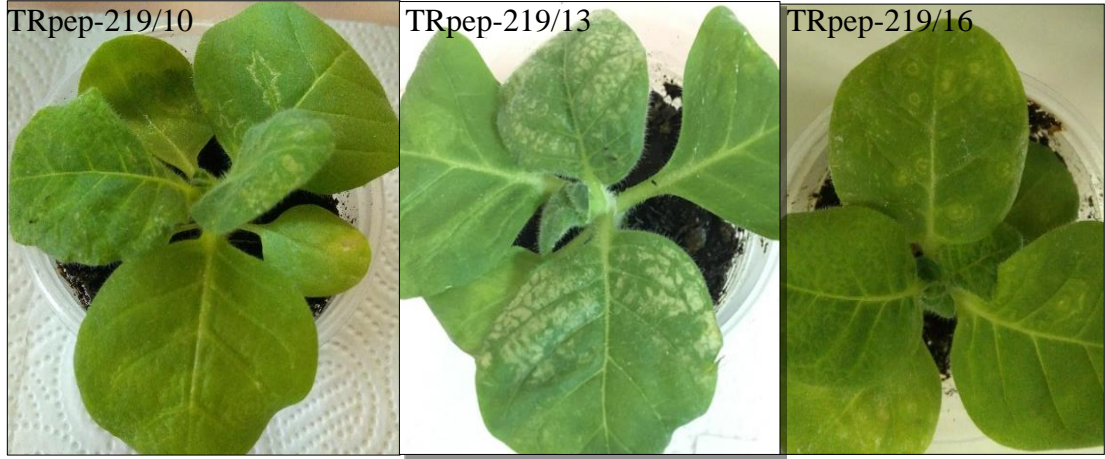
Şekil 4.14. TRpep-171 izolatının bazı biyolojik klonlarının *N. tabacum* cv. Samsun NN bitkilerinde meydana getirdiği belirtiler

TRpep-209/6 ve TRpep-209/17 biyolojik klonları *N. tabacum* cv. Samsun NN bitkilerinde genel olarak klorotik halka lekeler ve damarlarda renk açılmasına neden olurken, TRpep-209/9 biyolojik klonu ise nekrotik belirtiler oluşumuna sebep olmuştur (Şekil 4.15). TRpep-209 klonları *N. benthamiana* bitkilerinde genel olarak kloroz ve yaprak kıvrılmasına neden olmuştur.



Şekil 4.15. TRpep-209 izolatının bazı biyolojik klonlarının *N. tabacum* cv. Samsun NN bitkilerinde meydana getirdiği belirtiler

TRpep-219/10 biyolojik klonu *N. tabacum* cv. Samsun NN’da helezonik ve klorotik halka lekeler oluştururken, TRpep-219/13 biyolojik klonu nekrotik belirtiler oluşturmuştur. TRpep-219/16 biyolojik klonu ise iç içe geçmiş klorotik halka lekeler ve damarlarda renk açılmasına neden olmuştur (Şekil 4.16). TRpep-219 klonları *N. benthamiana* bitkilerinde genel olarak kloroz, yaprak kıvrılmasına neden olmuştur.



Şekil 4.16. TRpep-219 izolatının biyolojik klonlarının *N. tabacum* cv. Samsun NN bitkilerinde meydana getirdiği belirtiler

Ayrıca, biyolojik klonlar duyarlı (*C. annuum*) ve dayanıklı (PI 152225, *C. annuum*^{T_{sw}}) biber genotiplerine mekanik olarak taşınarak, izolat-konukçu interaksyonu incelenmiştir (Ek 7). Denemede negatif kontrollerde belirtiler oluşumu gözlenmezken, virüs izolatlarının biyolojik klonlarının biber genotiplerinde farklı fenotip özellikler gösterdikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2’de belirtilen enfeksiyon oluşturmeyen biyolojik klonlar haricindeki tüm klonlar *T_{sw}* geni taşımayan (duyarlı) biber bitkilerinde, inokulasyon yapılan yapraklarında mekanik inokulasyondan 6-10 gün sonra klorotik halka lekelerine neden olmuştur. Klonların sistemik enfeksiyonu sonucu ise test bitkilerinin yeni çıkan yapraklarında yaprak kıvrılması, küçük yaprak oluşumu kaydedilmiştir (Şekil 4.17). İnokulum kalitesinden kaynaklı bazı klonların enfeksiyon oluşturmadığı düşünülmektedir. Bazı arazi izolatlarında *T_{sw}* dayanıklılığını kıran ve kırmayan ırkların karışık enfeksiyon halinde bulunduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. TSWV izolatlarının biyolojik klonlarının virülensliği

İzolat	Enfeksiyon oluşturmayan biyolojik klon sayısı	Dayanıklılığı kırmayan biyolojik klon sayısı	Dayanıklılığı kıran biyolojik klon sayısı	Alındığı İl/Yetiştiricilik Şekli
TRpep-37	-	11	-	Mersin/Örtü altı
TRpep-47	3	14	4	Mersin/Örtü altı
TRpep-59	-	14	-	Mersin/Örtü altı
TRpep-67	-	9	2	Mersin/Örtü altı
TRpep-125	-	12	-	Adana/Örtü altı
TRpep-146	-	14	2	Adana/Örtü altı
TRpep-150	-	11	1	Adana/Örtü altı
TRpep-154	1	13	1	Adana/Örtü altı
TRpep-160	-	10	-	Adana/Örtü altı
TRpep-171	-	12	1	Mersin/Örtü altı
TRpep-175	-	13	1	Mersin/Örtü altı
TRpep-209	-	14	3	Adana/Açık
TRpep-219	-	15	1	Mersin/Açık
TRpep-272	-	12	-	Kahramanmaraş/ Açık
Toplam	4	174	16	
194				



Şekil 4.17. Biyolojik klonların duyarlı biber (*C. annuum* cv. Naz F₁) bitkilerinde meydana getirdiği simptomlar

Virüs izolatlarının biyolojik klonları, *C. annuum*^{Tsw} ve PI 152225 (*C. chinense*) biber genotiplerinde çeşitli simptomlara neden olmuştur. Bunlar;

(i) inokulasyondan 3-5 gün sonra inokulasyon yapılan yapraklarda aşırı duyarlılık reaksiyonu sonucu lokal nekrotik lezyonlar oluşmuş ve 7-10 gün sonrasında yapraklar dökülmüştür (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19).

(ii) sistemik enfeksiyon sonucu mozaik, klorotik lekeler ve iç içe geçmiş dairesel lezyonlar (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21),

(iii) uç yapraklarda (inokulasyon yapılmayan) kloroz ve toplu iğne başı büyüklüğünde oluşan nekrotik lezyonlar (Şekil 4.22),

(iv) şiddetli sistemik nekroz sonucu bitki ölümü (Şekil 4.23) gerçekleşmiştir.



Şekil 4.18. TRpep-209/3 klonunun PI 152225’de meydana getirdiği aşırı duyarlılık reaksiyonu



Şekil 4.19. Biyolojik TSWV klonlarının mekanik inokulasyonu sonucu *Tsw* geni taşıyan biber bitkilerinde (*C. annuum*^{*Tsw*}, PI 152225) inokulasyon yapılan yapraklarda oluşan lokal nekrotik lezyonlar



Şekil 4.20. TRpep-67/2 ve TRpep-154/8 klonlarının mekanik inokulasyonu sonucu *Tsw* geni taşıyan (*C. annuum*^{*Tsw*}, PI 152225) biber bitkilerinde meydana gelen kloroz, yaprak küçülmesi ve kıvrılması belirtileri



Şekil 4.21. Biyolojik TSWV klonlarının mekanik inokulasyonu sonucu *Tsw* geni taşıyan (*C. annuum*^{*Tsw*}, PI 152225) biber bitkilerinde meydana gelen sistemik enfeksiyon sonucu oluşan semptomlar

TRpep-209/3 biyolojik klonunun dayanıklı biber genotiplerinin inokulasyon yapılan yapraklarında, inokulasyondan 4-6 gün sonra nekrotik lekeler oluşturmuştur. Daha sonrasında enfeksiyon yapılmayan yaprakta toplu iğne başı büyüklüğünde nekrotik lekeler olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. TRpep-209/3 klonunun PI 152225 bitkisinin genç yapraklarında neden olduğu nekrotik lezyon

TRpep-47 (TRpep-47/17, TRpep-47/9) ve TRpep-150 (TRpep-150/7) izolatlarının bazı biyolojik klonları dayanıklı biber genotiplerinde; inokulasyon yapılan yapraklarda 4-6 gün sonra nekrotik lekeler neden olmuş ve inokulasyondan 8-10 gün sonra yaprakların öldüğü gözlenmiştir. İnokulasyondan 23-28 gün sonrasında uç yapraklarda nekroz oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.23).

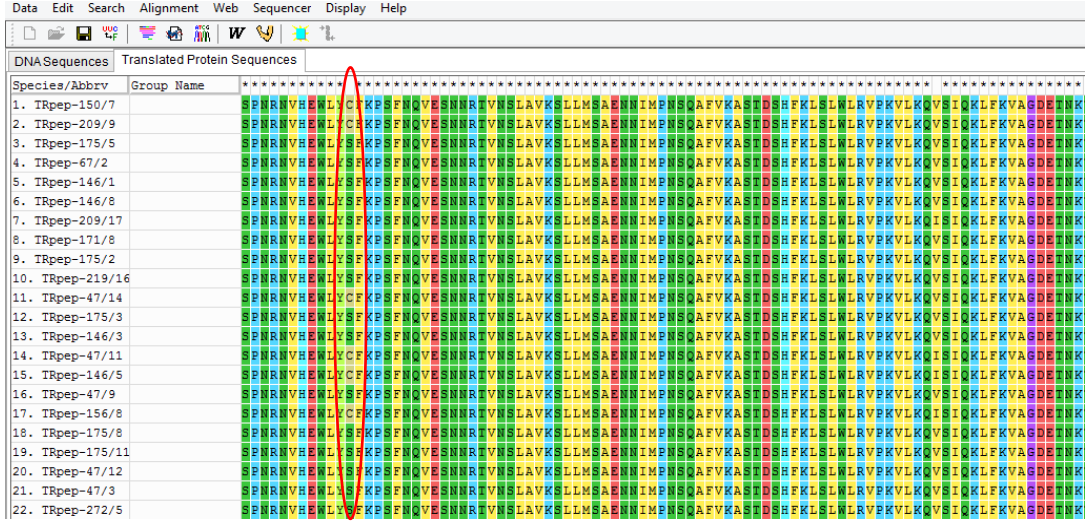


Şekil 4.23. TRpep-150/7, TRpep-47/17 ve TRpep-47/9 TSWV klonlarının mekanik inokulasyonu sonucu PI 152225 bitkilerindeki sistemik nekroz sonucu bitki ölümü

4.5. NSs Gen Bölgesi Amino Asit Dizilerinin Karşılaştırılması

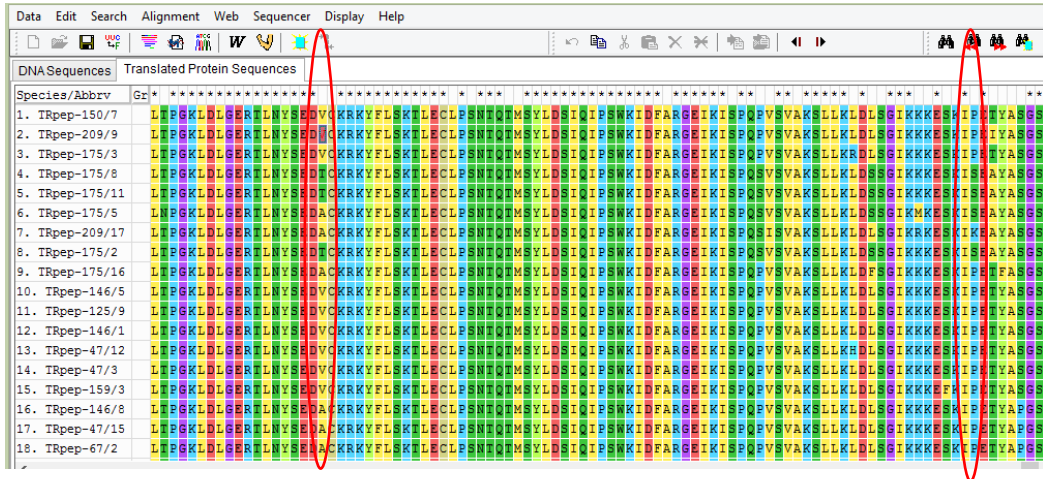
NSs proteininin konukçu bitkinin gen susturma mekanizmasını baskılayan protein ve *Tsw* dayanıklılık geni için *avr* protein olarak rol oynamaktadır. Bu gen bölgesinde meydana gelen mutasyon veya mutasyonlar sonucunda *Tsw* dayanıklılığının kırıldığı bilinmektedir. Klonlar arasında ortak bir mutasyon varlığını belirlemek amacıyla bölüm 4.4'te biyolojik karakterizasyonu yapılan TSWV izolatlarının biyolojik klonları seçilmiş (104) ve karşılaştırılmıştır. *Tsw* dayanıklılığını kıran ve kırmayan TSWV biyolojik klonlarının NSs gen bölgesinin 843 nt uzunluğundaki DNA dizisinden elde edilen aa dizinleri (281 aa) karşılaştırıldığında birkaç amino asit pozisyonunda farklılıklar belirlenmiştir.

TSWV biyolojik klonlarının 12. aa pozisyonunda Serin (S) veya Sistein (C) bulunmaktadır. TRpep-150/7 ve TRpep-209/9 hariç diğer dayanıklılığı kıran biyolojik klonların, aynı pozisyondaki sahip olduğu amino asitin Serin (S) olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.24)



Şekil 4.24. TSWV biyolojik klonlarının 12. aa pozisyonundaki değişimin gösterilmesi

Dayanıklılığı kırmayan TRpep-175/2, TRpep-175/8, TRpep-175/11 biyolojik klonlarının 203. aa pozisyonunda Treonin (T) bulunurken, TRpep-175 nolu izolatin diğer biyolojik klonlarında Valin (V) yer almaktadır. Aynı pozisyonda diğer biyolojik klonlarda ise Valin (V), Alanin (A) veya İzolösün (I) bulunmaktadır (Şekil 4.25). Ayrıca, biyolojik klonların 273. aa pozisyonunda Proline (P) veya Serin (S) bulunurken, TRpep-209/17 dayanıklılığı kıran biyolojik klonunda Lizin (K) yer almaktadır. Fakat, *Tsw* dayanıklılığını kıran ve kırmayan izolatlar arasında belirlenen spesifik bir aa değişimi belirlenmemiştir.



nükleotid dizinlerinin, NCBI'da kayıtlı diğer TSWV izolatlar ile çoklu karşılaştırması yapılmıştır. TSWV-biber izolatlarının akrabalık ilişkilerinin ve olası coğrafi orijinlerinin belirlenmesi amacıyla filogenetik analiz yapılmıştır. Filogenetik analiz MEGA6 programında Neighbor-joining (Saitou ve Nei, 1987) metodu ve Kimura 2 parametre modeli kullanılarak yapılmış, bootstrap değeri 1000 olarak alınmıştır.

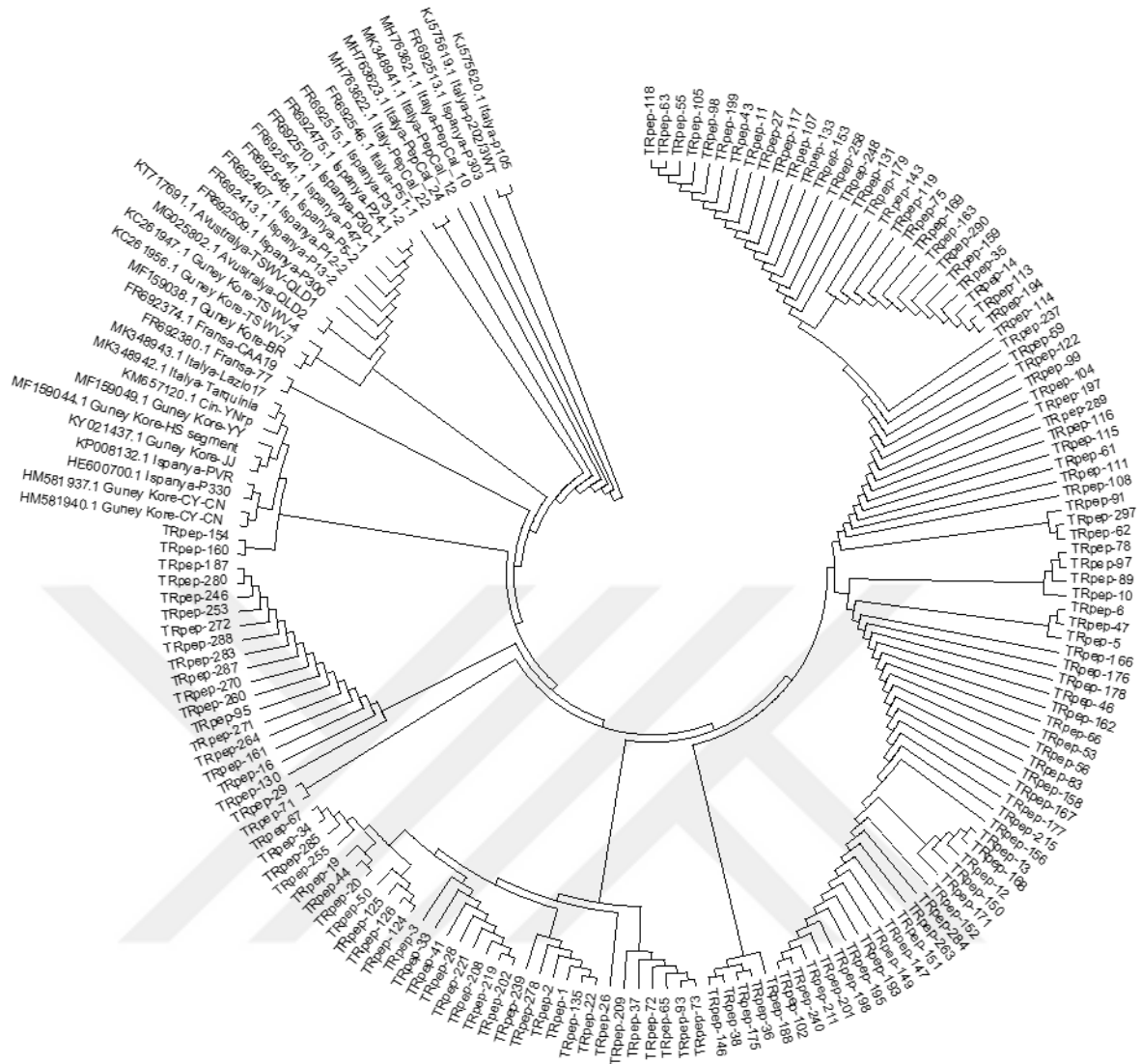
Türk TSWV-biber izolatlarının L RNA segmentinin RdRp gen bölgesinin filogenetik analizi (Şekil 4.26) 950 nt uzunluğundaki DNA dizinleri kullanılarak NCBI'da kayıtlı 33 biber izolatı (Çizelge 4.3) ile gerçekleştirilmiştir. Türk TSWV-biber izolatlarının kendi aralarındaki nükleotid benzerliği %95-100, aa benzerliğinin ise %94-100 arasında olduğu belirlenmiştir. Filogenetik ağaç üzerinde izolatların genel olarak coğrafi orijinlerine göre gruplandığı görülmüştür. Türk TSWV-biber izolatlarının NCBI'da kayıtlı diğer izolatlar (Çizelge 4.3) ile nükleotid ve aa benzerlik oranının %93.2-99.2 arasında olduğu belirlenmiştir. İtalya'dan kayıt altına alınmış izolatlar (KJ575620.1, KJ575619.1) hariç, düşük oranda benzerlik belirlenmiştir. TRpep-154 ve TRpep-160 izolatları, diğerlerinden farklı olarak Güney Kore (HM581940.1, HM581937.1, MF159049.1, KY021437.1, MF159044.1), Çin (KM657120.1), İspanya (HE600700.1, KP008132.1) ve İtalya (MK348943.1, MK348942.1) izolatları (Çizelge 4.3) ile aynı kladda yer almıştır (Şekil 4.26).

Çizelge 4.3. L RNA segmentinin kodladığı RdRp gen bölgesinin filogenetik analizinde kullanılan izolatlar

Erişim Numarası	Orijin
FR692513.1	İspanya
FR692509.1	İspanya
FR692541.1	İspanya
FR692510.1	İspanya
FR692515.1	İspanya
FR692380.1	Fransa
FR692374.1	Fransa
FR692407.1	İspanya
HM581940.1	Güney Kore
MF159049.1	Güney Kore
HE600700.1	İspanya
HM581937.1	Güney Kore

Çizelge 4.3.'ün devamı

MK348942.1	İtalya
KP008132.1	İspanya
KY021437.1	Güney Kore
MK348941.1	İtalya
MH763621.1	İtalya
MK348943.1	İtalya
MG025802.1	Avustralya
KC261947.1	Güney Kore
MF159038.1	Güney Kore
KC261956.1	Güney Kore
MH763622.1	İtalya
MH763623.1	İtalya
KJ575619.1	İtalya
KT717691.1	Avustralya
KJ575620.1	İtalya
KM657120.1	Çin
MF159044.1	Güney Kore
FR692546.1	İtalya



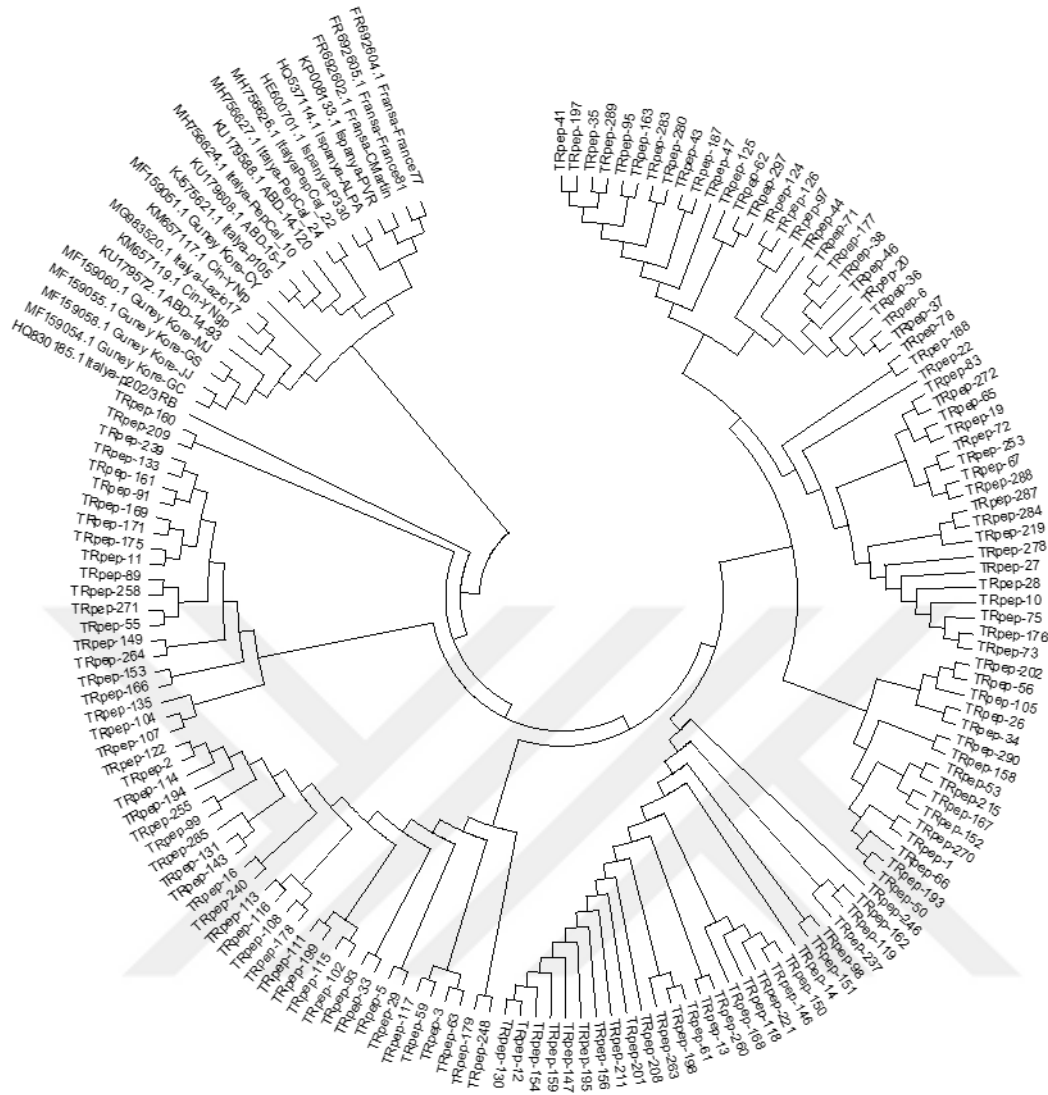
Şekil 4.26. Türk TSWV-biber izolatlarıyla NCBI'da kayıtlı diğer TSWV izolatlarının RdRp gen bölgesine göre filogenetik analizi

Türk TSWV-biber izolatlarının M RNA segmentinin kodladığı NSm geninin 771 nt uzunluğundaki DNA dizinleriyle homoloji gösteren, NCBI'da kayıtlı 22 biber izolatı (Çizelge 4.4) kullanılarak filogenetik analiz (Şekil 4.27) yapılmıştır. Türk TSWV-biber izolatlarının kendi aralarındaki nükleotid benzerliği %97-100, aa benzerliğinin ise %96-100 arasında olduğu belirlenmiştir. Türk TSWV-biber izolatlarının çizelge 4.4'te belirtilen izolatlarla nükleotid benzerliğinin %92-96.4, aa benzerliğinin ise %94.8-99 düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Türk TSWV-biber izolatları NSm gen bölgesine göre İtalya izolatıyla (HQ830185.1) %98.1-99.3 düzeyinde nükleotid, %99-100 aa benzerliğine sahip ve diğer izolatlardan ayrı bir grup oluşturmuştur. Diğer 21 izolat Türk TSWV-biber izolatlarından farklı bir kladda yer alarak, ayrı bir grup oluşturmuştur (Şekil 4.27).

Diğer konukçu bitkilerden elde edilen gen bankasında kayıtlı TSWV izolatları ile yapılan Blast analizinde 21 Türk TSWV izolatının, İspanya (HM015515.1, HM015517.1, HM015521.1) ve Fransa (MK792775.1)'dan bildirilen domates izolatları ile aynı grupta yer alıp, İspanya izolatlarıyla (HM015515.1, HM015517.1, HM015521.1) %97.8-99 nükleotid ve % 99.2-100 aa, Fransa izolatıyla (MK792775.1) %97.4 nükleotid, % 99.6 aa benzerliği gösterdiği saptanmıştır. ABD'de dahlia (AY744486.1), Sırbistan'da tütün (GQ373174.1) ve Güney Kore'de marul (KC261966.1) izolatlarıyla %98.4-99 nükleotid, %99.2-99.6 aa benzerliği belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. M RNA segmentinin kodladığı NSm gen bölgesinin filogenetik analizinde kullanılan izolatlar

Erişim Numarası	Orijin
KU179572.1	A.B.D
KU179588.1	A.B.D
MG983520.1	İtalya
MH756624.1	İtalya
HE600701.1	İspanya
HQ537114.1	İspanya
MH756627.1	İtalya
KJ575621.1	İtalya
KP008133.1	İspanya
MF159054.1	Güney Kore
MF159055.1	Güney Kore
MH756626.1	İtalya
MF159058.1	Güney Kore
KU179608.1	A.B.D
MF159060.1	Güney Kore
HQ830185.1	İtalya
MF159051.1	Güney Kore
KM657119.1	Çin
KM657117.1	Çin
FR692605.1	Fransa
FR692604.1	Fransa
FR692602.1	Fransa



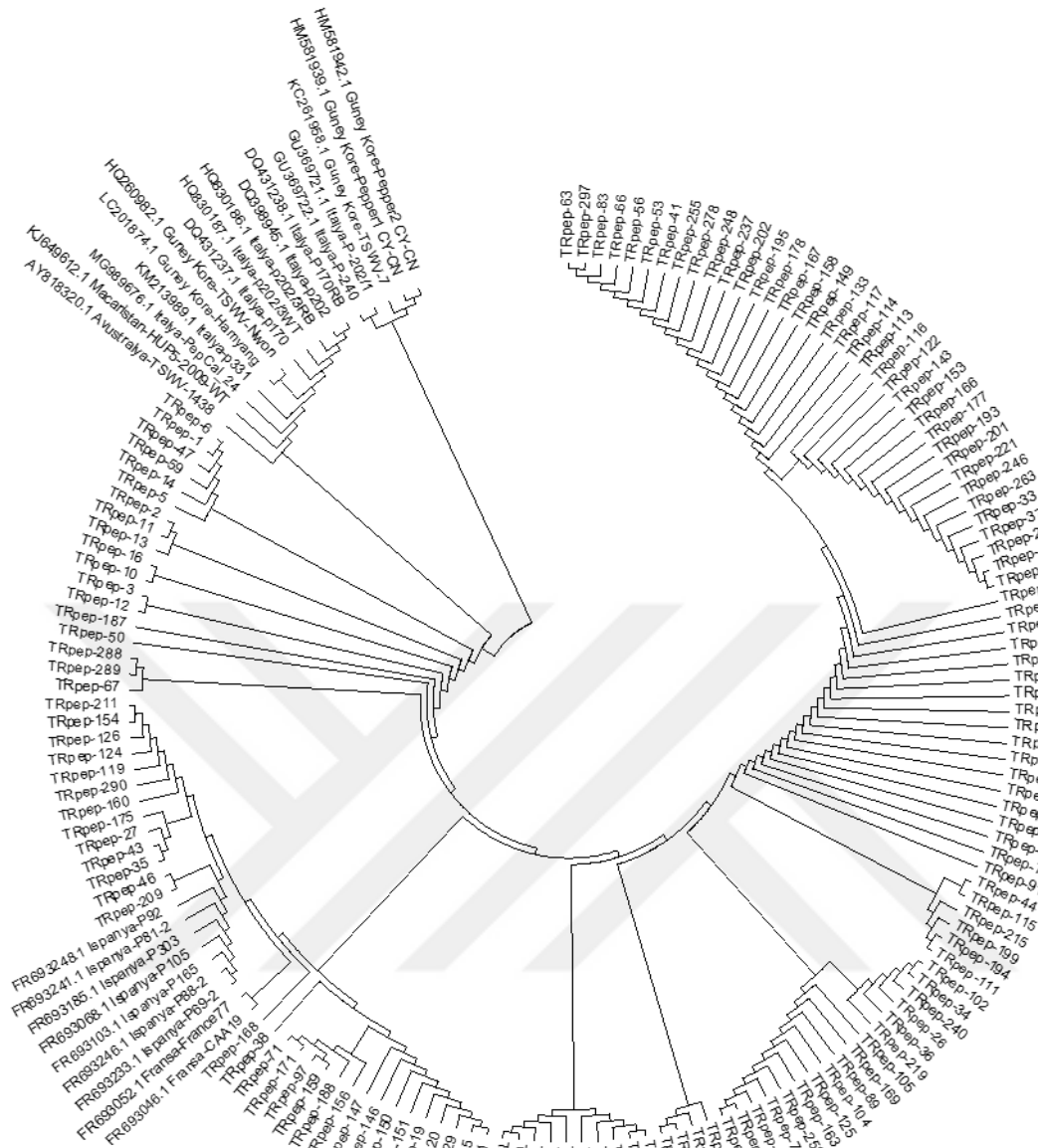
Şekil 4.27. Türk TSWV-biber izolatlarıyla NCBI’da kayıtlı diğer TSWV izolatlarının M RNA segmentinin kodladığı NSm gen bölgesine göre filogenetik analizi

Türk TSWV-biber izolatlarının S RNA segmentinin kodladığı N gen bölgesinin 777 nt uzunluğundaki DNA dizinleri kullanılarak NCBI’da kayıtlı 26 biber izolatı (Çizelge 4.5) ile filogenetik analizi (Şekil 4.28) yapılmıştır. Türk TSWV-biber izolatlarının kendi aralarında % 96-100 nükleotid, % 95-100 aa benzerliğine sahip olduğu belirlenmiştir. Türk TSWV-biber izolatları İspanya (FR693233.1, FR693248.1, FR693103.1, FR693185.19, FR693246.1, FR693241.1, FR693068.1) ve Fransa (FR693046.1, FR693052.1)’dan kayıt yapılan TSWV izolatları ile % 96-98 düzeyinde nükleotid benzerliği gösterirken, izolatlar arası aa benzerliği %95-100 düzeyinde belirlenmiştir.

