

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**ADİYAMAN İLİ TÜTÜN ÜRETİM ALANLARINDAKİ BAZI TÜTÜN
VİRÜSLERİNİN MULTİPLEKS RT-PCR YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI
VE BAZI VİRÜS İZOLATLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Abidin GÜNAY
DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Mustafa USTA

VAN-2019

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**ADİYAMAN İLİ TÜTÜN ÜRETİM ALANLARINDAKİ BAZI TÜTÜN
VİRÜSLERİNİN MULTİPLEKS RT-PCR YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI
VE BAZI VİRÜS İZOLATLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Abidin GÜNAY

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından **FYL-2018-7339** No'lu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda Dr.Öğr.Üyesi Mustafa USTA danışmanlığında, Abidin GÜNAY tarafından sunulan "**Adıyaman İli Tütün Üretim Alanlarındaki Bazı Tütün Virüslerinin Multipleks RT-PCR Yöntemi İle Araştırılması ve Bazı Virüs izolatlarının Moleküler Karakterizasyonu**" isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri gereğince 13/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Dr.Öğr.Üyesi Emre DEMİRER
DURAK

İmza:

Üye: Dr.Öğr.Üyesi Mustafa USTA

İmza:

Üye: Dr.Öğr.Üyesi Abdullah GÜLLER

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 12.107.12019 Tarih ve 2019/38-T sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Suat SENSÖY
Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Suat SENSÖY
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Abidin GÜNAY


ÖZET

ADİYAMAN İLİ TÜTÜN ÜRETİM ALANLARINDAKİ BAZI TÜTÜN VİRÜSLERİNİN MULTİPLEKS RT-PCR YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI VE BAZI VİRÜS İZOLATLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

GÜNAY, Abidin

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi. Mustafa USTA

Temmuz 2019, 67 sayfa

Adıyaman ili tütün üretim alanlarında Tütün virüslerini (TMV, TEV, PVY, CMV ve TVBMV) tespit etmek amacı ile 2018 yılında survey çalışmaları yapılmıştır. Tütün virüslerinin varlığını test etmek için multipleks RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Adıyaman ilinde tespit edilen virüslerin kılıf protein genlerinin moleküler karakterizasyonları yapılmıştır. İldeki tütün tarlalarından 450 tane taze tütün yaprak örneği toplanmıştır. Test edilen 450 tütün örneğinden 40 tanesinde CMV (% 8.8), 25 tanesinde TMV (% 5.5), 1 tanesinde TMV+CMV karışık enfeksiyon (% 0.2) tespit edilmiştir. Adıyaman ilinde tütün virüslerinin genel enfeksiyon oranı % 14.4 olarak bulunmuştur. Yapılan testler sonucunda toplanan tütün örneklerinde TEV, PVY, TVMBV virüsleri tespit edilememiştir. Adıyaman ilinde belirlenen virüslerin kılıf protein genlerinin tamamının moleküler klonlama karakterizasyonları yapılmıştır.

Tespit edilen her virüs türünden rastgele ikişer izolat seçilerek kılıf protein genleri karakterize edilmiştir. TMV 20 nolu örnek (Gen bankası Ulaşım No:MK677444), TMV 307 nolu örnek (Gen bankası Ulaşım No:MK689859), CMV 61 nolu örnek (Gen bankası Ulaşım No:MK704430) ve CMV 73 nolu örnek (Gen bankası Ulaşım No:MK704429) virüslerinin kılıf protein genlerinin tamamı klonlanarak universal primerler ile DNA dizilemeleri gerçekleştirilmiştir. TMV Adıyaman izolatlarının dünyadaki 19 farklı izolatın nükleik asitleri ile % 72.3-% 99.17 değişen oranlarda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. CMV Adıyaman izolatlarının nükleik asit düzeyinde dünyadaki 20 farklı izolat ile % 74.09-99.54 arasında benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. Bu çalışma ile Adıyaman ili tütün üretim alanlarında CMV ve TMV ilk defa rapor edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Adiyaman ili, Klonlama, Moleküler karakterizasyon, Multipleks RT-PCR, Tütün.



ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF SOME TOBACCO VIRUSES IN TOBACCO FIELDS OF ADIYAMAN BY MULTIPLEX RT-PCR METHOD AND THE MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SOME VIRUS ISOLATES

GÜNAY, Abidin

M. Sc. Thesis, Department of Plant Protection

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Mustafa USTA

July 2019, 67 pages

Survey studies were conducted in 2018 in order to detect tobacco viruses (TMV, TEV, PVY, CMV and TVBMV) in tobacco production areas of Adiyaman province. Multiplex RT-PCR method was used to test the presence of tobacco viruses. Four hundred fifty fresh leaf samples were collected from tobacco fields in Adiyaman province. Of the 450 tobacco samples tested, 40 had CMV (8.8 %), 25 had TMV (5.5 %), and 1 had TMV + CMV infection (0.2 %). The overall infection rate of tobacco viruses in Adiyaman province was found to be 14.4%. According to the molecular tests, TEV, PVY, TVMBV viruses were not detected in the collected tobacco samples.

Among the viruses detected in Adiyaman province, all of the coat protein genes of two randomly selected isolates (TMV 20, TMV 307, CMV 61 and CMV 73) were cloned and molecularly characterized. TMV Adiyaman isolates showed similarity between 72.3 % and 99.17 % while CMV Adiyaman isolates showed similarity between 74.09-99.54 % at nucleotide level with other 19 different isolates in the World. Otherwise, CMV Adiyaman isolates showed similarity between 74.09 % and 99.54 % at nucleotide level with other 20 different isolates in the world. In this study, CMV and TMV were first reported in tobacco production areas of Adiyaman province.

Key words: Adiyaman province, Cloning, Molecular characterization, Multiplex RT-PCR, Tobacco.



ÖN SÖZ

Yürüttüğüm çalışmam boyunca desteğini benden esirgemeyen, çalışmalarımı izleyip bana yön veren, tezin tasarlanma, laboratuvar çalışmaları ve yazım aşamaları olmak üzere her aşamasında yanımda olan, bilgi, öneri ve görüşlerini benimle paylaşan değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Mustafa USTA'ya, Dr. Öğr. Üyesi Abdullah GÜLLER'e katkılarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim. Yüksek lisans çalışmam boyunca maddi manevi yardımlarını esirgemeyen aileme ve arkadaşlarım Abdulsalam KARAOZAN, Ferhat KAPÇAK, Erkan DEMİR ve Yasin BABİER'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu yüksek lisans tez çalışmasını, FYL-2018-7339 No' lu proje ile destekleyen, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi' ne teşekkür ederim.

2019

Abidin GÜNAY



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	ix
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	7
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1. Materyal.....	17
3.2. Yöntem	18
3.2.1. Survey çalışmaları.....	18
3.2.2. Viral enfeksiyonların araştırılması.....	18
3.2.3. Virüs izolatlarının moleküler karakterizasyonlarının yapılması.....	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
4.1. Survey Çalışmaları.....	31
4.2. Pozitif Kontrol Olarak Kullanılacak İzolatların Ön Survey Çalışmaları ile Araştırılması	32
4.3. Moleküler Testlere Ait Bulgular.....	33
4.3.1. mRT-PCR testi ile testlenen örneklerde TMV ve CMV tespit edilmesine dair bulgular	35
4.3.2. RT-PCR testi ile örneklerde TMV tespit edilmesine dair bulgular	36
4.3.3. RT-PCR testi ile örneklerde CMV tespit edilmesine dair bulgular	37
4.4. Tespit Edilen İzolatlara Ait Kılıf Protein Genlerinin Karakterizasyonu	41
4.4.1. TMV izolatlarının kılıf protein geninin karakterizasyonu	41
4.4.2. CMV izolatlarının kılıf protein geninin karakterizasyonu.....	48
5. SONUÇ.....	57
KAYNAKLAR.....	61
ÖZ GEÇMİŞ.....	67



ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Tütün Bitkisinde Tespit Edilen Bazı Virüsler	7
Çizelge 3.1. Survey yapılan ilçelerdeki tütün ekim alanları, toplanan yaprak sayıları ..	18
Çizelge 3.2. Virüslerin teşhisinde kullanılan primerler, amplifikasyon ürünü, PCR türü, sıcaklık döngüleri ve kaynaklar.....	21
Çizelge 3.3. Bazı Tütün virüslerinin RT-PCR ve multipleks RT-PCR testi ile tespit etmede kullanılan primerler	21
Çizelge 3.4. TMV ve CMV virüs izolatlarının kılıf protein genlerini çoğaltmak amacıyla Vector NTI 10 programı kullanılarak dizayn edilen primerler ile bu primerlerin çoğalttığı bölgelerin uzunluğu.....	23
Çizelge 3.5. Virüslerin kılıf protein genlerini çoğaltmak için gerekli olan sıcaklık döngüleri ve primerlerin bağlanma sıcaklığı.....	24
Çizelge 4.1. Adıyaman ilinde tütün virüslerini araştırmak amacı ile survey çalışmalarının yürütüldüğü ilçeler, testlenen örnek sayıları, araştırılan virüsler ve tespit edilen virüslerin bulunma oranları.....	34
Çizelge 4.2. 20 numaralı TMV izolatına ait kılıf protein geni dizisi.....	42
Çizelge 4.3. 307 numaralı TMV izolatına ait kılıf protein geni dizisi.....	42
Çizelge 4.4. Gen bankasında bulunan TMV kılıf protein geninin ulaşım numarası, konukçu, ülke, gen ve uzunluğu konusundaki bilgiler.....	43
Çizelge 4.5. TMV 20 nolu (MK677444) örneğin kılıf protein geninde meydana gelen yer değiştirme	46
Çizelge 4.6. TMV 307 nolu (MK689859) örneğin kılıf protein geninde meydana gelen yer değiştirme	46
Çizelge 4.7. CMV 61 nolu izolatına ait kılıf protein geni dizisi	49
Çizelge 4.8. CMV 73 nolu izolatına ait kılıf protein geni dizisi	49
Çizelge 4.9. Gen bankasında bulunan CMV kılıf protein geninin ulaşım numarası, konukçu, ülke, gen ve uzunluğu konusundaki bilgiler.....	50
Çizelge 4.10. CMV 73 nolu (MK704429) örneğin kılıf protein geninde meydana gelen yer değiştirme.	54

Çizelge**Sayfa**

Çizelge 4.11. CMV 61 nolu (MK704430) örneğın kılıf protein geninde meydana gelen yer değiştirme.	55
---	----



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Dünyada tütün üretimi yapılan ülkeler (Tabacco Atlas, 2010).	2
Şekil 1.2. Dünya tütün üretim grafiği (FAO, 2016).	3
Şekil 1.3. Türkiye’de bölgelere göre tütün ekim alanları (TÜİK, 2016).	4
Şekil 1.4. Tütün içimini gösteren temsili resim (Aybakan, 2016).	5
Şekil 2.1. Tobomoviridae familyasının genom yapısı (Viral zone, 2019).	8
Şekil 2.2. Bromoviridae familyasının genom yapısı (Viral zone, 2019).	9
Şekil 2.3. Potyviridae familyasının genom yapısı (Viral Zone, 2019).	11
Şekil 3.1. Tütün surveyi yapılan adıyaman il haritası.	17
Şekil 3.2. Transformasyon işleminin mikropulser cihazı ile gerçekleştirilmesi.	26
Şekil 3.3. Transformasyon sonrası gelişen mavi ve beyaz koloniler (A) Katı LB’de gelişen mavive beyaz kolonilerden beyaz kolonilerin seçimi (B) 15 ml’lik steril tüplerde bulunan sıvı LB’ ye daldırma yöntemi ile inokulasyonu ve inkubatörde 2 saat gelişimi (C).	28
Şekil 3.4. Rekombinant plazmid saflaştırma aşaması.	29
Şekil 4.1. Survey çalışmalarının yürütüldüğü tütün tarlalarının genelgörünümü ve rastgele tütün yaprak örneklerin toplanması.	31
Şekil 4.2. Sürvey sırasında görülen bazı virüs belirtileri A-B-C: CMV’nin belirtileri, D-E-F: TMV’nin belirtileri.	32
Şekil 4.3. Adıyaman ilinden toplanan tütün örneklerinin pozitif kontrol olarak kullanmak amacıyla tütün virüslerine karşı multipleks RT-PCR ile araştırılması	33
Şekil 4.4. Adıyaman ili örneklerine uygulanan multipleks RT-PCR testinin agaroz jel görüntüsü	35
Şekil 4.5. Adıyaman ili örneklerine uygulanan multipleks RT-PCR testinin agaroz jel görüntüsü	35

Şekil	Sayfa
Şekil 4.6. Adıyaman ili RT-PCR ile TMV virüsünün pozitiflerinin agaroz jel görüntüsü .	36
Şekil 4.7. Adıyaman ili RT-PCR ile TMV virüsünün pozitiflerinin agaroz jel görüntüsü.	36
Şekil 4.8. Adıyaman ili RT-PCR ile CMV virüsünün pozitiflerinin agaroz jel görüntüsü.	37
Şekil 4.9. Adıyaman ili RT-PCR ile CMV virüsünün pozitiflerinin agaroz jel görüntüsü.	37
Şekil 4.10. Adıyaman ili RT-PCR ile CMV virüsünün pozitiflerinin agaroz jel görüntüsü.	37
Şekil 4.11. Saflaştırılmış plazmite uygulanan PCR'ın jel görüntüsü.	42
Şekil 4.12. CLC Main Workbench 6.7.1 programı ile TMV Adıyaman 1 ve 2 (MK677444 ve MK689859) izolatlarının dünyadaki TMV izolatlarının (Çizelge 4.3) kılıf protein genlerinin nükleik asit dizilerinin benzerlik oranları.	45
Şekil 4.13. TMV Adıyaman (MK677444 ve (MK689859) izolatları ile dünyadaki TMV izolatlarının (Çizelge 4.3.) kılıf protein geninin nükleik asit dizisi 100 tekerrürlü olarak Neighbor joining yöntemiyle oluşturulan filogenetik ağacı.....	47
Şekil 4.14. Saflaştırılmış plazmite uygulanan PCR'ın agaroz jel görüntüsü,	48
Şekil 4.15. CLC Workbench programı 6.7.1 ile CMV Adıyaman (MK704429 ve MK704430) izolatlarının dünyadaki CMV izolatlarının (Çizelge 4.4) kılıf protein genlerinin nükleik asit dizilerinin benzerlik oranları.....	51
Şekil 4.16. CLC Workbench 6.7.1. programı ile CMV Adıyaman (MK704429 ve MK704430) izolatlarının dünyadaki diğer CMV izolatlarının(Çizelge 4.4) kılıf protein genlerinin nükleik asit dizilerinde meydana gelen yer değiştirmeleri.	53
Şekil 4.17. CMV Adıyaman (MK704429 ve MK704430) izolatları ile dünyadaki CMV izolatlarının (Çizelge 4.4.) kılıf protein geninin nükleik asit dizisi 100 tekerrürlü olarak Neighbor joining yöntemiyle oluşturulan filogenetik ağacı.....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simge	Açıklama
μ	Mikron
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
Da	Dalton
Dk	Dakika
G	Gram
kDa	Kilo dalton
Kg	Kilogram
M	Molar
Mg	Miligram
mg/ml	Miligram/mililitre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MW	Molekül ağırlığı (weight)
Nm	Nanometre
pmol	Pikomol
U	Ünite
V	Volt
v/v	Hacim/hacim
w/v	Ağırlık/hacim

Kısaltma	Açıklama
-----------------	-----------------

A	Adenin
ABD	Amerika Birleşik Devleti
AB	Avrupa Birliği

Kısaltma	Açıklama
C	Sitozin
cDNA	Komplementer Deoksiribo Nükleikasit
CP	Coat protein (Kılıf protein)
DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich -ELISA
dATP	Deoksiadenozintrifosfat
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
DNase	Deoksiribonükleaz
dNTP	Deoksinüklotidtrifosfat
EDTA	Ethylenediaminetetraaceticacid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtBr	Etüdyo Bromide
EtOH	Etanol
FAO	Dünya Tarım Örgütü
HCl	Hidroklorik Asit
ME	Mercaptoethanol
MgCl₂	Magnezyum klorür
NaI	Sodyum iyodür
NaOAc	Sodyum asetat
Nt	Nükleotid
PCR	Polymerase chain reaction
PVY	Patates Y Virüsü
PVX	Patates Virüsü X
RNA	Ribo Nükleik Asit
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
RT	Reverse Transkriptase
RT-LAMP	Reverse Transcription-Loop-mediated Isothermal Amplification
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction
ssRNA	Tek iplikli (single stranded) ribonükleik asit
T	Timin

Kısaltma**Açıklama****TAE**

Tris Asetat EDTA

TEV

Tütün Etch Virüsü

Taq DNA Polimeraz

Termo stabil DNA polimeraz enzimi

TMV

Tütün Mozaik Virüsü

TNA

Total Nükleik Asit

TSWV

Tomato spotted Wild Virüs

TUİK

Türkiye İstatistik Kurumu

U

Urasil





1. GİRİŞ

Tütün bitkisi Patlıcangiller (*Solanacea*) familyasında yer alan, *Nicotina* cinsine ait tek yıllık otsu bir bitkidir. Tütün bitkisinin ana vatanı olarak Orta Amerika ve Antiller Bölgesi gösterilmektedir. Tütün bitkisinin, Amerika kökenli olan 50 tane çeşidi, Avusturya ve Yeni Zelanda kökenli 5-6 çeşidi ve Asya kökenli olan birkaç çeşidi ile birlikte 60 üzerinde çeşidi olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte, saf tür olarak belirtilen birçok tütün çeşidinin aynı türün alt türleri olduğu tespit edilmiştir (Ersan, 2004). Dünyada önemli tarımsal ürünlerden biri olan tütünün önemi, insanlara faydalı olmasından değil, tütün ve tütün ürünlerini üreten ve ticaretini yapanların ekonomik kazanç sağlamalarındandır. Dünyada üretimi yapılan tütünün % 95'i sigara yapımında kullanılmaktadır. Sigara endüstrisinde en çok Virginia, Burley ve Oriental (Türk tipi veya Şark tipi) tütün çeşitleri kullanılmaktadır (Parlaklar, 2010).