TRpep-290, -154, -119, -211, -124, -126, -160, -175, -43, -27, -35 ve -168 nolu izolatlar İspanya (FR693248.1, FR693241.1, FR693185.1, FR693068.1, FR693103.1, FR693246.1, FR693233.1) ve Fransa izolatlarıyla (FR693046.1, FR693052.1) birlikte ayrı bir klad oluşturmuştur. TRpep-209 ve TRpep-46 nolu izolatların ise İspanya izolatları (FR693248.1, FR693241.1, FR693185.1, FR693068.1, FR693103.1, FR693246.1, FR693233.1) ile yüksek düzeyde homoloji gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.28).

Çizelge 4.5. S RNA segmentinin kodladığı N gen bölgesinin filogenetik analizinde kullanılan izolatlar

Erişim Numarası	Orijin
FR693046.1	Fransa
FR693052.1	Fransa
FR693233.1	İspanya
FR693248.1	İspanya
FR693103.1	İspanya
FR693185.1	İspanya
FR693246.1	İspanya
GU369722.1	İtalya
GU369721.1	İtalya
DQ431237.1	İtalya
HQ830187.1	İtalya
HQ830186.1	İtalya
DQ398945.1	İtalya
LC201874.1	Güney Kore
KJ649612.1	Macaristan
HQ260982.1	Güney Kore
FR693241.1	İspanya
FR693068.1	İspanya
AY818320.1	Avustralya
MG989676.1	İtalya
KM213989.1	İtalya
DQ431238.1	İtalya
HM581939.1	Güney Kore
HM581942.1	Güney Kore
KC261958.1	Güney Kore



Şekil 4.28. Türk TSWV-biber izolatlarıyla NCBI’da kayıtlı diğer TSWV izolatlarının S RNA segmentinin kodladığı N gen bölgesine göre filogenetik analizi

Türk TSWV-biber izolatlarının S RNA segmentinin kodladığı NSs gen bölgesinin 843 nt uzunluğundaki DNA dizinleri kullanılarak NCBI’da kayıtlı referans 24 biber izolatıyla (Çizelge 4.6) filogenetik analiz yapılmıştır (Şekil 4.29). Türk TSWV-biber izolatlarının kendi aralarında nükleotid benzerliği % 86.9-100, aa benzerliği ise % 78.6-100 düzeyinde bulunmuştur. Türk TSWV-biber izolatlarının NCBI’da kayıtlı diğer izolatlar (Çizelge 4.6) ile nükleotid ve aa benzerlik oranının % 86.6-99 ve %77.7-99 arasında olduğu belirlenmiştir.

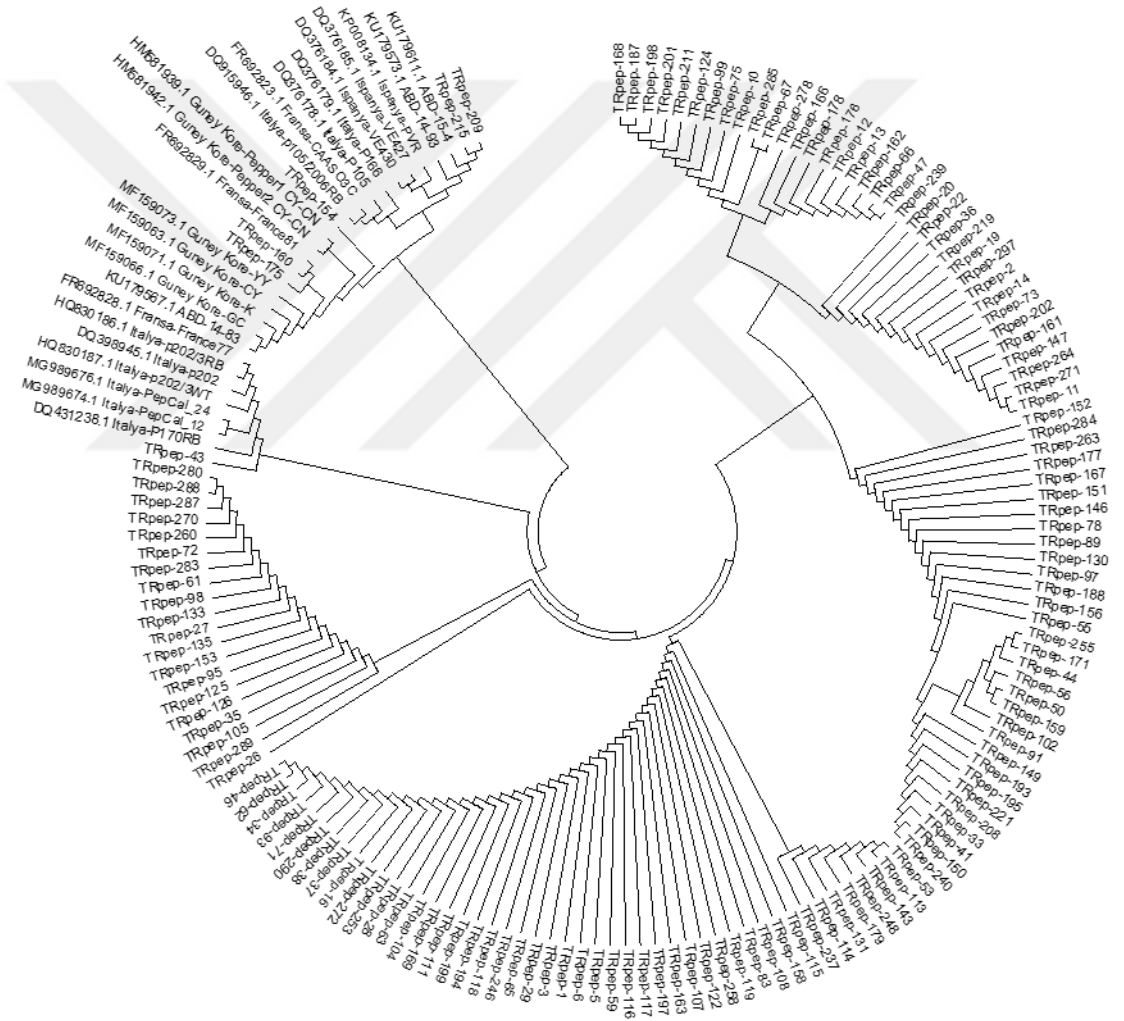
TRpep-43 nolu izolat, altı İtalya (HQ830187.1, DQ398945.1, HQ830186.1, DQ431238.1, MG989674.1, MG989676.1) ve bir Fransa (FR692828.1) izolatıyla aynı grupta yer alıp, diğer biber izolatlarından farklı bir kladda yer almıştır. TRpep-43 nolu izolatın referans izolatlarıyla nükleotid benzerliğinin %98.2-98.5, aa benzerliğinin ise %95.5-97.5 arasında olduğu belirlenmiştir. TRpep-154, -160 ve -175 nolu izolatları Fransa izolatı (FR692829.1) ile %98.2-98.8 nükleotid, %95.9-97 aa benzerliği belirlenmiştir. TRpep-154, -160 ve -175 izolatları, altı Güney Kore izolatıyla (MF159073.1, MF159071.1, MF159066.1, MF159063.1, HM581942.1, HM581939.1) nükleotid benzerliği %95.5-96.9, aa benzerliği ise %89-94 arasındadır. TRpep-209 ve -215 izolatları İspanya (DQ376184.1, DQ376185.1, KP008134.1), ABD (KU179611.1, KU179573.1), İtalya (DQ376179.1, DQ376178.1, DQ915946.1) ve Fransa (FR692823.1) izolatlarıyla aynı grupta, ancak diğer biber izolatlarından farklı bir kladda yer almıştır. TRpep-209 ve 215 nolu izolatların referans izolatlarıyla nükleotid benzerliği % 93.9-98.8 arasında belirlenirken, aa benzerliği ise % 89-98 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.29).

Çizelge 4.6. S RNA segmentinin kodladığı NSs gen bölgesinin filogenetik analizinde kullanılan izolatlar

Erişim Numarası	Orijin
MG989674.1	İtalya
HQ830187.1	İtalya
DQ431238.1	İtalya
DQ398945.1	İtalya
MG989676.1	İtalya
MF159063.1	Güney Kore
MF159071.1	Güney Kore
MF159073.1	Güney Kore
HM581942.1	Güney Kore
HM581939.1	Güney Kore
DQ376179.1	İtalya
HQ830186.1	İtalya
KU179567.1	A.B.D
DQ376178.1	İtalya
DQ376184.1	İspanya
DQ376185.1	İspanya
KP008134.1	İspanya
KU179611.1	A.B.D

Çizelge 4.6.'nın devamı

Erişim Numarası	Orijin
KU179573.1	A.B.D
DQ915946.1	İtalya
MF159066.1	Güney Kore
FR692829.1	Fransa
FR692823.1	Fransa
FR692828.1	Fransa



Şekil 4.29. Türk TSWV-biber izolatlarıyla NCBI'da kayıtlı diğer TSWV izolatlarının S RNA segmentinin kodladığı NSs gen bölgesine göre filogenetik analizi

4.7. Biber TSWV Popülasyonunun Genetik Yapısı

Üç lokasyonda (Adana, Mersin, Kahramanmaraş) ve iki farklı yetiştiricilik sisteminden (açıkta ve örtü altı) alınan örnekleri temsil edecek şekilde seçilen 3 popülasyona ait toplam 140 TSWV-biber izolatının L, M ve S RNA segmentlerinin kodladığı dört bölgenin (RdRp, NSm, N ve NSs) PCR ile çoğaltılmasıyla elde edilen nükleotid dizinleri popülasyon genetiği analiz programı kullanılarak analiz edilmiştir.

4.7.1. Nükleotid farklılığı (P_i , π), mutasyon oranı (Θ_w), haplotip çeşitliliği (H_d)

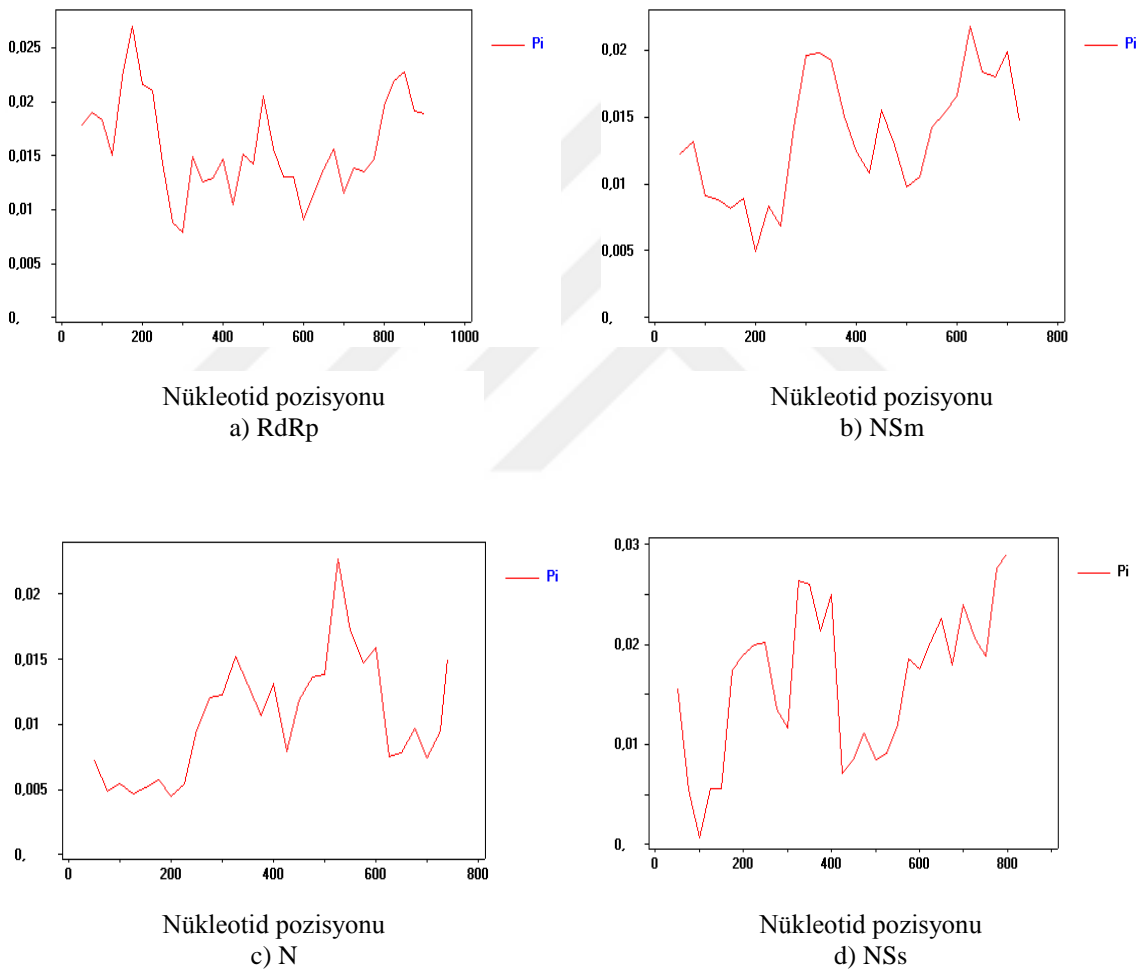
Virüs genomunun RdRp geni 948 nt büyüklüğündeki bölgesinde 162 polimorfik (değişken) bölge bulunmuştur. Baz başına nükleotid çeşitliliği (P_i , π) 0.013 olup (Çizelge 4.7), nükleotid değişiminin en fazla 126. - 225. ve 576 - 675. pozisyonlar arasında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.30). Mutasyon oranı (Θ_w) 0.031 ve haplotip sayısı 56 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7 ve Ek 1).

NSm geninin 771 nt büyüklüğündeki bölgesinde 135 polimorfik (değişken) bölge bulunmuştur. Baz başına nükleotid çeşitliliği (P_i , π) 0.013 (Çizelge 4.7), nükleotid değişiminin ise en fazla 251. - 350. ve 451 - 550. pozisyonlar arasında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.30). Mutasyon oranı (Θ_w) 0.036, haplotip sayısı 73 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7 ve Ek 2).

Çizelge 4.7. Türk TSWV-biber izolatlarının L, M ve S RNA bölgelerinin genetik çeşitliliği ile ilgili istatistiki değerlendirme

	RdRp	NSm	N	NSs
İzolat sayısı	140	140	140	140
Nükleotid dizin uzunluğu	948	771	777	843
Polimorfik bölge sayısı	162	135	127	112
Haplotip sayısı	56	73	51	43
Haplotip çeşitliliği (H_d)	0.964	0.973	0.899	0.926
π	0.013	0.013	0.011	0.018
Θ_w	0.031	0.036	0.032	0.030
ω (dN/dS)	0.389	0.432	0.203	0.416

N geni 777 nt büyüklüğündeki bölgede 127 polimorfik (değişken) bölge bulunmuştur. Baz başına nükleotid çeşitliliği (P_i , π) 0.011 (Çizelge 4.7), nükleotid değişiminin ise en fazla 426. - 525. pozisyonlar arasında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.30). Mutasyon oranı (Θ_w) 0.032, haplotip sayısı 51 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7 ve Ek 3). NSs geni 843 nt büyüklüğündeki bölgede 112 polimorfik (değişken) bölge bulunmuştur. Baz başına nükleotid çeşitliliği (P_i , π) 0.018 (Çizelge 4.7), nükleotid değişiminin ise en fazla 201. - 300. ve 580. - 720. pozisyonlar arasında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.30). Mutasyon oranı (Θ_w) 0.030, haplotip sayısı 43 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7 ve Ek 4).



Şekil 4.30. RdRp, NSm, N ve NSs gen bölgelerinin baz başına nükleotid çeşitliliği

Haplotip çeşitliliği, 0 ile 1 arasında değer alır; 0'a yaklaşması çeşitliliğin az olduğu, 1'e yakın olması durumunda ise haplotip çeşitliliğin yüksek olarak değerlendirilmektedir (Nei ve Tajima, 1981). İzolatların haplotip çeşitliliğinin en yüksek NSm (0.973), en düşük N (0.899) geninde olduğu belirlenmiştir. RdRp gen bölgesindeki singleton (sekanslar arasında bir kez görülen mutasyonlar) haplotip sayısı 61, NSm gen bölgesinde 76, N gen

bölgesinde 58 ve NSs gen bölgesinde ise 43 olarak belirlenmiştir. Dört ayrı gen bölgesindeki, haplotip çeşitliliği değerlerinin yüksek, nükleotid çeşitliliği değerlerinin ise düşük olduğu görülmüştür (Çizelge 4.7).

Örtü altında yetiştirilen *Tsw* geni taşıyan biber bitkilerinden elde edilen izolatların RdRp gen bölgesinin haplotip analizinde; Adana izolatlarının çoğunlukla Haplotip-3 ve 9; Mersin izolatlarının ise Haplotip-12 profiline sahip olduğu belirlenmiştir. Açıkta biber üretim yapılan alanlardan elde edilen Adana izolatlarının birçoğunun Haplotip-42 profilini sergilediği belirlenmiştir. NSm gen bölgesinin haplotip analizinde izolatların alındığı bölge veya yetiştirildiği alana göre gruplanmadığı; her haplotip profiline sahip en az 2 izolat olduğu belirlenmiştir. Singleton haplotip sayısının yüksek olmasından dolayı haplotip sayısının ve çeşitliliğinin yüksek olduğu belirlenmiştir. N gen bölgesinin haplotip analizinde izolatlarının çoğunluğunun Haplotip-9, 18 ve 24 profiline sahip olduğu belirlenmiştir. NSs gen bölgesinin haplotip analizinde; Adana ve Kahramanmaraş illerindeki açıkta biber üretim yapılan alanlardan elde edilen izolatların genellikle Haplotip-1; örtü altında yetiştirilen biber bitkilerinden elde edilen Mersin izolatlarının ise çoğunlukla Haplotip-4 ve 16 profilinde olduğu belirlenmiştir.

4.7.2. dN/dS (ω) oranının belirlenmesi

RdRp gen bölgesinin 948 nt büyüklüğündeki bölgenin dN/dS (ω) oranı Datamonkey yazılımı kullanılarak SLAC (Single-Likelihood Ancestor Counting) (Kosakovsky Pond ve Frost, 2005) metodu ile 0.389 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.7). SLAC ve FEL (Fixed Effects Likelihood) analizinde toplam 12 kodon bölgesinde (11, 24, 34, 46, 64, 90, 99, 152, 176, 221, 239, 252) ($p < 0.1$) negatif (safılaştırıcı) seçim ve 1 kodon bölgesinin ise (293.) (A→T) pozitif seçim etkisinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.31). NSm geninin 771 nt büyüklüğündeki bölgenin dN/dS (ω) oranı 0.432 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.7). SLAC ve FEL analizleri toplam 12 kodon bölgesinin (16, 27, 47, 71, 104, 113, 137, 143, 174, 217, 227, 247) ($p < 0.1$) negatif seçim etkisinde olduğunu göstermiştir (Şekil 4.32).

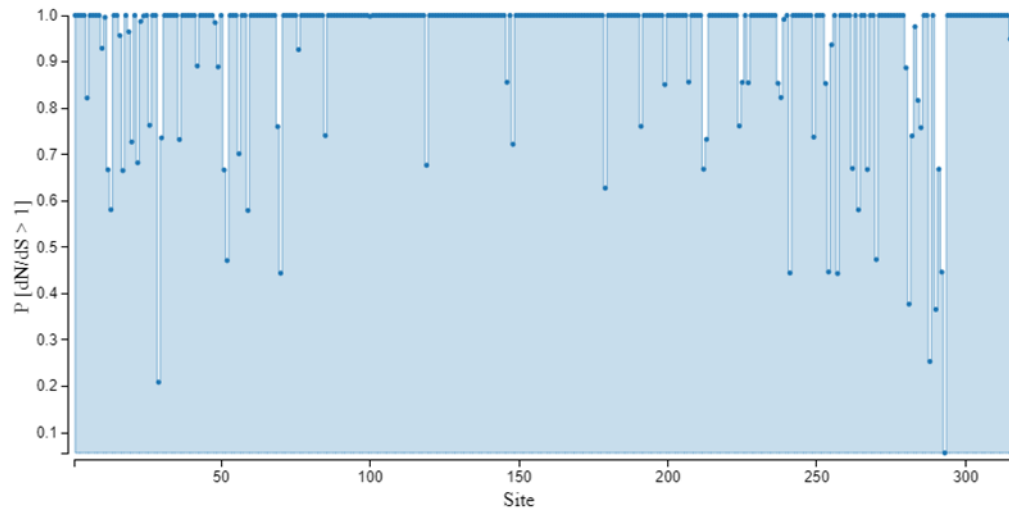
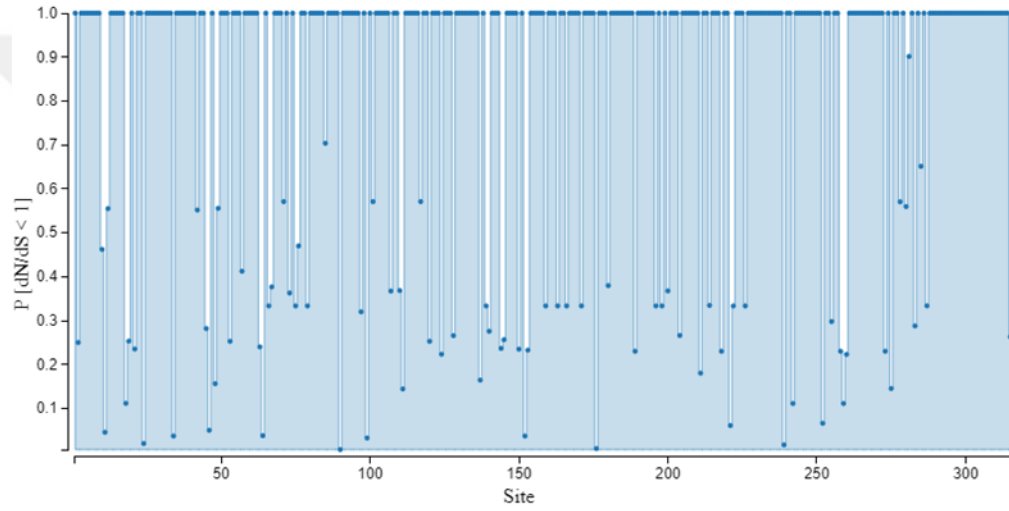
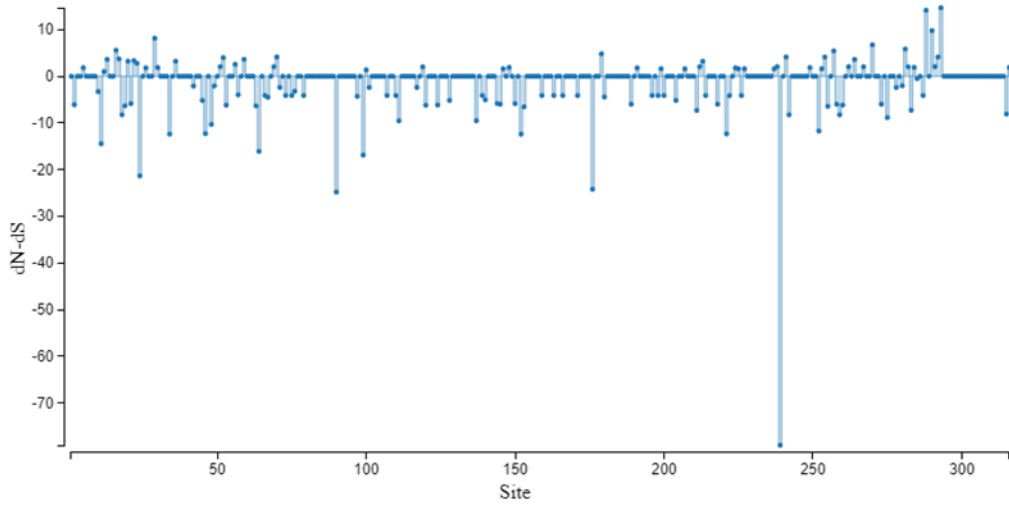
N geni 777 nt büyüklüğündeki bölgenin dN/dS (ω) oranı 0.203 değerini vermiştir (Çizelge 4.7). Bu bölge için SLAC ve FEL analizleri toplam 17 kodon bölgesinin (5, 46, 52, 62, 68, 85, 105, 123, 128, 160, 175, 179, 180, 187, 191, 246, 254) ($p < 0.1$) negatif seçim etkisinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.33).

NSs geninin 843 nt büyüklüğündeki bölgenin dN/dS (ω) oranı 0.416 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.7). SLAC ve FEL analizleri toplam 15 kodon bölgesinin (1, 4,

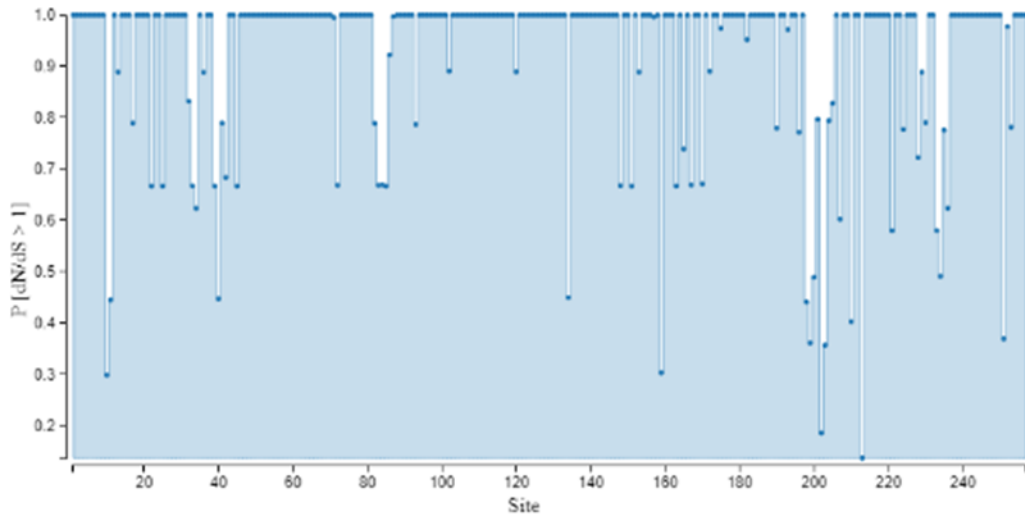
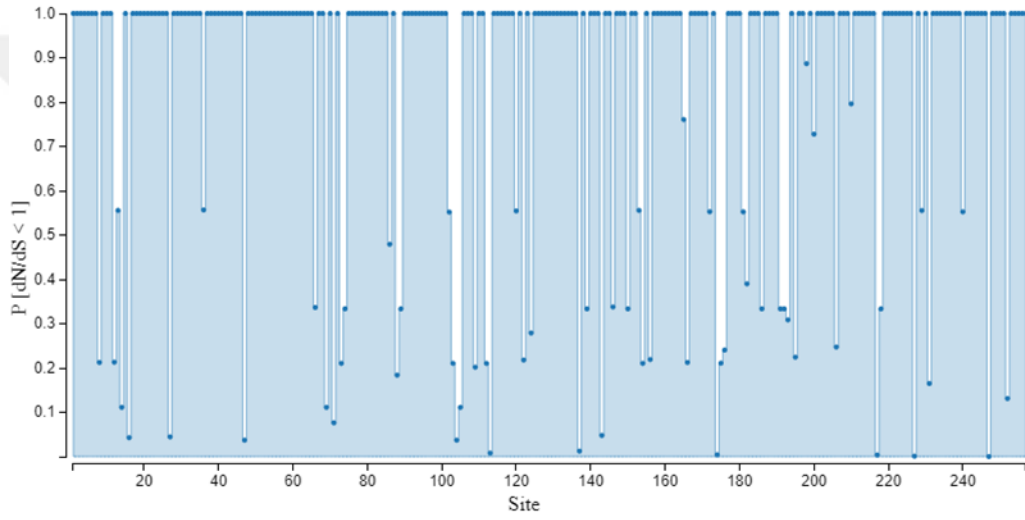
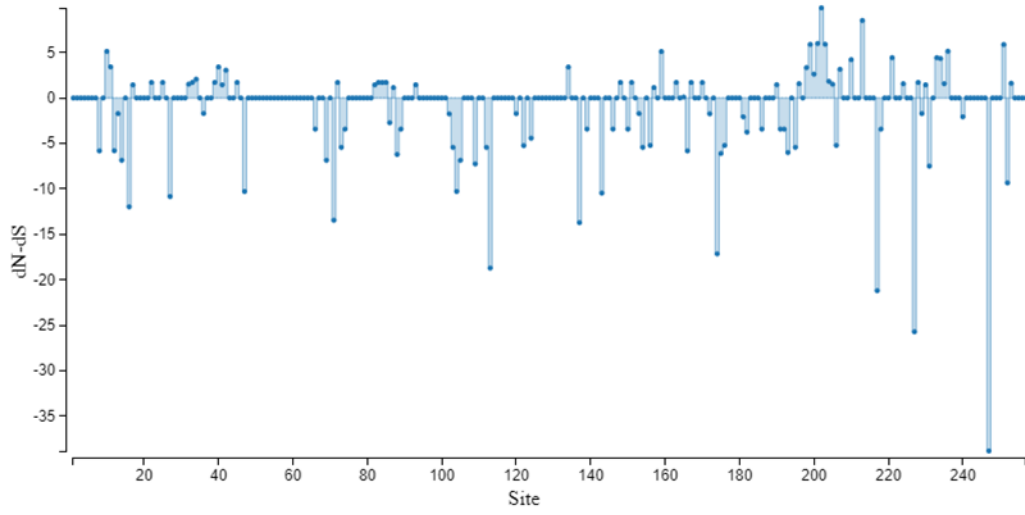
67, 85, 86, 88, 149, 150, 192, 193, 229, 234, 248, 256, 273) ($p < 0.1$) negatif seçilim etkisinde olduğunu göstermiştir. Ancak 124. (K→P) ve 203. (I→V, A veya T) kodon bölgesinin ise pozitif seçilim etkisinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.34).

SLAC analizleri genomik bölgelerin dN/dS oranlarının < 1 'den küçük olduğunu göstermiştir. Bu durum analizi yapılan dört gen bölgesinin (RdRp, NSm, N, NSs) negatif seçilim etkisinde olduğu düşüncesini desteklemektedir. Gen bölgeleri için elde edilen dN/dS oranlarına bakıldığında negatif (safılaştırıcı) seçilim etkisinin en fazla N geninde olduğu görülmektedir.

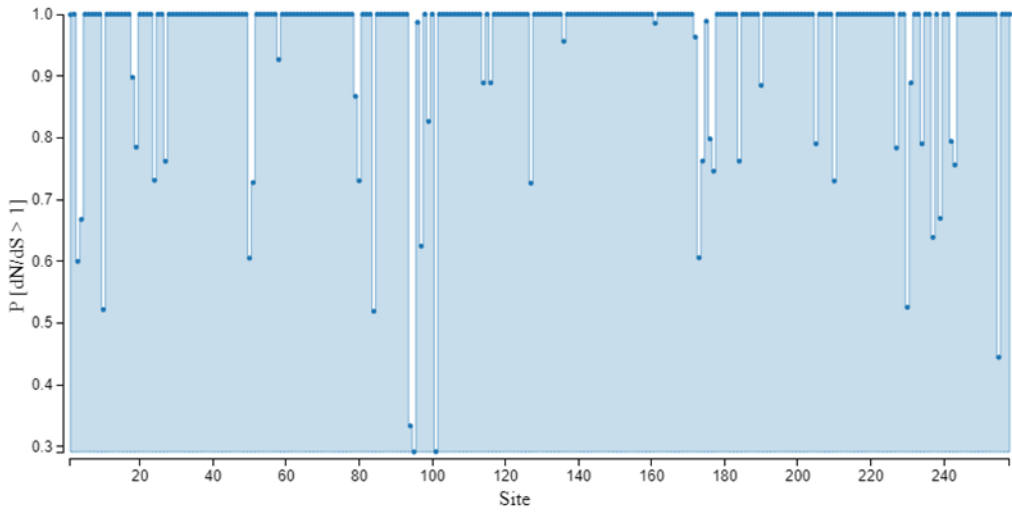
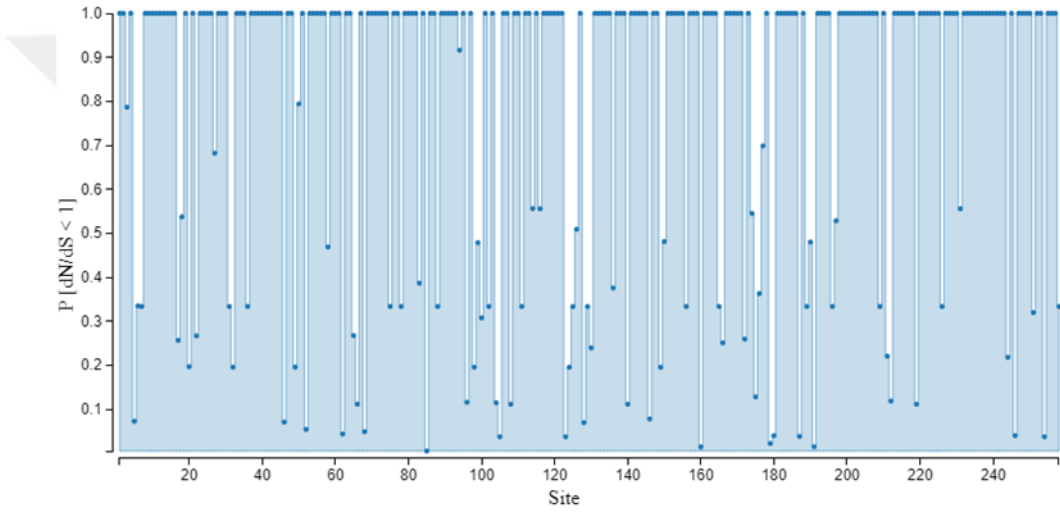
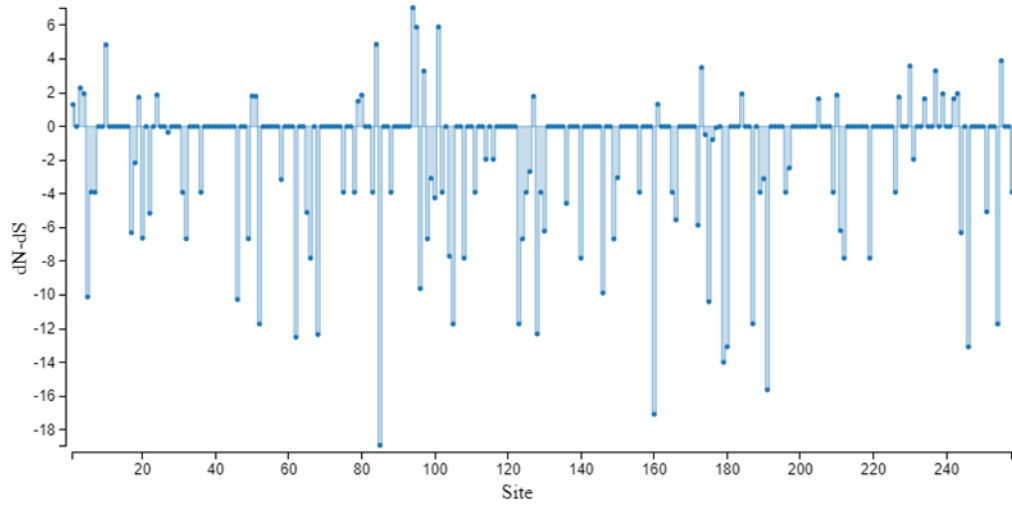




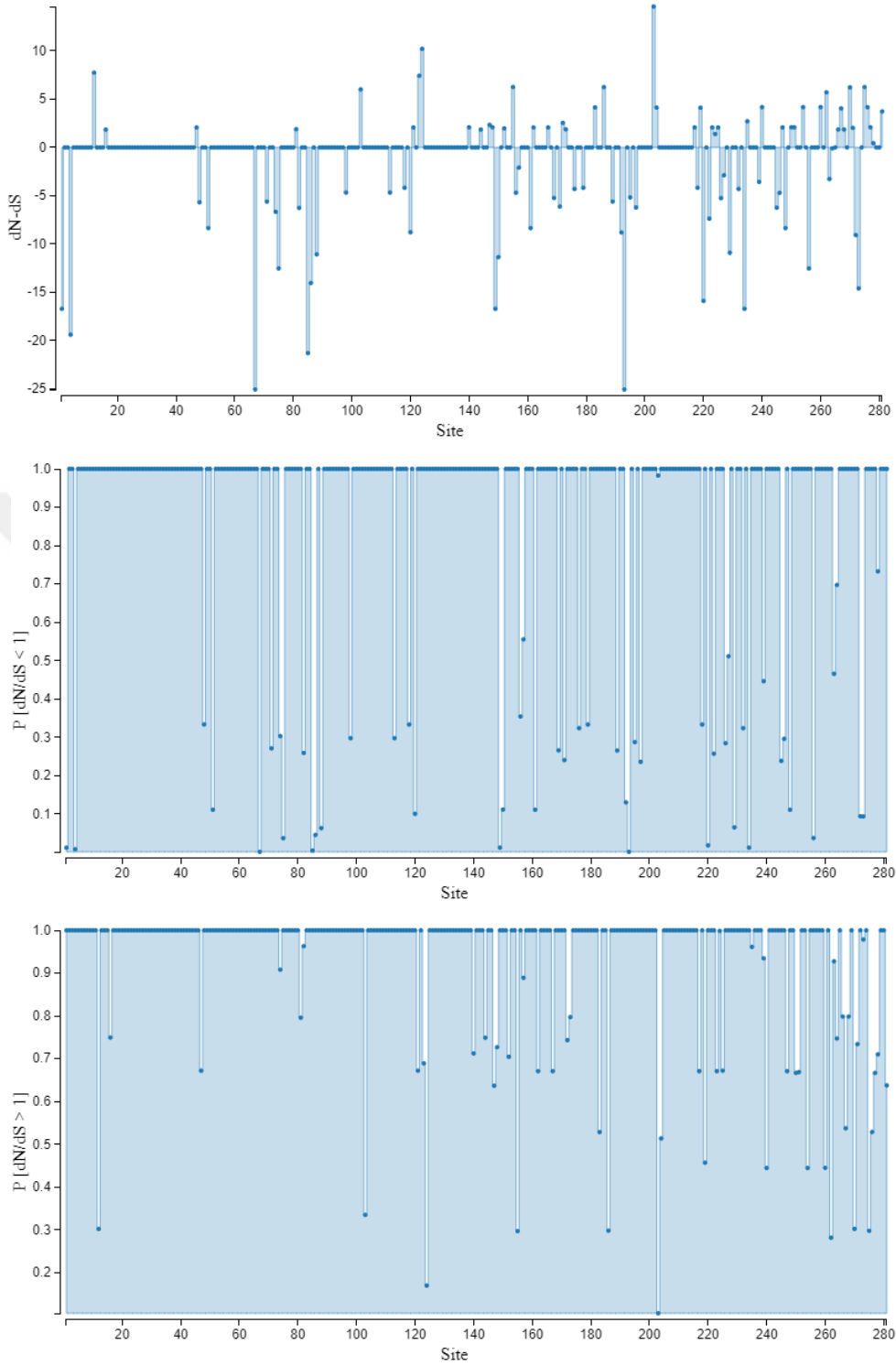
Şekil 4.31. RdRp proteinin pozitif veya negatif seleksiyon altındaki kodon veya amino asit bölgeleri, SLAC analizi (www.datamonkey.org)



Şekil 4.32. N5m proteinin pozitif veya negatif seleksiyon altındaki kodon veya amino asit bölgeleri, SLAC analizi (www.datamonkey.org)



Şekil 4.33. N proteinin pozitif veya negatif seleksiyon altındaki kodon veya amino asit bölgeleri, SLAC analizi (www.datamonkey.org)



Şekil 4.34. NSs proteinin pozitif veya negatif seleksiyon altındaki kodon veya amino asit bölgeleri, SLAC analizi (www.datamonkey.org)

4.7.3. Nötralite testleri

Biber bitkisindeki TSWV popülasyonunun evrim mekanizmasında rol oynayan güçleri belirlemek amacıyla yapılan nötralite testlerinin (Tajima's D , Fu ve Li's D^* ve F^* ve Fu's F_s) değerleri negatif olup, istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.8). Bu durum nötral olmayan mutasyon hipotezinin geçerli olduğunu gösterir.

Tajima's D değerinin istatistiki olarak anlamlı ve negatif değer alması dört gen bölgesinin popülasyon darboğazından geçtiğini ve popülasyonun bazı güçlü faktörler tarafından sınırlandırılıyor olabileceğini göstermektedir (Tajima, 1989). Popülasyon darboğazına neden olabilecek etkenler arasında virüsün yayılmasında etkili trips vektörünün biyolojisi ve beslenme alışkanlığı, yeni konukçu bitkiye adaptasyon gibi faktörler sayılabilmektedir.

Çizelge 4.8. Nötralite Testlerinin Değerleri

	RdRp	NSm	N	NSs
Tajima's D	-2.0581***	-2.0373***	-2.1512*	-2.1384***
Fu ve Li's D^*	-3.4718**	-6.1227**	-3.9957**	-2.5659**
Fu ve Li's F^*	-3.3852**	-5.1120**	-3.7895**	-2.8478**
Fu's F_s	-16.774*	-45.732*	-19.892*	-15.240*

(* , $p < 0.01$; ** , $p < 0.02$; *** , $p < 0.05$) * , istatistiki olarak anlamlı

Tajima's D , Fu ve Li's D^* ve F^* ve Fu's F_s testlerinin negatif ve istatistiki olarak anlamlı olması, arka plan seçilimi veya popülasyon genişlemesi nedeniyle, popülasyonda yüksek miktarda ender haplotiplerin (genetik varyantların) bulunduğunu gösterir. Arka plan seçilimle ilgili gen bölgelerinde güçlü negatif (safılaştırıcı) seçim etkisiyle çeşitliliğin azalması ve hızlı popülasyon büyümesini göstermektedir.

4.7.4. Popülasyon farklılığı testi

Farklı coğrafi bölgelerdeki TSWV izolatlarının karşılaştırılması virüsün epidemiyolojisini, hareketini ve gen akışı hakkında bilgi sahibi olmamıza yardımcı olmaktadır. Ayrıca virüsün yayılmasını engellemek amacıyla belirlenecek mücadele stratejilerinin belirlenmesine katkı sağlar. Buna göre TSWV izolatları alındıkları lokasyonlara göre (Adana, Mersin, Kahramanmaraş) gene özgü 3 alt popülasyona ayrılmıştır. Alt popülasyonlar arasındaki genetik farklılığı seviyesinin belirlenmesi

amacıyla izolatların gen bölgesi kullanılarak K_{ST} , Z , S_{nn} ve F_{ST} istatistik testleri (1000 permütasyon uygulanarak) yapılmıştır (Çizelge 4.9). Alt popülasyonların ikili karşılaştırılmaları sonucunda, alt popülasyonları oluşturan izolatlar arasında önemli bir farklılık belirlenmemiş olup, izolatların coğrafi olarak birbirlerinden farklı olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Coğrafi izolatlar arasındaki gene özgü popülasyon farklılığını belirlemek amacıyla yapılan istatistik testlerinin değerleri

Genom	Bölge	K_S^*	K_{ST}^*	$K_S, K_{ST}; P$	Z^*	P	S_{nn}	P	F_{ST}
RdRp	Adana-Mersin	2,352	0,031	0,000***	7,685	0,000***	0,677	0,000***	0,103
	Adana-Kahramanmaraş	2,332	0,038	0,000***	7,295	0,000***	0,776	0,000***	0,125
	Mersin-Kahramanmaraş	2,037	0,046	0,000***	6,658	0,000***	0,702	0,657	0,137
NSm	Adana-Mersin	2,179	0,034	0,000***	7,804	0,000***	0,779	0,000***	0,071
	Adana-Kahramanmaraş	2,289	0,003	0,134	7,219	0,092	0,741	0,042*	0,013
	Mersin-Kahramanmaraş	1,941	0,008	0,073	6,787	0,050	0,645	0,310	0,024
N	Adana-Mersin	1,986	0,012	0,004**	7,755	0,011*	0,657	0,000***	0,038
	Adana-Kahramanmaraş	1,942	0,020	0,000***	7,444	0,000***	0,695	0,024*	0,093
	Mersin-Kahramanmaraş	1,484	0,007	0,129	6,621	0,105	0,579	0,091	0,029
NSs	Adana-Mersin	1,670	0,010	0,014*	7,767	0,014*	0,624	0,000***	0,027
	Adana-Kahramanmaraş	1,713	0,012	0,013*	7,450	0,010*	0,666	0,005**	0,038
	Mersin-Kahramanmaraş	1,502	0,003	0,270	6,822	0,242	0,549	0,183	0,001

P (probability; olasılık), *, $0.01 < P < 0.05$; **, $0.001 < P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, *, istatistiki olarak anlamlı

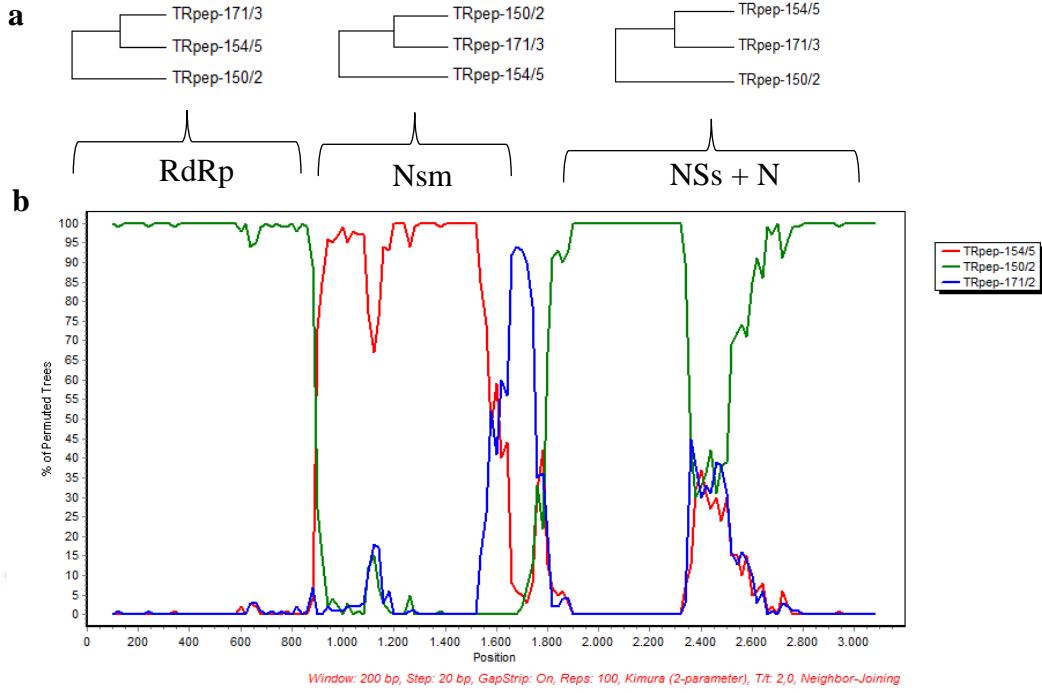
Popülasyonların tahmini F_{ST} (Fiksasyon indeksi) karşılaştırmaları incelendiğinde Nsm, N ve NSs gen bölgelerinde genetik farklılaşmanın genellikle düşük düzeyde olduğu; N geni için Adana-Kahramanmaraş popülasyon çiftinin (F_{ST} : 0.093) orta düzeyde farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.9). İkili karşılaştırmalar sonucu üç popülasyon için RdRp gen bölgesinin tahmini F_{ST} değerleri 0.125, 0.103 ve 0.137 (Çizelge 4.9) olarak belirlenmiştir ve diğer gen bölgeleriyle kıyaslandığında gen akışının daha düşük olduğu saptanmıştır.

4.8. Reassortant TSWV-Biber İzolatlarının Belirlenmesi

Aynı bitkide TSWV izolatlarının karışık enfeksiyonu, virüs genomunun farklı bölgelerinin tamamının birbirleri arasında değiştirilmesiyle veya ssRNA genomlarında

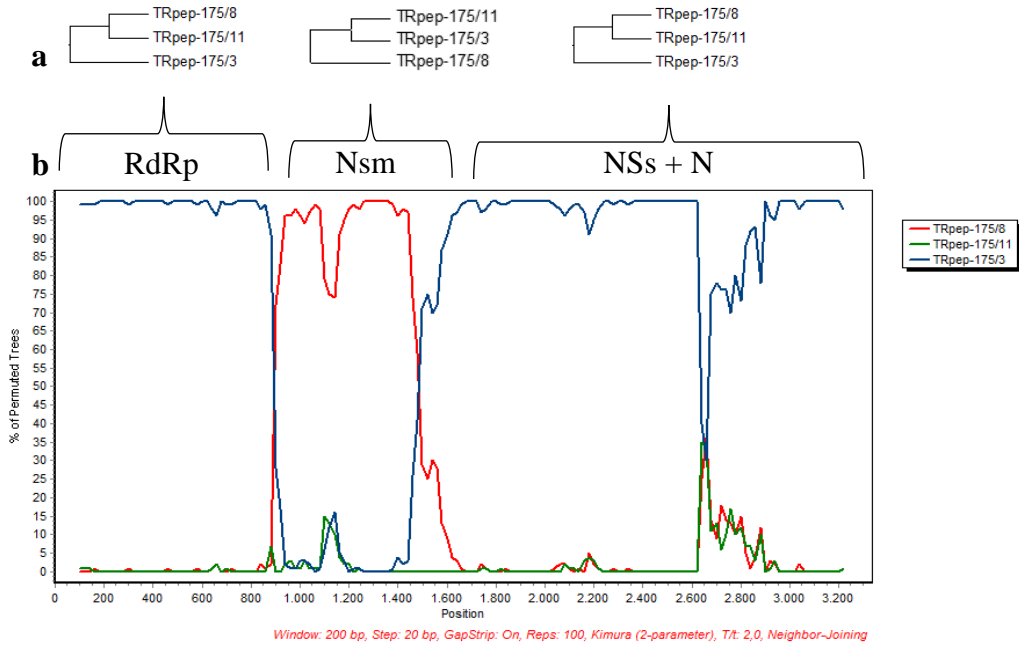
kolaylıkla meydana gelen rekombinasyon sonucu iki virüs streynlerinin nükleotid dizinlerini içeren RNA molekülünün oluşmasıyla yeni TSWV varyantların ortaya çıkmasına neden olduğu bilinmektedir. Bölüm 4.4'te biyolojik karakterizasyonu yapılan biyolojik klonların (104 adet) L, M ve S RNA bölgelerinin kısmi çoğaltılması ile elde edilen dizinler arka arkaya sıralanarak tek bir dizin dosyası olarak kaydedilmiştir. Virüs genomunu meydana getiren sırasıyla L, M, S RNA segmentlerinin kodladığı RdRp (950 nt), NSm (771 nt), NSs (843 nt) ve N (777 nt) genleriyle 3341 nt uzunluğunda DNA dizinleri elde edilmiştir. Nükleotid dizinler Clustal W (Thompson ve ark., 1994) ile hizalandıktan sonra MEGA6 (Tamura ve ark., 2013) yazılım programında, NJ (Saitou ve Nei, 1987) metodu kullanılarak filogenetik analiz yapılmıştır. İzolatların rekombinasyon ilişkisi, reassortantları meydana getiren muhtemel ebeveyn izolatları ve kırılma noktaları RDP4 yazılım programındaki RDP, Geneconv, Chimaera, MaxChi, BootScan ve Siscan metodlarıyla analiz edilmiştir. En az 3 metodun P değerinin $P \leq 10^{-6}$ ten küçük olması durumunda rekombinasyon olayı kabul edilmiştir.

Rekombinasyon analizlerinde TRpep-154/5 biyolojik klonunun L ve S RNA bölgelerinin, TRpep-171/3 biyolojik klonunun majör ebeveyni olarak belirlenirken, TRpep-150/2 biyolojik klonu ise M RNA bölgesine göre majör ebeveyn olarak belirlenmiştir. Genomik bölgelere göre yapılan filogenetik analizde L ve S RNA bölgelerine göre TRpep-171/3 ve TRpep-154/5 biyolojik klonları beraber gruplanırken, M RNA bölgesine göre yapılan filogenetik ağaçta ise TRpep-171/3 biyolojik klonunun TRpep-150/2 klonuyla gruplandığı gözlenmiştir (Şekil 4.35). TRpep-171/3 klonunun genom bölgelerinin farklı orijinli olduğu belirlenmiş olup, TRpep-150/2 ve TRpep-154/5 klonlarının reassortment ilişkisi sonucu meydana geldiği belirlenmiştir.



Şekil 4.35. İzolatların dizin karşılaştırması a: Genom bölgelerine ait filogenetik ağaç b: rekombinasyon veya kırılma noktalarının SimPlot programı kullanılarak Bootscan metoduyla gösterimi

İzolatlar arası rekombinasyon analizine göre TRpep-175/8 klonunun L ve S RNA bölgeleri TRpep-175/11 klonunun başlıca ebeveyni olarak belirlenirken, TRpep-175/3 izolatının ise M RNA bölgesi majör ebeveyn olarak belirlenmiştir. Virüs genomunun L ve S RNA bölgelerine göre yapılan filogenetik ağaçta TRpep-175/11 ve TRpep-175/8 biyolojik klonlarının birlikte gruplandığı gözlenmiştir (Şekil 4.36). TRpep-175/11 biyolojik klonunun genom bölgelerinin farklı orijinli olduğu, TRpep-175/8 ve TRpep-175/3 biyolojik klonlarının reassortment ilişkisi sonucu meydana geldiği belirlenmiştir.



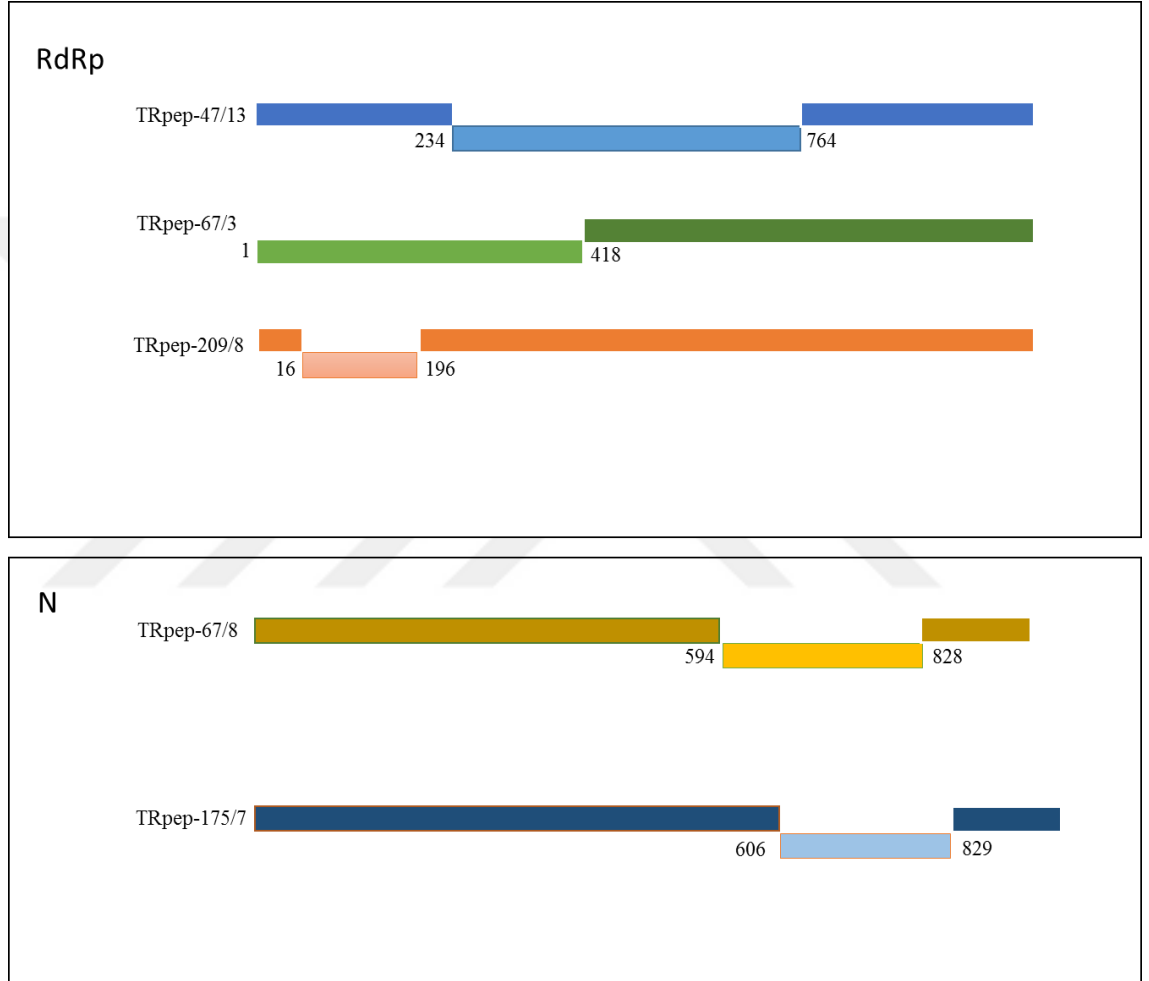
Şekil 4.36. İzolatların dizin karşılaştırması a: Genom bölgelerine ait filogenetik ağaç b: rekombinasyon veya kırılma noktalarının SimPlot programı kullanılarak Bootscan metoduyla gösterimi

RDP programı kullanılarak yapılan RdRp geninin 950 nt büyüklükteki kısmının rekombinasyon analizi sonucunda, 3 reassortant izolat belirlenmiştir. TRpep-47/13 izolatının reassortant olduğu, 234-764. nükleotidleri arası kırılma noktası olarak belirlenmiş olup; majör ebeveynin TRpep-47/4 ve minör ebeveynin TRpep-47/11 olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.37). TRpep-67/3 reassortant izolat ise majör ebeveyn TRpep-47/15 ve minör ebeveyn TRpep-171/10 arasında gerçekleşen 1-418. nükleotid bölgesindeki rekombinasyon sonucu meydana geldiği belirlenmiştir (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.37). TRpep-209/8 reassortant izolatın majör ebeveyni TRpep-47/15 ve minör ebeveyni ise İtalya izolatı (MK348941.1) belirlenmiştir. İzolatlar arası rekombinasyonun 16-196. nükleotid bölgesi arasında gerçekleştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.37). TRpep-272/3, TRpep-67/8 ve TRpep-146/1 biyolojik klonlarında da rekombinasyon ilişkisi belirlenmiş olmasına karşın en az 3 metodun P değerinin $P \leq 10^{-6}$ ten küçük olması şartını sağlamadığı için rekombinasyon olayı kabul edilmemiştir.

N gen bölgesinin 777 nt büyüklüğündeki kısmında 2 rekombinasyon olayı belirlenmiştir. Reassortant olarak belirlenen TRpep-67/8 izolatının rekombinasyon kırılma noktaları 594-828. nükleotidde belirlenmiş olup, majör ebeveynin TRpep-146/9 ve minör ebeveynin ise TRpep-159/3 olduğu saptanmıştır.

TRpep-175/7 reassortant izolatının majör ebeveyni (TRpep-209/6) ve minör ebeveyni (TRpep-175/11) arasında gerçekleşen 606-829. nükleotid bölgesindeki rekombinasyon sonucu meydana geldiği belirlenmiştir (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.37). NSm (771 nt) ve NSs (843 nt) gen bölgelerinde ise rekombinasyon belirlenmemiştir.

Reassortment ve rekombinasyon olayı sonucu oluşan TSWV biyolojik klonlarının ebeveyn izolatları gibi *Tsw* dayanıklılık geniyle olan ilişkisi bölüm 4.4'te belirlenmiştir.