Tütünün kalitesini etkileyen en önemli unsur kurutma işlemidir. Tütünün dört farklı kurutma şekli vardır. Bunlar, Flue-Cured tütünler (ısı ile kurutulan), Air-Cured tütünler (hava ile kurutulan), Sun-Cured tütünler (güneşte kurutulan) ve Fire-Cured tütünler (ateşte kurutulan) şeklinde kurutmalardır. Türkiye'de üretilen tütünler en çok sun-cured kategorisinde olup güneşte kurutulmaktadır. Üretimden değerlendirme aşamasına kadar geniş istihdam imkânı sağlayan tütün, yüzyıllardır çeşitli bölgelerde yaygın şekilde aile tarımı olarak üretilmekte, başta ihracat olmak üzere ulusal gelir açısından Türk ekonomisinde oldukça önemli bir yere sahip olmaktadır (Parlaklar, 2010).

Gelişmiş ülkelerde tütün ürünleri ve tütün destekleme politikaları yoğun baskı altında bulunmakta ve işletme düzeyinde tütün üretiminin kârlılığında azalma gözlenmektedir. Buna karşılık gelişmekte olan ülkelerin çoğunda tütün ve ürünlerinin kârlılığı diğer ürünlere göre daha yüksek düzeydedir. Bu nedenle, dünya tütün üretiminin gelişmekte olan ülkelere özellikle Brezilya, Zimbabve, Malawi, Hindistan, Türkiye ve Çin'e kayması beklenmektedir (Gümüş, 2004). Dünya'da üretilen tütün en çok sigara yapımında ve diğer tütün mamullerinin elde edilmesinde kullanılmaktadır. Son yıllarda Dünya'da yaklaşık 4 milyon hektar alanda her yıl ortalama 6-7 milyon ton tütün üretilmektedir. Tütün üretimi yıldan yıla değişiklik göstermekle birlikte 1961 yılında yaklaşık 3-4 milyon tondan kademeli bir şekilde

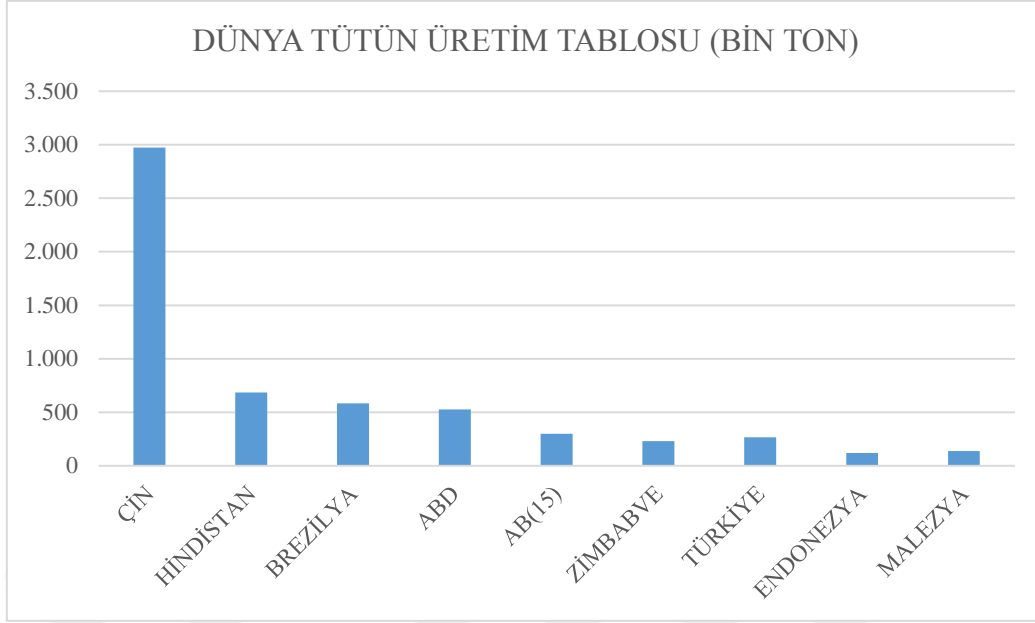
artmış en yüksek üretime 8-9 milyon tonla 1997 yılında ulaşmıştır. Bu tarihten sonra ise artış azalış göstererek üretim ortalama 6-7 milyon ton düzeyinde kalmıştır (Karabacak, 2017).

Çin ile birlikte ABD, Rusya, Endonezya ve Japonya tütün mamulleri üretiminde ilk 5 ülke konumundadır. Bugün dünyanın 128 ülkesinde değişik kalite ve özelliğe sahip tütün çeşitlerinin tarımı yapılmaktadır (Köprülü ve ark., 2009). Dünyadaki tarım alanlarının yaklaşık 4 milyon hektarında tütün yetiştirilmektedir. Dünya genelinde tütün üretimine yönelik bazı bilgiler Şekil 1.1 'de verilmiştir (Tobacco Atlas, 2010).



Şekil 1.1. Dünyada tütün üretimi yapılan ülkeler (Tobacco Atlas, 2010).

Dünya toplam tütün üretiminin yaklaşık $\frac{3}{4}$ 'ü Çin, Türkiye, ABD, Hindistan, Endonezya ve Brezilya tarafından üretilmektedir (Gül ve Ataseven, 2004). Şekil 1.2'de Tütün üretimi yapan başlıca ülkelerin üretim miktarları verilmiştir (Köprülü ve ark., 2009). Farklı coğrafi şartlara daha erken ve oldukça iyi uyum sağlayabilen tütün, adaptasyon sürecini kısa sürede atlatan en iyi tarımsal ürünlerden biridir. Tütün, 2010 yılı itibariyle Çin'den Kanada'ya, Zimbabve'den Belçika'ya kadar dünyada toplam 128 ülkede yetiştirilmeye başlanmıştır. Dünya tarım tarihinde neredeyse hiçbir ürün tütün gibi çok hızlı bir yayılış göstermemiştir. Günümüzde tütün ve tütün ürünlerinin tüketilmediği bir ülkeden bahsedilemez. Günümüzde 60'ı aşkın tütün türü içerisinde en fazla yetiştiriciliği yapılan *Nicotiana tabacum* L. olup ülkemizde de yetiştirilen tütünlerin % 95'i bu türdür.



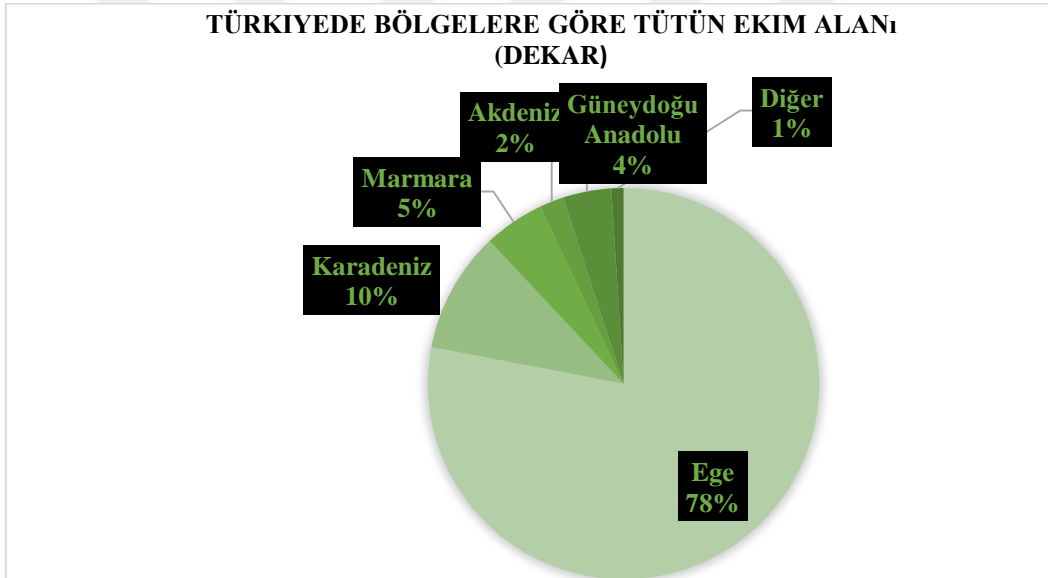
Şekil 1.2. Dünya tütün üretim grafiği (FAO, 2016).

Türkiye'ye tütün bitkisinin ilk olarak ne zaman ve nasıl geldiği konusunda farklı araştırmacılar tarafından farklı görüşler öne sürülmüştür. Tütünün ülkeye 1580'de Venedik'liler tarafından getirildiği, 1600'lü yılların başına kadar tütün ihtiyacının ithalat yoluyla karşılandığı, 1630'lu yıllara gelindiğinde ülkenin farklı illerde yetiştirilmeye başlandığı söylenmektedir (Borio ve ark., 2001). Tütünün yetişme koşullarında belirtildiği üzere, çok fazla seçici bir bitki değildir. Dünya'da geniş bir enlem aralığında ekimi yapılabilen, iklim şartlarına bağlı olarak neredeyse 1000 m.'ye varan rakımlarda yetiştirilmektedir. Tütün kurak iklimlerden nemli bölgelere kadar tarımın yapıldığı her yerde yetiştirilebilir. Yetiştirilicikte önemli olan tütünün kalitesi ile tütün tiplerine göre bitkinin isteğinin farklılık göstermesidir. Dolayısıyla Türkiye'de kısa mesafede çeşitli iklim özelliklerinin görülebiliyor olması hem pek çok tütün tipinin yetişmesine, hem de geniş alanda tütün tarımının yapılmasına olanak sağlamaktadır.

Türkiye'de tarımı yapılan tütünlerin yaklaşık % 96'sı Şark (Türk) tütünü olup, geri kalanı Virginia, Burley, Tömbeki ve Hasankeyf tütünlerinden oluşmaktadır (Daşdemir, 2006). Türkiye'de 2016 yılı verilerine göre ekiliş bakımından ilk sırada Ege Bölgesi gelirken onu sırasıyla Karadeniz, Marmara, Güneydoğu Anadolu, Akdeniz ve Doğu Anadolu Bölgeleri izlemektedir (Şekil 1.3). Ege Bölgesi yıllardan beri gerek tütün

ekim alanlarında gerekse tütün üretim miktarında önemli bir oranla ilk sırada yer almaktadır.

Ülkemizde tütün üretimi sözleşmeli üretim modeli yapılmaktadır. 2018 yılında sözleşmeli üretim yapan 56 bin tütün üreticisi 943.000 dekada ülke genelinde 82,5 milyon kg tütün üretmiştir. Ülkemizde bir de sözleşmesiz olarak üretilen ve kayıtlara geçen 11 milyon kg tütün ile beraber ülke genelinde toplam tütün üretimi 93,5 milyon kg olarak gerçekleşmiştir. 4733 Sayılı kanunun çıktığı günden itibaren geçen 15 yılda büyük düşüş gösteren tütün üretimi rakamlarla belirtilecek olursa; 2002 yılında 405 bin olan tütün üreticisi sayısı 2018 yılı itibarıyla %86 oranında azalarak 56 bine, tütün üretimi ise 2002 yılında 159.521 tondan toplam %48 azalarak 2018 yılında 82.500 ton civarına gerilemiştir (Tütün Raporu, 2018).



Şekil 1.3. Türkiye’de bölgelere göre tütün ekim alanları (TÜİK, 2016).

Türkiye’de tütün üretiminde Adıyaman, Malatya, Akçadağ’da şark tipi tütün üretimi yapılmaktadır. Bu tütünler orta ve büyük boyutlu, sarı, açık kırmızı, kırmızı renkli, sağlam dokulu, kalınca, sertçe içimli, lezzetleri tatlı ve kokulu tütünlerdir. Adıyaman tütünleri içimlik tütün olarak ülke içinde iyi bir yere sahiptir (Peksüslü ve ark., 2004).



Şekil 1.4. Tütün içimini gösteren temsili resim (Aybakan, 2016).

Tütün üretiminde Türkiye’de önemli bir yere sahip olan Adıyaman, 1990’lı yıllarının sonuna da uygulanmaya başlanan kotalar ve 2002 yılında yürürlüğe giren Tütün Kanunu ile birlikte tütün üretiminde ve pazarlamasında büyük sorunlar yaşamaktadır Adıyaman ilinde Çiftçi Kayıt Sistemi’ne kayıtlı olmayan tütün yetiştiricilerinin ektiği tütün miktarı oldukça yüksek olup mevcut verilerin 3-4 katıdır. Bu anlamda 2017 yılı Adıyaman genelinde 100.329 dekar ekili alan tespit edilmiş olup üretim miktarı 9.739 ton olarak belirlenmiştir (TÜİK, 2017).

Dünya ve Türkiye’de büyük bir ekonomik öneme sahip olan tütün yetiştiriciliği çok zor, zahmetli ve masraflı bir iştir. Diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi tütün bitkisi de üretim dönemi içerisinde çeşitli hastalıklardan etkilenmekte ve önemli fitopatolojik sorunlar ortaya çıkabilmektedir. Buna bağlı olarak elde edilen ürünlerde verim kayıpları olmakta ve ürün kalitesi düşmektedir (Koca ve ark., 1982).

Tütünde ürün ve kalite kaybına yol açan çok sayıda zararlı ve hastalık etmeni bulunmaktadır. Tütün üretiminde fungal ve bakteriyel hastalıkların dışında birçok virüs hastalığının olduğu da bilinmektedir.

Bu çalışmada ele alınan bazı tütün virüsleri *Tobacco mosaic tobamovirus* (TMV), *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV), *Potato potyvirus Y* (PVY), *Tobacco vein banding mosaic potyvirus* (TVBMV) ve *Tobacco etch potyvirus* (TEV) dünya çapında ticari olarak yetiştiriciliği yapılan tütünlerde yaygın olarak infeksiyon meydana getirmekte, hem verimi hem de kaliteyi düşürmektedir. Ayrıca, çok kolay yayılan bu virüslerin kontrolü oldukça zordur. Bitkide gözle görünür hiçbir belirti olmasa da

virüsler sistemik olarak konukçunun kök, gövde ve yapraklarında bulunabilmektedir (Bagley, 2001).

Tütün virüs hastalıkları bitkinin tümüyle ölümüne neden olmadığı için oluşturdukları zarar zaman zaman gözden kaçmaktadır. Buna karşın, diğer ülkelerde yapılan çeşitli araştırmalarda virüs hastalıklarının tütünün verim, kalite ve kimyasal bileşimini büyük oranda etkiledikleri bildirilmiştir. Virüs hastalıklarının tütünün kimyasal bileşimine etkileri, azotlu maddeler ve özellikle protein azotunu artırıp şeker miktarını düşürmesi nedeniyle kalitenin bozulması yönünde olmaktadır. Şark tipi tütünlerde fazla azotlu maddeler özellikle de protein azotu yanma sırasında hoşagitmeyen bir kokunun oluşmasına neden olur. Tütünde şeker içeriğinin yüksek olması, duman reaksiyonunu asit hale getirmesinden dolayı istenilen bir durumdur ve kalite üzerine olumlu etkisi bulunmaktadır. Oysaki virüs enfeksiyonları nedeniyle şeker miktarındaki düşme, bu olumlu özelliği ortadan kaldırmaktadır (Yorgancı ve Sekin, 1982).

Ülkemizin hemen hemen her bölgesinde tütün üretimi yapılmaktadır. Ülke olarak dünya çapında önemli bir yere sahip olmamıza rağmen tütünün önemli sorunlarından biri olan virüsler ile ilgili olarak yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesinde bugüne kadar yapılan çalışma olmadığından dolayı bu bölgede hangi virüslerin enfeksiyona yol açtığı ve yayılışları hakkında literatür bulunmamaktadır.

Bu çalışmada Adıyaman ilinde önemli ölçüde tütün üretimi yapılan alanlarda enfeksiyon oluşturan bazı tütün virüslerinin (TMV, CMV, PVY, TVBMV, TEV) multipleks RT-PCR yöntemi ile belirlenmesi, tütündeki virüs hastalıklarının yayılış alanlarının ve enfeksiyon oranının ortaya konulması ve tespit edilecek virüs izolatlarının genomunda yer alan kılıf protein geninin tamamının moleküler klonlama ile dizilenecek filogenetik analizlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Tütün virüsleri genel olarak yaprak klorozu (benek, mozaik, çizgi ve sararma gibi), nekroz, cüceleşme ve rozetleşme gibi simptomlara neden olurlar. Simptomların bazıları özellikle besin elementi eksiklikleri ve abiyotik faktörler ile karıştırılmaktadır. Tütün virüslerinin teşhisi zor olduğundan günümüzde sıklıkla kullanılan ve son yıllarda kullanımı oldukça artan moleküler yöntemlerdeki gelişmeler sayesinde virüslerin sınıflandırılması, karakterizasyonu ve adlandırılması daha kolay yapılmaktadır. Çizelge 2.1.'de tütün bitkisinde belirlenen bazı virüsler verilmiştir.