Şekil 4.37. Reassortant izolatların kırılma noktalarının gösterimi

Çizelge 4.10. TSWV-biber biyolojik klonları arasındaki rekombinasyon ilişkisinin RDP yazılım programında farklı metodlarla belirlenmesi

RNA segmenti	Rekombinant dizinin kırılma noktasının pozisyonu		Ebeveyn dizinler		P değerleri						
	Başlangıç	Bitiş	Rekombinant dizin	Majör	Minör	RDP	Geneconv	Bootsca n	Maxchi	Chimera	Siscan
L	234	764	TRpep-47/13	TRpep-47/4	TRpep-47/11	1.363E-11	5.022E-08	2.587E-07	3.980E-05	1.125E-07	3.756E-05
	1	418	TRpep-67/3	TRpep-47/15	TRpep-171/10	1.549E-19	1.819E-22	4.825E-31	3.647E-11	2.631E-07	1.398E-16
	16	196	TRpep-209/8	TRpep-47/15	MK348941.1	2.143E-14	2.442E-10	2.495E-06	2.019E-03	3.610E-53	8.767E-08
S	594	828	TRpep-67/8	TRpep-146/9	TRpep-159/3	3.486E-18	7.627E-20	9.386E-05	1.908E-15	1.817E-14	8.750E-13
	606	829	TRpep-175/7	TRpep-209/6	TRpep-175/11	6.665E-08	4.935E-06	7.087E-07	1.328E-09	1.570E-09	1.229E-11

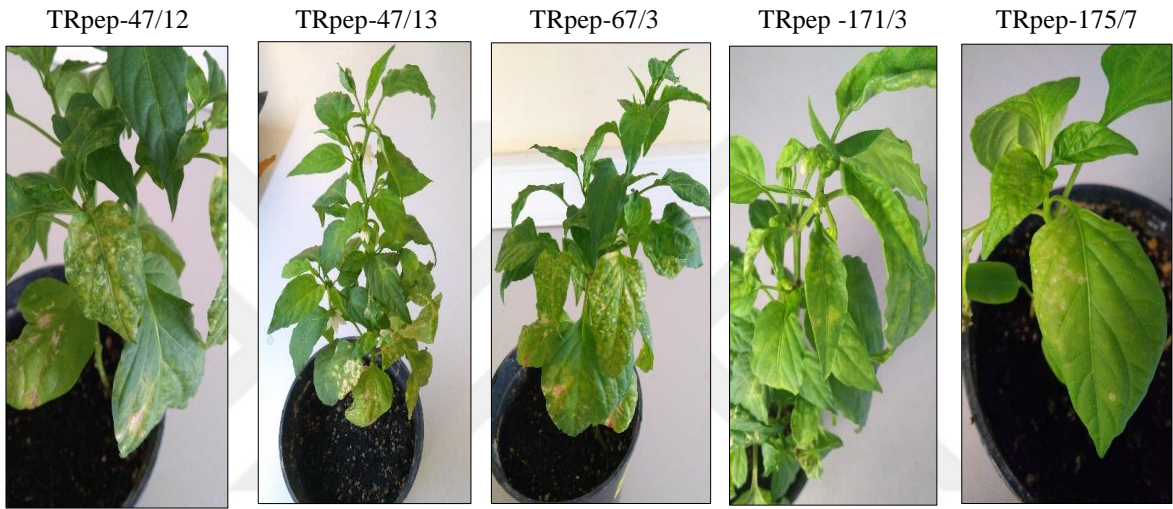
4.9. TSWV Reassortant Biber İzolatlarına Biber Genotiplerinin Dayanıklılık Reaksiyonlarının Belirlenmesi

TSWV'nin konukçu dizisinin geniş olması, izolatlarının populasyon yapısının çeşitliliği ve vektörlerle persistent-propagatif taşınması nedeniyle, kültürel yollarla mücadelesi neredeyse olanaksızdır. TSWV ile mücadelede sürdürülebilir dayanıklılık için kullanılacak etkili yöntem, konukçuda genetik dayanıklılık kaynaklarının belirlenmesi olarak önerilmektedir. Temel araştırma sonuçlarının uygulamaya aktarılması için TSWV izolat ve reassortantlarına dayanıklı yeni biber genotiplerinin araştırılması için belirlenen dayanıklılığı kıran ve reassortant izolatlar biberlerde *Tsw* geni dışında dayanıklılık geni veya genleri içeren genotiplere mekanik olarak taşınmıştır. Denemede kullanılan PM 702/Criollo de Morelos 334 (*pvr1¹*, *Pvr4*, *L²*) (Arnedo-Andrés ve ark., 2006; Parisi ve ark., 2020) biber genotipi ve PI 439381 (*Cmr1*, *L²*) (Suzuki ve ark., 2003; Parisi ve ark., 2020) hattının diğer virüslere dayanıklılık sağlayan genleri bulundurduğu bilinmektedir. CM334 genotipinin *Phytophthora capsici* için önemli bir dayanıklılık kaynağı olduğu ve ayrıca sahip olduğu *pvr* allelleri sayesinde PVY'ye dayanıklılık sağladığı bildirilmiştir (Thabius ve ark., 2003; Arnedo-Andrés ve ark., 2006; Djian-Caporalino ve ark., 2007; Arpacı ve ark., 2016). *C. chacoense* (PI 260429) *Tobamovirus* cinsindeki virüs türlerine dayanıklılık sağlayan *L⁴* genine sahiptir (Kim ve ark., 2008). Er Fou Tou genotipinin *Cmr1* genine sahip olduğu ve CMV'ye dayanıklılık sağladığı bildirilmiştir (Green ve Kim, 1994). Kilis 7 Aralık Üniversitesi Bahçe Bitkileri bölümünde Dr.Öğr. Üyesi Bekir Bülent ARPACI'nın yürüttüğü ıslah çalışmalarında, Maraş 6 hattı Sena çeşidi ile *C.chacoense*'nin, Maraş 19 hattı ise Maraş 46 hattı ile *C.chacoense*'nin melezlenip kendilenerek F₄ kademesine getirilen hatlardır.

Tsw-dayanıklılığını kıran (TRpep-47/12) ve reassortant biyolojik klonların (TRpep-47/13, TRpep-67/3, TRpep-171/3, TRpep-175/7) pozitif kontrol olarak kullanılan duyarlı biber genotipine (*C. annuum*, Naz F₁) yapılan mekanik inokulasyondan 7-10 gün sonra test bitkilerinde sistemik enfeksiyon gözlenmiştir. Negatif kontrol bitkilerinde ise herhangi bir symptom oluşmamıştır.

PM 815/Er Fu Tou bitkilerinde TRpep-47/12 biyolojik klonu, inokulasyonda 10-15 gün sonra yaprak yüzeyinde klorotik halka leke simptomları meydana getirmiştir. TRpep-47/13, TRpep-67/3 ve TRpep-171/3 reassortant biyolojik klonları ise inokulasyon yapılan yapraklarda klorotik halka lekelerine neden olurken, yeni çıkan yapraklarda klorotik halka lekeler ve klorotik beneklenmeler gözlenmiştir. TRpep-175/7 reassortant biyolojik klonu inokulasyon yapılan yapraklarda nekrotik halka lekelerine neden olmuş ve yeni çıkan yapraklarda ise klorotik benekler oluşturmuştur (Şekil 4.38).

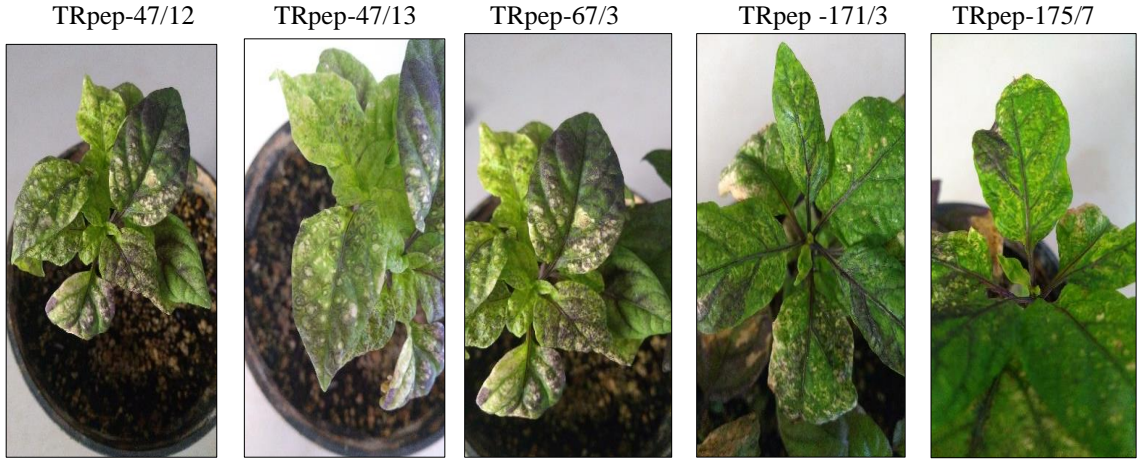
PM 815 Er Fu Tou



Şekil 4.38. TSWV izolatlarının PM 815 Er Fu Tou genotipinde oluşturduğu simptomlar

Dayanıklılığı kıran TRpep-47/12 ve reassortant TRpep-47/13, TRpep-67/3 biyolojik klonları Maraş 19 genotipinde halka lekeler oluşturmuş, yeni çıkan yapraklarda halka lekelerle birlikte yaprak kıvrılması ve bitkilerde genel sararma simptomlarına neden olmuştur. TRpep-47/13 aynı genotipte halka lekeler oluşturmuş ve yapraklarda küçülme gözlenmiştir. TRpep-171/3 ve TRpep-175/7 reassortant biyolojik klonları klorotik halka lekeler oluşturmuş ve yeni çıkan yapraklarda helezonik simptom gözlenmiş, yapraklarda deformasyona neden olmuştur (Şekil 4.39).

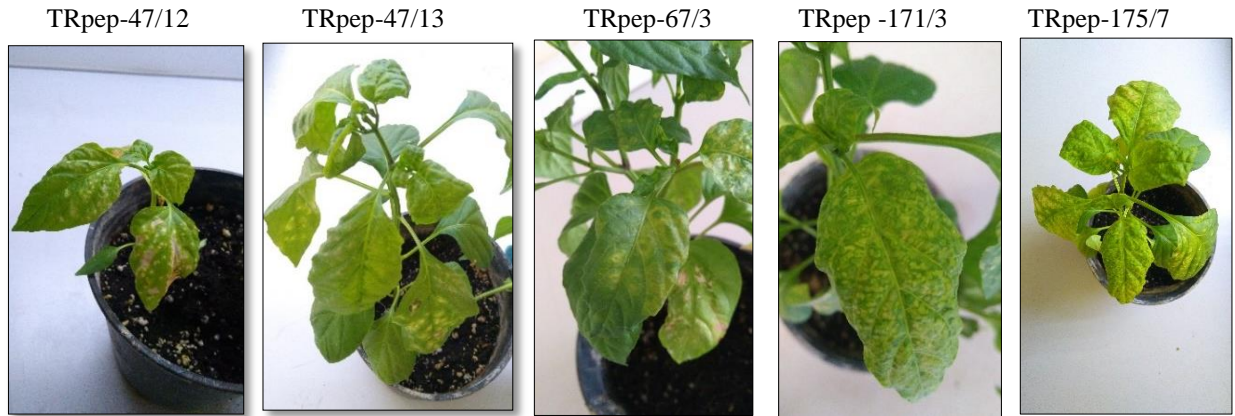
Maras 19



Şekil 4.39. TSWV izolatlarının Maras 19 genotipinde oluşturduğu belirtiler

C. baccatum 'PI 439381' hattına TRpep-47/12 ve reassortant TRpep-67/3 biyolojik klonlarıyla yapılan inokulasyon sonrası, bitkilerde klorotik halka ve genel sarılık belirtileri gözlemlenmiştir. Reassortant TRpep-47/13 izolatı inokulasyon yapılan yaprakta nekrotik ve klorotik halka lekeleri oluşturmuş, daha sonra sistemik enfeksiyona neden olmuştur. Yeni çıkan yapraklarda klorotik halkasal lekeler meydana getirmiştir. TRpep-171/3 ve TRpep-175/7 reassortant biyolojik klonları bitkilerde klorotik halka lekelerine, klorotik beneklenme ve sarılık belirtilerine neden olmuştur (Şekil 4.40).

PI 439381

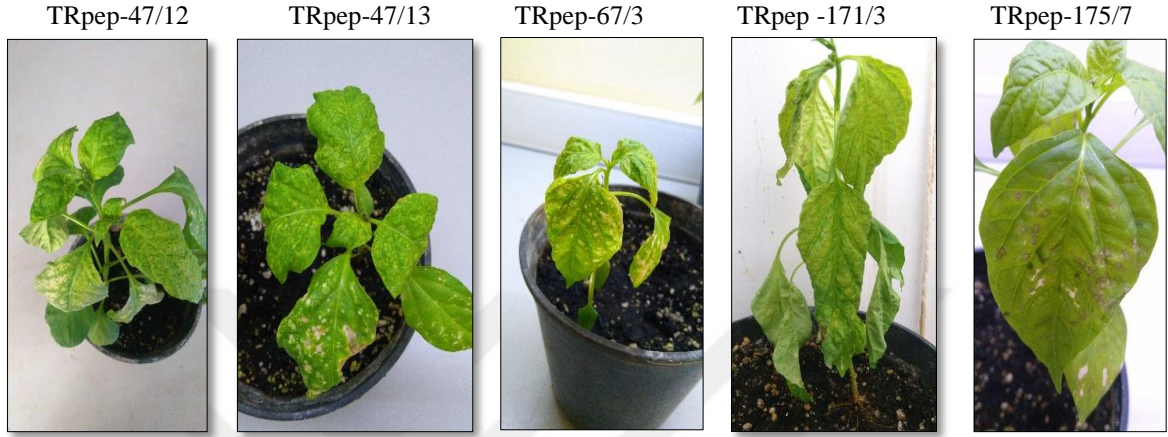


Şekil 4.40. TSWV izolatlarının PI 439381 genotipinde oluşturduğu belirtiler

Maras 6 genotipinde TRpep-47/12, TRpep-47/13, TRpep-67/3 ve TRpep-171/3 biyolojik klonlarıyla yapılan mekanik inokulasyon sonucu bitkilerde klorotik halka leke, yaprak kıvrılması ve bitkilerde genel sararma belirtilerine neden olmuştur. Diğer

izolatlardan farklı olarak TRpep-175/7, bir tekerrür bitkisinde inokulasyon yapılan yaprakta HR sonucu nekrotik lokal lezyon oluşturmuş ve yapraklar 7-10 gün sonra dökülmüştür, yeni çıkan yapraklarda ise klorotik beneklenme gözlenmiştir (Şekil 4.41). Diğer iki tekerrürde ise klorotik lokal lezyon ve beneklenme oluşturmuştur.

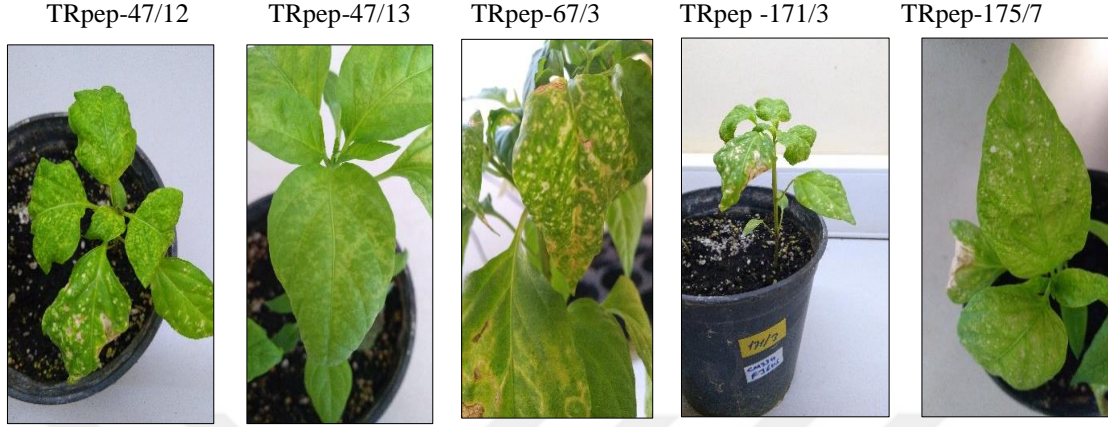
Maraş 6



Şekil 4.41. TSWV izolatlarının Maraş 6 genotipinde oluşturduğu belirtiler

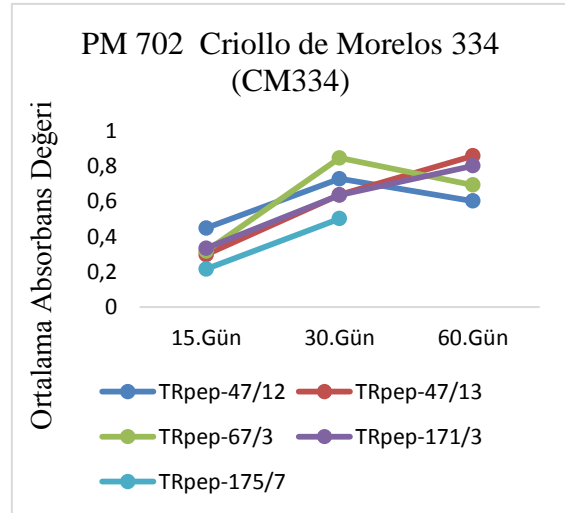
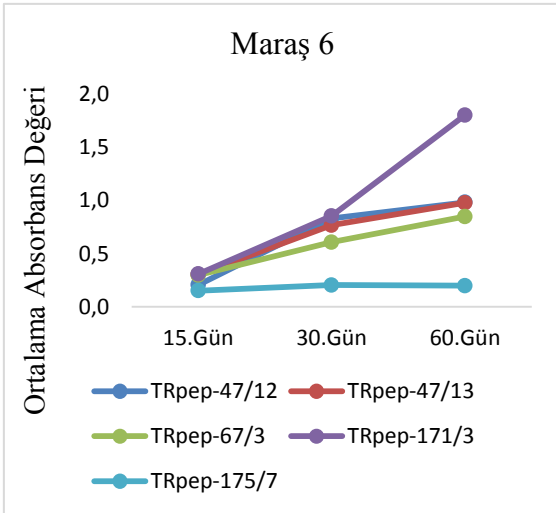
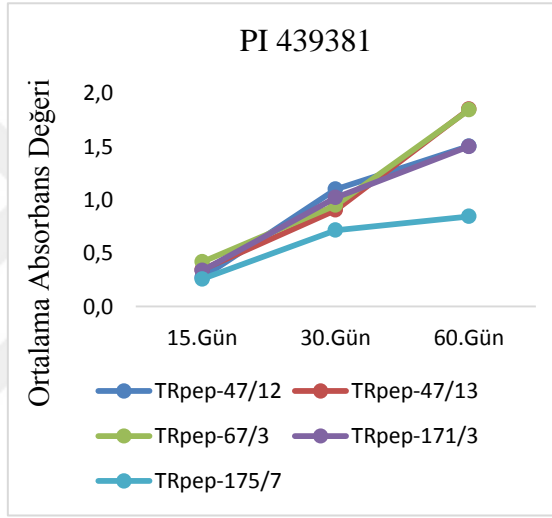
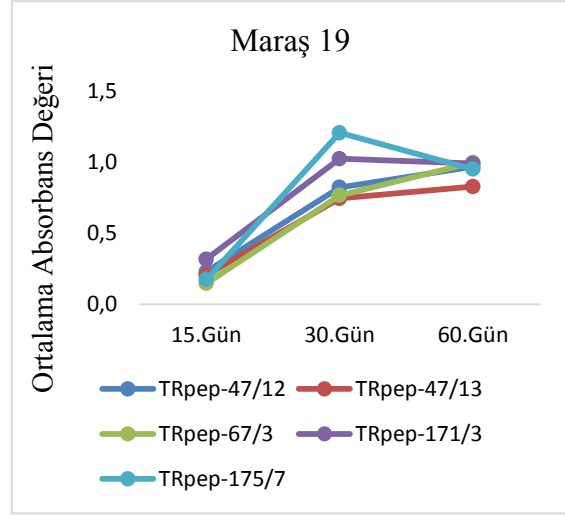
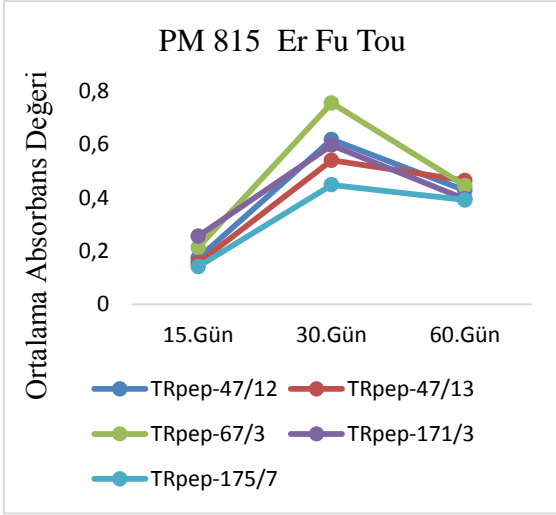
PM 702/Criollo de Morelos 334 (CM334) genotipinde, TRpep-47/12 inokulasyon yapılan yapraklarda klorotik halka lekeler oluştururken, 30. günden sonra yapraklarda kıvrılma ve şiddetli klorozlar meydana gelmiştir. TRpep-47/13 bitkilerde klorotik halka lekeler, klorotik beneklenme ve daha sonra şiddetli kloroza neden olmuştur. TRpep-67/3 ve TRpep-171/3 reassortant biyolojik klonları test bitkilerinde klorotik halka lekeler meydana getirmiştir. Reassortant TRpep-175/7 biyolojik klonu inokulasyon yapılan yapraklarda nekrotik halka lekelerine neden olmuş ve yeni çıkan yapraklarda da nekrotik halka lekeler görülmüştür (Şekil 4.42). İnokulasyondan 30 gün sonra bitkilerde kurumalar ve ölümler gerçekleştiği için gözlem ve ELISA testi yapılamamıştır.

PM 702 Criollo de Morelos 334
(CM334)



Şekil 4.42. TSWV izolatlarının PM 702/Criollo de Morelos 334 (CM334) genotipinde oluşturduğu simptomlar

TSWV-biber reassortant izolatları biber genotiplerinde, inokulasyondan sonraki 15, 30 ve 60. günde test bitkilerinin yeni çıkan yaprakları kullanılarak yapılan DAS-ELISA ile virüsün konukçusundaki hareketi izlenmiştir. Maraş 6 genotipinde reassortant TRpep-175/17 biyolojik klonu dışındaki diğer izolatların OD değerlerinde tüm zamanlarda artış gözlenmiştir. PI 439381 genotipinde, tüm biyolojik klonların OD değerlerinin Maraş 6 genotipinde olduğu gibi TRpep-175/17 klonunun düşük değerlerde ancak diğerlerinin ise artış gösterdiği belirlenmiştir. PM 815/Er Fu Tou genotipinde izolatların inokulasyonun 15. ve 30. günlerde OD değerlerinde artış gösterdiği, fakat 60. gündeki OD değerlerinin diğer genotiplerin 60. gün OD değerlerinden de düşük olduğu belirlenmiştir. Maraş 19 genotipinde de izolatların OD değerlerinde artış gözlenmiş fakat Maraş 6 ve PI 439381 genotipleri ile karşılaştırıldığında artış oranının düşük olduğu belirlenmiştir. PM 702/Criollo de Morelos 334 (CM334) genotipinde inokulasyondan 60.güne kadar TRpep-47/13 ve TRpep-171/3 biyolojik klonlarının OD değerlerinde artış izlenirken, diğer izolatlardan alınan OD değerlerinde düşüş kaydedilmiştir (Şekil 4.43).



Şekil 4.43. TSWV biyolojik klonlarının biber genotiplerine yapılan mekanik inokulasyon sonucu inokulasyon yapılmayan yaprakların DAS-ELISA ile testlenmesi sonucu elde edilen ortalama absorbanans değerleri

5. TARTIŞMA ve ÖNERİLER

Türkiye, örtü altı ve açıkta biber üretimiyle Akdeniz havzasında ve dünyada önde gelen üretici ülke konumundadır. Bu coğrafyada biber tarımının en büyük sorunlarından biri olan TSWV'nin Türkiye'de örtü altı ve açıkta biber tarımı yapılan alanlarda artan epidemileri rapor edilmeye başlamıştır. Bilinen virüs hastalıkları mücadele stratejileri, TSWV ile mücadelede yetersiz kalmaktadır. TSWV ile en etkili mücadele konukçu dayanıklılık kaynaklarının kullanılmasıdır. Bunun için de tarım alanlarında bulunan ve üretimde ekonomik kayıplara neden olan izolatların yapısı çok iyi bilinmelidir. Yapılan bu tez çalışmasında, örtü altında ve açıkta; sofralık, salçalık ve pul biber üretiminde önemli paya sahip olan Mersin, Adana ve Kahramanmaraş illerindeki biber tarımında ekonomik kayıplara neden olan TSWV izolatlarının yapısı, orijinleri ve izolatlar arası ilişkinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, Kahramanmaraş, Mersin ve Adana'daki örtü altı ve açıkta yetiştiricilik yapılan biber alanlarından elde edilen TSWV izolatlarının moleküler, biyolojik karakterizasyonu yapılmış, genetik çeşitliliği ve popülasyon yapısı incelenmiştir. Ayrıca, lokasyonda reassortant (yeniden yapılanmış) izolatların bulunma durumu araştırılarak biber genotiplerinin belirlenen olası reassortant izolatlara reaksiyonları incelenmiştir.

Üç ildeki biber alanlarından toplanan biber örneklerinde TSWV'nin tekli enfeksiyonunu taşıyan 14 izolat DAS-ELISA ile seçilmiş ve virüsün lokal enfeksiyon yaptığı *V. unguiculata* bitkileri kullanılarak saflaştırılmıştır. İzolatlardan saflaştırılan biyolojik klonların biyolojik karakterizasyonu *N. tabacum* cv. Samsun NN üzerinde yapılmış ve farklı tipte semptomlara neden oldukları belirlenmiştir. Daha sonra, TSWV izolat ve reassortantların biber genotipleriyle olan ilişkisinin ve saldırganlık düzeylerinin belirlenmesi amacıyla, TSWV izolatlarının biyolojik klonları *Tsw* dayanıklılık geni taşıyan (*C. chinense* 'PI 152225', *C. annuum* cv. Mertcan F₁) ve taşımayan (*C. annuum* cv. Naz F₁) biber genotiplerine mekanik olarak taşınmıştır. Duyarlı biber bitkilerinde, klorotik mozaik ve halka lekeler görülmüş, sistemik enfeksiyon sonucu yeni çıkan yapraklarda yaprak kıvrılması, küçük yaprak oluşumu gibi tipik belirtiler meydana gelmiştir. Dayanıklı biber genotiplerinde (i) lokal nekrotik lezyonlar, (ii) sistemik enfeksiyon sonucu mozaik, klorotik lekeler ve iç içe geçmiş dairesel lezyonlar, (iii) uç yapraklarda (inokulasyon yapılmayan) kloroz ve toplu iğne başı büyüklüğünde nekrotik lezyonlar, (iv) şiddetli sistemik nekroz sonucu bitki ölümü gibi farklı semptomlar gözlenmiştir. Meydana gelen bu

farklı simptomların gözlenmesi, açıkta ve örtü altında farklı tipte TSWV izolatlarının karışık enfeksiyon halinde bulunduğunu ve TSWV popülasyonunda biyolojik çeşitliliğin olduğunu göstermektedir.

Sinerjik etkileşim sonucunda, virüslerin birinin veya her ikisinin konukçusundaki replikasyonunda artışa olanak sağladığı bilinmektedir (Syller, 2012). Farklı virüslerin aynı konukçuda karışık enfeksiyon şeklinde bulunması sinerjik etkileşime neden olacağı gibi aynı virüsün farklı ırklarının da karışık enfeksiyonu konukçu bitkide (yaprak ve meyve) farklı tip ve şiddette simptom oluşumuna neden olmaktadır (Garcia-Cano ve ark., 2006). Benzer şekilde, Aramburu ve ark. (2015) farklı tipte TSWV izolatlarının karışık halde bulunduğunu ve dayanıklılığı kırmayan izolatların, dayanıklılığı kıran izolat ile karışık enfeksiyon halinde bulunma durumunda ise sinerjik etkileşim sonucunda dayanıklı biber genotiplerinde şiddetli sistemik nekroza neden olduğunu belirtmişlerdir. Üretim alanlarında TSWV'nin farklı ırklarının karışık enfeksiyon şeklinde bulunması konukçuda daha şiddetli simptomlar oluşturarak bitki ölümüne neden olması sonucu meydana getireceği zararın daha da artması söz konusudur.

TSWV izolatlarının biyolojik karakterizasyonunun belirlenmesi denemesi sonucunda, TRpep-209/3 nolu izolat ile *Tsw* geni taşıyan biber genotiplerine yapılan mekanik inokulasyon sonucunda, inokulasyon yapılan yaprakta meydana gelen nekrotik lezyon sonrası inokulasyon yapılmayan yapraklarda da nekrotik lekeler gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuç, genel olarak kabul edilen spesifik virüs-konukçu ilişkisinden dolayı enfeksiyonun başladığı noktada oluşan lokal HR dayanıklılık için yeterli olmadığını doğrulamaktadır (Moury ve ark.,1997). TRpep-47/9, TRpep-47/17 ve TRpep-150/7 TSWV biyolojik klonlarının *C. chinense* bitkilerinin inokulasyon yapılan yapraklarında nekrotik lezyon oluşurduktan sonra bitkide meydana gelen sistemik nekroz sonucu bitki ölümleri gerçekleştiği belirlenmiştir. Margaria ve ark. (2007)'da benzer şekilde yürüttükleri çalışmada p166^{RB} izolatının diğer izolatlardan farklı olarak *C.chinense*'de inokulasyon yapılan yapraklarda lokal nekrotik lezyonlar meydana getirdiğini ve daha sonra yeni çıkan yapraklarda da nekrotik lezyon oluştuğunu belirtmiştir.

Türk TSWV-biber izolatlarının *Tsw* dayanıklılığını kıran ve kırmayan biyolojik klonlarının (104) NSs gen bölgesinin 843 nt uzunluğundaki DNA dizisinden elde edilen aa dizinleri karşılaştırıldığında *Tsw* dayanıklılığını kıran ve kırmayan izolatlar arasında belirlenen spesifik bir aa değişiminin gözlenmediği, ancak izolatlar arasında birçok pozisyonda aa farklılıklarının olduğu belirlenmiştir. Yapılan filogenetik analizde ise

dayanıklılığı kıran ve kırmayan izolatların fenotiplerine göre gruplanmadığı görülmüştür. Bununla birlikte NSs bölgesinde meydana gelen çeşitli mutasyonlar, dayanıklılığı kıran fenotiplerin oluşmasına neden olmaktadır.

NSs proteininin konukçu bitkinin gen susturma mekanizmasını baskılayan protein olduğu ve bitkinin dayanıklılığının kırılmasından sorumlu olduğu bilinmektedir (Takede ve ark., 2002; de Ronde ve ark., 2013; 2014). *R* gen dayanıklılığına dayanarak, gen için gen mekanizması ve belirleyicileri virüs türü, streyni ve konukçu bitkiye bağlı olarak değişiklik gösterir. Birçok virüste farklı genler veya gen ürünlerinin (kılıf proteini, hareket proteini, viral polimeraz vb.) aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşturduğu bilinmektedir. Genellikle, *R* genine bağlı dayanıklılığın (çoğunlukla dominant monogenik) kırılması, avirülenslik faktörde meydana gelen spesifik nokta mutasyonlarıyla ilişkilendirilmiştir (Harrison, 2002). *Tsw* dayanıklılık genleri için *avr* protein olarak rol oynayan NSs proteinin aa dizinlerinin incelemesi sonucunda, dayanıklılığı kıran TSWV izolatlarının tamamında spesifik bir nokta mutasyonunun olmadığı, çeşitli aa pozisyonlarında farklılıklar gösterdiği belirtilmiştir (Tsompana ve ark., 2005; Margaria ve ark., 2007; Almasi ve ark., 2015; 2017). de Ronde ve ark. (2014) TSWV NSs proteininin ve diğer *Orthospovirus* NSs proteinlerinin kristal yapısının açıklanamadığını ve bu nedenle NSs proteininin üç boyutlu yapısının hala bilinmediğini belirtmiştir. Bu durum, NSs protein dizisindeki mutasyonların sonucunun proteinin yapısında ve işlev kaybının üzerinde etkisinin öngörülebilirliğini engellemektedir. Sonuç olarak, TSWV biber izolatlarının farklı yetiştirme koşullarından (açıkta ve örtü altı) ve çeşitli biber genotiplerinden elde edilmiştir. NSs geni bölgesinde var olan aa değişikliklerinin nedeninin konukçu bitki popülasyonunun sahip olduğu birden fazla dayanıklılık geninin seçilim baskısı sonucu meydana gelmiş olabileceği de düşünülmektedir.

TSWV-biber izolatlarının kısmi L, M ve S RNA bölgelerinin nükleotid dizinleriyle yapılan filogenetik analizde, RdRp gen bölgesi için izolatların coğrafi orijinine göre gruplandığı; TRpep-154 ve TRpep-160 izolatlarının diğerlerinden farklı olarak Güney Kore ve Çin izolatları ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. NSm gen bölgesine göre, TSWV-biber izolatlarının İtalya (HQ830185.1) izolatıyla aynı kladda yer alarak diğer referans izolatlardan ayrı gruplanmıştır. Ayrıca TSWV'nin farklı konukçularından elde edilen dizinlerin kullanılmasıyla oluşturulan filogenetik ağaçta, 21 TSWV-biber izolatlarının, İspanya domates referans izolatlarıyla gruplandığı belirlenmiş olup bu izolatların konukçu orijininin domates olabileceği düşünülmektedir. N gen

bölgesine göre, izolatlara Fransa ve İspanya izolatlarıyla ayrı bir grup oluşturmuş, diğer kladda ise İtalya, Güney Kore, Macaristan ve Avustralya izolatları yer almıştır.

NSs gen bölgesine göre TRpep-43 izolatu Fransa ve İtalya izolatlarıyla, TRpep-154, 160 ve 175 izolatları Güney Kore ve Fransa izolatlarıyla, TRpep-209 ve TRpep-215 izolatları ABD, İspanya ve Fransa izolatlarıyla aynı grupta yer alıp, diğer biber izolatlarından farklı kladda yer aldığı belirlenmiştir.

Popülasyonların tahmini F_{ST} (Fiksasyon indeksi) karşılaştırmaları yapıldığında alt popülasyonları oluşturan izolatlara arasında önemli bir farklılık belirlenmemiş, izolatlara coğrafi olarak birbirlerinden farklı olmadığı belirlenmiştir. Bazı TSWV-biber izolatlara dört farklı gen bölgelerine göre farklı ülkelerdeki izolatlara benzerlik göstermesinden dolayı biber üretim alanlarında farklı coğrafi orijinli izolatlara karışık olabileceği değerlendirmesini yapmak mümkündür. Türkiye'ye farklı ülkelerden ithalatı yapılan birçok bitki materyaliyle ve bu bitkilerde bulunan vektörlerle veya farklı orijinli TSWV izolatlara karışık enfeksiyon halinde ülkemize girmiş olabileceği düşünülmektedir.

TSWV'nin genetik yapısını incelemek ve bu viral türde varyasyonu şekillendiren potansiyel faktörleri açıklamak için tek bir konukçudaki coğrafi olarak farklı izolatlara kullanılarak moleküler popülasyon genetik yaklaşımı kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, Mersin, Adana ve Kahramanmaraş illerindeki biberdeki TSWV'nin popülasyon yapısında negatif ve pozitif seçilimin aynı zamanda rekombinasyon ve reassortment olaylarının etkili olduğu belirlenmiştir. Biber tarım alanlarımızda TSWV'nin doğal reassortant izolata varlığının belirlenmesi amacıyla, saflaştırılmış TSWV izolatlara ile yapılan analizlerde: 2 izolata (TRpep-154/5 ve TRpep/171/3) reassortment, 5 izolata (TRpep-47/13, TRpep-67/3, TRpep-209/8, TRpep-67/8, TRpep-175/7) ise rekombinasyon olayı sonucu meydana çıkmış olabileceği belirlenmiştir. Bununla birlikte, reassortment ve rekombinasyon olayı sonucu oluşan TSWV biyolojik klonlarının da ebeveyn izolatlara gibi *Tsw* dayanıklılığını kırmadığı belirlenmiştir. Bu yüzden, dayanıklılığı kıran TSWV biyolojik klonlarının oluşumu ile reassortment veya rekombinasyon olayları ilişkilendirilememiştir. Çok sayıda izolata ile çalışılmasına rağmen belirlenen rekombinasyon ve reassortment olayının az olmasının sebebini; tek bir konukçu, birbirine yakın bölgelerden alınan izolatlara ve en önemlisi TSWV izolatlara karışık enfeksiyon halinde ülkemize girmiş olmasıyla ilişkilendirilmiştir.

Tek-iplikli RNA virüslerinde, rekombinasyon olayı izolatlara yeni çevresel koşullara ve konukçuya adaptasyonunda önemli rol oynar. Çok parçalı RNA virüslerinde

rekombinasyon ve reassortment olaylarının her ikisi de genetik değişim için önemlidir (Bujarski ve Kaesberg, 1986).

Daha önceki birçok çalışmada, TSWV izolatlarında rekombinasyon ve reassortment olayının gerçekleştiğini (Qiu ve ark., 1998; Tentchev ve ark., 2011), reassortment olayının rekombinasyondan daha fazla görüldüğü belirtilmiştir (Tentch ve ark., 2011; Lian ve ark., 2013). TSWV'nin konukçu ve vektöründe çoğalabilmesi gibi özelliklerinden dolayı TSWV popülasyonundaki genetik heterojenite yüksektir. TSWV'nin farklı izolatları arasındaki reassortment ve/veya rekombinasyon olayı, NSs veya diğer genlerinde meydana gelen mutasyon sonucu yeni TSWV patotiplerinin bulunması ve dayanıklılık genlerinin farklı uyum yeteneğine sahip TSWV izolatlarındaki seçim baskısı gibi nedenler konukçu bitkilerde patolojik değişikliklere neden olabilmektedir (Qui ve Moyer, 1999; Aramburu ve ark., 2010; Lopez ve ark., 2011). Reassortment olayı genellikle aynı virüsün iki farklı streyn ve/veya izolatı arasında meydana geldiği görülmüştür; fakat düşük oranda da olsa farklı türler arasında da oluşmaktadır. Örneğin, Webster ve ark. (2011) *Orthospovirus* üyesi olan *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) ve *Groundnut ringspot virus* (GRSV)'un M RNA reassortantı olan $L_GM_T S_G$ genotipinin güney Florida'da yetiştirilen domateslerde yaygın olarak bulunduğunu ve şiddetli simptomlara neden olduğunu belirtmişlerdir. Orthospovirüslerin genetiği ile ilgili yapılan çalışmalarda genellikle konukçu bitki üzerinde durulmuştur. Bu cinsin üyelerinin konukçu ve vektörlerinde çoğalma özelliğine sahip olmasından dolayı reassortment olayının tripslerin bünyesinde meydana gelmiş olma olasılığının da değerlendirilmesi gereklidir.

Moury ve ark. (2006)'nın belirttiği üzere haplotip sayısı ve çeşitliliği viral popülasyonun genetik çeşitliliğinin ölçülmesinde kullanılan parametrelerden biridir. TSWV-biber izolatlarının L, M ve S RNA segmentlerinin nükleotid çeşitliliğine bakıldığında RdRp'nin baz başına nükleotid çeşitliliği (P_i, π) 0.013, NSm'nin 0.013, N'in 0.011 ve NSs'nin 0.018 olduğu hesaplanmıştır. Timmerman-Vaughan ve ark. (2014) Yeni Zelanda'daki farklı konukçulardan elde edilen TSWV izolatlarında π değerlerini RdRp gen bölgesinde 0.012 ve N gen bölgesinde 0.003 olarak hesaplamıştır. Kaye ve ark (2010) ABD'deki TSWV-yerfıstığı izolatlarında RdRp, NSm ve N genininindeki π değerleri sırasıyla 0.013, 0.010 ve 0.010, Tsompana ve ark. (2005) ise farklı ülkelerden elde edilen TSWV izolatlarındaki NSm, N ve NSs genindeki π değerlerini sırasıyla 0.030, 0.024 ve 0.034 olarak hesaplamıştır. Bu durum, TSWV'nin geniş konukçu dizisine sahip olması ve vektöründe persistent propagatif olarak taşınması ile ilişkilendirilebilir. Yapılan çalışmada

sadece biber izolatlarından elde edilen TSWV izolatlarıyla genetik çeşitlilik belirlenmiş olup, farklı konukçulardan elde edilecek izolatlar ile bu analizlerin gerçekleştirilip karşılaştırmalar yapılması TSWV'nin farklı konukçularındaki popülasyon çeşitliliği hakkında detaylı bilgiler sunacaktır.

Haplotip çeşitliliği, 0 ile 1 arasında değer alır; ve değer 0'a yaklaşması çeşitliliğin az, 1'e yakın olması durumunda ise haplotip çeşitliliğin yüksek olduğu yorumu yapılmaktadır (Nei ve Tajima, 1981). Analizi yapılan dört gen bölgesinin haplotip çeşitliliği 0.899 ile 0.982 arasında değer aldığından incelenen gen bölgelerinde yüksek oranda çeşitliliğin olduğu söylenebilmektedir. Coğrafi bölgelere göre alt popülasyonlara ayrılan izolatların kendi aralarındaki nükleotid çeşitliliğinin düşük fakat haplotip çeşitliliğinin yüksek olması TSWV popülasyonunun genişlediğini (büyüdüğünü) göstermektedir. TSWV'nin bitkilerde yaygın olarak bulunması ve ekonomik düzeyde önemli oranda zarara sebep olması TSWV popülasyonunun büyüdüğünü doğrulamaktadır.

Dört gen bölgesinin Tajima's *D* değerinin istatistiki olarak anlamlı ve negatif değer alması popülasyon darboğazından geçtiğini göstermektedir (Tajima, 1989; Tsompana ve ark., 2005; Kaye ve ark., 2010). Örneğin, tripslerin etmenleri bir bitkiden diğerine taşıma esnasındaki seçiciliği ve trips-virüs replikasyon özgünlüğü gibi nedenler TSWV'nin belirli trips biyotiplerine adaptasyonu zorunlu kılar; bu da coğrafi varyantların oluşumuna sebep olur (Bergstrom ve ark., 1999; Tsompana ve ark., 2005). Tajima's *D*, Fu ve Li's *D** ve *F** ve Fu's *F_s* testlerinin negatif ve istatistiki olarak anlamlı olması, arka plan seçilimi işaret eder (Fu, 1997), güçlü negatif seçilimin ilgili bölgelerde varyasyonu baskıladığını ve popülasyon genişlemesi nedeniyle, popülasyonda yüksek miktarda ender haplotiplerin varlığını göstermektedir.

İzolatların moleküler karakterizasyonunu yapmak üzere kullanılan RdRp, NSm, N ve NSs gen bölgelerinin dN/dS (ω) oranının <1'in altında olduğu ve kılıf proteinin kodlandığı N geninin (777 nt) en fazla negatif (safılaştırıcı) seçilim etkisinde olduğu (17 kodon) belirlenmiştir. Chare ve Holmes (2004), böceklerle taşınan RNA virüslerin kılıf proteinlerinin aa dizinlerini diğer yollarla taşınanlara göre daha fazla negatif seçilime maruz kaldığını bildirmiştir. Farklı konukçulardan elde edilen TSWV izolatlarıyla yapılan çalışmalarda N geninin pozitif seçilim etkisinde olduğu belirlenmiş olmasına rağmen (Tsompana ve ark., 2005; Kaye ve ark., 2010; Tentchev ve ark., 2011) bu çalışmada, N geninde pozitif seçilim etkisinde olan herhangi bir kodon belirlenmemiştir. Timmerman-Vaughan ve ark. (2013) farklı yıllarda farklı konukçulardan elde ettikleri TSWV

izolatlarının N geninde pozitif seçim etkisinde olan kodon belirleyemediklerini belirtmişlerdir.

NSs (843 nt) gen bölgesinin dN/dS (ω) oranı SLAC metodu ile 0.416 olarak bulunmuştur. SLAC ve FEL analizi sonucu toplamda 12 kodon bölgesinin negatif seçim etkisinde olduğu ve 2 kodon bölgesinin ise pozitif seçim etkisinde olduğu belirlenmiştir. Tentchev ve ark. (2011) NSs geninin 11 kodonun pozitif seçim etkisinde olduğu ve N geninin dN/dS (ω) değerinin NSs'den küçük olduğunu belirlemiştir. RdRp geninde (948 nt) 1 kodon bölgesinin pozitif seçim etkisinde olduğu belirlenirken, NSm gen bölgesinde (771 nt) belirlenememiştir. RdRp gen bölgesinde belirlenen pozitif seçim bölgesi virüsün konukçu genotiplerindeki replikasyonu ve bitkideki sistemik hareketinde önemli role sahip olabilir. Lopez ve ark. (2011) NSm hareket protein geninde meydana gelen pozitif seçim domateste *Sw-5* dayanıklılığını kıran TSWV streynleriyle ilişkilendirmiştir. Negatif seçim bitki virüslerinin varlığını sürdürmelerinde önemli bir olaydır. Bu seleksiyon, replikaz, hareket veya kılıf proteininin kodlandığı genlerde fonksiyonunu kısıtlayan zararlı mutasyonların popülasyondan ayıklanmasında rol oynar. Popülasyonun yeterince büyük olması şartıyla, popülasyon darboğazdan geçerken (örn. aynı bitki üzerinde bir yapraktan diğerine geçerken veya vektörle taşınırken) zararlı mutasyonlar içeren varyantları eleyerek virüs popülasyonunu stabilize eder (Elena ve ark., 2008). Sonuç olarak, negatif seçim genin fonksiyonunda bir değişikliğe neden olmazken, pozitif seçim ise izolatın çevresel faktörlere (konukçu, lokasyon vb.) adapte olmasında rol oynadığı bilinmektedir. İzolatlarda belirlenen pozitif seçimlerin izolatların konukçu, vektör ve/veya vektör ile taşınmasında etkili olabileceği fakat doğrudan ilişkilendirmenin elimizdeki verilerle mümkün olmadığı, ancak bu izolatlar ile daha detaylı çalışılması sonucu değerlendirmek daha doğru olacaktır. TSWV'nin dayanıklılık genine hızlı adaptasyonu muhtemelen yetiştirme alanlarındaki heterojen popülasyonundaki *Tsw*-virulent varyantların seçilimi ve vektörler aracılığıyla hızlı yayılımıyla gerçekleşmektedir. Dayanıklı ıslah stratejileri ve kullanımı için önemli olan patojen virülensliğindeki evrimi destekleyen faktörleri anlamak sürekli koruma sağlayacaktır.

Türk TSWV-biber izolatlarıyla mücadele için farklı biber hat ve genotiplerinde virüs-konukçu ilişkisini incelemek için, *Tsw*-dayanıklılığını kıran bir, reassortant izolatlardan 4 tane seçilmiştir. Denemede kullanılan PM 702/Criollo de Morelos 334 genotipi ve PI 439381 hattında Türk TSWV-biber reassortant izolatlarına karşı dayanıklılık taşımadığı belirlenmiştir. Ayrıca, Suzuki ve ark. (2003) yapmış oldukları

çalışmada *C. baccatum* PI 439381 tipinin CMV ve TSWV enfeksiyonuna karşı duyarlı olduğunu belirtmiştir. PM 815/Er Fu Tou genotipinde ise enfeksiyon diğer genotiplere kıyasla daha yavaş ilerlemiştir. Yeni çıkan birçok yaprakta semptom gözlenmemiş ve virüs için yapılan DAS-ELISA testi negatif sonuçlanmıştır. Sistemik enfeksiyon sonrasında asimptomatik yaprakların oluşması RNA susturma mekanizmasıyla ilişkilendirilerek virüs birikimini azalttığı ve bu yapraklarda semptom oluşumunu etkilediği düşünülmektedir (Baulcombe, 2004; Ghoshal ve Sanfaçon, 2015).

Benzer durum Margaria ve ark.(2007)'nin çalışmasında bazı izolatların *C. chinense*'de sistemik enfeksiyon oluşturduğunu fakat yeni çıkan yapraklarda semptom gözlenmediği ve Western blot analizi ile de etmenin belirlenmediği teyit edilmiştir.

Reassortant TRpep-175/7 biyolojik klonu Maraş 6 genotipinin birinci tekerrür bitkisinde inokulasyon yapılan yaprakta HR sonucu nekrotik lokal lezyon oluşturduktan sonra yeni çıkan yapraklardaki sistemik enfeksiyon sonucu bitkilerde klorotik beneklenmeler oluşturmuştur. İnokulasyon yapılan yapraklarda virüs birikimini engellemiş olmakla birlikte, virüsün hücreler arası yayılmasını engelleyememiştir. Maraş 6 ve Maraş 19 genotiplerinin izolatlarına reaksiyonları karşılaştırılacak olursa; inokulasyon sonrasındaki 7-10 gün sonrasındaki semptom oluşturması ve DAS-ELISA testi sonucundaki absorbans değerlerinin daha yüksek olması göz önünde bulundurularak Maraş 6'nın Maraş 19 genotipine göre daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Collembola-Cornejo ve ark. (2003) ve Hoang ve ark. (2013) *C. annuum* türünde TSWV'ye dayanıklılığın bulunamamış olması, dayanıklılık gen veya genlerin *C. annuum* türlerinde nadir bulunduğunu göstermektedir. Biber ve domateste enfeksiyona neden olan TSWV ve diğer tospovirüslere yeni dayanıklılık veya tolerans kaynaklarının değerlendirilmesi gereklidir.

KAYNAKLAR

- Adkins, S. (2000). *Tomato spotted wilt virus*-positive steps towards negative success. *Molecular Plant Pathology*, 1(3)de la,151-157.
- Allen, W.R., Broadbent, A.B. (1986). Transmission of *tomato spotted wilt virus* in Ontario greenhouses by *Frankliniella occidentalis*. *Canadian journal of plant pathology*, 8, 33–38.
- Almasi, A., Csillery, G., Csomor, Z., Nemes, K., Palkovics, L., Salanki, K., Tobias, I. (2015). Phylogenetic analysis of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) NSs protein demonstrates the isolated emergence of resistance breaking strains in pepper. *Virus Genes*, 50: 71-78.
- Almasi, A., Nemes, K., Csomor, Z., Tobias, I., Palkovics, L., Salanki, K. (2017). A single point mutation in *Tomato spotted wilt virus* NSs protein is sufficient to overcome *Tsw*-gene-mediated resistance in pepper. *Journal of General Virology*, 98, 1521–5.
- Almási, A., Nemes, K., Salánki, K. (2020). Increasing diversity of resistance breaking pepper strains of *Tomato spotted wilt virus* in the Mediterranean region. *Phytopathologia Mediterranea*, 59(2): 385-391.
- Anfoka, G.H., Abhary, M., Stevens, M.R. (2006). Occurrence of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in Jordan. *EPPO Bull.* 36, 517–522. *Annals of Applied Biology*, 143,143-152.
- Aramburu, J., Galipienso, L., Soler, S., López, C. (2010). Characterization of *Tomato spotted wilt virus* isolates that overcome the *Sw-5* resistance gene in tomato and fitness assays. *Phytopathologia Mediterranea*, 49, 342–351.
- Aramburu, J., Galipienso, L., Soler, S., Rubio, L., López, C. (2015). A severe symptom phenotype in pepper cultivars carrying the *Tsw* resistance gene is caused by a mixed infection between resistance-breaking and non-resistance-breaking isolates of *Tomato spotted wilt virus*. *Phytoparasitica*, 43,597.
- Arlı-Sökmen, M., Mennan, H.,Sevik, M. A., Ecevit, O. (2005). Occurence of viruses in field- grown pepper crops and some of their reservoir weed hosts in Samsun, Turkey. *Phytoparastica*, 33 (4), 347-358.
- Arli Sokmen, M., Sevik, M. (2006). Viruses infectig field- grown tomatoes in Samsun, Turkey, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 39(4): 283- 288pp.
- Arnedo-Andrés, M.S., Luis-Arteaga, M. & Gil Ortega, R. (2006). New inheritance studies related to *Potato Virus Y* (PVY) resistance in *Capsicum annuum* L. ‘Serrano Criollo de Morelos-334’. *Euphytica*, 151, 95.
- Arpacı, B., Ak, A., Abak, K. (2016). Kök Boğazı Yanıklığı Hastalığına Dayanıklı Biber (*Capsicum annuum* L.) Melezlerinin Anaç Performansları. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*: 26 (1) , 7-16.

- Avila, Y., Stavisky, J., Hague, S., Funderburk, J., Reitz, S. and Momol, T. (2006). Evaluation of *Frankliniella bispinosa* (Thysanoptera: Thripidae) as a vector of the *Tomato spotted wilt virus* in pepper. *Florida Entomologist*: 89(2), 204-207.
- Azeri, T. (1981). Preliminary report of tomato spotted wilt virus and its epidemy on tobacco in the Çanakkale region of Turkey, *Journal of Turkish Phytopathology*: 10 (2-3), 79- 87pp.
- Azeri, T., (1994). Detection of tomato spotted wilt virus in tabacco and tomato cultivars by enzyme linked immunosorbent assay. *Journal of Turkish Phytopathology*, 23(1): 37- 46pp.
- Bananej, K., Shahraeen, N., Ahoonmanesh, A. and Lasemann, D.E. (1998). *Tomato spotted wilt virus* Identification of from tomato fields in Varamin 34 area. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 30-36.
- Bandla, M.D., Campbell, L.R., Ullman, D.E., Sherwood, J.L. (1998). Interaction of Tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) glycoproteins with a thrips midgut protein, a potential cellular receptor for TSWV. *Phytopathology*, 88:98–104.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 431:356- 363.
- Barboza, G. E., de Bem Bianchetti, L., Stehmann, J. R. (2020). *Capsicum carassense* (*Solanaceae*), a new species from the Brazilian Atlantic Forest. *PhytoKeys*, 140, 125.
- Bergstrom, C.T., McElhany, P., Real, L.A. (1999). Transmission bottlenecks as determinants of virulence in rapidly evolving pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96, 5095–5100.
- Bertrand, P. (2001). 2000 Tobacco disease losses. 2000 Georgia Tobacco Research-Extension Report. University of Georgia Coop. Res.-Ext. Publ. 1-2001: 2.
- Best, R.J. (1961). Recombination experiments with strains A and E of *tomato spotted wilt virus*. *Virology*, 15, 327–339.
- Black, L. L., Hobbs, H. A., and Gatti, J. M. Jr. (1991). *Tomato spotted wilt virus* resistance in *Capsicum chinense* PI 152225 and 159236. *Plant Disease*, 75: 863.
- Boiteux, L. S. (1995). Allelic relationships between genes for resistance to *tomato spotted wilt tospovirus* in *Capsicum chinense*. *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 146-149.
- Boiteux, L.S. and Nagata, T. (1993). Susceptibility of *Capsicum chinense* PI 159236 to *tomato spotted wilt virus* isolates in Brazil. *Plant Disease*, 77, 210.
- Bozdoğan, V., Kamberoğlu, M.A. (2015). Incidence and distribution of Tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) in vegetable crops in Antalya Province of Turkey. *Turkish Journal of Phytopathology*, 44 (1-3): 39-50.
- Brittlebank, C. C. (1919). Tomato diseases. *Journal of Agriculture Victoria*, 27: 231-235.

- Bujarski, J., Kaesberg, P. (1986). Genetic recombination between RNA components of a multipartite plant virus. *Nature*, 321, 528–531.
- Cebolla-Cornejo, J., Soler, S. and Nuez, F. (2007). Genetic erosion of traditional varieties of vegetable crops in Europe: tomato cultivation in Valencia (Spain) as a case Study. *International Journal of Plant Production*, 1(2): 113-128.
- Chare, E.R., Holmes, E.C. (2004). Selection pressures in the capsid genes of plant RNA viruses reflect mode of transmission. *Journal of General Virology*, 85:3149–3157.
- Chatzivassiliou, K., Peters, D., and Katis, N. I. (2007). The role of weeds in the spread of *Tomato spotted wilt virus* by *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) in tobacco crops. *Journal of Phytopathology*, 11:699-705.
- Chen, T. C., Tsai, W. T., Kang, Y. C., Wang, Y. C., Yeh, S.D. (2016). Using monoclonal antibodies against the common epitopes of NSs proteins for the prompt detection and differentiation of tospoviruses prevalent in Euro-America and Asia regions. *European Journal of Plant Pathology*, 144:509-524.
- Chiemsombat, P., Adkins, S. (2006). *Tospoviruses* In: Characterization, Diagnosis and Management of Plant Viruses (Rao, G.P., Lava Kumar, P. And Holguín-Peña, R.J., eds), pp. 1–37. Houston, TX: Studium Press.
- Cho, J.J., Mau, R.F.L., German, T.L., Hartmann, R.W., Yudin, L.S., Gonsalves, D., Provvidenti, R. (1989). A multidisciplinary approach to management of *tomato spotted wilt virus* in Hawaii. *Plant Disease*, 73, 375-383.
- Chung, B.N., Lee, J.H., Kang, B.C., Koh, S.W., Joa, J.H., Choi, K.S., Ahn, J.J. (2018). HR-Mediated Defense Response is Overcome at High Temperatures in Capsicum Species. *Plant Pathology*, 34(1): 71-77.
- Clark, M. F., Adams, A.N. (1977). Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475–483.
- Cortez, I., Saaijer, J., Wongjkaew, K. S., Pereira, A. M., Goldbach, R. Peters, D., Kormelink, R. (2001). Identification and characterization of a novel tospovirus species using a new RT-PCR approach. *Archives of Virology*, 146: 265-278.
- Dağlı, F. ve Tunç, İ. (2006). Frankliniella occidentalis (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) Üzerinde Farklı Gruplardan İsektisidlerle Yaprak Kalıntı Testleri. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19 (1): 9-14.
- De Borbón, C. M., Gracia, O., De Santis, L. (1999). Survey of Thysanoptera occurring on vegetable crops as potential Tospovirus vectors in Mendoza, Argentina. *Revista de Sociedad Entomologica Argentina*, 58: 59-66.
- De Haan, P., Kormelink, R., de Oliveira Resende, R., van Poelwijk, F., Peters, D., Goldbach, R. (1991). *Tomato spotted wilt virus* L RNA encodes a putative RNA polymerase. *Journal of General Virology*, 72:2207–2216.

- de Ronde, D., Butterbach, P., Lohuis, D., Heild, M., van Lent, J. W. M., Kormelink, R. (2013). *Tsw* gene-based resistance is triggered by a functional RNA silencing suppressor protein of the *Tomato spotted wilt virus*. *Molecular Plant Pathology*, 14, 405–415.
- de Ronde, D., Pasquier, A., Ying, S., Butterbach, P., Lohuis, D., Kormelink, R. (2014). Analysis of *Tomato spotted wilt virus* NSs protein indicates the importance of the N-terminal domain for avirulence and RNA silencing suppression. *Molecular Plant Pathology*, 15, 185–195.
- Debreczeni, D.E., López, C., Aramburu, J., Darós, J.A., Soler, S., Galipienso, L., Falk, B.W., Rubio, L. (2015). Complete sequence of three different biotypes of *tomato spotted wilt virus* (wild type, tomato *Sw-5* resistance-breaking and pepper *Tsw* resistance-breaking) from Spain. *Archives of Virology*, August 2015, Volume 160, Issue 8, pp 2117–2123.
- Deligöz, I., Sökmen, M.A., Sarı S. (2014). First report of resistance breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* (Tospovirus; Bunyaviridae) on resistant sweet pepper cultivars in Turkey. *New Disease Reports*: 30, 26.
- Díaz-Pérez, J. C., Gitaitis, R. and Mandal, B. (2007). Effects of plastic mulches on root zone temperature and on the manifestation of tomato spotted wilt symptoms and yield of tomato. *Scientia Horticulturae*, 114(2): 90-95.
- Diaz-Perez, J.C., Gitaitis, R., Mandal, B. (2007). Effects of plastic mulches on root zone temperature and on the manifestation of tomato spotted wilt symptoms and yield of tomato. *Scientia Horticulturae*, 114, 90–95.
- Dietzgen, R.G., Twin, J., Talty, J., Selladurai, S., Carroll, M.L., Coutts, B.A., Berryman, D.I., Jones, R.A.C. (2005). Genetic variability of *Tomato spotted wilt virus* in Australia and validation of real time RT-PCR for its detection in single and bulked leaf samples. *Annals of Applied Biology*, 146, 517–530.
- Djian-Caporalino, C., Fazari, A., Arguel, M.J., Vernie, T., VandeCastele, C., Faure, I., Brunoud, G., Pijarowski, L., Palloix, A., Lefebvre, V., Abad, P. (2007). Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) Me resistance genes in pepper (*Capsicum annum* L.) are clustered on the P9 chromosome. *Theoretical and Applied Genetics*, Feb;114(3):473-86.
- Duffus, J.E., (1971). Role of weeds in the incidence of virus disease. *Annual Review of Phytopathology*, 15:319-335.
- Elena, S.F., Agudelo-Romero, P., Carrasco, P., Codon̄er, F.M., Martı́n, S., Torres-Barcelo´ C, Sanjua´n, R. (2008). Experimental evolution of plant RNA viruses. *Heredity*, 100:478–483.
- Espinosa, P. J., Bielza, P., Contreras, J. and Lacasa, A., (2002). Insecticide resistance in field populations of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) in Murcia (south-east Spain). *Pest Management Science*, 58:967-971.
- FAOSTAT (2020) www.faostat.fao.org (Erişim Tarihi: 01.06.2020).

- Fidan H., Sarı, N. (2019). Molecular characterization of resistance-breaking *tomato spotted wilt virus* (TSWV) isolate medium segment in tomato. *Applied Ecology And Environmental Research*, vol.17, pp.5321-5339.
- Fidan, H., Koç, G., Topçu, T. (2016). Anthurium sp.'de *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) Enfeksiyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. *Alatarım*. 15(2): 28-36.
- Florini, D. A., Zitter, T. A. (1987). *Cucumber mosaic virus* (CMV) in peppers (*C. annuum* L.) in New York and associated yield losses. *Phytopathology*, 77: 652.
- Freeman, S., Herron, J.C. 2007. *Evolutionary Analysis*, Second Edition USA, Prentice Hall., 704 pp.
- Fu, Y., Li, W.H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133:693–709.
- Fu, Y. (1996) New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. *Genetics*; 143: 557–570.
- Fu, Y. (1997). Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics*, 147 2:915-925.
- García-Cano, E., Resende, R. O., Fernández-Muñoz, R., and Moriones, E. (2006). Synergistic interaction between Tomato chlorosis virus and Tomato spotted wilt virus results in breakdown of resistance in tomato. *Phytopathology*, 96:1263-1269.
- German, T.L., Ullman, D.E., Moyer, J.W. (1992). Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Annual Review of Phytopathology*, 30, 315–348.
- Ghoshal, B., Sanfaçon, H. (2015). Symptom recovery in virus-infected plants: Revisiting the role of RNA silencing mechanisms. *Virology*, May;479-480:167-79. Epub 2015 Feb 9. PMID: 25677651.
- Gniffke, P.A., Shieh, S.C., Lin, S.W., Sheu, Z.M., Chen, J.R., Ho, F.I., Tsai, W.S., Chou, Y.Y., Wang, J.F., Cho, M.C., Roland, S., Kenyon, L., Ebert, A.W., Srinivasan, R., Kumar, S. (2013). Pepper research and breeding at AVRDC—the world vegetable center. In: Proceedings of XV EUCARPIA meeting on genetics and breeding of capsicum and eggplant, Turin, Italy, 2–4 September, pp 305–311.
- Green, S. K., Kim, J.S. (1994). Source of resistance to viruses of pepper (*Capsicum* spp.): A catalog. Technical Bulletin, 20, AVRDC, 64.
- Goldbach, R., Peters, D. (1996). Molecular and biological aspects of tospoviruses. In: Elliott, R.M. (Ed.), *The Bunyaviridae*. Plenum Press, New York.
- Golnaraghi, A.R., Shahraeen, N., Pourrahim, R., Ghorbani, Sh., Farzadfar, Sh. (2001). First report of Tomato spotted wilt virus on soybean in Iranian Plant Diseases, 85, 1290.