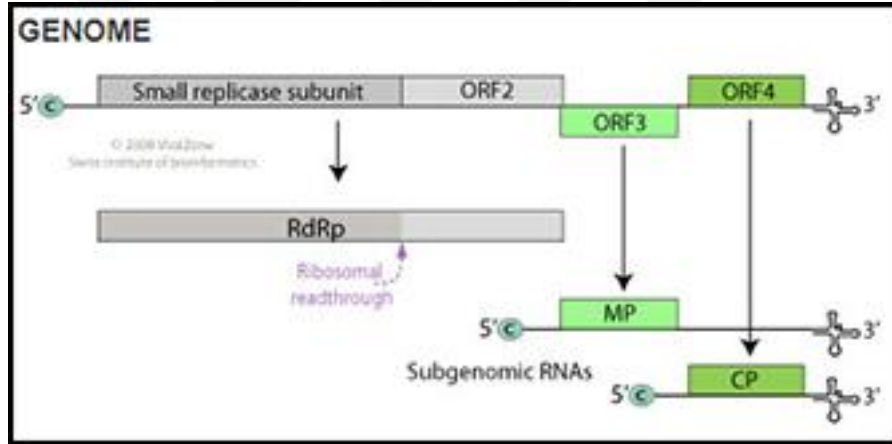
Çizelge 2.1. Tütün Bitkisinde Tespit Edilen Bazı Virüsler

Virüsün adı	Simge	Familya	Cins
<i>Tobacco mosaic virus</i>	TMV	<i>Virgaviridae</i>	<i>Tobamovirus</i>
<i>Potato Y virus</i>	PVY	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	TSWV	<i>Tospoviridae</i>	<i>Tospovirus</i>
<i>Tobacco vein mottling virus</i>	TVMV	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>
<i>Tobacco stunt virus</i>	TSV	<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Varicosavirus</i>
<i>Cucumber mosaic virus</i>	CMV	<i>Bromoviridae</i>	<i>Cucumovirus</i>
<i>Tobacco etch virus</i>	TEV	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>
<i>Tobacco streak virus</i>	TsV	<i>Bromoviridae</i>	<i>Ilarvirus</i>
<i>Tobacco leaf curl cuba virus</i>	TLCCV	<i>Geminiviridae</i>	<i>Begomovirus</i>
<i>Tobacco ring spot virus</i>	TRSV	<i>Secoviridae</i>	<i>Nepovirus</i>
<i>Tobacco necrosis virus</i>	TNV	<i>Tombusviridae</i>	<i>Alphanecrovirus</i>
<i>Tobacco mottle virus</i>	TmV	<i>Tombusviridae</i>	<i>Umbravirus</i>
<i>Tobacco bushy top virus</i>	TBTV	<i>Tombusviridae</i>	<i>Umbravirus</i>
<i>Tobacco latent virus</i>	TLV	<i>Virgaviridae</i>	<i>Tobamovirus</i>
<i>Tobacco vein banding mosaic virus</i>	TVBMV	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>

Tütün mozaik virüsü Tobamovirus genusu içerisinde yer alan, tek sarmallı RNA genomu içeren ve 300×18 mm boyutlarında çubuk şeklinde partiküllere sahip bir hastalık etmenidir (Şekil 2.1.). Dünya genelinde yaygın olan bu virüs 30 familyaya ait 199 farklı çeşidi enfekte edebilmektedir. Ancak virüsün neden olduğu hastalık sonucu oluşan kayıplar en fazla *Solanaceae* familyasına ait türlerde görülmektedir (Bagley, 2001). TMV teşhisi ELISA (Van Regenmortel ve Burckard, 1980), RT-LAMP (Liu ve ark, 2010) ve Ters transkripsiyon-Polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) gibi yöntemler ile tespiti için yapılabilmektedir.

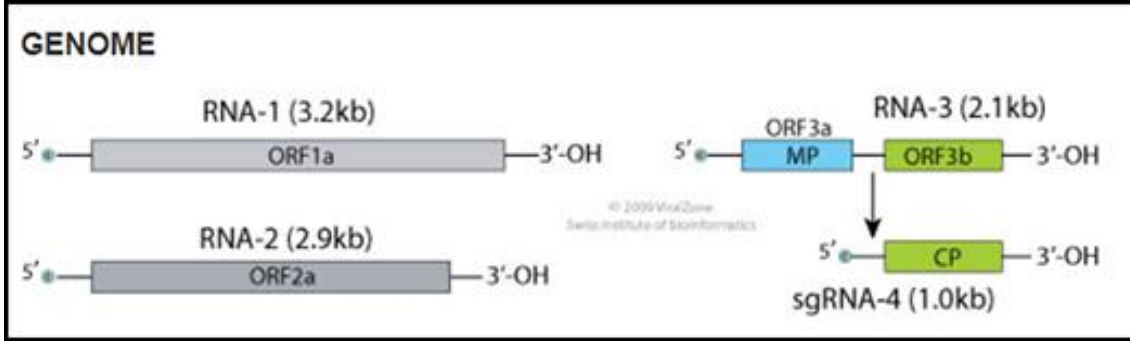
Virüs mekanik inokulasyonla, bazı böcek türleri ile, aşı ile ve bitkilerin birbiriyle temasıyla kolayca taşınabilmektedir (Paylan ve ark.,2011). TMV bitkinin kök, gövde, tohum, tohum kabuğu ve tohum endospermünde bulunmaktadır. TMV bitki atıklarında, bulaşık topraklarda ve bazı yabancı otlarda oldukça uzun süre varlığını koruyabilmektedir (Yeşil ve Tunç, 2012).

Yapılan çalışmada TMV'nin su kültüründe yetiştirilen domates bitkilerinde önemli ekonomik kayıplara neden olduğu tespit edilmiştir (Gonzalez ve ark., 2012). Yapılan başka bir çalışmada su kültüründe yetiştirilen sağlam bitkilere virüs infekteli bitkilerin kılcal köklerinden virüsün taşındığı bildirilmiştir. Çalışmada TMV ile bulaşık tütün bitkisinin köklerinden besin solüsyonuna virüs bulaşmış ve daha sonra tütün ve domatesler bu solusyonda yetiştirilmiştir. Yetişen bitkilerde virüs varlığı DAS ELISA ile test edilmiştir (Park ve ark., 1999).



Şekil 2.1. Tobomoviridae familyasının genom yapısı (Viral zone, 2019).

CMV, genom yapısı (Şekil 2.2) izometrik ve zarf içermeyen, yaklaşık olarak 29-30 nm çapında yuvarlak şekilli, üç parçalıklı (+) ssRNA genomuna sahip ve tek bir partikülden oluşan bir virüstür (Palukaitis ve Garcia-Arenal 2003). Bu 3 parçalı genom RNA1, RNA2 ve RNA3'den oluşmaktadır (Zitter ve Murphy 2009). RNA1 ve RNA2, replikasyon için gerekli olan sırasıyla 1a ve 2a proteinlerini kodlar. RNA interferansının baskılanması ile ilişkili küçük bir protein (2b) de RNA2 tarafından kodlanmaktadır (Arafati ve ark.,2013).



Şekil 2.2. Bromoviridae familyasının genom yapısı (Viral zone, 2019).

CMV infekteli bitkilerdeki simptomsu daha çok genç yapraklarda kloroz, bitki ölümleri ve büyüme noktalarında şiddetli yanmalar şeklinde görünür. Enfekteli bitkilerde şekil bozuklukları, genç yapraklarında çoğunlukla klorotik lekeler ve şiddetli kıvrılma şeklindedir. Virüs en çok bitkilerin büyüme noktasına zarar vermektedir. Yapraklarda daha çok kenarlardan içe doğru kıvrılmalar görülmektedir. Virüsün ilerleyen döneminde bitkide bodurlaşma ve yapraklarında tamamen kurumalar meydana gelir (Kaper ve Waterworth, 1981).

CMV virüsünün 80 farklı yaprak biti türü ile non-persistent olarak taşınabilmektedir (Palukaitis ve Garcia-Arenal, 2003). Japonya'da yapılan farklı çalışmalarda bazı CMV ırkları ve konukçu bitki kombinasyonlarında yaprak biti ile semi-persistent taşınma ile taşındıkları bildirilmiştir (Kameya-Iwaki ve ark., 2000). CMV virüsü en çok *Myzus persica* ve *Aphis gossypii* (Palukaitis ve Garcia-Arenal, 2003), tohumla, aşı yoluyla ve mekanik olarak sağlıklı bitkilere taşınmaktadır. Virüs, afitler dışında küskütün birçok farklı türü ile de taşınmaktadır, enfekteli bitki artıklarında uzun süre kalabilmekte ve bu yolla sağlıklı bitkilere bulaşabilmektedir. Birçok yabancı otu ara konukçu olarak kullanmakta ve hastalığın yayılmasında etkili olmaktadır (Roossinck, 2002).

Hıyar mozaik virüsünün, dünyada ilk olarak hıyar (*Cucumis sativus* L.) bitkisinde 1934 yılında Amerika'da Price tarafından bulunduğu bildirilmiştir. Cucumovirus cinsine ait Hıyar mozaik virüsü (CMV), Bromoviridae familyasında yer alan 500'den fazla cinsten ve 1300'den fazla türü kapsayan konukçu dizisine sahiptir. CMV, TMV'den sonra en fazla konukçu dizisine sahip virüs olarak bilinmektedir (Zitter ve Murphy 2009).

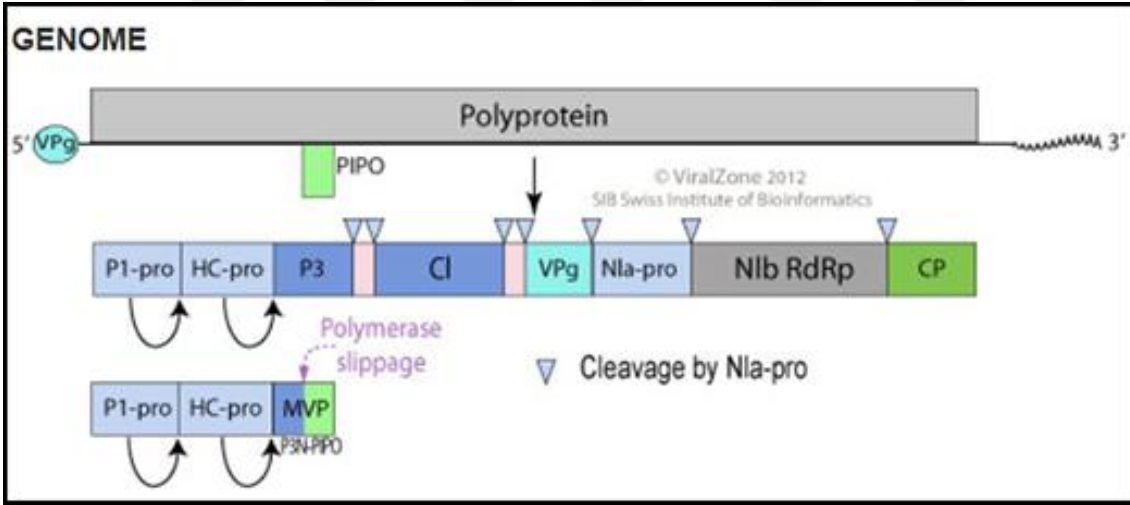
Ülkemizde CMV ile yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. (Çuhal-Kılıç ve Yardımcı, 2012). Beler ve Açıkgöz (2005)'ün yaptıkları bir çalışmada, Marmara ve Ege Bölgesi zeytin alanlarında bazı virüs infeksiyon oranları yayılış yoğunluğu araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda zeytin alanlarında CMV infeksiyonu % 36.36 olarak tespit edilmiştir. Değirmenci ve Uzunoğulları (2007), Marmara Bölgesi domates üretimi yapılan alanlarda bazı virüs hastalıklarının infeksiyonlarını araştırdıkları çalışmalarında, CMV infeksiyon oranını % 9-68.7 olarak belirtmişlerdir. Erkan ve ark. (2013), İzmir ili ve çevresinde yetiştiriciliği yapılan bazı kışlık sebzelerdeki viral etmenlerin saptanması üzerine yürüttükleri çalışmalarında en yaygın olarak tespit edilen virüs hastalıklarından bir tanesinin CMV olduğunu belirtmişlerdir. Sertkaya (2015), Hatay ili marul ve ıspanak üretim alanlarında sorun oluşturan bazı virüs hastalıklarının tespiti amacı ile yapmış olduğu çalışmalarda marullarda % 3.7, ıspanaklarda ise % 16.6 oranında CMV enfeksiyonunu tespit etmiştir.

Başka bir çalışmada Çanakkale ilinde ıspanak üretiminin yoğun olarak yapıldığı alanlarda Hıyar mozaik virüsü (CMV) infeksiyonunun oranının belirlenmesi ve moleküler karakterizasyonu yapmak amacı ile 2016–2017 yıllarında arazilerde taze yaprak örnekleri toplanmıştır. Yapılan surveylerde virüs benzeri symptom gösteren 66 taze ıspanak toplanmıştır. Toplanan örnekler DAS-ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Yapılan bu tesler sonucunda örneklerden dört tanesinin CMV ile enfekteli olduğu bulunmuştur. Virüs tespit edilen örneklerden rastgele bir izolat seçilerek moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda Çanakkale CMV ıspanak izolatu ve dünyada tespit edilen diğer CMV izolatları ile nükleotid düzeyinde % 87–98 ve aminoasit düzeyinde ise % 91–99 oranında benzerlik tespit edilmiştir. Yapılan filogenetik analizler sonucunda bu izolatin CMV'nin altgrup IA'da yer aldığı belirlenmiştir (Kurtoğlu ve ark.,2018).

Bostan ve ark., (2002), tarafından yapılan bir çalışmada 2001 yılının Temmuz ve Ağustos aylarında Kemaliye (Erzincan) ve Yusufeli (Artvin) ilçelerinde biber üretim alanlarındaki virüslerin belirlenmesi hedeflenmiştir. Survey sırasında yapraklarında mozaik, kıvrılma, deformasyon ve sarılık gibi virüs belirtileri gösteren biber bitkilerinden alınan örnekler patates X virüsü (PVX), patates Y virüsü (PVY), hıyar mozaik virüsü (CMV) ve tütün mozaik virüsüne (TMV) spesifik ELISA kitleri ile test edilmiştir. Çalışmada, Kemaliye ilçesindeki üretim alanlarından 30, Yusufeli ilçesindeki

üretim alanlarından ise 15 yaprak örneği olmak üzere toplam 45 örnek testlenmiştir. Sonuçta, Kemalîye ilçesinden alınan 30 yaprak örneğinden 11'inin PVY, 7'sinin TMV ve 1'inin ise PVY+TMV; Yusufeli ilçesinden alınan 15 yaprak örneğinden 6'sının PVY, 3'ünün ise TMV ile enfekteli olduğu saptanmış, PVX ve CMV virüslerine ise rastlanılmamıştır.

PVY, Potyviridae grubunun bir üyesi olup, 730x11 nm boyutlarında, esnek çubuksu partiküllere sahiptir (Hooker, 1986). PVY virüsünün genom yapısı Şekil 2.3' de verilmiştir. PVY'nin patates bitkisinde oluşturduğu semptomların ırka ve çeşitlere göre değiştiği, genel olarak ise yapraklarda mozaik, sararma yanında yaprakların alt yüzeyindeki damarlarda Y şeklinde nekrotik siyah çizgilere, sürgünlerin alt yapraklarında kurumalara ve çoğu kez de bitkilerde ölümlere neden olduğu kaydedilmiştir (Hooker, 1986). Enfekteli bitkilerden sağlıklı bitkilere mekaniksel olarak bitki öz suyu ile taşınabilen PVY'nin aynı zamanda patatesten kolonize olan ya da olmayan çok sayıda afet türü tarafından da non persistent olarak taşınabildiği belirlenmiştir (DiFonzo ve ark., 1996).



Şekil 2.3. Potyviridae familyasının genom yapısı (Viral Zone, 2019).

PVY, Potyvirus cinsinin bir tür üyesidir ve dünya da yaygın olarak görülen tek iplikli bir RNA virüsüdür. PVY'nin tespiti için çeşitli tespit yöntemleri kullanılmıştır. Bunlar arasında ELISA (Crosslin ve ark, 2005), MIA (Bergervoet ve ark, 2008), RT-LAMP (Nie, 2005), radyoaktif olmayan nükleik asit hibridizasyonu (NASH) (Janczur

ve ark., 2006), RT-PCR (Kogovsek ve ark., 2008) ve hibridizasyon (Hataya ve ark., 1994; Maoka ve ark., 2010) gibi yöntemler kullanılmaktadır.

Patates Y virüsü (PVY), biber, patates, tütün ve domates dahil olmak üzere dünya çapında birçok önemli tarım ürününü infekteleyen bir RNA virüsüdür (Shukla ve ark., 1994). PVY ırkları daha çok patates verimini ve kalitesini önemli ölçüde azaltma potansiyeline sahip olduğu için, birçok ülkede patates sertifikalandırma programları için PVY içermeyen patates tohumu gerekmektedir (Slack ve Singh, 1998). PVY virüsünün yayılmaması için önlemlerin alınması PVY enfeksiyonunu ve yayılmasını azaltsa da, çok az oranda PVY enfekteli patates tohumları ve tohum yumruları ile virüsün yayılması tolere edilebilir (Anon, 1991; Singh, 1992; Singh ve ark., 1993).