- Green, S. K., Kim, J. S. (1991). Characteristics and control of viruses infecting peppers, a literature review. Asian Vegetable Research and Development Centre, Technical Bulletin, 18, 60 p.
- Greenhough, D.R., and Black, L.L. (1990). Aluminium-surfaced mulch: an approach to the control of tomato spotted wilt virus in solanaceous crops. *Plant Disease*, 74:805-808.
- Griep, R.A., Prins, M., van Twisk, C., Keller, H.J.H.G., Kerschbaumer, R.J., Kormelink, R., Golbach, R.W., Schots, A. (2000). Application of Phage display in selecting Tomato spotted wilt virus –Specific single -Chain antibodies (scFvs) for sensitive diagnosis in ELISA. *Phytopathology*, 90: 183-190.
- Güneş, N., Gümüş, M. (2019). Detection and Characterization of *Tomato spotted wilt virus* and *Cucumber mosaic virus* on Pepper Growing Areas in Antalya, Journal Of Agricultural Sciences-Tarım Bilimleri Dergisi, vol.25, pp.259-271.
- Hanssen, I. M., Lapidot, M., Thomma, B. P. H. J. (2010). Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23:539–548.
- Harrison, B.D. (2002). Virus variation in relation to resistance-breaking in plants. *Euphytica*, 124, 181–192. <https://doi.org/10.1023/A:1015630516425>.
- Hedrick, P.W. (2005). A standardized genetic differentiation measure *Evolution*, 59 (8), 1633-1638.
- Hoang, N.H., Yang, H.B., Kang, B.C. (2013). Identification and inheritance of a new source of resistance against Tomato spotted wilt virus (TSWV) in *Capsicum*. *Scientia Horticulturae*, 161. pp. 8-14.
- Hu, Z.Z., Feng, Z.K., Zhang, Z.J., Liu, Y.B., Tao, X.R. (2011). Complete genome sequence of a tomato spotted wilt virus isolate from China and comparison to other TSWV isolates of different geographic origin. *Archives of Virology*, 156, 1905.
- Hudson, R.R. (2000). A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics*, 155:2011–2014.
- Hudson, R.R., Boos, D.D., Kaplan, N.L. (1992). A statistical test for detecting geographic subdivision. *Mol Biol Evol* 9:138–151.
- Hunziker, A.T. (2001). *Genera solanacearum: the genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system*. ARG Gantner Verlag K-G, Liechtenstein.
- Ie, T.S. (1970). Tomato spotted wilt virus. In: *Descriptions of Plant Viruses* No. 39, October.
- Jahn, M., Paran, I., Hoffmann, K., Radwanski, E.R., Livingstone, K.D., Grube, R.C., Aftergoot, E., Lapidot, M. And Moyer, J. (2000). Genetic mapping of the *Tsw* locus for resistance to the *tospovirus tomato spotted wilt virus* in *Capsicum* spp. and its relationship to the Sw-5 gene for resistance to the same pathogen in tomato. *The American Phytopathological Society*, 13 (6): 673-682.

- Jones, D.R. (2005). Plant viruses transmitted by thrips. *European Journal of Plant Pathology*, 113, 119–157.
- Kameroğlu, M.A., Çalışkan A.F., Alan, B. (2009). First Report of Tomato spotted wilt virus on eggplant in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 91(1): 231-231.
- Kaye AC, Moyer JW, Parks EJ, Carbone I, Cubeta MA (2011). Population genetics analysis of tomato spotted wilt virus on peanut in North Carolina and Virginia. *Phytopathology*, 101:147–53.
- Kazinczi, G., Horváth, J., Takács, A. (2007). Tospoviruses on ornamentals. *Plant Viruses*, 1, 142–162.
- Keleş-Öztürk, P., Baloğlu, S. (2019). Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Açık Alanda Yetiştirilen Biberlerde Bazı Virüslerin Serolojik ve Moleküler Tanısı . Alatarım.
- Kenyon, L., Kumar, S., Tsai, W.S., Hughes, J.d. (2014). Virus diseases of peppers (*Capsicum* spp.) and their control. *Advances in Virus Research*, 90:297-354. doi:10.1016/B978-0-12-801246-8.00006-8.
- Kim, H.J., Han, J.H., Yoo, J.H., Cho, H.J., Kim, B.D. (2008). Development of a sequence characteristic amplified region marker linked to the L4 locus conferring broad spectrum resistance to tobamoviruses in pepper plants. *Molecules and Cells*, 30;25(2):205-10. Epub 2008 Mar 31. PMID: 18414011.
- Kimura, M. (1968). Evolutionary Rate at the Molecular Level. *Nature*, 217, 624–626.
- Kirk, W. D. J., and Terry, L. I. (2003). The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Agricultural and Forest Entomology*, 5:301–310.
- Koike, S.T., Gladdens, P., Paulus, A.O. (2007). Vegetable diseases: a color handbook. San Diego: Academic Press. 323 p.
- Kormelink, R., Storms, M., van Lent, J., Peters, D., Goldbach, R. (1994). Expression and subcellular location of the NSm protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology*, 200, 56–65.
- Kosakovsky Pond, S.L., Frost, S.D.W. (2005). Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics*, vol. 21.
- Kring, J.B. and Schuster, D.J. (1992). Management of insects on pepper and tomato with UV-reflective mulches. *Florida Entomologist*, 75:119-129.
- Latham, L.J., Jones, R.A.C. (1997). Occurrence of tomato spotted wilt tospovirus in native flora, weeds and horticultural crops. *Australian Journal of Agricultural Research*, 48, 359–369.
- Leach, J.E., Vera Cruz, C.M., Bai, J., Leung, H. (2001). Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology*, 39, 187–224.

- Li, W., Lewandowski, D. J., Hilf, M. E., Adkins, S. (2009). Identification of domains of the Tomato spotted wilt virus NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology. *Virology*, 390, 110–121.
- Li, Y.Y, Xiao L, Tan GL, Fu, X.P, Li, R.H, Li, F. (2015) First report of Tomato spotted virus virus on celery in China. *Plant Disease*, 99(5), 734-735.
- Lian, S., Lee, J. S., Cho, W. K., Yu J., Kim, M. K., Choi, H. S. Kim, K. H. (2013). Phylogenetic and recombination analysis of *tomato spotted wilt virus*. *PLOS ONE*, Vol. 8 Issue: 5 e63380.
- López, C., Aramburu, J., Galipienso, L., Soler, S., Nuez, F., Rubio, L. (2011). Evolutionary analysis of tomato Sw-5 resistance breaking isolates of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of General Virology*, 92, 210–215.
- Malipatil, M.B., Postle, A.C., Osmelak, J.A., Hill, M., Moran, J. (1993). First record of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) in Australia (Thysanoptera: Thripidae). *Australian Journal of Entomology*, 32, 378.
- Mandal, B., Pappu, H. R., Csinos, A. S., Culbreath, A. K. (2006). Response of peanut, pepper, tobacco, and tomato cultivars to two biologically distinct isolates of *Tomato spotted wilt virus*. *Plant Disease*, 90: 1150-1155.
- Margaria, P., Ciuffo, M., Pacifico, D., Turina, M. (2007). Evidence that the nonstructural protein of Tomato spotted wilt virus is the avirulence determinant in the interaction with resistant pepper carrying the Tsw gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20:547–558.
- Margaria, P., Miozzi, L., Ciuffo, M., Pappu, H., Turina, M. (2014). The first complete genome sequences of two distinct European tomato spotted wilt virus isolates. *Archives of Virology*, 160, pages591–595.
- Martelli, G. P., Quacquarelli, A. (1983). The present status of tomato and pepper viruses. *Acta Horticulturae*, 127: 39-64.
- Martin, D., Rybicki, RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*, 2010;26:2462–2463.
- Massumi, H., Samei, A., Hosseini Pour, A., Shaabani, M., Rahimian, H. (2007). Occurrence, distribution, and relative incidence of seven viruses infecting greenhouse-grown cucurbits in Iranian Plant Diseases. 91, 159–163.
- Mateus C, Pequeto A, Teixeira S, Queirós R, Godinho MC, et al. (2012). Development of a Tomato spotted wilt virus (TSWV) risk evaluation methodology for a processing tomato region. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 10: 191–197.
- Matteson, N.A., and Terry, L.I. (1992). Response to color by male and female *Frankliniella occidentalis* during swarming and non-swarming behavior. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 63: 187–201.

- McDonald, S.M., Nelson, M.I., Turner, P.E., Patton, J.T. (2016). Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 14, no. 7, p. 448+. Gale Academic OneFile.
- McPherson, R. M., Jones, D. C., Pappu, H. R., Moore, J. M. (2003). Reducing the risks of spotted wilt virus in tobacco with selected Thrips (Thysanoptera: Thripidae) control practices. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 20(1): 11-23.
- Medeiros, R. B., de O. Resende, R. and de Avila, A. C. (2004). The plant virus Tomato spotted wilt tospovirus activates the immune system of its main insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Virology*, 78: 4976-4982.
- Medeiros, R.B., Ullman, D.E., Sherwood, J.L., German, T.L. (2000). Immunoprecipitation of a 50-kDa protein: a candidate receptor component for *tomato spotted wilt tospovirus* (Bunyaviridae) in its main vector, *Frankliniella occidentalis*. *Virus Research*, 67:109–118.
- Montero-Astúa M., Rotenberg D., Leach-Kieffaber, A., Schneeweis, B.A., Park, S., Park, J.K., German, T.L., Whitfield, A.E. (2014). Disruption of vector transmission by a plant-expressed viral glycoprotein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Mar;27(3):296-304. doi: 10.1094/MPMI-09-13-0287-FI. PMID: 24405031.
- Moury, B., Palloix, A., Gebre-Selassie, K., Marchoux, G. (1997). Hypersensitive resistance to *Tomato spotted wilt virus* in three *Capsicum chinense* accessions is controlled by a single gene and is overcome by virulent strains. *Euphytica*, 94:45–52.
- Moury, B., Gebre Selassie, K., Marchoux, G., Daube`ze, A. M., Palloix, A. (1998). High temperature effects on hypersensitive resistance to *tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV) in pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *European Journal of Plant Pathology*, 104:489–498.
- Moury, B., Pflieger, S., Blattes, A., Lefebvre, V. And Palloix, A. (2000). A CAPS marker to assist selection of *tomato spotted wilt virus* (TSWV) resistance in pepper. *Genome*, 43 (1): 137–142.
- Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., Caranta, C., Palloix, A., Jacquemond, M. (2004). Hypersensitive resistance to *tomato spotted wilt virus* in three *Capsicum chinense* accessions is controlled by a single gene and is overcome by virulent strains. *Euphytica*, 94: 45–52, 1997.
- Moury, B., Desbiez, C., Jacquemond, M., Lecoq, H. (2006). Genetic diversity of plant virus populations: towards hypothesis testing in molecular epidemiology. *Advances in Virus Research*, 2006;67:49-87.
- Moury B., Verdin E. (2012) Viruses of pepper crops in the Mediterranean basin: a remarkable stasis. *Advances in Virus Research*, 84, 127–162.
- Mumford, R.A., Barker, I., Wood, K.R., (1996). The biology of the tospoviruses. *Annals of Applied Biology*, 128, 159–183.

- Nagata, T., Inoue-Nagata, A.K., Prins, M., Goldbach, R., Peters, D. (2000). Impeded thrips transmission of defective Tomato spotted wilt virus isolates. *Phytopathology*, 90:454–459.
- Naidu, R. A., Deom, C. M. and Sherwood. J. L. (2001). First report of *Frankliniella fusca* as a vector of *Impatiens necrotic spot tospovirus*. *Plant Disease*, 85: 1211.
- Naidu, R.A., Sherwood, J.L., Deom, C.M. (2008). Characterization of a vector-non-transmissible isolate of Tomato spotted wilt virus. *Plant Pathology*, 57: 190–200.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei, M., Tajima, F. (1981). DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, 97 1:145-163.
- Nielsen, R. (2001). Statistical tests of selective neutrality in the age of genomics. *Heredity*, 86:641–647.
- Ochoa, M.D.L., Zavaleta-Mejía, Mora-Aguilera, G., Johansen, N. R. M. (1999). implications of weed composition and thrips species for the epidemiology of Tomato spotted wilt virus in *Chrysanthemum* (*Dendranthema grandiflora*). *Plant Pathology*, 48: 707-717.
- Ohnishi, J., Katsuzaki, H., Tsuda, S., Sakurai, T., Akutsu, K., Murai, T. (2006). *Frankliniella cephalica*, a new vector for Tomato spotted wilt virus. *Plant Disease*, 90: 685.
- Pappu, H.R, Whitfield, A.E., de Oliveria, A.S. (2020). *Tomato Spotted Wilt Virus* (Tospoviridae). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21329-0>.
- Pappu, H.R., Jones, R.A., and Jain, R.K. (2009). Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: :Successes achieved and challenges ahead, *Virus Research*, 141: 219-236pp.
- Parisi, M.; Alioto, D.; Tripodi, P. Overview of Biotic Stresses in Pepper (*Capsicum* spp.): Sources of Genetic Resistance, Molecular Breeding and Genomics (2020). *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 2587.
- Parrella, G., Gognalons, P., Gebre-Selassie, K., Vovlas, C., Marchoux, G. (2003). An update of the host range of Tomato spotted wilt virus. *Journal of Plant Pathology*, 85: 227-264.
- Pennazio S. (1995). The hypersensitive reaction of higher plants to viruses: a molecular approach. *Microbiologica*, 18, 229-240.
- Persley, D. M., Thomas, J. E., Sharman, M. (2006). Tospoviruses: an Australian perspective. *Australasian Plant Pathology*, 35: 161–180.
- Peters, D. (1998). An updated list of plant species susceptible to tospoviruses. In D. Peters and RW Goldbach (eds.): *Recent Progress in Tospovirus and Thrips Research*. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands. pp.107-110.

- Peters, D., Wijkamp, I., van de Wetering, F., Goldbach, R. (1996). Vector relations in the transmission and epidemiology of tospoviruses. *Acta Horticulturae*, 431, 29–43.
- Prins, M., Goldbach, R. (1998). The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. *Trends in Microbiology*, 6, 31–35.
- Prins, M., Storms, M.M.H., Kormelink, R., Haan, P.D., Goldbach, R. (1997). Transgenic tobacco plants expressing the putative movement protein of tomato spotted wilt tospovirus exhibit aberrations in growth and appearance. *Transgenic Research*, 6, 245–251.
- Qiu, W.P., Geske, S.M., Hickey, C.M., Moyer, J.W. (1998). Tomato spotted wilt Tospovirus genome reassortment and genome segment-specific adaptation. *Virology*, 244:186–94
- Qiu, W.P., Moyer, J.W. (1999). Tomato Spotted Wilt Tospovirus adapts to the TSWV N gene-derived resistance by genome reassortment. *Phytopathology*, 89 7:575-582.
- Reddy, D.V.R., Wightman, J.A. (1988). Tomato spotted wilt virus: thrips transmission and control. In: *Advances in Disease Vector Research* (Ed by K F. Harris). Vol. 8 pp. 203-220, Springer-Verlag. New York.
- Rice, D.J., German, T.L., Mau, R.E.L., Fujimoto, F.M. (1990). Dot blot detection of Tomatospotted wilt virus RNA in plant and thrips tissues by cDNA clones. *Plant Disease*. 74,274–276.
- Riley, D.G., Joseph, S.V., Srinivasan, R., Diffie, S. (2011). Thrips vectors of tospoviruses. *Journal of Integrated Pest Management*, 2:1-10.
- Robb, K.L. and Parella, M.P. (1995). IPM of Western Flower Thrips. In: B.L, Parker, M. Skinner and T. Lewis.(Editors), *Thrips Biology and Management*. Plenum Press. Newyork pp. 365-370.
- Roditakis, N.E., Lykouressis, D.P., and Golfinopoulou, N.G. (2001). Color preference, sticky trap catches and distribution of western flower thrips in greenhouse cucumber, sweet pepper and eggplant crops. *Southwest. Entomology*, 26: 227–238.
- Rotenberg, D., Jacobson, A.L., Schneweis, D.J., Whitfield, A.E. (2015). Thrips transmission of tospoviruses. *Current Opinion in Virology*;15:80.
- Rozas, J., Librado, P., Sánchez-Del Barrio, J. C., Messeguer, X. and Rozas, R. (2010). DnaSP Version 5 Help Contents [Help File]. Available with the program at <http://www.ub.edu/dnasp/>.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method—a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406–425.
- Salamon, P., Nemes, K., Salanki, K., Palkovics, L. (2012). First Report of Natural Infection of Pea (*Pisum sativum*) by Tomato spotted wilt virus in Hungary. *Plant Disease*, 96. 295-295. 10.1094/PDIS-06-11-0508.

- Salaudeen, M.T. (2016). Growth and yield responses of some cowpea accessions to cucumber mosaic virus infection. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 62:2, 289-298.
- Samuel, G., Bald, J.G., and Pitman, H.A. (1930). Investigations on 'Spotted wilt' of tomatoes, Australia. *Council for Scientific and Industrial Research*.
- Schnettler E, Hemmes H, Huismann R, Goldbach R, Prins M, Kormelink R. (2010). Diverging affinity of Tospovirus RNA silencing suppressor proteins, NSs, for various RNA duplex molecules. *Journal of Virology*, 84, 11542–54.
- Scholthof KB, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, Hohn T, Hohn B, Saunders K, Candresse T, Ahlquist P, Hemenway C, Foster GD. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, Dec;12(9):938-54.
- Sertkaya, G. (2015). Hatay ili marul ve ıspanak alanlarında bazı virüslerin araştırılması, Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 20 (1) :7-12pp.
- Simon-Loriere, E., Holmes, E.C. (2011). Why do RNA viruses recombine? *Nature Reviews Microbiology*, 9: 617–626.
- Sin, S.H., McNulty, B.C., Kennedy, G.G., Moyer, J.W. (2005). Viral genetic determinants for thrips transmission of Tomato spotted wilt virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, U. S. A. 102:5168–5173.
- Smith, K.M. (1932). Studies on plant virus diseases. XI. Further experiments with a ringspot virus: its identification with spotted wilt of tomato. *Annals of Applied Biology*, 19, 305–320.
- Smith, K.M. (1957). A Textbook of Plant Virus Diseases, 2nd ed. Churchill, London.
- Soellick, T., Uhrig, J.F., Bucher, G.L., Kellmann, J.W., Schreier, P.H. (2000). The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, U.S.A. 97, 2373–2378.
- Soler, S., Diez, M.J., Nuez, F. (1998). Effect of temperature regime and growth stage interaction on pattern of virus presence in TSWV-resistant accessions of *Capsicum chinense*. *Plant Disease*, 82, 1199-1204.
- Soler, S., Diez, M.J., Rosello, S., Nuez, F. (1999). Movement and distribution of tomato spotted wilt virus in resistant and susceptible accessions of *Capsicum* spp. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 21, 317-325.
- Stephens, M., Smith, N.J., Donnelly, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics*, 68:978–989.

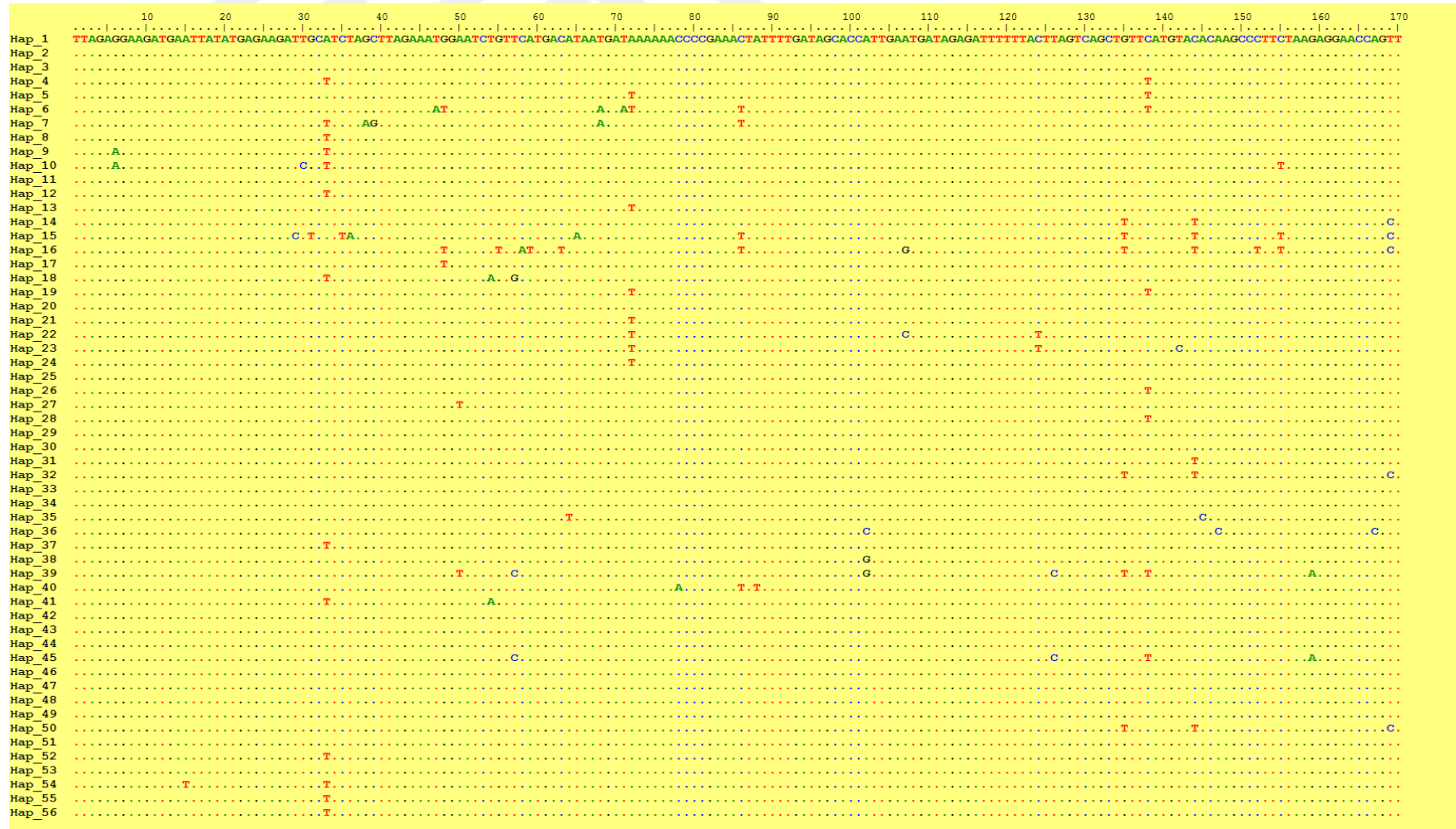
- Storms, M.M., Kormelink, R., Peters, D., van Lent, J.W., Goldbach, R.W. (1995). The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology*, 214, 485–493.
- Suzuki, K., Kuroda, T., Miura, Y., and Murai, J. (2003). Screening and field trials of virus resistant sources in *Capsicum* spp. *Plant Disease*, 87:779-783.
- Syller, J. (2012). Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular Plant Pathology*, 13, 204–216.
- Şevik M.A., Arlı-Sökmen M. (2012). Estimation of the Effect of Tomato spotted wilt virus (TSWV) Infection on Some Yield Components of Tomato. *Phytoparasitica*, 40: 87-93.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123:597–601.
- Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S., Okuno, T. (2002). Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. *FEBS Lett* 532:75–79.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30:2725–2729.
- Tekinel, N. (1973). Adana, Antalya, Hatay ve _çel illerinde domates virüs hastalıklarının yayılış alanlarının ve oranlarının tespiti üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 13(3), 107-141.
- Tekinel, N., Dolar, M.S., Sağsöz, S. ve Salcan, Y. (1969). Mersin bölgesinde ekonomik bakımdan önemli bazı sebzelerin virüsleri üzerinde araştırmalar, *Bitki Koruma Bülteni*, 9: 37-49pp.
- Tentchev, D., Verdin, E., Marchal, C., Jacquet, M., Aguilar, J.M., Moury, B. (2011). Evolution and structure of Tomato spotted wilt virus populations: evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes. *Journal of General Virology*, 92, 961–973.
- Thabuis, A., Palloix, A., Pflieger, S., Daubeze, A.M., Caranta, C., Lefebvre, V. (2003). Comparative mapping of Phytophthora resistance loci in pepper germplasm: evidence for conserved resistance loci across Solanaceae and for a large genetic diversity. *Theoretical and Applied Genetics*, 106:1473–1485.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucleic Acid Research*, 22:4673-4680.
- Thottappilly, G., Rossel, H.W. (1997). Identification and characterization of viruses infecting bambara groundnut (*Vigna subterranea*) in Nigeria, *International Journal of Pest Management*, 43:3, 177-185.

- Thresh, J. M. (1981). The role of weeds and wild plants in the epidemiology of plant virus diseases. In J. M. Thresh (Ed.), *Pests, pathogens and vegetation* (pp. 53–70). London: Pitman.
- Timmerman-Vaughan, G.M., Lister, R., Cooper, R., Tang, J. (2014). Phylogenetic analysis of New Zealand tomato spotted wilt virus isolates suggests likely incursion history scenarios and mechanisms for population evolution. *Archives of Virology*, 159, 993–1003.
- Tsompana, M., Abad, J., Purugganan, M., Moyer, J.W. (2005). The molecular population genetics of the Tomato spotted wilt virus (TSWV) genome. *Molecular Ecology*, 14, 53–66.
- Tsuda, S., Fujisawa, I., Ohnishi, J., Hosokawa, D., Tomaru, K. (1996). Localization of tomato spotted wilt tospovirus in larvae and pupae of the insect vector *Thrips setosus*. *Phytopathology*, 86: 1199-1203.
- Tunç, İ. and Hastenpflug-Vesmanis, A. (2016). Records and checklist of Thysanoptera in Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 40: 769-778.
- TÜİK (2019) www.tuik.gov.tr (Erişim Tarihi: 01.06.2020).
- Uhrig, J.F., Soellick, T.R., Minke, C.J., Philipp, C., Kellmann, J.W., Schreier, P.H. (1999). Homotypic interaction and multimerization of nucleocapsid protein of Tomato spotted wilt tospovirus: Identification and characterization of two interacting domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 55-60.
- Ullman, D. E., German, T. L., Sherwood, J. L., Westcot, D.M., Cantone, F. A. (1993). Tospovirus replication in insect vector cells, immunocytochemical evidence that the non-structural protein encoded by the S RNA of tomato spotted wilt tospovirus is present in thrips vector cells. *Phytopathology*, 83, 456–463.
- Wang, D., Bosland, P.W. (2006). The genes of Capsicum. *Horticultural Science*, 41:1169–1187.
- Watterson, G. A. (1975). On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology*, 7:256-276.
- Webster, C.G., Reitz, S.R., Perry, K.L., Adkins, S. (2011). A natural M RNA reassortant arising from two species of plant- and insect-infecting bunyaviruses and comparison of its sequence and biological properties to parental species. *Virology*, May;413(2):216-225.
- Whitfield, A.E., Ullman, D.E., German, T.L. (2005). Tospovirus-thrips interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 459–489.
- Wijkamp, I., Alarza, N., Goldbach, R. and Peters, D. (1995). Distinct levels of specificity in thrips transmission of Tospoviruses. *Phytopathology* 85: 1069-1074.
- Wright S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics*, 15: 323-354.

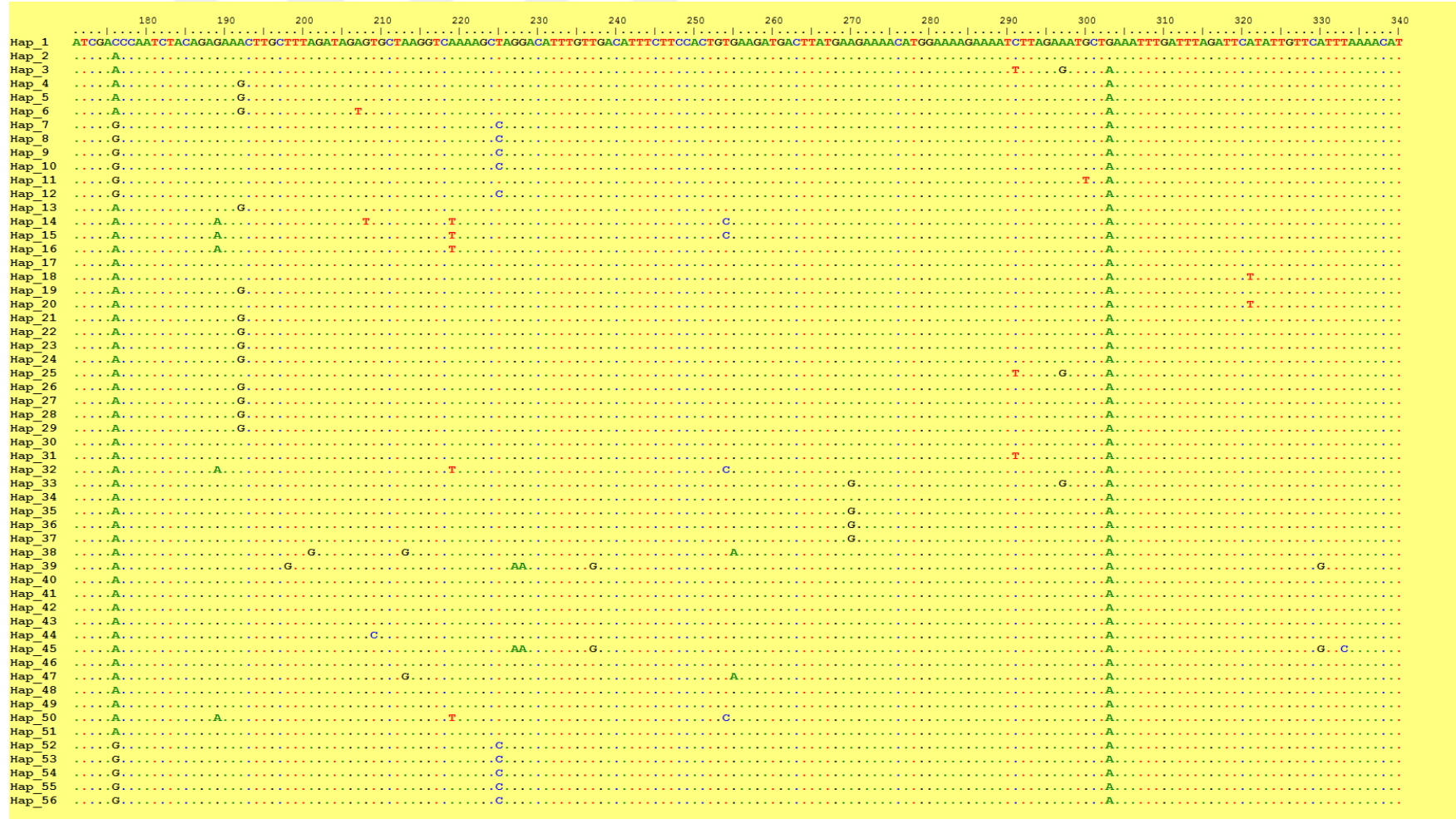
- Yang, Z., Bielawski, J.P. (2000a). Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends in Ecology & Evolution*, 15:496–503.
- Yang, Z., Nielsen, R. (2000b). Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models. *Molecular Biology and Evolution*, 17, 32–43.
- Yardımcı, N., Çulal-Kılıç, H. (2009). Tomato spotted wilt virus in vegetable growing areas in the west mediterranean region of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 8: 4539-4541.
- Yoon, J.Y., Green, S.K., Tschanz, A.T., Tsou, S.C.S., and Chang, L.C. (1989). Pepper Improvement for the Tropics, Problems and the AVRDC Approach. Asian Vegetable Research and Development Center, Tomato and Pepper Production in the Tropics, AVRDC, Shanhua, Tainan, 86-98.
- Yurtmen, M., Güldür, M.E. and Yılmaz, M.A. (1998). Tomato spotted wilt virus on pepper in İçel Province of Turkey. Ninth Conference of the I.S.H.S Vegetable Virus Working Group, Recent Advance in Vegetable Virus Research, 22-27 August 1998, pp: 91-92. Torino, Italy.