TVBMV, Potyviridae familyasında yer alan bitki virüsüdür. İlk olarak 1964 yılında Tayvan'da keşfedilmiştir (Chin, 1966). Virüs enfekteli tütün bitkilerinin yapraklarında daha çok klorotik halkalar, damarlarda bantlaşma ve sistemik nekrotik halkalar şeklinde belirtiler gösterir. TVBMV tespiti için RT-PCR yöntemi geliştirilmiştir (Tian ve ark., 2007).

TEV, Potyvirus cinsine ait bir virüs türüdür ve tütün bitkilerinde ciddi ekonomik kayıplara neden olur. TEV virüsünün tespit edilmesi için ELISA ile serolojik tanı ve RT-PCR ile moleküler tanı (Lockhart ve ark. 2010) gibi yöntemler geliştirilmiştir.

TEV virüsü farklı afit türleri ile taşınmaktadır. Virüs 20 familyaya ait 150 türden fazla bitkide görülmektedir (Purcifall ve Hiebert, 1982; Edwardson ve Christie, 1997). Jameica'da yapılan bir çalışmada TEV virüsünün biber üretiminde önemli kayıplara neden olduğu ve bu virüsün 20 afit türü ile taşındığı saptanmıştır (Laird ve Dickson, 1963; Herold, 1970; Eckel ve Lambert, 1993; McGlashan, 1993; Myers, 1996; Martin ve ark., 1998).

TEV ile infekteli bitkilerde yaprak deformasyonu, mozaik, renk açılması, klorotik lekeler, bantlaşmalar, damarlarda büzüşme, yaprak yüzeyinde daralma ve uzama, sürgünlerde geriye doğru ölüm, meyvelerde şekil bozuklukları, yapraklarda yanıklık, nekrotik ve klorotik lekeler, bitkilerde cüceleşme ve yaprakların dökülmesi şeklinde belirtiler gözlemlenmektedir (Edwardson ve Christie, 1997).

Kuzeydoğu Georgi'da yapılan survey çalışmaları sonucunda biber tarlarından hasat edilen biberlerin % 90'ı TEV virüsü ile bulaşık olduğu bildirilmiştir (Banner ve ark., 1985; Nutter ve ark., 1989). Nutter ve ark. (1989), biber bitkilerinin TEV virüsü ile

erken dönemde bulaşık olmasının oldukça önemli olduğunu bildirmiştir. Biber bitkileri erken dönemde virüse infekte olduğunda bitkinin meyve tutumunda, meyve ağırlığında ve büyüklüğünde önemli azalmalar olduğu, bitkinin geç dönem infeksiyonlarının ise bitkide fazla zarara neden olmadığı bildirilmiştir. Araştırmacılar geç dönem infeksiyonlarında bitki verimindeki kaybın % 5'ten düşük olduğunu saptamışlardır.

McGovern and Mullahey (1994), Florida'da Solanaceae familyasına ait bitkileri enfekte eden virüslerin varlığını test etmek için *Solanum viarum* bitkisini kullanmıştır. Yapılan çalışmada bu bitkinin TEV virüsüne konukçuluk ettiği DAS ELISA yöntemiyle saptanmıştır.

Multipleks RT-PCR yöntemi birden fazla primer çifti kullanarak bir reaksiyonda ilgilenilen birçok hedefin eşzamanlı çoğaltımını sağlayan bir PCR çeşididir. Diğer geleneksel yöntemlerden daha verimli, zaman tasarrufu sağlayan uygun maliyetli bir yöntemdir. Bu yöntem, farklı virüslerin tespiti için değerli bir alternatif araç haline gelmiştir (Bertolini ve ark, 2001; Dovas ve Katis, 2003; Ito ve ark, 2002; Ragozzino ve ark, 2004; Uga ve Tsuda, 2005, La Faucee ve ark., 2007). Tek gerçek zamanlı RT-PCR ile karşılaştırıldığında, mRT-PCR, tek bir reaksiyon tüpünde birkaç farklı hedefi çoğaltma avantajına sahiptir.

Jin dia ve ark., (2012) tütünün ciddi ürün kayıplarına neden olan TMV, CMV, TEV, PVY ve TVBMV virüslerini birbirinden ayırt edebilmek için multipleks RT-PCR yöntemi kullanmışlardır. Bu virüsleri belirlemek amacıyla; TMV için 237 bp, CMV için 273 bp, PVY için 347 bp, TEV için 456 bp ve TVBMV için 547 bp uzunluğunda DNA parçası çoğaltan spesifik primerler kullanılmıştır. Çalışma sonucunda TMV ve CMV bir grup, TEV ve TVBMV ise farklı bir grup altında toplanmış sonuçlar DNA dizi analizi ile doğrulanmıştır

Çin de yapılan bir çalışmada Tobacco etch virüs (TEV), Patates Y virüsü (PVY) ve Tütün damar bantlaşma mozaik virüsü (TVBMV) 'nin eşzamanlı tespiti ve ölçümü için TaqMan problarını kullanılarak bir multipleks gerçek zamanlı PCR testi geliştirilmiştir. TEV ve TVBMV için spesifik primer ve prob kombinasyonları, viral genomun kaplama proteini bölgesinden geliştirilmiştir. PVY'yi saptamak için virüs genomunun kaplama protein bölgesini güçlendirmek için PVY, YanF, PVY, Yan R ve PVY, Yan P gibi bir primer ve prob kombinasyonu kullanılmıştır. Spesifik olmayan amplifikasyon ve çapraz reaksiyon olmadan, bu üç patojenin tespitinde multipleks

reaksiyonu başarılı sonuç vermiştir. Bu multipleks real-time PCR, enfekteli tütün bitkilerinde üç patojenin eşzamanlı tespiti ve ölçümü için hızlı, etkili, spesifik ve hassas bir yöntem olmuştur. multipleks RT-PCR, yalnızca tanısal, ekolojik, epidemiyolojik ve patojenez çalışmaları için değil, aynı zamanda özellikle karışım enfeksiyonu sırasında konukçu-virüs veya virüs-virüs etkileşimlerini araştırmak için de faydalı araç olduğu ortaya çıkarılmıştır (Dai ve ark., 2012).

1997'den 2000 yılına kadar Yunanistan'da yapılan bir çalışmada yoğun olarak tütün üretimi yapılan bölgelerde virüs benzeri belirtiler gösteren tütün fidelerinde Patates Y virüsü (PVY), Hıyar mozaik virüsü (CMV) ve Tütün mozaik virüsü (TMV)'nü araştırmak için, ELISA testi kullanılmıştır. Ayrıca indikatör bitkiler kullanılarak mekanik aşılama yapılmıştır. Yapılan bu test sonucunda Patates Y virüsü (PVY), Salatalık mozaik virüsü (CMV) ve Tütün mozaik virüsü (TMV) tüm örnekleme alanlarında tespit edilmiştir (Elisavet ve ark., 2004).

Sırbistan'ın Vojvodina Bölgesi ve Merkez Sırbistan'ın 17 bölgesinde tütün üretim alanlarında domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV), Patates Y virüsü (PVY), tütün mozaik virüsü (TMV), Hıyar mozaik virüsü (CMV) ve yonca mozaik virüsü (AMV)'nin varlığını ve dağılımını belirlemeye yönelik dört yıllık bir araştırmada 380 tane tütün örneği toplanmış ve DAS-ELISA ile test edilmiştir. Test edilen örneklerin % 37.9'unda TSWV, % 33.4'ünde PVY % 28.7'sinde TMV, % 23.9'unda PVY ve % 15.5'inde AMV virüsleri belirlenmiştir. Böylece TSWV Orta Sırbistan'da en çok PVY ve CMV ise Vojvodina eyaletinde en sık karşılaşılan virüsler olarak kayıtlara geçmiştir. ELISA yöntemi ile tespit edilen pozitif örnekler ayrıca RT-PCR ve sekanslama ile testlenerek bu oranlar doğrulanmıştır. Elde edilen virüs izolat dizilerinin NCBI'da kayıtlı olan virüslerle karşılaştırılması sonucunda Sırp, Bulgar ve Karadağ'ın TSWV izolatlarının ortak bir kümelenme gösterdiği, Avrupa ülkelerinin diğer alt popülasyonlarından farklı olduğu tespit edilmiştir. Sırbistan'da yapılan bu çalışma ile tütün ürünlerinde virüslerin yüksek oranda görülmesi, çiftçilerin ciddi kayıpları önlemek için kontrol stratejilerinin daha iyi uygulanmasına yönelik bilginin artırılmasının önemini vurgulamıştır (Stankoviç ve ark.,2011).

Çin'de domates üretim alanlarında toplanan örneklerde Domates mozaik virüsü ToMV, Tütün mozaik virüsü (TMV) ve Hıyar mozaik virüsü (CMV) alt gruplarının aynı anda saptanması ve ayırt edilmesi için bir multipleks ters transkripsiyon polimeraz

zincir reaksiyonu (RT-PCR) testi geliştirilmiştir. CMV alt gruplarını I ve II, ToMV ve TMV'yi birbirinden ayırt etmek için tasarlanan türlere ve alt gruplara özgü primerler kullanılarak domates (*Solanum lycopersicum L.*) ve tütün (*Nicotiana tabacum L.*)'nün 18SrRNA geni, virüslerin cDNA klonları, CMV'nin uydu RNA ve 18SrRNA geni kullanılmıştır. Bu yöntemle CMV alt grubu II, CMV alt grubu I, ToMV, TMV, CMV'nin RNA ve 18S rRNA'ya özgü altı adet 704, 593, 512, 421, 385, 255 bp fragment aynı anda çoğaltılmıştır. Bu çalışma kapsamında multipleks RT-PCR yönteminin CMV'yi saptama duyarlılığı, çift antikorlu enzim bağlanmış immünosorbent yöntemi (DAS-ELISA)'den 100 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu yöntem virüslerin alandaki tespitini belirlemek amacıyla başarıyla kullanılmıştır. Doğu Çin'den domates büyüme dönemi boyunca toplanan ve test edilen 141 örnek arasından 106 tane örnekte enfeksiyon tespit edilmiş ve 13 karışık enfeksiyon saptanmıştır. Bu sonuç bu metodun, domatesi infekteleyen birden fazla viral hastalıkların epidemiyolojisinin araştırılmasında başarılı bir şekilde kullanıldığını göstermiştir (Chen ve ark.,2011).

Başka bir çalışmada Biber ve domateste Tütün mozaik virüsü (TMV) ve Domates mozaik virüsünün (ToMV) eşzamanlı tespiti ve ayrımı için oldukça hassas ve hızlı bir yöntem geliştirilmiştir. Bu çalışmada, bu iki virüsün çift enfeksiyonunu eş zamanlı tespit etmek için replikaz genlerini hedef alan iki primer çifti ile tek tüplü reaksiyondan oluşan multipleks RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Spesifik primerleri, virüs genlerinin her birinin korunan bölgelerinden dizayn edilmiştir. Multiplex RT-PCR sonucuna göre 18 tane tohumluk domates numunesinin üçünde ve 18 tane tohumluk biber numunesinden birinde TMV ve ToMV'nin varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan multipleks RT-PCR testi bitki patolojisi ve temel araştırma çalışmaları için değerli bir araçtır(Kumar ve ark., 2011).

Sing ve ark.(2000), tarafından çoklu virüslerin eş zamanlı tespiti için yeni bir multipleks ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonunun kullanıldığı rapor edilmiştir. Bir oligo (dT) kullanılarak, ortak bir primer olarak, neredeyse tam uzunlukta cDNA'lar sentezlenmiştir. Ayrıca, bir oligo (dT) primer spesifik bir antisens primer ile aynı tüpe konularak, RNA'ların ters transkripsiyonu aynı anda sağlanmış ve gerçekleştirilen Multipleks RT-PCR yöntemi ile bu beş farklı virüs ve virod (carlavirüs (PVS), polerovirüs (PLRV), poteks virüs (PVX), potyvirus (PVA ve PVY) ve bir viroid genomu (pospiviroid (PSTVd) aynı anda başarılı bir şekilde tespit edilmiştir. Doğal

olarak enfekte olmuş yumrularda Multipleks RT-PCR yöntemi ile bir yumruda iki ile üç virüsün karışık enfeksiyon gösterdiği tespit edilmiştir.

Zhang ve ark.,(2012) tarafından yapılan çalışmada tütünde sıkça görülen Salatalık mozaik virüsü (CMV), Tütün mozaik virüsü (TMV), Tütün etch virüsü (TEV) ve Patates Y virüsü (PVY) eşzamanlı olarak tespiti için tek aşamalı bir multipleks RT-PCR yöntemi geliştirilmiştir. Dört farklı spesifik primer seti kullanılarak aynı reaksiyon reaktifleri ve döngü koşulları ile birlikte çalışacak şekilde tasarlanmıştır. Kullanılan bu multipleks PCR yöntemi ile RT-PCR karşılaştırıldığında daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu tespit edilmiştir.

Beibei ve ark., (2013) tarafından Çin'de yürütülen bir çalışmada pepino meyvesinde ciddi ürün kaybına neden olan Patates virüsü M (PVM), pepino mozaik virüsü (PepMV), domates mozaik virüsü (ToMV) ve patates virüsü S (PVS)'nün eş zamanlı belirlenmesi için multipleks RT-PCR yöntemi geliştirilmiştir. Çalışmada PVM, TOMV ve PVS enfeksiyonları sırasıyla % 37.0, % 31.0 ve% 5.5 oranında tespit edilmiş ve bu yöntemin virüs araştırmaları için rutin potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Temmuz ayında önemli ölçüde tütün üretimi yapılan Adıyaman ilinde 2018 yılında yürütülen survey çalışmada, toplanan yaprak örnekleri çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Tütün'ün yoğun olarak yetiştiriciliğın yapıldığı ilçelerden (Şekil 3.1.) toplam 450 taze tütün yaprak örneğı toplanmıştır.



Şekil 3.1. Tütün surveyi yapılan adıyaman il haritası.

3.2. Yöntem

3.2.1. Survey çalışmaları

Survey çalışmalarında, 2018 yılında Adıyaman ili ve ilçelerinden tütün arazilerini temsil edecek şekilde taze yaprak örnekleri toplanmıştır. Kademeli örnekleme yönteminden yararlanarak incelenen alan oranı, survey yapılan ilin ilçelerindeki toplam üretim alanının en az %3'nü kapsayacak şekilde hesaplanmıştır. Toplam incelenen alan içerisinde toplanan örnek sayısı en az % 5-10'nu oluşturacak şekilde hesaplanmıştır (Bora ve Karaca, 1970). Örnekleme her tarladan ve tarlayı olabildiğince temsil edebilecek farklı bölgelerden simptom gösteren ve göstermeyen bitkilerden rastgele en az 5-10 yaprak örneği seçilerek yapılmıştır (Çizelge 3.1).

Toplanan tütün yaprak örnekleri polietilen torbalara konularak soğuk zincirde laboratuvara getirilmiştir. Toplanan tütün yaprakları, total RNA ekstraksiyonu yapıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.1. Survey yapılan ilçelerdeki tütün ekim alanları, toplanan yaprak sayıları

İlçeler	Ekilen alan (dekar)	Üretim (ton)	İncelenen tarla sayısı	Toplanan yaprak sayısı
Kahta	11.497	635	12	65
Besni	8.455	467	10	55
Merkez	51.083	4.702	20	165
Samsat	14.021	1.162	10	30
Sincik	37	2	3	15
Tut	280	18	8	40
Çelikhan	14.956	2.753	15	80
Toplam	100.329	9.739	78	450

3.2.2. Viral enfeksiyonların araştırılması

3.2.2.1. Bitki total nükleik asit (TNA) ekstraksiyonu

Adıyaman ilinde tütün üretimi yapılan alanlardaki araştırılan tütün virüslerinin genetik materyali RNA yapılı genoma sahip oldukları için, toplanan tütün yaprak örneklerine total RNA ekstraksiyonu (Foissac ve ark., 2001)'in bildirdiği silika temelli

yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre 100 mg tütün yaprak örneği, 1 ml ekstraksiyon tamponu (grinding buffer) ile steril plastik torba içerisinde bilyeli el homojenizatör ile ezilerek özsu haline getirilmiştir. Homojenize edilen ekstraktan 500 µl hacimde steril ependorf tüplerine alınarak üzerine 100 µl 10 % Sodium lauryl sarcosyl solüsyonu eklenerek tüpler ters düz edilerek karışımın homojen bir şekilde karıştırılması sağlanmış ve 10 dakika süreyle 70°C’de kuru blok ısıtıcıda inkübe edildikten sonra 5 dakika süreyle buz dolu kaptaki bekletilmiştir. Daha sonra ependorf tüpleri 10 dakika 14.000 rpm’de santrifüj edildikten sonra tüplerin üstünde biriken sıvının 500 µl’si yeni boş steril ependorf tüplerine mikropipet yardımıyla aktarılmış ve üzerine 150 µl ethanol, 25 µl resuspansiyon silika ve 300µl 6M sodium iodide eklenmiştir. Karışım, daha sonra oda sıcaklığında sallayıcı (shaker) üzerinde 10 dakika inkübe edilmiştir.