EKLER

Ek 1. L RNA segmentinin RdRp gen bölgesinde belirlenen haplotiplere ait nükleotid değişimleri



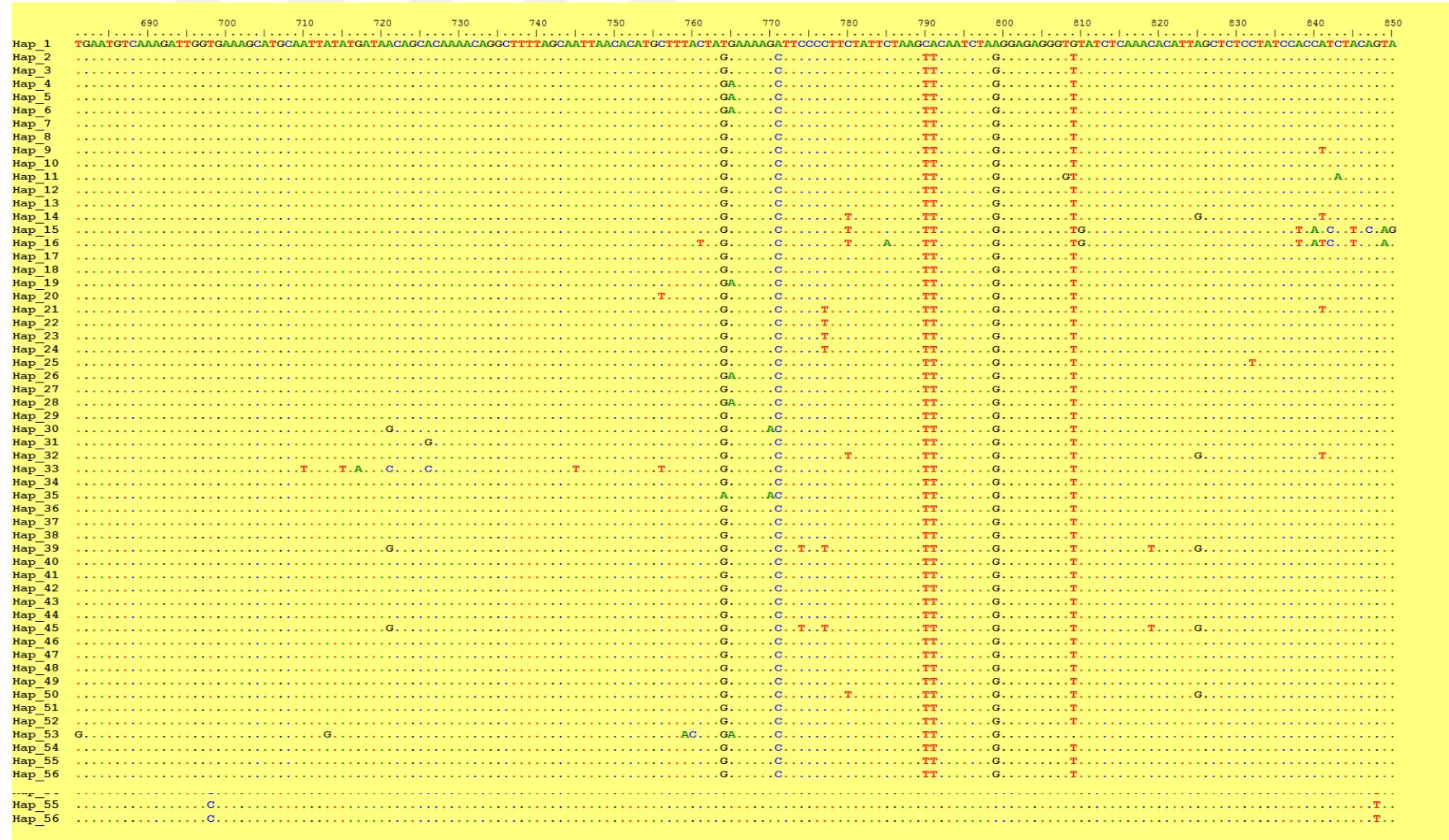
Ek 1.'in devamı



Ek 1.'in devamı

	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510
Hap_1	GTGTAAT	TGGTGATCAAGGATGTTAAT	TTCAGCATGCTAAT	TCCAAT	TTGGATTCTGCATACCCTT	GTGAATCTAGGAAAAGAGATAACTACAAT	TCAGGTGGT	CCAGACTGAAAAATGGATACCTGTTGTTGAAGGCTCTCCGGGACTAGTGGTGATGCATGCT									
Hap_2																	
Hap_3		A.											T.				A.
Hap_4		A.															A.
Hap_5		A.															A.
Hap_6		A.															A.
Hap_7		A.															A.
Hap_8		A.															A.
Hap_9		A.															A.
Hap_10		A.															A.
Hap_11		A.															A.
Hap_12		A.															A.
Hap_13		A.															A.
Hap_14		A.															A.
Hap_15		A.															A.
Hap_16		A.															A.
Hap_17		A.															A.
Hap_18		A.															A.
Hap_19		A.															A.
Hap_20		A.															A.
Hap_21		A.															A.
Hap_22		A.															A.
Hap_23		A.															A.
Hap_24		A.															A.
Hap_25		A.															A.
Hap_26		A.															A.
Hap_27		A.															A.
Hap_28		A.															A.
Hap_29		A.															A.
Hap_30		A.															A.
Hap_31		A.															A.
Hap_32		A.															A.
Hap_33		A.															A.
Hap_34		A.															A.
Hap_35		A.															A.
Hap_36		A.															A.
Hap_37		A.															A.
Hap_38		A.															A.
Hap_39		A.															A.
Hap_40		A.															A.
Hap_41		A.															A.
Hap_42		A.															A.
Hap_43		A.															A.
Hap_44		A.															A.
Hap_45		A.															A.
Hap_46		A.															A.
Hap_47		A.															A.
Hap_48		A.															A.
Hap_49		A.															A.
Hap_50		A.															A.
Hap_51		A.															A.
Hap_52		A.															A.
Hap_53		A.															A.
Hap_54		A.															A.
Hap_55		A.															A.
Hap_56		A.															A.

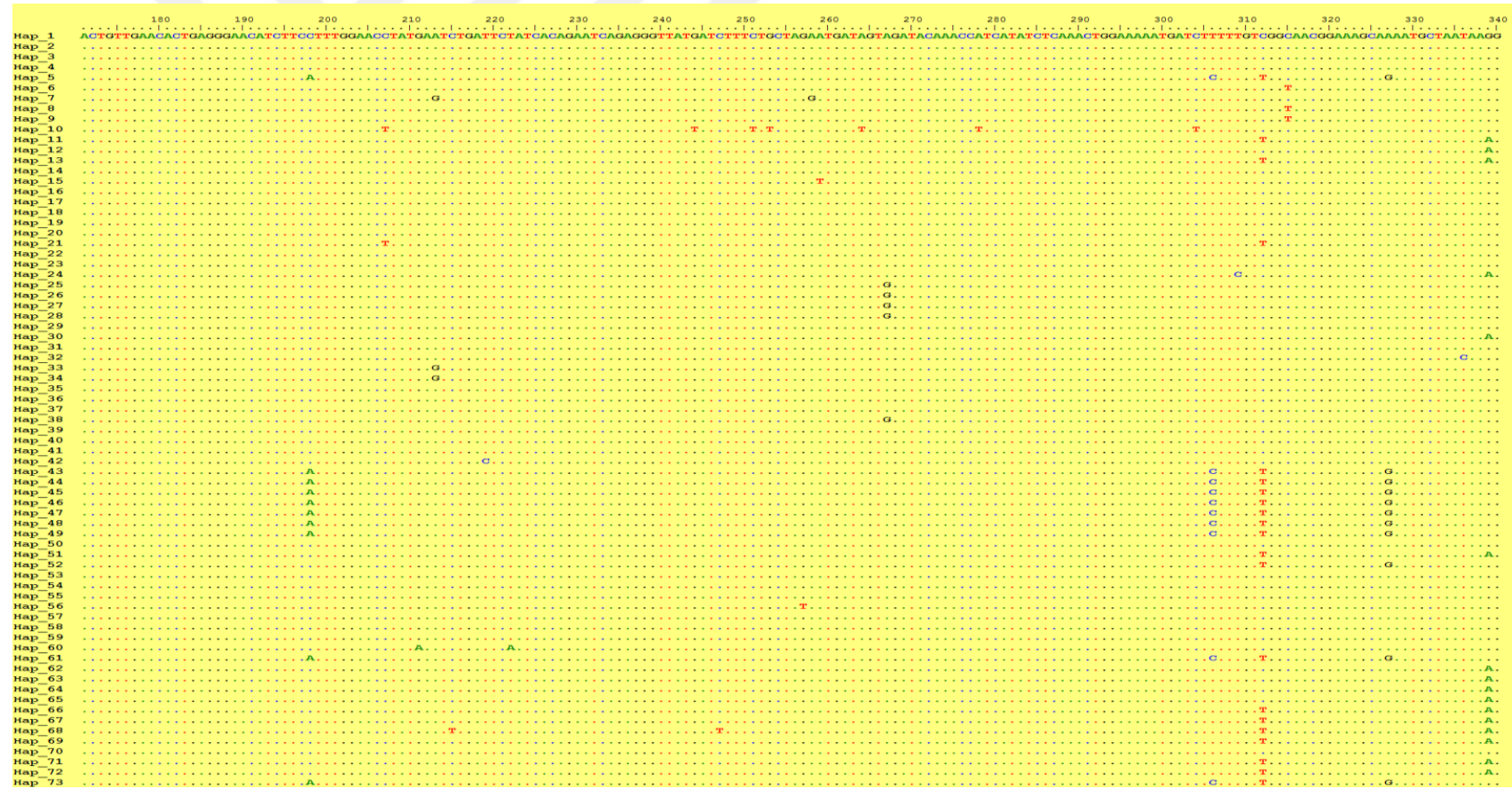
Ek 1.'in devamı



Ek 2. M RNA Segmentinin NSm gen bölgesinde belirlenen haplotiplere ait nükleotid değişimleri



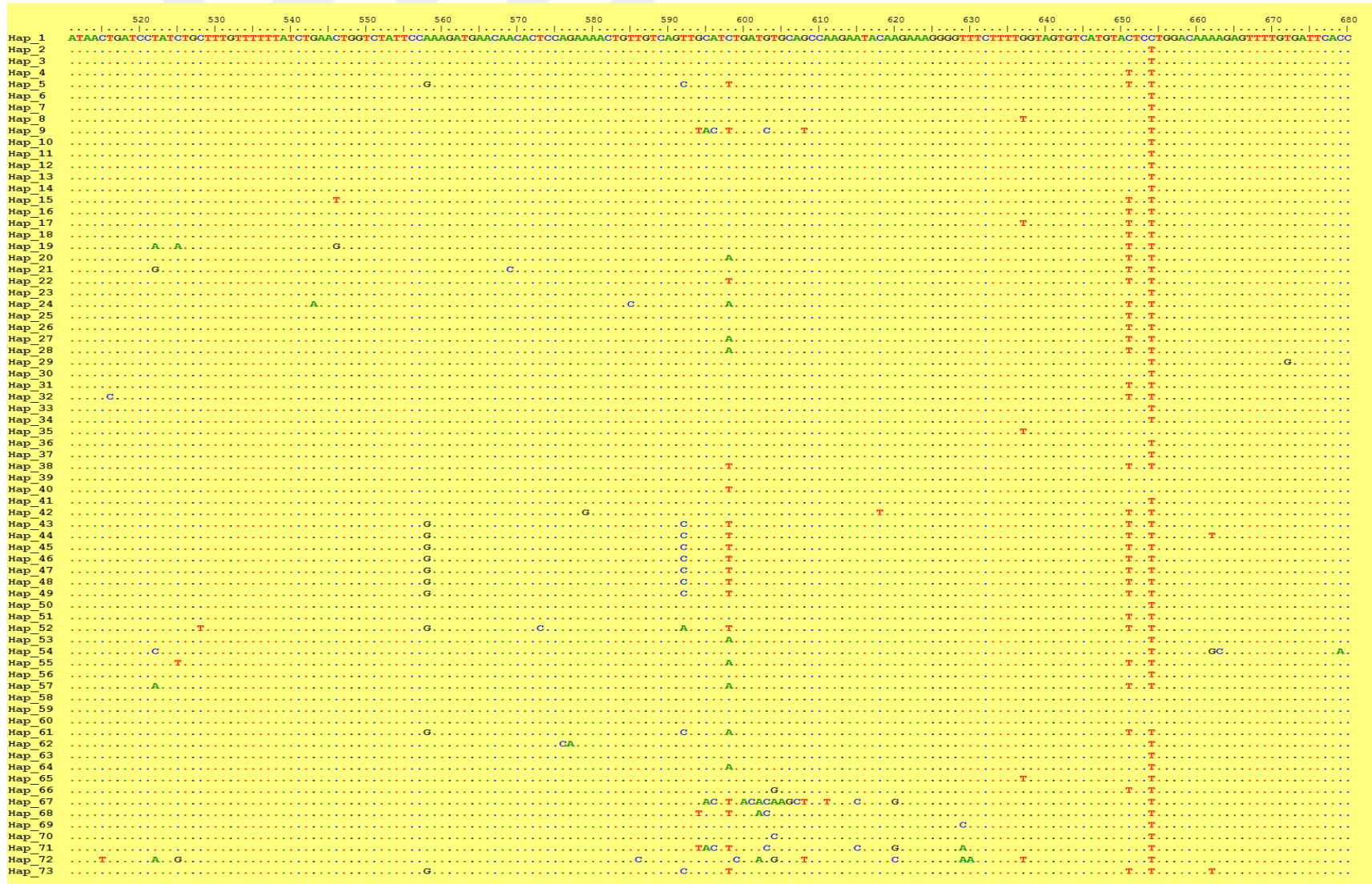
Ek 2.'nin devamı



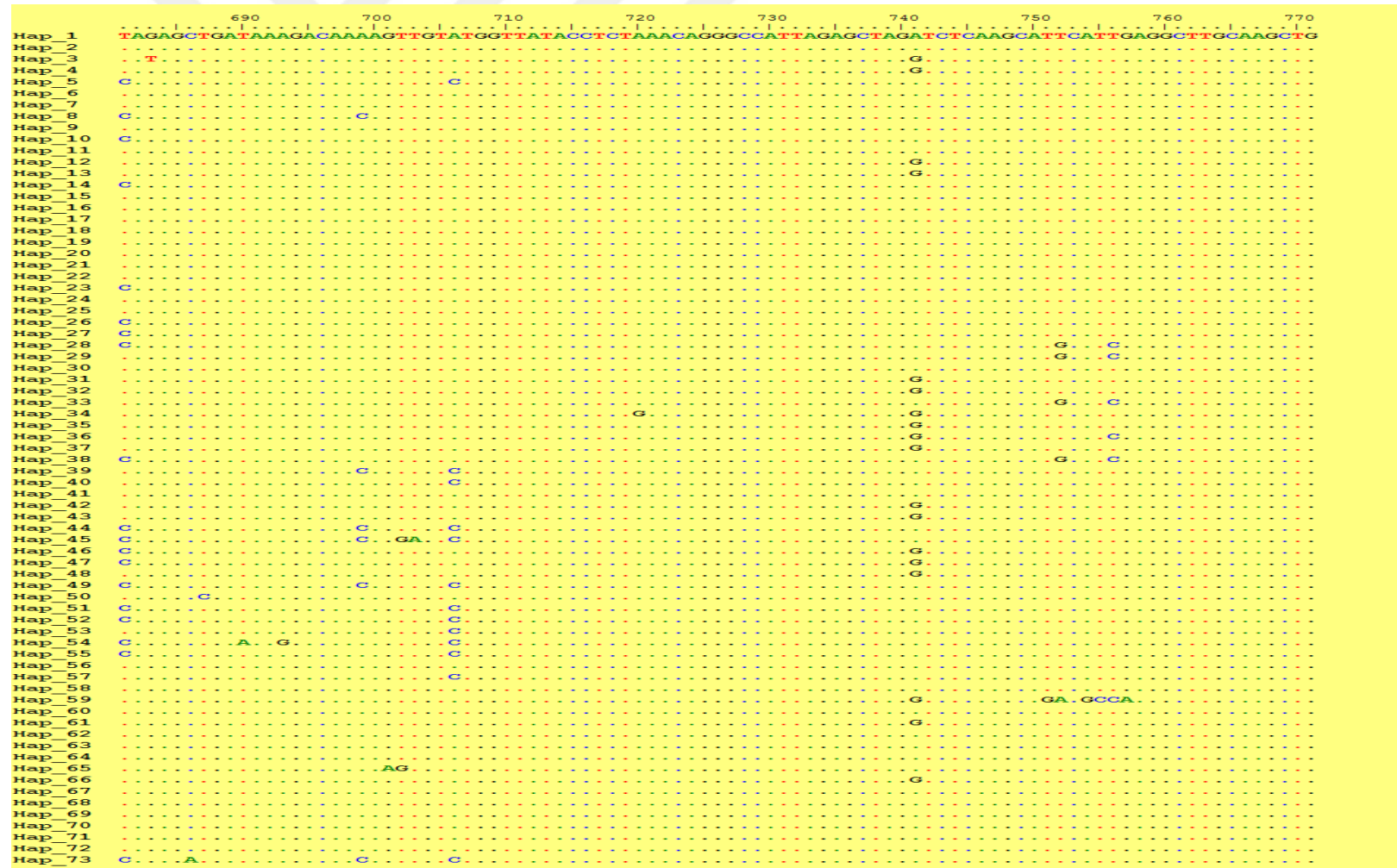
Ek 2.'nin devam



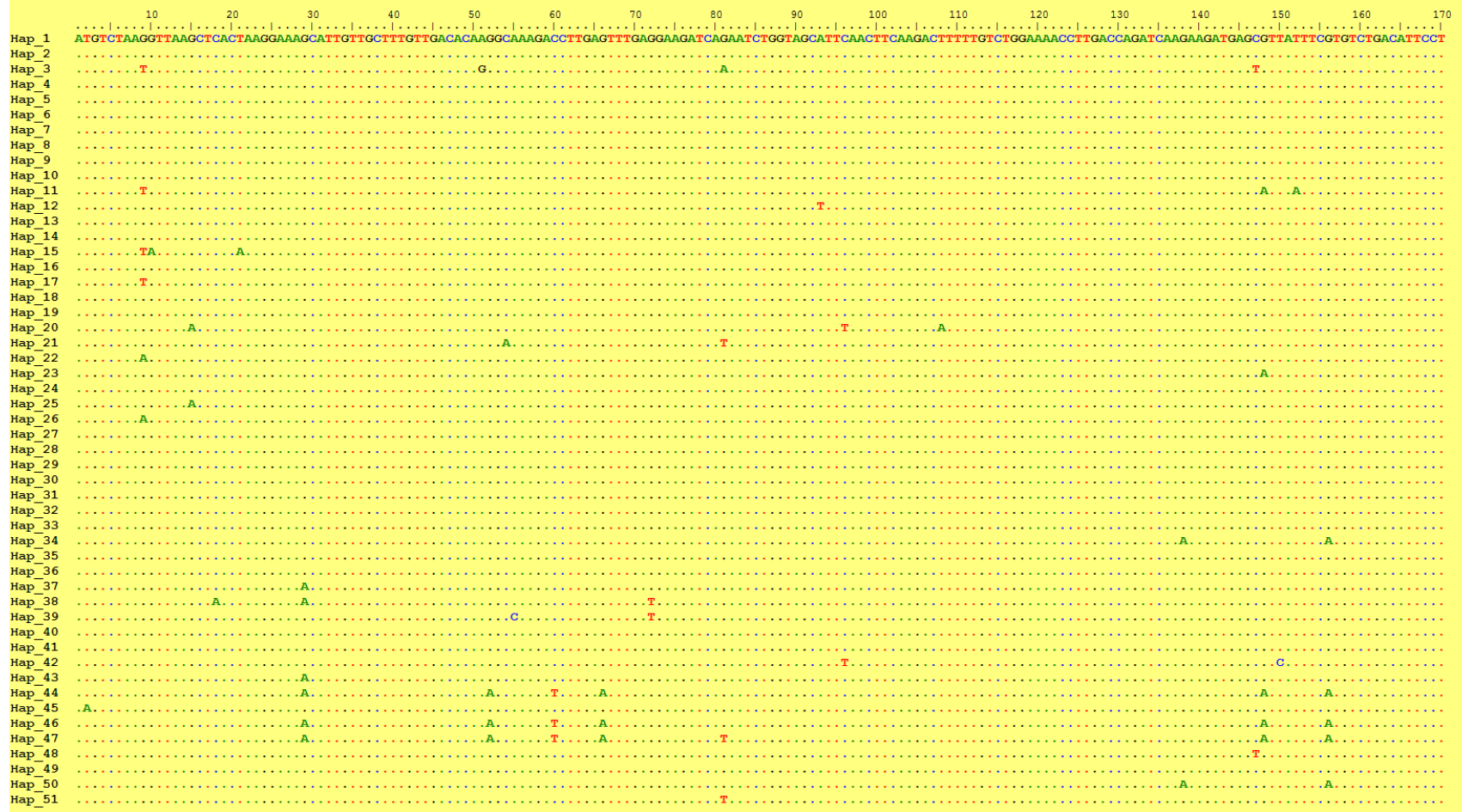
Ek 2.'nin devamı



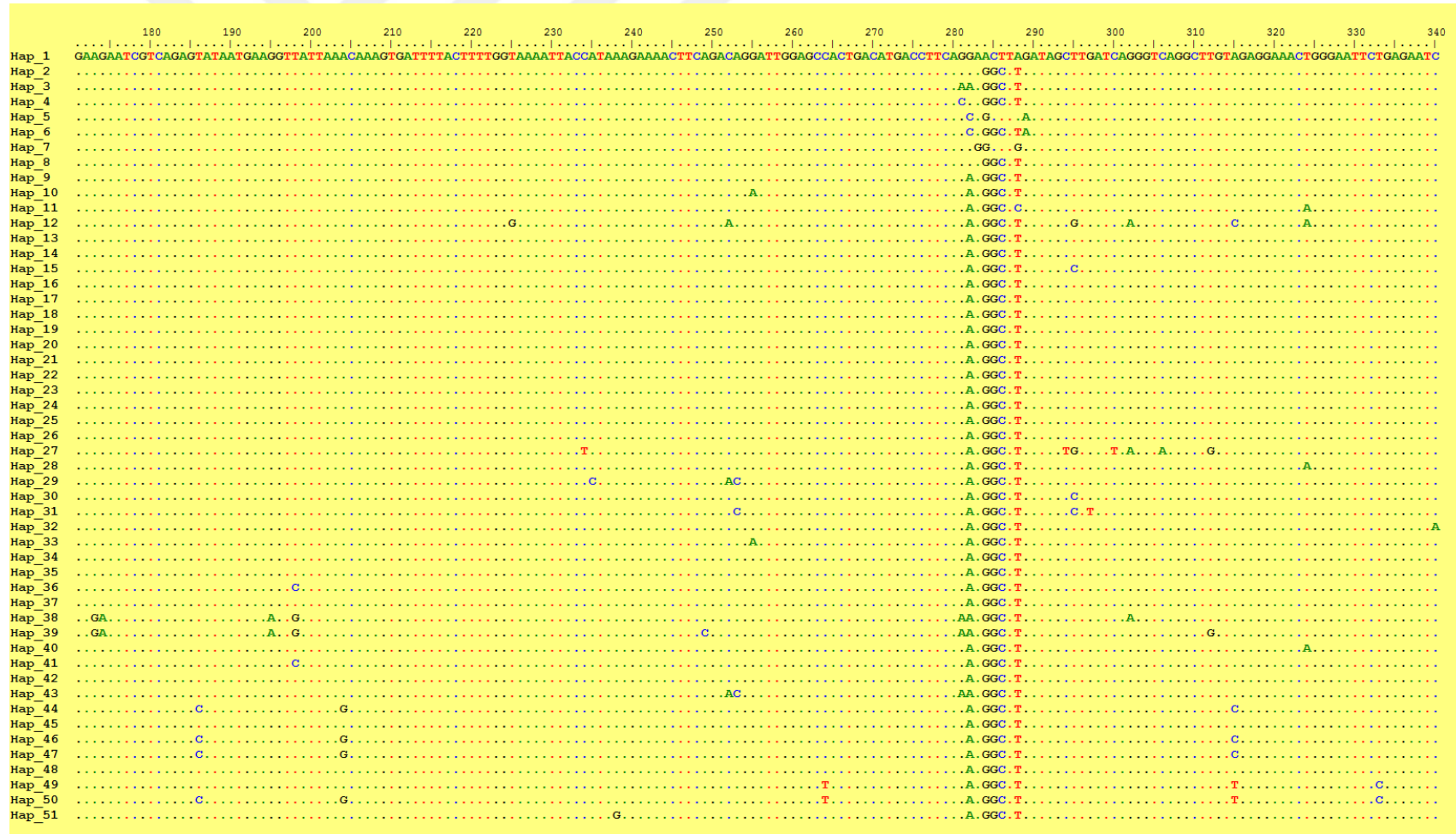
Ek 2.'nin devamı



Ek 3. S RNA Segmentinin N gen bölgesinde belirlenen haplotiplere ait nükleotid değişimleri