Daha sonra ependorf tüpler 6000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilip üstte biriken sıvı (supernatant) atılarak dipte pellet şeklinde biriken silika üzerine 500µl yıkama tamponu (washing buffer) ilave edilerek vorteks yardımıyla yıkanmıştır. Bu yıkama, daha saf RNA elde edebilmek amacı ile iki defa daha tekrarlanmıştır. Elde edilen pelletler üzerine 100 µl nükleaz free su ilave edilmiş sonra vortekslenip iyice çözdürüldükten sonra 4 dakika 70°C’ de thermo blok ısıtıcıda inkübe edilmiştir. Sonra, tüpler 3 dakika 14.000 rpm’de santrifüj edildikten sonra, üst sıvı yeni ependorf tüplerine alınarak geriye kalan pelletler atılmıştır. Böylece elde edilen 100 µl total RNA’ lar, tamamlayıcı DNA (cDNA) elde edilinceye kadar -20 °C de saklanmıştır.

3.2.2.2. Komplemanter DNA (cDNA)’nın sentezi

Tütün virüsleri (TMV, TEV, TVBMV, PVY ve CMV) multipleks RT-PCR yöntemi ile eş zamanlı olarak araştırılmıştır. Jin Dia ve ark (2012) ’nin kullandığı yönteme göre tütün virüslerinin RNA’larını tanıyan random hexamer primeri kullanarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem sayesinde her bir tütün virüsü için ayrı ayrı cDNA yapılmasına gerek kalmamıştır. Hem iş yükü hemde daha fazla gerekli malzeme kullanımının önüne geçilmiştir.

Bu yöntem için PCR tüpü içerisine her bir örnek için 1µl 50 pmol/µl random primer, 2µl total RNA, 1µl 10mM dNTP karışımı eklenmiştir. Daha sonra Nuclease free

su ile 12 µl'ye tamamlanarak karışım köpürtülmeden tüpün kenarlarındaki karışım damlaları tüpün dibine indirmek için 4–5 bin rpm'de kısa bir spin yapılmıştır. Karışım 5 dakika 65 °C PCR cihazında inkübe edildikten sonra buza daldırılarak hızla soğutulmuştur. Daha sonra buz üzerinde bu tüplere her bir örnek için 4µl 5X RT Reaksiyon buffer, 2µl 0.1M DDT, 1µl RNAase inhibitör ve 1µl reverse transcriptase enzimi ilave edilerek reaksiyon karışımı 20 µl ye tamamlanmıştır. Tüpler kısa bir spin yaptıktan sonra PCR cihazında 42°C' de 50 dakika inkübe edilerek transkripsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra aynı PCR cihazında Reverse transkriptaz enzimini inaktive etmek için inkübasyon sonrası tüpler 70 °C sıcaklıkta 15 dakika süreyle bekletilerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Kullanıma hazır olan tamamlayıcı DNA (cDNA)' lar PCR işlemi yapılncaya kadar –80 °C'de tutulmuştur.

3.2.2.3. PCR reaksiyonu

Tütün virüslerinin (TMV, CMV, TEV, TVBMV ve PVY) multipleks RT-PCR ile teşhisleri Jin Dia ve ark. (2012)'ye göre yapılmıştır. Türe özgü primerler (Çizelge 3.3.) kullanılarak gerçekleştirilen multipleks RT-PCR yöntemi virüslerin daha spesifik teşhislerinin yapılmasına olanak sağlamıştır. Multipleks RT-PCR ile tütün virüslerinin eş zamanlı teşhisinin yapılması için bir PCR tüpüne her bir örnek için aşağıdaki bileşenler konulmuştur;

- 28.6 µl Nuclease free su
- 5 µl 10X PCR Taq polimeraz Tamponu
- 3µl 25mM MgCl₂
- 1µl 10mM dNTP karışımı
- 1µl 20µM TMV F
- 1µl 20µM TMV R
- 1µl 20µM TEV F
- 1µl 20µM TEV R
- 1µl 20µM PVY F
- 1µl 20µM PVY R
- 1µl 20µM TVBMV F
- 1µl 20µM TVBMV R

- 1µl 20µM CMV F
- 1µl 20µM CMV R
- 0.4 µl Taq DNA polimeraz enzimi (50/µl)

Karışım üzerine 2µl cDNA ilave edilmiş ve toplam miktar 50 µl'ye tamamlanmıştır. Daha sonra PCR tüpleri mikropipet yardımıyla karıştırıldıktan sonra kısa bir spin yapılarak tüplerin etrafındaki sıvının dibe inmesi sağlanmıştır. Daha sonra bu tüpler PCR cihazına yerleştirilerek cihaz çalıştırılmış ve böylece virüslerin istenilen bölgesinin çoğaltımı gerçekleştirilmiştir. Virüslerin tespit edilmesinde çizelge 3.2. ve Çizelge 3.3'de virüslere özgü primerler ve sıcaklık döngüleri kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Virüslerin teşhisinde kullanılan primerler, amplifikasyon ürünü, PCR türü, sıcaklık döngüleri ve kaynaklar

Virüsler	Primer Adı	Amplifikasyon ürünü (bp)	PCR Çeşidi	Sıcaklık döngüleri
TMV	TMVF TMVR	237	M-RT-PCR	94°C3dk 94°C.....30sn 50°C..... 30sn 72°C..... 1dk 72°C.....5dk (Jin dia ve ark, 2012)
CMV	CMVF CMVR	273		
TEV	TEVF TEVR	347		
PVY	PVYF PVYR	456		
TVBMV	TVBMVF TVBMVR	547		

Çizelge 3.3. Bazı Tütün virüslerinin RT-PCR ve multipleks RT-PCR testi ile tespit etmede kullanılan primerler

Virüsler	Primer Adı	Dizi (5'-3')	Giriş Numarası
TMV	TMVF TMVR	TAGACCCGCTAGTCACAG CAGAGGTCCAAACCAAAC	JN711115
CMV	CMVF CMVR	GTGGGTGACAGTTCGTAAA GTGGGAATGCGTTGGT	JN711116
PVY	PVYF PVYR	CCGAGAATCAAGGCTATC CGCTAAACCTACATCCC	JN711117
TEV	TEVF TEVR	TGATGGATGGTGAGGAG GTGCCGTTTCAGTGTCTT	JN111118
TVBMV	TVBMVF	GAGGTCGTGAACTTACAGC	JN111119

TVBMVR

TTTCCTCCTTCGTGCT

3.2.2.4. PCR ürünlerinin agaroz jel'de elektroforezi, DNA'yı boyama ve görüntüleme

Multipleks RT-PCR sonrası çoğaltılan DNA ürünleri % 1'lik agaroz jel'de elektroforez yapılarak analiz edilmiştir. Buna göre 1 gram agaroz 100 ml 1X TAE (Tris-Asetikasit- EDTA) tamponu içerisinde mikro dalga fırında 500 Voltta çözdürülerek soğumaya bırakılmıştır. Daha sonra jel tepsisine dökülerek üzerine 2 µl EtBr (0.5 µg/ml) çözeltisi eklenerek mikropipet ucu ile jelde iyice karışması sağlanmıştır. Jelin katılaşması için 30-40 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir. 1X TAE tamponu jeli kapatacak şekilde tankın üzerine eklenmiş ve jeldeki tarak çıkarılarak jelde yükleme çukurları oluşturulmuştur. Oluşan bu jel çukurlarına 2 µl DNA Ladder, 5 µl 5X yükleme tamponu karıştırıldıktan sonra ilk çukura yüklenmiştir. Toplamda 25 µl olarak hazırlanan PCR ürünlerinin, 15 µl' si 5µl yükleme tamponu ile parafilm üzerinde mikropipet yardımı ile homojen bir şekilde karıştırılarak sırasıyla jelin diğer çukurlarına yüklenmiştir. Yükleme yapıldıktan sonra, büyük elektroforez tankına 110 V' luk elektrik akımı 45 dk süreyle koşturulmuştur. Yüklenen örnekler % 1'lik agaroz jel içerisinde elektroforez yöntemiyle koşturulduktan sonra jel görüntüleme ve analiz sisteminde görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.3. Virüs izolatlarının moleküler karakterizasyonlarının yapılması

Adıyaman ilinde survey gerçekleştirilen ilçelerden toplanan tütün örneklerine yapılan multipleks RT-PCR sonucu tespit edilen iki farklı virüs türü olan Tütün Mozaik Virüsü (TMV) ve Hıyar Mozaik Virüs (CMV)'lerinden rastgele ikişer izolat seçilerek kılıf protein genlerinin tamamı pGEM-T easy vektörde klonlanarak karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. Teşhis edilen virüslerin kılıf protein genleri için primer dizaynı

Multipleks RT-PCR sonucu pozitif bant veren TMV ve CMV virüs izolatlarından iki izolat seçilerek karakterizasyonları yapılmıştır. Karakterizasyonun

yapılabilmesi için tütün virüslerinin genomunda bulunan kılıf protein geninin tamamını çoğaltacak şekilde primer dizaynı Vector NTI 10 programı ile gerçekleştirilmiştir. Primer dizaynı için daha önce gen bankasına girilmiş tüm genomu ortaya çıkarılmış DNA dizilerinden yararlanılmıştır. Tespit edilen TMV virüsünün kılıf protein geni için Gen Bankasında JN711115 (Accession number) ulaşım numaralı dizi, CMV virüsünün kılıf protein geni için JN711116 (Accession number) ulaşım numaralı diziler referans alınmıştır. TMV için 480 bp da CMV içinse 657 bp uzunluğunda kılıf proteini çoğaltan primerlerin doğruluğu BLAST programı ile kontrol edildikten sonra primer sentezi için ilgili firma Sentebiolab'a gönderilmiştir (Çizelge3.4.).

Çizelge 3.4. TMV ve CMV virüs izolatlarının kılıf protein genlerini çoğaltmak amacıyla Vector NTI 10 programı kullanılarak dizayn edilen primerler ile bu primerlerin çoğalttığı bölgelerin uzunluğu

Virüs	Primer dizisi	Çoğaltılan gen	Çoğaltılan alanın uzunluğu (bp)
TMV	5'-ATGTCTTACAGTATCACTACTCC-3' 5'-TCAAGTTGCAGGACCAGAGG-3'	Kılıf protein	480 bp
CMV	5'-ATGGACAAATCTGAATCAAC-3' 5'-TCAGACTGGGAGCACTCCAG-3'	Kılıf protein	657 bp

3.2.3.2. Tespit edilen virüslerin kılıf protein genin çoğaltılması

Dizayn edilen primerler kullanılarak TMV ve CMV'nin kılıf protein genleri RT-PCR yöntemiyle çoğaltılmış ve sonrasında ticari kitlerle saflaştırılarak T-A klonlama yöntemi ile pGEM-T Easy plazmid vektörüne klonlanmıştır. Kılıf protein genlerinin çoğaltılmasında Taq DNA polimeraz enziminin yararlanılmış ve sıcaklık döngüleri Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Virüslerin kılıf protein genlerini çoğaltmak için gerekli olan sıcaklık döngüleri ve primerlerin bağlanma sıcaklığı

Virüs	Sıcaklık Döngüsü	Kullanılan Polimeraz Enzimi	Bağlanma Sıcaklığı	Kaynak
TMV	94°C 5 dk 94°C 1 dk 42°C 1 dk 72°C 1 dk 72°C 5 dk	Taq polimeraz Enzimi	50 °C	Bu tez çalışması
CMV	94°C 5 dk 94°C 1 dk 53°C 1 dk 72°C 1 dk 72°C 5 dk	Taq polimeraz Enzimi	53 °C	Bu tez çalışması

3.2.3.3. DNA fragmentlerinin agaroz jel'den saflaştırılması

DNA bantları UV üzerinde steril bisturi ile kesilerek UV altında kesilen DNA bantları steril eppendorf tüplerine konarak DNA saflaştırılması aşamasına geçilmiştir (Şekil 3.2). Klonlama çalışmasında agaroz jelden DNA'nın elde edilmesini kolaylaştırmak için agaroz jel konsantrasyonunun düşük olmasına (% 0.8) dikkat edilmiştir. Agaroz jelden DNA'nın saflaştırma işlemi Thermo Marka Jel Saflaştırma kiti ile yapılmıştır. Bu işlem kitin önerdiği prosedüre uygun yapılmıştır. Bu işleme göre;

- UV uygulaması altında DNA bantları bisturi ile kesilerek steril 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine konulmuştur.
- Tüplere 750 µl Jel çözücü tamponu (Gel Solubilizer) eklenmiş ve jel çözünene kadar thermo kuru blok ısıtıcıda 70 °C'de 10 dakika kadar inkübe edilmiştir. Jelin tamamen eritilmesi sağlanmıştır.
- Jel eridikten sonra tüplerin üzerine 50 µl bağlanma tamponu (binding optimizer) ilave edilmiştir.
- 2 ml'lik koleksiyon tüpü içersine yerleştirilen spin kolona 750 µl' si aktarılıp 1 dakika 14.000 rpm de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüpte biriken sıvı atılmıştır. Spin kolona çözünmüş jelden kalan miktar eklenmiş ve santrifüj işlemi tekrarlanmıştır.

- Kolona 500 µl yıkama tamponu (wash buffer) ilave edilerek ve 14.000 rpm de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası biriktirme tüpüne geçen sıvı atılmış spin kolon tekrar biriktirme tüpüne yerleştirilerek ikinci kez yıkama yapılmıştır.
- Son olarak Spin kolon 1.5 ml'lik eppendorf tüpü içerisine yerleştirilmiş ve 50 µl elusyon tamponu doğrudan spin kolonun tam orta noktasına eklenmiş ve 2-3 dakika kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- DNA'yı kolondan almak için 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası elde edilen DNA ürünleri daha sonra kullanılmak üzere -20 °C' de saklanmıştır.

3.2.3.4. Kalıp DNA'nın plazmide yerleştirilmesi (Ligasyon)

RT-PCR yöntemi çoğaltılan kılıf protein genlerinin pGEM-T Easy plazmit vektörü ile birleştirilmesi T4 ligaz enzimi ile gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde, Promega firmasının pGEM-T Easy vector sistemi kullanılmıştır. Bunun için steril bir PCR tüpü içerisine;

Kullanılan miktar

- | | |
|--------------------------------|------|
| • 2x Rapid ligation tamponu | 5 µl |
| • pGEM-T Easy vektör | 1 µl |
| • 3'ucunda Adenin eklenmiş DNA | 5 µl |
| • T4 DNA ligaz enzimi | 1 µl |

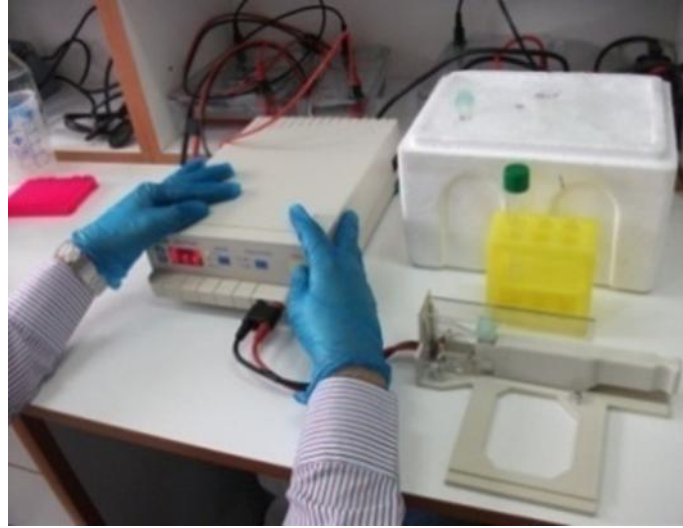
Hazırlanan bu tampon, plazmit, kalıp DNA ve ligaz enzimi bir eppendorf tüpüne aktarılmış ve karışım 12 µl olacak şekilde tamamlanmış ve tüpler kısa bir dönü yapılmıştır. Sonrasında 1 gece 4 °C' de inkübasyona bırakılarak rekombinant plazmitlerin oluşması sağlanmıştır. Rekombinant plazmitler, kullanılıncaya kadar -20 °C' de saklanmıştır.

3.2.3.5. Plazmidin bakteriye aktarılması (Transformasyon)

DNA fragmentinin plazmidle birleştirilmesi ile elde edilen rekombinant plazmidler, *Escherichia coli* bakterisinin JM109 suşuna elektroşok uygulaması ile rekombinant DNA transfer edilmiştir. Bu amaçla 6 µl rekombinant plazmit ile 100 µl

kompetan bakteri süspansiyonu karıştırıldıktan sonra 5 dakika süre ile buzda inkübe edilmiştir. Elektrik akımı uygulaması için Micropulser cihazı (BioRad) kullanılmıştır (Şekil 3.3).

Transformasyonda kullanılacak spesifik küvetler kullanılmadan önce içlerindeki etanolü tamamen uzaklaştırmak için steril saf su ile temizlenmiştir. Daha sonra bu küvetlere rekombinant plazmit ve bakteri karışımı eklendikten sonra cihazın EC2 programı seçilerek elektrik akımı uygulanmıştır. Bu aşamadan sonra küvetteki bakteri süspansiyonunun canlılığını koruması için hızla 900 µl SOC solüsyonu eklenerek ve karışım 37 °C de 2 saat 150 rpm de inkübatörlü sallayıcı platformda gelişmesi sağlanmıştır. Bu arada daha önceden hazırlanmış ampisilin, IPTG ve X-GAL içeren katı LB petrilere buzdolabından alınıp inkubatörde 1 saat 37 °C’de ekim yapmak için uygun hale getirilmiştir. Hazırlanan bu petrilere 2 saat süren inkübasyon sonrası elde edilen bakteri süspansiyonundan 200 µl alınarak her bir petrinin yüzeylerine ekim yapılmış ve drigaski çubuğu ile petri yüzeyine dağıtılmıştır. Daha sonra petrilere ters çevrilip bir gece 37°C’ye ayarlanan etüvde 1 gece inkübasyona bırakılarak mavi beyaz kolonilerin gelişmesi sağlanmıştır.



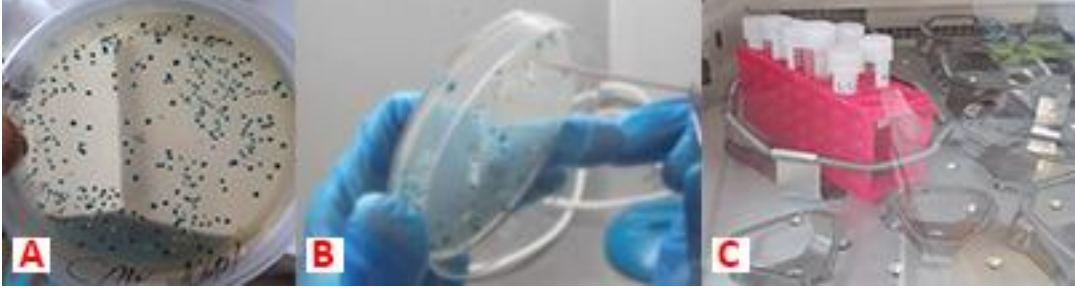
Şekil 3.2. Transformasyon işleminin mikropulser cihazı ile gerçekleştirilmesi.

3.2.3.6. Transforme olmuş (plazmit aktarılmış) bakterilerden tek kolonilerin oluşturulması

Transforme edilen bakterinin bünyesinde ampisiline dayanıklılık geni bulunmamaktadır. Bu nedenle, transformasyon sonrasında, ampisilin içeren besi ortamına ekilen bakterilerden yalnızca bünyesine plazmit alanlar canlılığını koruyacaklardır. Çünkü ampisiline dayanıklılık geni sadece pGEM-T Easy vektör plazmiti üzerinde bulunmaktadır. Bu durumda ampisilin içeren katı besi ortamında plazmit+PCR ürünü DNA içeren bakteriler ya da sadece plazmit alan transforme olmuş iki tür bakteri kolonileri gelişecektir. Bunlardan ilki beyaz diğer grup ise mavi koloni oluşturmaktadır. Eğer PCR ürünü DNA plazmite aktarılmış ise bu insert DNA plazmitin Lac Z bölgesine yerleşerek bakterinin X-Gal ve IPTG kimyasalını kullanamamasına sebep olarak beyaz renkli proteinlerin oluşmasına neden olmaktadır. Oysa, sadece plazmidi bünyesine alan bakteriler ise içerdikleri plazmit üzerindeki Lac Z bölgesi zarar görmediğinden X-Gal ve IPTG kimyasallarını kullanabilmekte ve mavi renkli proteinler oluşmaktadır. Dolayısıyla da kolonilerin rengi de mavi olmaktadır. Bu nedenle, gelişen kolonilerden beyaz olanlar seçilerek kültür oluşturulmaktadır.

3.2.3.7. Mavi-beyaz seleksiyon ve transforme olmuş kolonilerin çoğaltımı

Transforme olmuş bakterilerden geliştirilen kolonilerden beyaz olanlar yani klonlanacak DNA'yı taşıdıkları varsayılan her bir koloni steril mikropipet ucuyla seçim gerçekleştirilmiştir. Daha sonra beyaz koloni içeren kürdanlar 100 µl/ml ampisilin ile % 0.8 glycerol içeren 4 ml sıvı LB bulunan 15 ml'lik kapaklı steril tüplerin içine atılmıştır. Bu çalışmalardaki tüm aşamalar da kontaminasyonu engellemek amacı ile steril kabinde gerçekleştirilmiştir. Beyaz kolonilerin gelişmesi için 37°C'de 200 rpm hızda bir gece inkübe edilmiştir. Bu ortama konulan ampisilin bünyesinde plazmit içermeyen bakterilerin gelişmemesi için kullanılmıştır (Şekil 3.4.).



Şekil 3.3. Transformasyon sonrası gelişen mavi ve beyaz koloniler (A) Katı LB’de gelişen mavive beyaz kolonilerden beyaz kolonilerin seçimi (B) 15 ml’lik steril tüplerde bulunan sıvı LB’ ye daldırma yöntemi ile inokulasyonu ve inkubatörde 2 saat gelişimi (C).

3.2.3.8. Plasmid saflaştırılması

Bu amaçla Thermo Jene JET Plasmid MiniPrep Kiti ve protokolü uygulanmıştır (Şekil 3.5). Buna göre: 2 ml lik tüplerde bakteri süspansiyonları biriktirilerek 14.000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Dibe çöken bakterileri pelletlerinin üzerine 250 µl resuspension tamponu eklenerek vorteks edilip ve üzerine 250 µl lysis tamponu ilave edilip tüpler ters düz edilmiştir. Daha sonra üzerine 350 µl nötralizasyon tamponu ilave edilerek 4-6 kes ters düz edilmiştir. Tüpler 14.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Parçalanmış hücreler kitle verilen kolona yerleştirilerek 1 dk 14.000 rpm de santrifüj edilip sonra 500 µl yıkama tamponu ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi aynı şekilde 2 kez tekrarlanmıştır. Kolonlar steril yeni eppendorf tüplerine yerleştirilerek üzerlerine 50 µl elution tamponu ilave edilmiş ile 2 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 2 dk 14.000 rpm de santrifuj edilmiştir. Kolonda bulunan plazmitler elüsyon tamponuna geçmiştir. Saflaştırılan plazmidler daha sonra kullanılmak üzere -20 °C ‘de saklanmıştır.



Şekil 3.4. Rekombinant plazmid saflaştırma aşaması.

3.2.3.9. Plazmidin DNA fragmenti taşıyıp taşımadığını PCR ile kontrol edilmesi

Plazmitte klonlanan DNA olup olmadığı virüse ait spesifik primer kullanarak PCR ile gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonucu, istenen büyüklükte amplifikasyon ürünü oluşmuşsa klonlama işlemi gerçekleşmiş demektir. Yani PCR sonucunda çoğalmanın gerçekleştiği plazmitler seçilmiştir. Bu plazmit örneklerinin (50 μ l) bir kısmı (25 μ l) DNA dizileme için gönderilmiştir.

3.2.3.10. Plazmitlerin DNA dizi analizi

Moleküler klonlama sonrası rekombinant plazmitler çift yönlü DNA dizilemesi yapılması için İontek (Merter-İstanbul) ve Sentebiolab (Bilkent-Ankara)'ya gönderilmiştir. Gönderilen her izolat promotör bölgelerine spesifik T7 ve SP6 universal primeriyle çift yönlü dizileme yaptırılmıştır.

Dizi analizi sonrası elde edilen genom bilgileri farklı biyoinformatik programlar ile CLC Main Workbench 6.7.1, Snap Gene, Mega 7 ve Vector NTI 10 programları ile analiz edilmiştir. Belirtilen programların farklı özelliklerinden çalışmanın gerekli yerlerinde yararlanılmıştır. Farklı virüs izolatlarının kılıf protein genlerine ait nükleotid dizilerinin yüzde benzerlik oranları ve filogenetik ağaç CLC Main Workbench 6.7.1 ve Mega 7 programlarından yararlanılarak yapılmıştır. CLC Main Workbench 6 programı ile çoklu dizi karşılaştırma yapılarak dünyadaki diğer virüs izolatlarıyla benzerlikler ve farklılıklar belirlenmiştir. NCBI gen bankasında girilmiş olan tüm DNA tabanlarında araştırma yapılarak dünyanın farklı yerlerinde tespit edilmiş virüs izolatlarının tam kılıf

protein genlerinin nükleotid dizilimleri elde edilmiştir. CLC Main Workbench programı kullanılarak bu diziler ile dünyadaki diğer diziler arasında bir karşılaştırma yapılmıştır. Bu sayede, kılıf protein geni çoğaltılan virüs izolatlarının diğer dünya izolatlarıyla benzerlik gösterip göstermediği ve benzerlik oranları yüzde olarak belirlenmiştir. Son olarak filogenetik ağaç oluşturularak çalışmada tespit edilen Adıyaman izolatlarının dünyada tespit edilen diğer izolatlar ile genetik benzerlikleri ve farklılıkları ortaya konmuştur.

3.2.3.11. DNA dizilerinin gen bankasına girilmesi

TMV ve CMV virüslerinin çoğaltılan kılıf protein genlerinin sekans analizi sonrası elde edilen dizileri, National Center for Biotechnology Information (NCBI) gen bankasına girilmiştir. Dünyanın farklı bölgelerindeki izolatlarla filogenetik olarak karşılaştırılması yapılmıştır.

3.2.3.12. Klonlanmış kılıf protein genlerinin filogenetik analizi

Adıyaman ilin’de tespit edilen TMV ve CMV virüs izolatlarından rastgele ikişer izolat seçilerek kılıf protein genleri, CLC Main Workbench 6.7.1 programında çoklu karşılaştırma (Multiple Aligment) yapılmıştır. Gen bankasından farklı ülkelerde tespit edilen virüs izolatları seçilerek bu programla çoklu nükleotid dizi karşılaştırmaları yapılmıştır. Neighbor Joining Yöntemini ile filogenetik ağaç oluştururken ağacın daha iyi dallanması sağlamak amacıyla *Barley yellow dwarf virus-PAV* (KC900900) virüs izolatı dış grup olarak seçilmiştir. Oluşturulan soy ağaçları ile TMV ve CMV virüs izolatlarının dünyadaki diğer izolatlar ile yakınlık dereceleri ve genetik ilişkileri ortaya konulmuştur.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Survey Çalışmaları

Adıyaman ili ve ilçelerinde tütün üretim alanlarında TMV, CMV, PVY, TEV ve TVBMV virüslerinin varlığı ve bulunma oranlarını belirlemek için 2017 yılında yapılan ön survey ve 2018 yılında yapılan gerçek survey çalışmalarında, tüm tarlayı temsil edecek şekilde simptom gösteren ve göstermeyen bitkilerden rastgele taze yaprak örnekleri toplanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Survey çalışmalarının yürütüldüğü tütün tarlalarının genel görünümü ve rastgele tütün yaprak örneklerin toplanması.

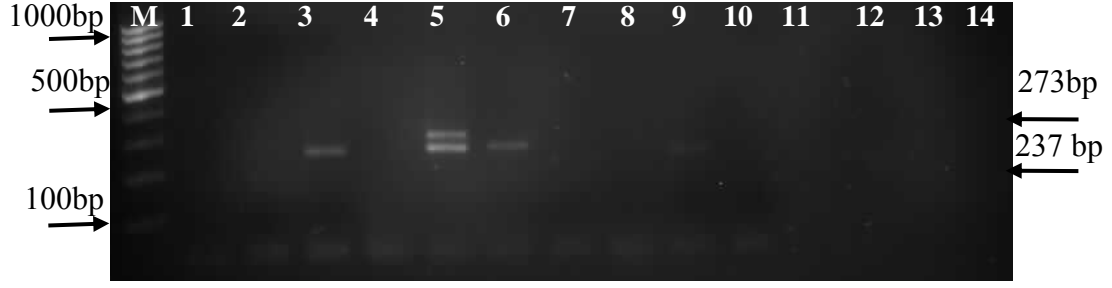
2017 ve 2018 yılında Temmuz ayında önemli ölçüde tütün üretimi yapılan Adıyaman ilinin tüm ilçelerinde örnekleme çalışmaları yapılmıştır. Survey yapılacak ilçelerden 450 yaprak örneği toplanmıştır. Survey çalışmaları esnasında tarlalarda görülen bitkilerde cüceleşme ve yapraklarda mozaik gibi viral infeksiyon belirtileri gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Survey sırasında görülen bazı virüs belirtileri A-B-C: CMV'nin belirtileri, D-E-F: TMV'nin belirtileri.

4.2. Pozitif Kontrol Olarak Kullanılacak İzolatların Ön Survey Çalışmaları ile Araştırılması

2017 yılında moleküler test çalışmalarında pozitif kontrol olarak kullanılacak izolatları belirlemek için Adıyaman ilinde 100 tütün örneği toplanmıştır. Bu örneklerle TMV, CMV, PVY, TVBMV ve TEV virüslerini araştırmak için Jin Dia ve ark. (2012)'nin primer setleri kullanılarak Multipleks RT-PCR testi uygulanmıştır. Multipleks RT-PCR testleri sonucunda TMV ve CMV virüslerine ait dört (20, 16, 23 ve 55) örnekte 237 bp ve 273 bp uzunluğunda pozitif reaksiyonlar tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Tespit edilen virüslere ait DNA bantları jelden saflaştırılarak ve DNA dizilemeleri gerçekleştirilmiştir. Tespit edilen virüsler daha sonraki moleküler test çalışmalarda pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.3. Adıyaman ilinden toplanan tütün örneklerinin pozitif kontrol olarak kullanmak amacıyla tütün virüslerine karşı multipleks RT-PCR ile araştırılması M:100 1000 bp, 1:32:5, 3:20:, 4:18:, 5:16, 6:23, 7:14, 8:35, 9:55 10:17,11:2, 12:8, 13:42,14:29.

4.3. Moleküler Testlere Ait Bulgular

Pozitif örneklerin bulunmasının ardından 2018 yılında Adıyaman ilinden toplam 450 tütün yaprak örneği toplanmıştır (Çizelge 4.1). 450 örneğe uygulanan test sonucunda 25 örnekte TMV (% 5.5), 40 örnekte CMV (% 8.8) virüsleri tespit edilmiştir. Testlenen 450 örneğin 1 tanesinde TMV+CMV (% 0.2) virüsleriyle karışık enfeksiyon halinde olduğu belirlenirken TEV, TVBMV ve PVY virüsleri ise tespit edilmemiştir.

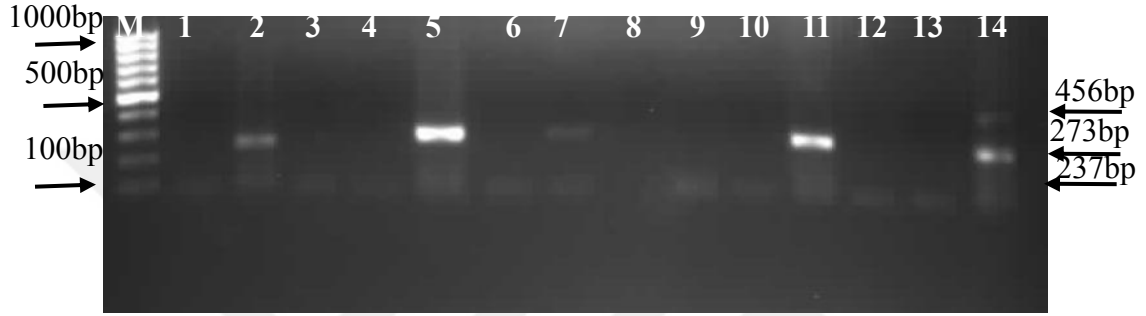
Çizelge 4.1. Adıyaman ilinde tütün virüslerini araştırmak amacı ile survey çalışmalarının yürütüldüğü ilçeler, testlenen örnek sayıları, araştırılan virüsler ve tespit edilen virüslerin bulunma oranları

Survey yapılan ilçeler	Testlenen örnek sayısı	CMV		TMV		TEV		PYV		TVBMV		TMV+CMV		Genel infeksiyon oranı	
		İB	BO (%)	İB	BO (%)	İB	BO (%)	İB	BO (%)	İB	BO (%)	İB	BO (%)	İB	BO (%)
Kahta	65	5	7.6	5	7.6	-	-	-	-	-	-	-	-	10	15.3
Besni	55	2	3.6	3	5.4	-	-	-	-	-	-	-	-	5	9.09
Merkez	165	16	9.6	5	4.8	-	-	-	-	-	-	1	0.6	24	14.5
Samsat	30	3	10	3	10	-	-	-	-	-	-	-	-	6	20
Sincik	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tut	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Çelikhan	80	14	17.5	6	7.5	-	-	-	-	-	-	-	-	20	25
Toplam	450	40	8.8	25	5.5	-	-	-	-	-	-	1	0.2	65	14.4

İB:İnfekteli bitki sayısı, BO:Yüzde olarak bulunma oranı,

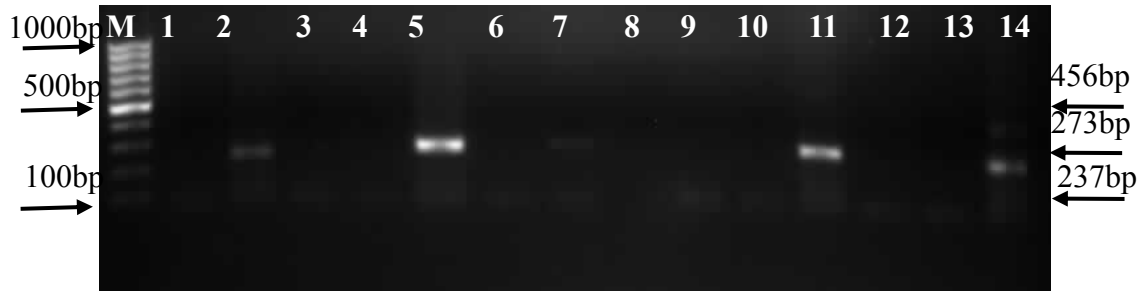
4.3.1. mRT-PCR testi ile testlenen örneklerde TMV ve CMV tespit edilmesine dair bulgular

Adıyaman ili tütün üretimi yapılan alanlarda 2018 yılı Temmuz ayında survey çalışması yürütülmüştür. Toplanan taze tütün yaprak örneklerine virüsleri belirlemek için multipleks RT-PCR testi yapılmıştır. Pozitif reaksiyonların jel görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10).