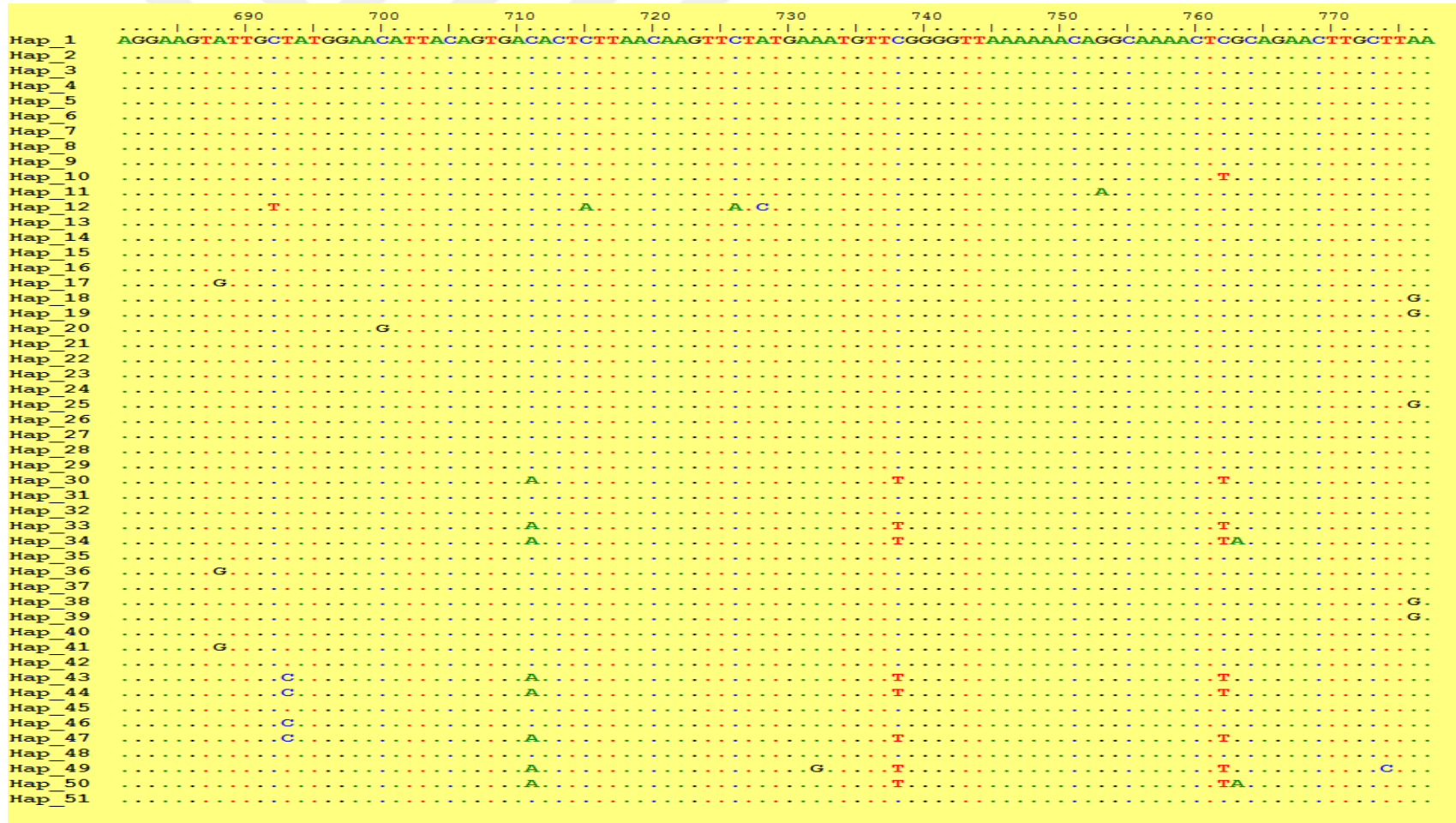
Ek 3. 'ün devamı



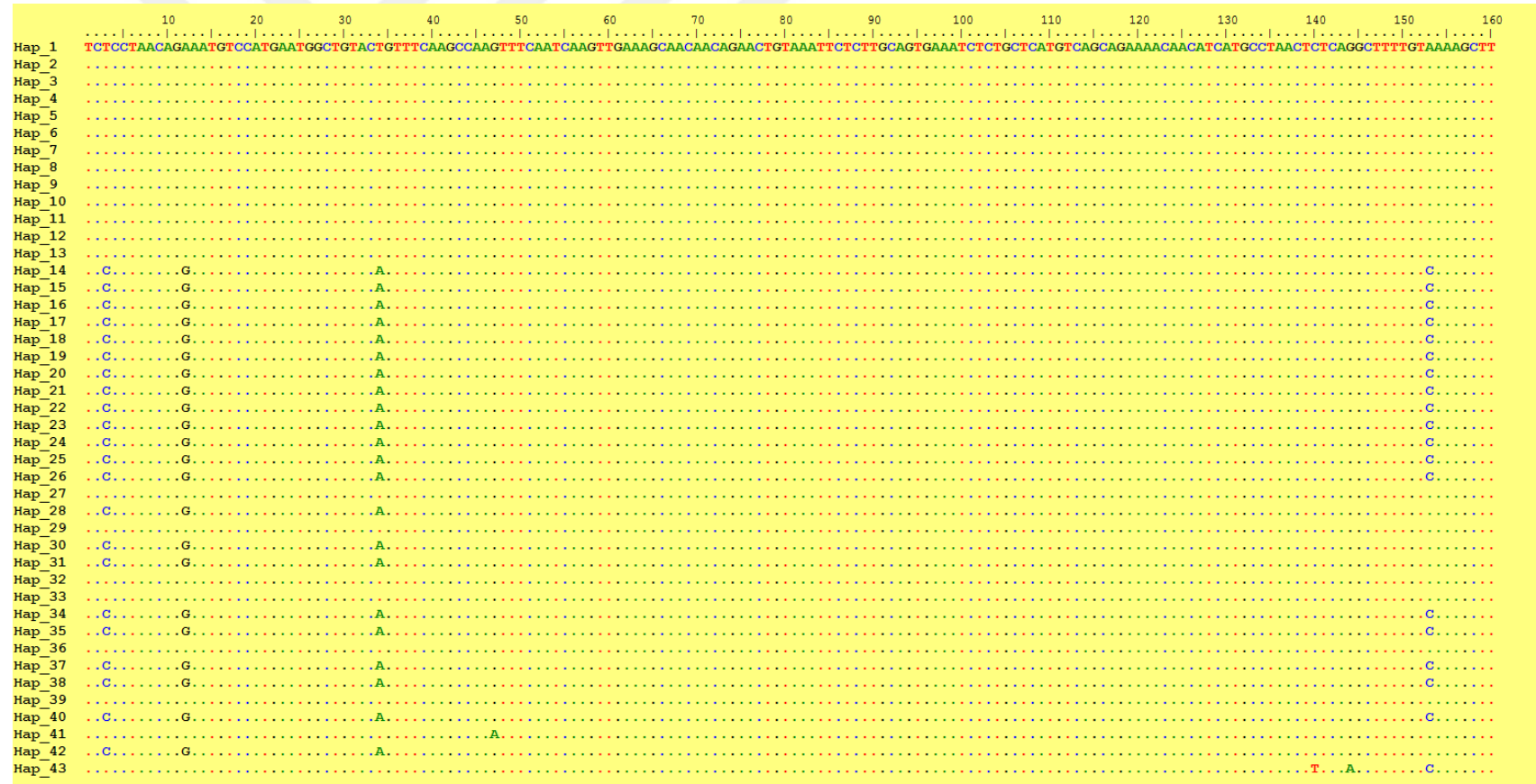
Ek 3. 'ün devamı

	520	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660	670	680
Hap 1	GATGCAAAATACAAGGACCTCGGGATTGACCCAAAGAAGTATGACACCAGGGAAGCATTAGGAAAAGTTGCACGTGCTGAAAAGCAAAGCATTGAAATGAATGAAGATCAGGTGAAGAAAAGAAAAGATATGCTGCTATCTCAGCTCCAGCAATCCTAATGCTAA																
Hap 2																	
Hap 3		A.															
Hap 4																	
Hap 5																	
Hap 6																	
Hap 7																	
Hap 8																	
Hap 9		A.						G.									
Hap 10		A.															
Hap 11		A.															
Hap 12	C.	A.	GA.	T.			T.										C.
Hap 13		A.															
Hap 14		A.															
Hap 15		A.						G.					A.				
Hap 16		A.															
Hap 17		A.												G.			
Hap 18		A.															
Hap 19		A.															
Hap 20		A.															
Hap 21		A.						G.									
Hap 22		A.															
Hap 23		A.															
Hap 24		A.						G.									
Hap 25		A.															
Hap 26		A.					A.										
Hap 27		A.						G.									
Hap 28		A.											G.		G.		
Hap 29		A.					T.								G.		
Hap 30		A.					T.								G.		
Hap 31		A.						CC.					A.				
Hap 32		A.						T.	G.								
Hap 33		A.							G.								
Hap 34		A.					T.		CC.				A.				G.
Hap 35		A.						C.	G.				A.				G.
Hap 36		A.															G.
Hap 37		A.															G.
Hap 38		A.															G.
Hap 39		A.															G.
Hap 40		A.															G.
Hap 41		A.						A.									G.
Hap 42		A.															G.
Hap 43		A.															G.
Hap 44		A.															G.
Hap 45		A.															G.
Hap 46		TCCT.ACA.	C.	TG.													
Hap 47		A.															
Hap 48		A.															
Hap 49		A.															
Hap 50		A.															
Hap 51		A.															

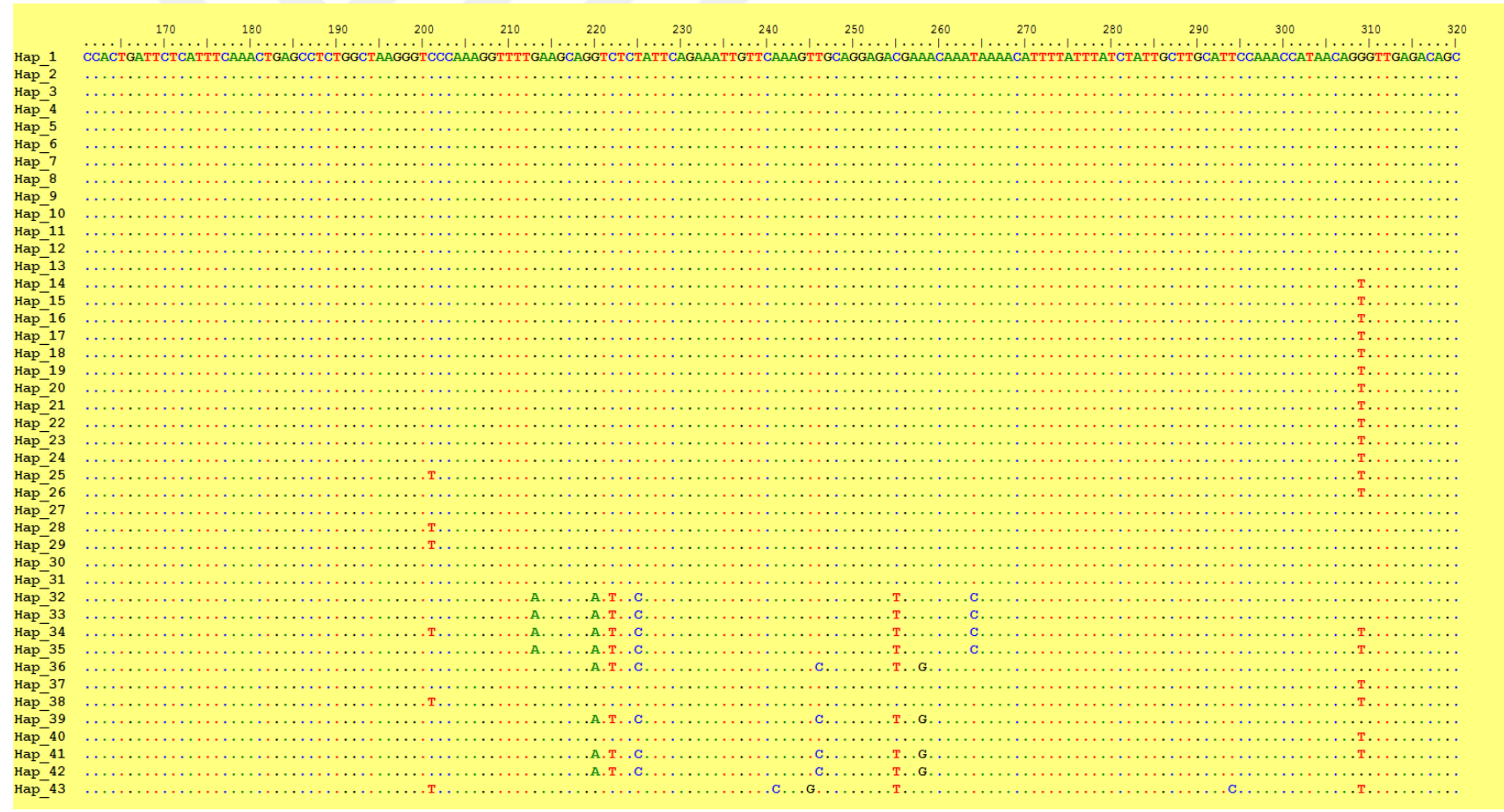
Ek 3.'ün devamı



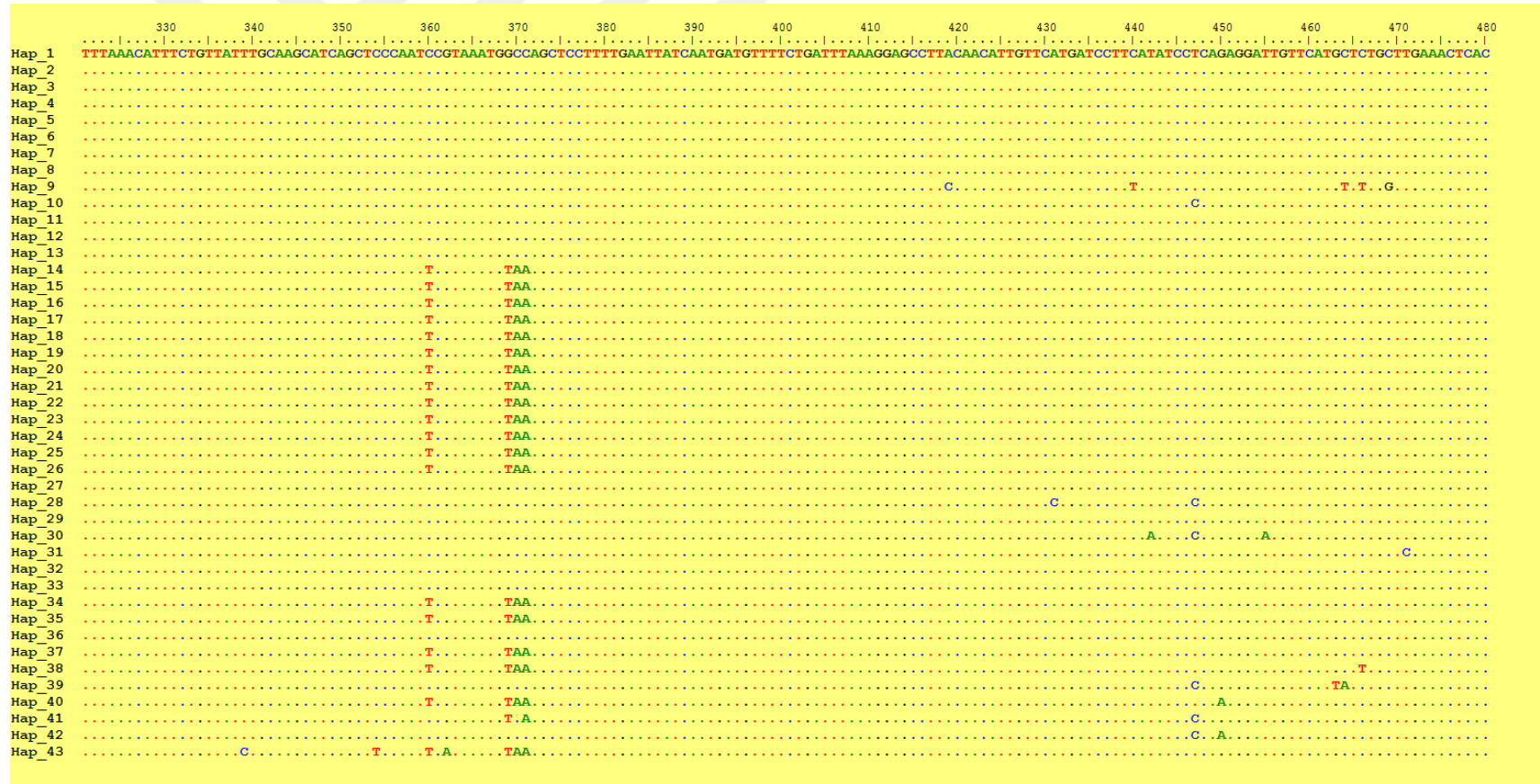
Ek 4. S RNA Segmentinin NSs gen bölgesinde belirlenen haplotiplere ait nükleotid değişimleri



Ek 4.'ün devamı



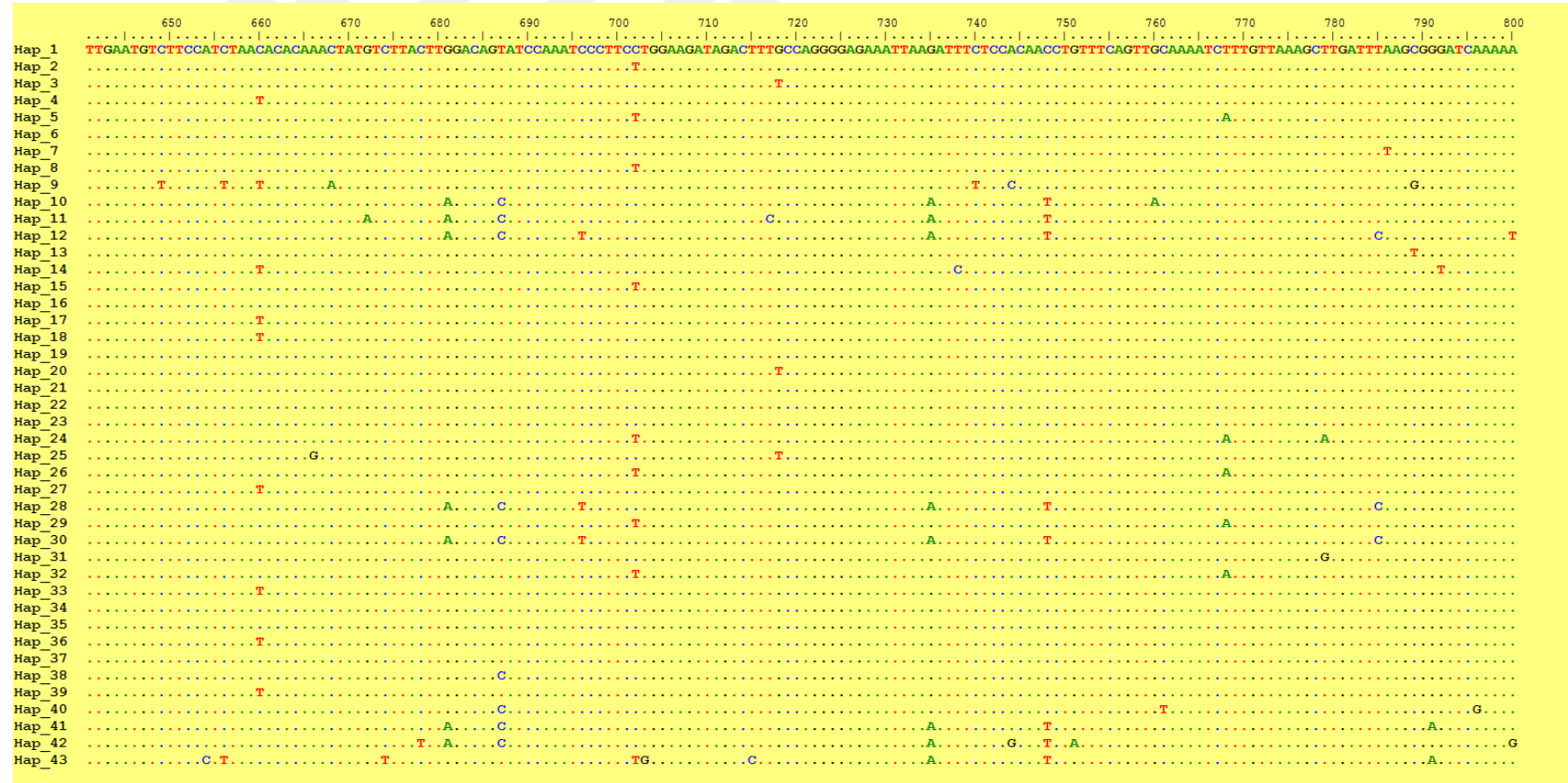
Ek 4.'ün devamı



Ek 4.'ün devamı

	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640
Hap_1	ACATCTTTTGCACAAGTTCTTTGCAACAAC	TTACAAGAAGATGTGATCATCTACACTTTGAACA	ATGAGCTAACTCCTGGAAAGTTAGATTTAGGTGAAAGAACCTTAAATTACAGTGAAGATGCCTGCAAAAGGAAATATTTCCCTTTCAAAAACAC													
Hap_2																
Hap_3																
Hap_4																
Hap_5																
Hap_6																
Hap_7																
Hap_8																
Hap_9																
Hap_10																
Hap_11																
Hap_12																
Hap_13																
Hap_14																
Hap_15																
Hap_16																
Hap_17																
Hap_18																
Hap_19																
Hap_20																
Hap_21																
Hap_22																
Hap_23																
Hap_24																
Hap_25																
Hap_26																
Hap_27																
Hap_28																
Hap_29																
Hap_30																
Hap_31																
Hap_32																
Hap_33																
Hap_34																
Hap_35																
Hap_36																
Hap_37																
Hap_38																
Hap_39																
Hap_40																
Hap_41																
Hap_42																
Hap_43																

Ek 4.'ün devamı



Ek 4.'ün devamı

	810	820	830	840
Hap_1	GAAAGAATCTAAGATTCCGGAAACATATGCTCCAGGATCAAAA			
Hap_2T.....T.....			
Hap_3T.....			
Hap_4T.....			
Hap_5T.....A.....T.....			
Hap_6T.....			
Hap_7T.....T.C.....			
Hap_8T.....T.....			
Hap_9T.....G.T.....			
Hap_10CT.A...G...T...T.....			
Hap_11CT.A...G...T.....			
Hap_12CT.A...G...T.....			
Hap_13C.....T.....			
Hap_14T.....			
Hap_15T.....T.....			
Hap_16T.....			
Hap_17T.....G..			
Hap_18T.....			
Hap_19T.....			
Hap_20	.G.....T.....			
Hap_21T.....			
Hap_22G.....T.....			
Hap_23T.....			
Hap_24A.....T.....			
Hap_25T.....			
Hap_26A.....T.....			
Hap_27T.....G..			
Hap_28CT.A...G...T.....			
Hap_29A.....T.....			
Hap_30CT.A...G...T.....			
Hap_31T.....			
Hap_32A.....T.....			
Hap_33T.....			
Hap_34T.....			
Hap_35T.....			
Hap_36T.....			
Hap_37T.....			
Hap_38T.....			
Hap_39T.....			
Hap_40T.....			
Hap_41CT.A...G...T.....			
Hap_42AA...G...T.....			
Hap_43CT.A...G...T.....			

Ek 5. ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

Kaplama Tampon Çözeltisi pH 9.6 1000 mL

1.59 gr Na_2CO_3

2.93 gr NaHCO_3

Yıkama Tampon Çözeltisi (Washing Buffer) pH 7.2-7.4 1000 mL

8.0 gr NaCl

0.2 gr KH_2PO_4

2.9 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

0.2 gr KCl

0.2 gr NaN_3

0.5 mL Tween 20

Konjugat /Örnek Tampon Çözeltisi pH 7.4 1000 mL

Yıkama tamponu çözeltisi içine,

20 gr polyvinyl pyrrolidone (K10-K40)

2 gr bovine serum albümin

0.1 gr NaN_3 ilave edilerek hazırlanır.

Substrat Tampon Çözeltisi pH 9.8 1000 mL

97 mL Diethanolamine

0.2 gr $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Ek 6. 0.03 M Fosfat Tamponunun Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasallar (pH 7, 100 mL)

0.426 gr Na_2PO_4

0.474 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Ek 7. Biyolojik Klonların *C.annuum* (Naz F1), *C.annuum*^{Tsw} ve PI 152225 (*C.chinense*) bitkilerinde meydana getirdiği simptomlar

Biyolojik Klon	<i>C.annuum</i> (Naz F1)	PI 152225 ve <i>C.annuum</i> ^{Tsw} (Mertcan F1)
TRpep-37/1	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-37/2	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-37/3	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-37/4	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-37/5	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-37/6	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-37/7	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-37/8	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-37/9	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-37/10	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-37/11	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-47/1	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-47/2	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-47/3	KHL,YD/KHL,K,YD,B	KHL/KHL,K,YD
TRpep-47/4	-/-	-/-
TRpep-47/5	K,M/KHL,K,M	NL/-
TRpep-47/6	-/-	-/-
TRpep-47/7	KHL/KHL,K,YD	NL/-
TRpep-47/8	K,M/K,M,YD	NL/-
TRpep-47/9	KHL,K/KHL,K,YD,B	K,NL/SN
TRpep-47/10	KHL,K/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-47/11	KHL,K/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-47/12	KHL/K,M/YD	KHL/KHL,K,YD
TRpep-47/13	KHL,K/KHL,K,B	NL/-
TRpep-47/14	-/-	-/-
TRpep-47/15	KHL,K/KHL,K	NL/-
TRpep-47/16	KHL,K/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-47/17	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	K,NL/SN
TRpep-47/18	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-47/19	KHL/KHL,K,YD	NL/-
TRpep-47/20	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-47/21	KHL/KHL,K,YD	NL/-
TRpep-59/1	KHL,K,YD/KHL,K,YD	NL/-

TRpep-59/2	KHL,K/KHL,K	NL/-
TRpep-59/3	K,M/K,M,YD	NL/-
TRpep-59/4	KHL/KHL,K,YD	NL/-
TRpep-59/5	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-59/6	KHL/KHL,K,YD	NL/-
TRpep-59/7	KHL/KHL,K,YD	NL/-
TRpep-59/8	KHL/KHL,K,YD	NL/-
TRpep-59/9	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-59/10	KHL/KHL,K,YD	NL/-
TRpep-59/11	KHL/KHL,K,YD	NL/-
TRpep-59/12	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-59/13	KHL/KHL,K,YD	NL/-
TRpep-59/14	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-67/1	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	KHL/KHL,K,YD
TRpep-67/2	NHL,KHL,YD/KHL,K,YD,B	KHL/KHL,K,YD
TRpep-67/3	KHL/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-67/4	KHL,K,YD/KHL,K,YD,	NL/-
TRpep-67/5	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-67/6	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-67/7	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-67/8	KHL,K,YD/KHL,K,YD,	NL/-
TRpep-67/9	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-67/10	KHL,K,YD/KHL,K,YD	NL/-
TRpep-67/11	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-125/1	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-125/2	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-125/3	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-125/4	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-125/5	KHL,K,YD/KHL,K,YD	NL/-
TRpep-125/6	KHL,K,YD/KHL,K,YD	NL/-
TRpep-125/7	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-125/8	KHL,K,YD/KHL,K,YD	NL/-
TRpep-125/9	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-125/10	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-125/11	KHL,K,YD/KHL,K,YD	NL/-
TRpep-125/12	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-146/1	KHL,YD/KHL,K,YD,B	KHL/KHL,YD

TRpep-146/2	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-146/3	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-146/4	KHL,K,YD/KHL,YD,B	NL/-
TRpep-146/5	KHL,K,YD/KHL,YD,B	NL/-
TRpep-146/6	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-146/7	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-146/8	KHL,K,YD/KHL,YD,B	KHL/KHL,YD
TRpep-146/9	KHL,K,YD/KHL,YD,B	NL/-
TRpep-146/10	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-146/11	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-146/12	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-146/13	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-146/14	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-146/15	KHL,K,YD/KHL,YD,B	NL/-
TRpep-146/16	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-150/1	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-150/2	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-150/3	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-150/4	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-150/5	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-150/6	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-150/7	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	K,NL/SN
TRpep-150/8	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-150/9	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-150/10	NHL,KHL,K,YD/KHL,K,YD	NL/-
TRpep-150/11	NHL,KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-150/12	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-154/1	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-154/2	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-154/3	NHL,KHL,K,YD/KHL,K,YD	NL/-
TRpep-154/4	NHL,KHL,K,YD/KHL,K,YD	NL/-
TRpep-154/5	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-154/6	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-154/7	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-154/8	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	KHL,K/KHL,K,YD
TRpep-154/9	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-154/10	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-

TRpep-154/11	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-154/12	NHL,KHL,K,YD/KHL,K,YD	NL/-
TRpep-154/13	-/-	-/-
TRpep-154/14	NHL,KHL,K,YD/KHL,K,YD	NL/-
TRpep-154/15	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-160/1	KHL,YD/KHL,YD,B	NL/-
TRpep-160/2	KHL,YD/KHL,YD,B	NL/-
TRpep-160/3	KHL,YD/KHL,YD,B	NL/-
TRpep-160/4	KHL,YD/KHL,YD,B	NL/-
TRpep-160/5	KHL,YD/KHL,YD,B	NL/-
TRpep-160/6	KHL,YD/KHL,YD,B	NL/-
TRpep-160/7	KHL,YD/KHL,YD,B	NL/-
TRpep-160/8	KHL,YD/KHL,YD,B	NL/-
TRpep-160/9	KHL,YD/KHL,YD,B	NL/-
TRpep-160/10	KHL,YD/KHL,YD,B	NL/-
TRpep-171/1	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-171/2	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-171/3	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-171/4	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-171/5	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-171/6	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-171/7	KHL,K/KHL,K,B	NL/-
TRpep-171/8	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	KHL/KHL,YD
TRpep-171/9	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-171/10	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-171/11	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-171/12	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-171/13	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-175/1	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-175/2	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-175/3	KHL,YD/KHL,YD,B	NL/-
TRpep-175/4	KHL,YD/KHL,YD,B	NL/-
TRpep-175/5	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	KHL,K/KHL,K,YD
TRpep-175/6	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-175/7	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-175/8	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-175/9	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-

TRpep-175/10	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-175/11	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-175/12	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-175/13	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-175/14	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-209/1	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-209/2	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-209/3	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/NL
TRpep-209/4	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-209/5	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-209/6	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-209/7	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-209/8	KHL/K,M/YD	NL/-
TRpep-209/9	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	KHL,K/KHL,K
TRpep-209/10	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-209/11	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-209/12	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-209/13	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-209/14	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-209/15	KHL/K,M/YD	NL/-
TRpep-209/16	KHL/K,M/YD	NL/-
TRpep-209/17	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	KHL,K/KHL,K,YD
TRpep-219/1	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-219/2	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-219/3	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-219/4	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-219/5	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-219/6	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-219/7	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-219/8	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-219/9	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-219/10	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-219/11	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-219/12	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-219/13	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-219/14	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-219/15	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-

TRpep-219/16	KHL,K,YD/KHL,K,YD,B	KHL,K/KHL,K,YD
TRpep-272/1	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-272/2	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-272/3	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-272/4	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-272/5	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-272/6	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-272/7	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-272/8	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-272/9	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-272/10	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-272/11	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-
TRpep-272/12	KHL,YD/KHL,K,YD,B	NL/-

Lokal/Sistemik Enfeksiyon, KHL: Klorotik Halka Leke, NHL: Nekrotik Halka Leke, YD:Yaprak Deformasyonu, B:Bodurluk, K:Kloroz, NL:Nekrotik Lezyon, SN: Sistemik Nekroz, -: Simptom yok

ÖZ GEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : SELİN CEREN BALSAK

Uyruğu : T.C.

Doğum yeri : ADANA

Telefon : 03443004681

e-posta : cerenbalsak@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	KSÜ / Bitki Koruma Bölümü	2020
Yüksek lisans	KSÜ / Bitki Koruma Bölümü	2016
Lisans	ÇÜ / Bitki Koruma Bölümü	2013

Yabancı Dil

İngilizce (YDS: 77.5)

Science Citation Index’ce taranan dergilerde yayınlanmış makaleler:

- 1) **Balsak, S.C.**, Kardeş, H. and Buzkan, N. (2020). First report of *Cucumber mosaic virus* in cyclamen (*Cyclamen* spp.) in Turkey. *Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00687-z>.
- 2) Buzkan, N., **Balsak S.C.**, Kılıç, D. (2018). Distribution and population diversity of *Australian grapevine viroid* (AGVd) in Turkish autochthonous grapevine varieties. *Phytoparasitica*, 46(3), 295-300., Doi: 10.1007/s12600-018-0668-4 (Yayın No: 4412684)
- 3) Demir, N., Buzkan, N., **Balsak, S.C.** (2018). Occurrence of *Beet western yellows virus* in spinach in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, Doi: 10.1007/s42161-018-0153-4 (MAKALE Vaka Takdimi) (Yayın No: 4412707).
- 4) Buzkan, N., Öztırak, M.K., **Balsak, S.C.** (2017). First report Of *Grapevine virus D* (GVD) in Autochthonous Grapevine Varieties in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 99(3), 803-803., Doi: 10.4454/jpp.v99i3.3966 (MAKALE Vaka Takdimi) (Yayın No: 3754762).

Uluslararası bildiriler:

- 1) Ayaz, H., **Balsak, S.C.**, Buzkan, N. (2020). Kahramanmaraş İlinde Zeytin Ağaçlarında *Necrovirus* Cinsi Virüslerin Teşhisi. 2. Uluslararası GAP Gıda, Tarım Ve Veteriner Bilimleri Kongresi, 3-5 Nisan 2020, Gaziantep.
- 2) Kardeş, H., **Balsak, S.C.**, Buzkan, N. (2019). Detection of Viruses infecting *Cyclamen* sp. Uluslararası ÜNİDOKAP Karadeniz Sempozyumu, 21-23 Haziran 2019, Tokat.
- 3) Çetiz, M.V., **Balsak, S.C.**, Buzkan, N. (2018). Detection of Viruses In Fig Trees With Fig Mosaic Disease-Like Symptoms. IV. International Agriculture Congress , 05-08 July 2018, Nevşehir/Turkey.
- 4) Buzkan, N., Yakar, M., **Balsak, S.C.** (2018). Genetic diversity of *Grapevine leafroll-associated virus-2* isolates in Turkey. 19th Conference of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of The Grapevine (Tam Metin Bildiri/Poster)(Yayın No:4539800)
- 5) Buzkan, N., Kılıç, D., **Balsak, S.C.** (2018). Genetic diversity of *Australian grapevine viroid* isolates in Turkey. ICVG (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4409636).
- 6) Buzkan, N., Öztırak, M.K., **Balsak, S.C.** (2018). Occurrence of *Grapevine virus D* (GVD) in Turkish vineyards. 19th Conference of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of The Grapevine (Tam Metin Bildiri/Poster)(Yayın No:4543792).
- 7) **Balsak, S.C.**, Buzkan, N., Ay, M.Z., Gürbüz, M. (2017). Occurrence of *Hop stunt viroid* (HSVd) in Turkish pistachio trees. 15. Congress of the Mediterranean phytopathological union, 56(2), 294-294. (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3745869).