Şekil 4.4. Adıyaman ili örneklerine uygulanan multipleks RT-PCR testinin agaroz jel görüntüsü M:100-1000bp 1:90, 2:66, 3:40, 4:5, 5:131, 6:24, 7:74, 8:50, 9:300, 10:280, 11:77, 12:30,13:Negatif kontrol,14:Pozitif kontrollere (PVY,CMV, TMV).

Şekil 4.4'te mRT-PCR sonucu agaroz jel görüntüsünde 2. ve 7.sırada bulunan 66 nolu ve 74 nolu örnekler 237 bp uzunluğunda bant vererek TMV virüsü ile enfekteli bulunmuş, 5.ve 11.sırada bulunan 131 nolu ve 77 nolu örneklerde 273 bp uzunluğunda bant vererek CMV virüsü enfekteli bulunmuştur.



Şekil 4.5. Adıyaman ili örneklerine uygulanan multipleks RT-PCR testinin agaroz jel görüntüsü M:100-1000bp 1:103, 2:136, 3:13, 4:400, 5:65, 6:332, 7:71, 8:91, 9:8, 10:241, 11:47,12:80,13:Negatif kontrol,14:Pozitif kontrol.

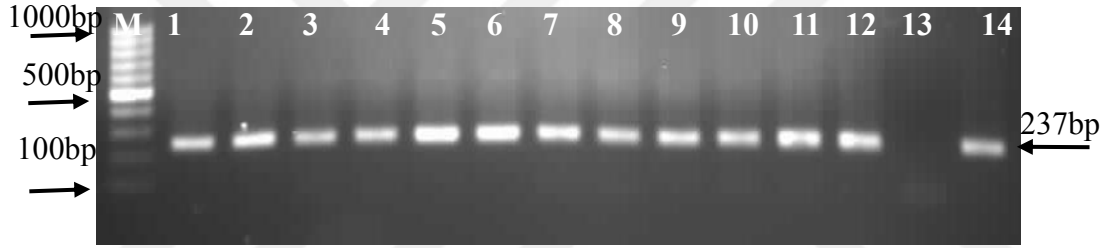
Şekil 4.5'te mRT-PCR sonucu agaroz jel görüntüsünde 2. ve 7.sırada bulunan 136 nolu ve 71 nolu örnekler 237 bp uzunluğunda bant vererek TMV virüsü ile, 5. ve

11.sırada bulunan 65 nolu ve 47 nolu örneklerde 273 bp uzunluğunda bant vererek CMV virüsü ile enfekteli bulunmuştur.

4.3.2. RT-PCR testi ile örneklerde TMV tespit edilmesine dair bulgular



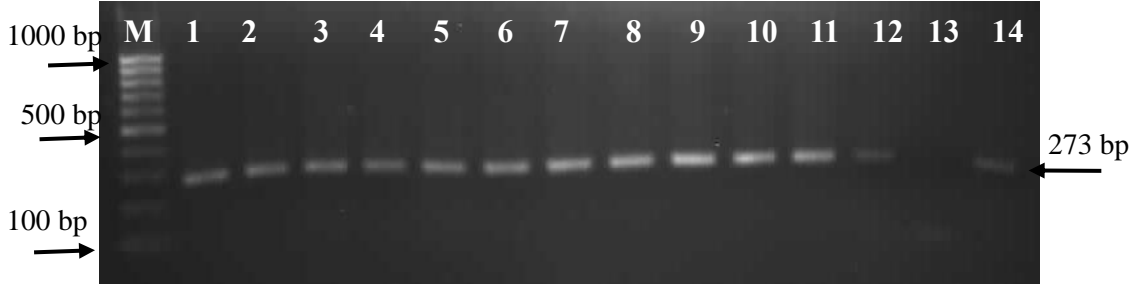
Şekil 4.6. Adıyaman ili RT-PCR ile TMV virüsünün pozitiflerinin agaroz jel görüntüsü
M:100-1000bp, 1:121, 2:138, 3:55, 4:105, 5:138, 6:136, 7: 101, 8:124, 9:42, 10:66, 11:307, 12:157, 13:Negatif kontrol, 14:Pozitif kontrol.



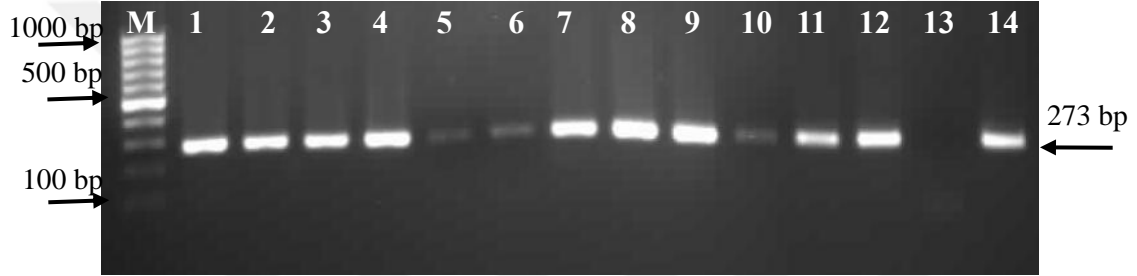
Şekil 4.7. Adıyaman ili RT-PCR ile TMV virüsünün pozitiflerinin agaroz jel görüntüsü
M:100-1000bp, 1:26, 2:20, 3:23, 4:312, 5:20, 6:307, 7:230, 8:59, 9:263, 10:303, 11:16, 12:66, 13: Negatif kontrol, 14: Pozitif kontrol.

Şekil 4.6' ve 4.7'de RT-PCR sonucu agaroz jel görüntüsünde toplam 25 örnekte tespit edilen 237 bp uzunluğunda DNA bantı vererek TMV virüsü ile enfekteli tüm pozitifler verilmiştir.

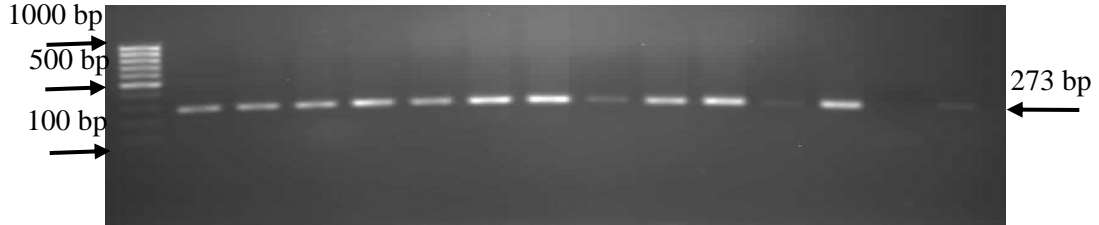
4.3.3. RT-PCR testi ile örneklerde CMV tespit edilmesine dair bulgular



Şekil 4.8. Adıyaman ili RT-PCR ile CMV virüsünün pozitiflerinin agaroz jel görüntüsü M: 100-1000bp, 1: 93, 2: 54, 3: 1, 4: 52, 5: 61, 6: 83, 7: 87, 8: 86, 9: 128, 10: 67, 11: 57, 12: 128, 13: Negatif kontrol, 14: Pozitif kontrol.



Şekil 4.9. Adıyaman ili RT-PCR ile CMV virüsünün pozitiflerinin agaroz jel görüntüsü M:100-1000bp, 1: 108, 2: 46, 3: 110, 4: 76, 5: 40, 6: 50, 7: 79, 8: 97, 9: 73, 10: 72, 11: 84, 12: 137, 13: Negatif kontrol, 14: Pozitif kontrol.



Şekil 4.10. Adıyaman ili RT-PCR ile CMV virüsünün pozitiflerinin agaroz jel görüntüsü M:100-1000bp, 1:139, 2:64, 3:41, 4:49, 5:178, 6:226, 7:235, 8:11, 9:4, 10:12, 11:212, 12:18, 13:Negatif kontrol, 14:Pozitif kontrol.

Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da RT-PCR sonucu agaroz jel görüntüsünde 40 örnekte tespit edilen örnekler 273 bp uzunluğunda bant veren CMV virüsü enfekteli tüm pozitifler verilmiştir.

Sırbistan'ın Vojvodina Bölgesi ve Merkez Sırbistan'ın 17 bölgesinde tütün üretim alanlarında 380 tane tütün örneği toplanmış ve DAS-ELISA testi ile araştırılmıştır. Toplanan tütünlerde, domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV), patates Y

virüsü (PVY), tütün mozaik virüsü (TMV), hıyar mozaik virüsü (CMV) ve yonca mozaik virüsü (AMV)'nün varlığı test edilmiştir. Test edilen örneklerin % 37.9'da TSWV, % 33.4'te PVY % 28.7'si TMV, % 23.9'u PVY ve % 15.5'i CMV olarak tespit edilmiştir (Stankoviç ve ark., 2011). Yapılan bu tez çalışmasında incelenen tütün örneklerinde TMV % 5.5 oranında CMV % 8.8 oranında belirlenmiştir.

Yunanistan'da yapılan çalışmada yoğun olarak tütün üretimi yapılan bölgeler, 1997'den 2000 yılına kadar virüs varlığı açısından araştırılmıştır. Virüs benzeri belirtiler gösteren tütün fideleri veya tütün yaprakları üretim yapılan alanlardan rastgele toplanmış ve ELISA ile test edilmiştir. Yapılan bu test sonucunda Patates virüsü Y (PVY), Hıyar mozaik virüsü (CMV) ve Tütün mozaik virüsü (TMV), tüm örnekleme alanlarında tespit edilmiştir. Bu virüslerden TMV, çoğunlukla oryantal çeşitlerde bulunmuştur (Elisavet ve ark.,2004). Yapılan bu tez çalışmasında tütün üretim alanlarında CMV ve TMV en yaygın virüsler olarak tespit edilmiştir. PVY virüsü testlenen örneklerin hiçbirinde tespit edilememiştir.

Çiçek ve Yorgancı (1991), tarafında yapılan çalışmada domates, biber ve patlıcan tohumlarında, tohum ile taşınan virüslerden biri olan TMV'nin bulaşma olasılığını saptamak için ELISA testi ile incelenen domates tohumlarında % 98.1, biber tohumlarında % 18.4 ve patlıcan tohumlarında % 7.4 oranında TMV ile infekteli olduğu tespit edilmiştir. Arlı-Sökmen ve ark., (2005) tarafından Samsun ili biber tarlalarından toplanan 313 örneğin % 15.4'ünde TMV+PVY karışık enfeksiyonunu saptanmıştır. Yapılan bu tez çalışmasında mRT-PCR ile testlenen 450 tütün örneğinden 25 tanesinde % 5.5 oranında TMV virüsü tespit edilmiş fakat PVY virüsüne rastlanmamıştır.

Çin de domates üretim alanlarında toplanan örneklerde Domates mozaik virüsü (ToMV), Tütün mozaik virüsü (TMV) ve Hıyar mozaik virüsü (CMV) alt gruplarının aynı anda saptanması ve ayırt edilmesi için bir multipleks ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) testi geliştirilmiştir. Doğu Çin'den domates tarlalarından toplanan ve test edilen 141 örnek arasından 106 tane örnekte enfeksiyon tespit edilmiş ve 13 karışık enfeksiyon saptanmıştır (Chen ve ark.,2011).

Bu tez çalışmasında tütün üretim alanlarından toplanan 450 örnek toplanmış ve multipleks RT-PCR ile 5 farklı virüs eş zamanlı olarak araştırılmıştır. Testlenen örneklerin % 8.8'inde CMV,% 5.5'inde TMV virüsü tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre bölgede virüslerin dünyaya oranla daha az yaygın olduğu görülmüştür. Bunun sebebi ise

örnek toplarken simptom gösteren ve göstermeyen bitkilerden alınması, bölgenin iklim koşulları, çevre şartları ve kullanılan tütün çeşitlerinin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. CMV Adıyaman ili tütün üretim alanlarında en yaygın virüs olarak tespit edilmiştir. Ülkemizde tütün virüslerinin yaygınlığını belirlemeye yönelik bir survey çalışması bulunmadığı için herhangi bir karşılaştırma yapılamamıştır.

İran'ın Guilan, Isfahan, Khorasan Razavi, Khuzestan ve Tahran illerindeki yapılan çalışmada, 2011-2012 döneminde CMV alt gruplarının varlığını belirlemek için domates alanları incelenmiştir. Çalışmada ELISA ile test edilen 305 domates yaprak örneğinden, Khorasan Razavi'de % 67.4 ile en yüksek oranda CMV bulunmuş ve bunu takiben Khuzestan % 50.6, Tahran % 48, İsfahan % 38 ve Guilan % 34.3 oranlarında CMV olduğu tespit edilmiştir (Lockhart ve ark. 2010).

Ülkemizde CMV ile yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Gümüş ve ark. 2004; Çuhal-Kılıç ve Yardımcı 2012; Çiftçi ve Ulubaş Serçe 2014). Beler ve Açıkgöz (2005)'ün yaptıkları bir çalışmada, Marmara ve Ege bölgesi zeytin alanlarında bazı virüs enfeksiyon oranları yayılım yoğunluğu araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda zeytin alanlarında CMV enfeksiyonunu % 36.36 olarak tespit edilmiştir. Değirmenci ve Uzunoğulları (2007), Marmara bölgesi domates üretimi yapılan alanlarda bazı virüs hastalıklarının enfeksiyonlarını araştırdıkları çalışmalarında, CMV enfeksiyon oranını % 68.7 olarak belirtmişlerdir. Erkan ve ark. (2013), İzmir ili ve çevresinde yetiştiriciliği yapılan bazı kışlık sebzelerdeki viral etmenlerin saptanması üzerine yürüttükleri çalışmalarında en yaygın olarak tespit edilen virüs hastalıklarından bir tanesinin CMV olduğunu belirtmişlerdir. Sertkaya (2015), Hatay ili marul ve ıspanak üretim alanlarında sorun oluşturan bazı virüs hastalıklarının tespiti amacı ile yapmış olduğu çalışmalarda marullarda % 3.7 ıspanaklarda ise % 16.6 oranında CMV enfeksiyonunu tespit etmiştir. Yapılan bu tez çalışmasında da tütün üretim alanlarında CMV % 8.8 oranında en yaygın virüs olarak belirlenmiştir. Yapılan tez çalışmasında testlenen örneklerin 40 tanesinde (% 8.8) CMV tespit edilmiş ve bu tez çalışması ülkemizde yapılan diğer çalışmalar ile paralellik göstererek CMV'nin oldukça yaygın bir şekilde görüldüğünü ispat etmektedir. Fakat farklı kültür bitkilerinde farklı enfeksiyon oranları bulunmuştur.

Çukurova bölgesinde 2004 yılında biber üretim alanlarında yaprak biti ile taşınan altı farklı virüsün tespiti için yapılan bir çalışmada biber tarlalarından 171 biber

örneği toplanmıştır. Toplanan örneklerle Hıyar mozaik virüsü (CMV), Yonca mozaik virüsü (AMV), patates X virüsü (PVX), patates Y virüsü (PVY), biber hafif benek virüsü (PMMV) ve tütün yanıklık virüsü (TEV)'leri DAS-ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. Test edilen örneklerin % 56'sının en az bir virüs ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir. Biberlerde virüs oranı en çok AMV % 35,7'de görülmüştür, bunu TEV % 21.6, PVY % 21.1, PVX % 17.5, PMMV % 8.2 ve CMV % 4.6 takip etmiştir (Özaydın, 2010).

Güneydoğu Amerika da yapılan çalışmalarda TEV'in dolmalık biberlerde önemli kayıplara neden olduğu rapor edilmiştir (Banner ve ark., 1985; Nutter ve ark., 1989; Patgett ve ark., 1990). Kaliforniya, Arizona, Teksas (ABD) ve Meksika da yapılan farklı çalışmalarda dolmalık biberlerde TEV'in çok büyük ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Laird ve ark., 1964; Villalon, 1985). Main ve Gurtz (1988), Kuzey Kaliforniya'da biber üretim alanlarında biberlerin TEV virüsü ile % 75 oranında bulaşık olduğunu ve her geçen yıl arttığını bildirilmiştir.

Bitkilerde önemli kayıplara neden olan virüslerden biri Tütün yanıklık virüsü. (TEV) Türkiye'de ilk olarak 1985 yılında Akdeniz bölgesinde biber alanlarında tespit edilmiştir (Yılmaz ve Davis, 1985). Yine 1994 yılında aynı bölgede saptanmıştır (Palloix ve ark., 1994). Virüsün Şanlıurfa'da ilk kez Güldür ve Ünlü (2004), tarafından varlığı rapor edilmiştir. Yapılan diğer çalışmada ise Şanlıurfa'nın Akçakale ilçesinde de virüsün yaygın olarak görülmeye başlandığı ortaya konmuştur (Güldür ve Ünlü, 2005). Ülkemizde tütün yanıklık virüsü biberde bulunmasına karşı tütünde bulunamamıştır. Tütünde yapılan bu survey çalışmasında da TEV virüsü tespit edilememiştir.

Bir çalışmada Adıyaman, Hatay, Kahramanmaraş, Kilis, Mersin ve Şanlıurfa illerinde biber üretim alanlarında TEV virüsünün yaygınlığının belirlenmesi için biber tarlalarından virüs-benzeri semptom taşıyan 561 biber bitkisinden yaprak ve meyve örneği toplanarak DAS-ELISA testi ile testlenmiştir. ELISA testi ile toplam örneklerin % 12.8'inde TEV enfeksiyonu belirlenmiştir. TEV'in en fazla yaygın olduğu il % 18. ile Hatay olurken, en az TEV enfeksiyonuna % 3.38 Şanlıurfa ilinde rastlanmıştır (Yıldız, 2016).

Yapılan bu tez çalışmasında tütünde araştırılan virüslerden biri olan TEV tespit edilememiştir. Ülkede daha önce yapılan çalışmalarda ise tütün ile aynı familyada olan

biber üretim alanlarında TEV tespit edilmesi o bölgelerde virüsün yoğun bir popülasyonu olduğu ve biber üretim alanlarında daha yaygın olduğu görülmüştür. Yapılan bu tez çalışmasında virüsün tespit edilememesi bölgedeki tütün üreticileri açısından önemli bir avantajdır.

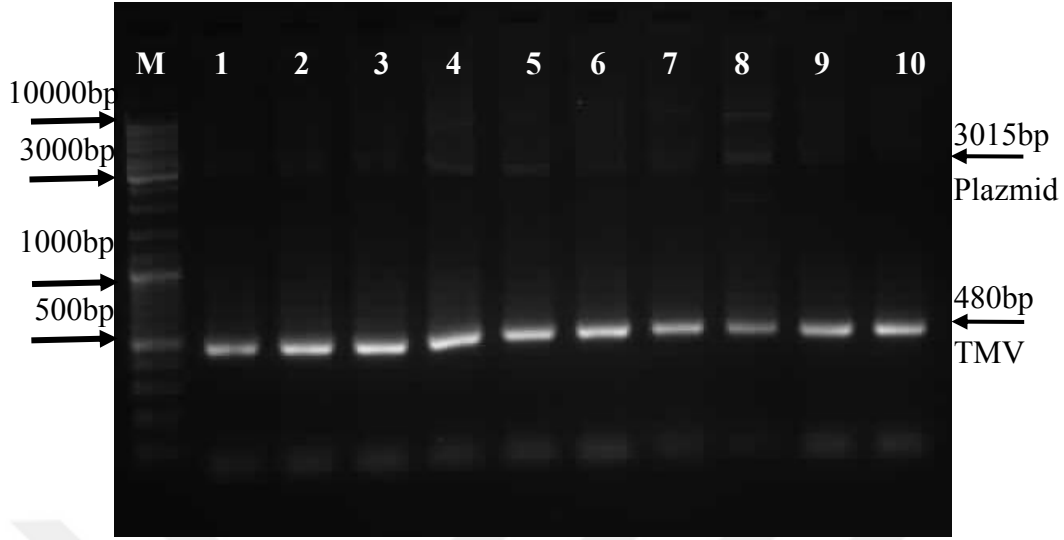
Kahramanmaraş ili biber tarlalarından 370 tane biber yaprak örneği toplanmıştır. Toplanan örneklerde Patates Y virüsü (PVY)'nin bulunma oranı DAS ELISA ile test edilmiş ve virüsün moleküller karakterizasyonu yapılmıştır. Yapılan test sonucunda 370 biberden 18 tanesinde (% 4.05) PVY ile infekteli olduğu saptanmıştır (Görsoy,2011). Arlı-Sökmen ve ark., (2005) Samsun ili biber üretim alanlarında biberlerde ve bu alanlarda bulunan yabancı otlarda altı farklı virüs (AMV, CMV, PVY, ToMV, TMV, TSWV) için çalışma yapmışlardır. Çalışmada toplanan örneklerle uygulanan serolojik testler sonucunda, bitkilerde bir veya iki virüs ile bulaşık olduğu saptanmıştır. Karışık infeksiyon gösteren bitkilerde PVY en çok tespit edilen virüsdür. Yaptığımız tez çalışmasında Adıyaman ili tütün üretim alanlarında testlenen örneklerde PVY virüsü tespit edilmemiştir. Bu da tütün üreticileri için büyük önem arz etmektedir.

4.4. Tespit Edilen İzolatlara Ait Kılıf Protein Genlerinin Karakterizasyonu

Adıyaman ilinde moleküler testler sonucunda tespit edilen 25 adet TMV ve 40 adet CMV izolatları arasından her bir virüs için rastgele iki izolat seçilmiş ve bu virüslerin kılıf protein geni karakterize edilmiştir.

4.4.1. TMV izolatlarının kılıf protein geninin karakterizasyonu

Kılıf protein geni karakterizasyonu için rastgele 20 ve 307 nolu TMV izolatları seçilmiştir. Kılıf protein geninin tamamı geni uçtan uca çoğaltan primerler sayesinde RT-PCR ile çoğaltılmış ve pGEM-T Easy vektör sisteminde klonlanmıştır. DNA dizisi elde edilen TMV Adıyaman 1 izolatı MK677444 ve TMV Adıyaman 2 izolatı MK689859 ulaşım numarası ile NCBI gen bankasına (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) kaydedilmiştir. 20 ve 307 numaralı TMV Adıyaman izolatlarına ait kılıf protein geninin uzunluğu 480 bp (Şekil 4.11) uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2; Çizelge 4.3).



Şekil 4.11. Saflaştırılmış plazmite uygulanan PCR'in jel görüntüsü, M:Marker (100 10000)bp, 1:20(1) nolu PCR yapılan rekombinant plazmit, 2:20(2) nolu PCR yapılan rekombinant plazmit, 3:20(3) nolu PCR yapılan rekombinant plazmit, 4:20(4)nolu PCR yapılan plazmit, 5:20(5) nolu PCR yapılan plazmit, 6:307(1), 7:307(2) nolu PCR yapılan rekombinant plazmit, 8:307(3) nolu PCR yapılan rekombinant plazmit, 9:307(4) nolu PCR yapılan rekombinant plazmit, 10:307(5) nolu PCR yapılan rekombinant plazmit.

Çizelge 4.2. 20 numaralı TMV izolatına ait kılıf protein geni dizisi

Baz sırası (bp)	Nükleik asit baz dizisi
1	atgtttacagtatcactactccatctcagttcgtgttcttgcatacagcgtggccgac
61	ccaatagagtaattaattatgtactaatgccttaggaaatcagttcaaacacaacaa
121	gctagaactgctgttcaaagacaattcagcaggtatggaaacctcgccacaagtaact
181	gtaggtccctgacagtgacttaaggtgtacaggtacaatgcggtgtagaccgcta
241	gtcacggcactgtaggtgctttgactagaaatagaataatagaagttgaaatcaa
301	gcgaacccacgactgccgaaacgttgatgctactcgtagagtagacgacgcaacggtg
361	gctataaggagcgcctataaataattaatagtagaattgatcagaggaaccggatcttat
421	aatcggagctcttcgagagctcttctggttggttgacctctggtcctgcaacttg
480	a

Çizelge 4.3. 307 numaralı TMV izolatına ait kılıf protein geni dizisi

Baz sırası (bp)	Nükleik asit baz dizisi
1	atgtttacagtatcactactccatctcagttcgtgttcttgcatacagcgtggccgac
61	ccaatagagtaattaattatgtactaatgccttaggaaatcagttcaaacacaacaa
121	gctagaactgctgttcaaagacaattcagcaggtatggaaacctcgccacaagtaact
181	gtaggtccctgacagtgacttaaggtgtacaggtacaatgcggtgtagaccgcta
241	gtcacggcactgtaggtgctttgactagaaatagaataatagaagttgaaatcaa
301	gcgaacccacgactgccgaaacgttgatgctactcgtagagtagacgacgcaacggtg
361	gctataaggagcgcctataaataattaatagtagaattgatcagaggaaccggatcttat

421 aatcggagctctttcgagagctcttctggttggttgacctctggtcctgcaacttg
480 a

TMV Adıyaman izolatlarının kılıf protein geninin dünyadaki diğer izolatların kılıf protein gen uzunlukları ile aynı uzunlukta olduğu görülmüştür. Elde edilen TMV gen dizileri, gen bankası veri tabanında bulunan ve dünyanın farklı bölgelerinde tespit edilen 19 farklı izolat dizisi ile olan akrabalık ilişkileri filogenetik analiz ile ortaya konulmuştur (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Gen bankasında bulunan TMV kılıf protein geninin ulaşım numarası, konukçu, ülke, gen ve uzunluğu konusundaki bilgiler

No	Ulaşım numarası	Konukçu	Ülke	Gen	Uzunluk
1	KC572633	<i>Nicotina tabacum</i>	Çin	Kılıf protein	480 bp
2	AF103780	<i>Nicotina tabacum</i>	Kuzey Kore	Kılıf protein	480 bp
3	LC390164	<i>Luffa acutangula</i>	Endonezya	Kılıf protein	480 bp
4	MF467220	<i>Lettuce sp</i>	Çin	Kılıf protein	480 bp
5	LN651241	<i>Nicotina tabacum</i>	Vietnam	Kılıf protein	480 bp
6	KM275231	<i>Petunia sp</i>	ABD	Kılıf protein	480 bp
7	AY629262	<i>Petunia sp</i>	Brezilya	Kılıf protein	480 bp
8	AF318218	<i>Solanum tuberosum</i>	G.Kore	Kılıf protein	480 bp
9	AF126505	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hindistan	Kılıf protein	480 bp
10	KT923126	<i>Nicotina tabacum</i>	Brezilya	Kılıf protein	480 bp
11	KF527471	<i>Solanum lycopersicum</i>	İran	Kılıf protein	480 bp
12	KM407602	<i>Nicotina glutinosa</i>	Türkiye	Kılıf protein	480 bp
13	KF184654	<i>Solanum lycopersicum</i>	Sırbistan	Kılıf protein	480 bp
14	KJ406323	<i>Solanum lycopersicum</i>	Rusya	Kılıf protein	480 bp
15	JN711115	<i>Nicotina tabacum</i>	Çin	Kılıf protein	480 bp
16	GQ340671	<i>Nicotina tabacum</i>	Sırbistan	Kılıf protein	480 bp
17	KY810785	<i>Nicotina sp.</i>	İngiltere	Kılıf protein	480 bp
18	MK087763	<i>Nicotina benthamiana</i>	İspanya	Kılıf protein	480 bp
19	DQ401152	<i>Leonotis nepetaefolia</i>	Meksika	Kılıf protein	480 bp
20	MK677444	<i>Nicotina tabacum</i>	Türkiye	Kılıf protein	480 bp
21	MK689859	<i>Nicotina tabacum</i>	Türkiye	Kılıf protein	480 bp
22	KC900900	<i>Triticum aestivum</i>	Türkiye	Kılıf protein	603 bp

Yapılan çoklu nükleik asit karşılaştırmaları sonucu TMV Adıyaman 1 (MK677444) izolatının dünyadaki tespit edilen diğer izolatlar ile %74.17-99.17 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdikleri ve TMV Adıyaman 2 (MK689859) izolatının dünyada tespit edilen diğer izolatlar ile % 74.79-99.38 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. TMV Adıyaman izolatı 1 (MK677444) % 99.17 oranı ile Sırbistan (GQ340671) izolatı ile en düşük ise % 74.17 oranda Brezilya izolatı (KT923126) ile benzerlik göstermektedir. TMV Adıyaman 2 izolatı (MK689859) %

99.38 oranı ile en çok Sırbistan (GQ340671) izolatu ile en düşük ise % 74.79 oranda Brezilya izolatu (KT923126) ile benzerlik göstermektedir (Şekil 4.12).



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
LN651241	1	99,17	98,75	98,96	98,54	98,54	98,12	98,75	97,29	97,08	97,08	96,88	97,29	96,25	96,67	95,83	93,12	92,29	88,33	74,79	73,96
KJ406323	2	99,17	99,17	98,96	98,54	98,54	98,12	98,33	98,12	97,08	97,08	96,88	97,29	96,67	96,67	95,83	93,12	92,29	88,33	74,58	73,75
JN711115	3	98,75	99,17	98,54	98,12	98,12	97,71	97,92	97,71	96,67	97,08	96,46	96,88	96,25	96,25	95,83	93,33	92,29	88,54	74,79	73,96
KF184654	4	98,96	98,96	98,54	98,75	98,75	98,33	98,12	97,08	97,71	97,29	97,50	97,08	96,04	96,46	95,62	92,50	91,67	88,54	75,62	74,79
KY810785	5	98,54	98,54	98,12	98,75	99,58	99,17	97,71	96,67	97,29	97,29	97,08	97,08	96,88	96,88	96,04	93,12	92,50	88,75	75,00	74,17
MK087763	6	98,54	98,54	98,12	98,75	99,58	99,17	97,71	96,67	97,29	97,29	97,08	97,08	96,88	96,88	96,04	93,12	92,50	88,75	74,79	73,96
AF318218	7	98,12	98,12	97,71	98,33	99,17	99,17	97,29	96,25	96,88	96,88	96,67	96,67	96,46	96,46	95,62	92,71	92,08	88,33	74,38	73,54
MF467220	8	98,75	98,33	97,92	98,12	97,71	97,71	97,29	96,46	96,25	96,25	96,04	96,46	95,42	95,83	95,00	92,29	91,67	87,50	74,17	73,33
KC572633	9	97,29	98,12	97,71	97,08	96,67	96,67	96,25	96,46	95,21	95,21	95,00	95,42	94,79	95,00	94,79	92,50	91,46	87,92	75,00	74,17
GQ340671	10	97,08	97,08	96,67	97,71	97,29	97,29	96,88	96,25	95,21	99,17	99,38	95,83	95,21	95,83	94,79	92,92	91,67	87,92	75,42	74,58
MK677444	11	97,08	97,08	97,08	97,29	97,29	97,29	96,88	96,25	95,21	99,17	98,96	95,83	95,21	95,83	94,79	92,50	92,08	87,50	75,00	74,17
MK689859	12	96,88	96,88	96,46	97,50	97,08	97,08	96,67	96,04	95,00	99,38	98,96	95,62	95,00	95,62	94,58	92,29	91,46	87,29	75,62	74,79
KM275231	13	97,29	97,29	96,88	97,08	97,08	97,08	96,67	96,46	95,42	95,83	95,83	95,62	96,46	95,62	95,21	92,08	92,29	88,12	74,79	74,17
KM407602	14	96,25	96,67	96,25	96,04	96,88	96,88	96,46	95,42	94,79	95,21	95,21	95,00	96,46	95,42	95,21	93,12	92,71	87,08	74,58	73,96
LC390164	15	96,67	96,67	96,25	96,46	96,88	96,88	96,46	95,83	95,00	95,83	95,83	95,62	95,62	95,42	94,79	91,88	90,83	87,92	74,38	73,54
AY029262	16	95,83	95,83	95,83	95,62	96,04	96,04	95,62	95,00	94,79	94,79	94,79	94,58	95,21	95,21	94,79	92,92	92,50	88,96	74,79	74,17
KF527471	17	93,12	93,12	93,33	92,50	93,12	93,12	92,71	92,29	92,50	92,92	92,50	92,29	92,08	93,12	91,88	92,92	92,29	89,79	75,62	75,00
AF126505	18	92,29	92,29	92,29	91,67	92,50	92,50	92,08	91,67	91,46	91,67	92,08	91,46	92,29	92,71	90,83	92,50	92,29	86,04	72,71	72,08
DQ401152	19	88,33	88,33	88,54	88,54	88,75	88,75	88,33	87,50	87,92	87,92	87,50	87,29	88,12	87,08	87,92	88,96	89,79	86,04	77,50	77,29
AF103780	20	74,79	74,58	74,79	75,62	75,00	74,79	74,38	74,17	75,00	75,42	75,00	75,62	74,79	74,58	74,38	74,79	75,62	72,71	77,50	98,54
KT923126	21	73,96	73,75	73,96	74,79	74,17	73,96	73,54	73,33	74,17	74,58	74,17	74,79	74,17	73,96	73,54	74,17	75,00	72,08	77,29	98,54

Şekil 4.12. CLC Main Workbench 6.7.1 programı ile TMV Adıyaman 1 ve Adıyaman 2 (MK677444 ve MK689859) izolatlarının dünyadaki TMV izolatlarının (Çizelge 4.3) kılıf protein genlerinin nükleik asit dizilerinin benzerlik oranları.

CLC Main Workbench 6.7.1 programı ile yapılan nükleik asit dizi karşılaştırmalarına göre MK67744 (20 nolu örnek) ulaşım numaralı örnekte kılıf protein geni üzerinde 480 nükleotit içerisinde 10 baz da (%2'lik) yer değiştirme (Çizelge 4.5) ve MK689859 (307 nolu örnek) ulaşım numaralı örnekte kılıf protein geninde 11 bazda (%2'lik) yer değiştirme (Çizelge 4.6) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5. TMV 20 nolu (MK677444) örneğin kılıf protein geninde meydana gelen yer değiştirme

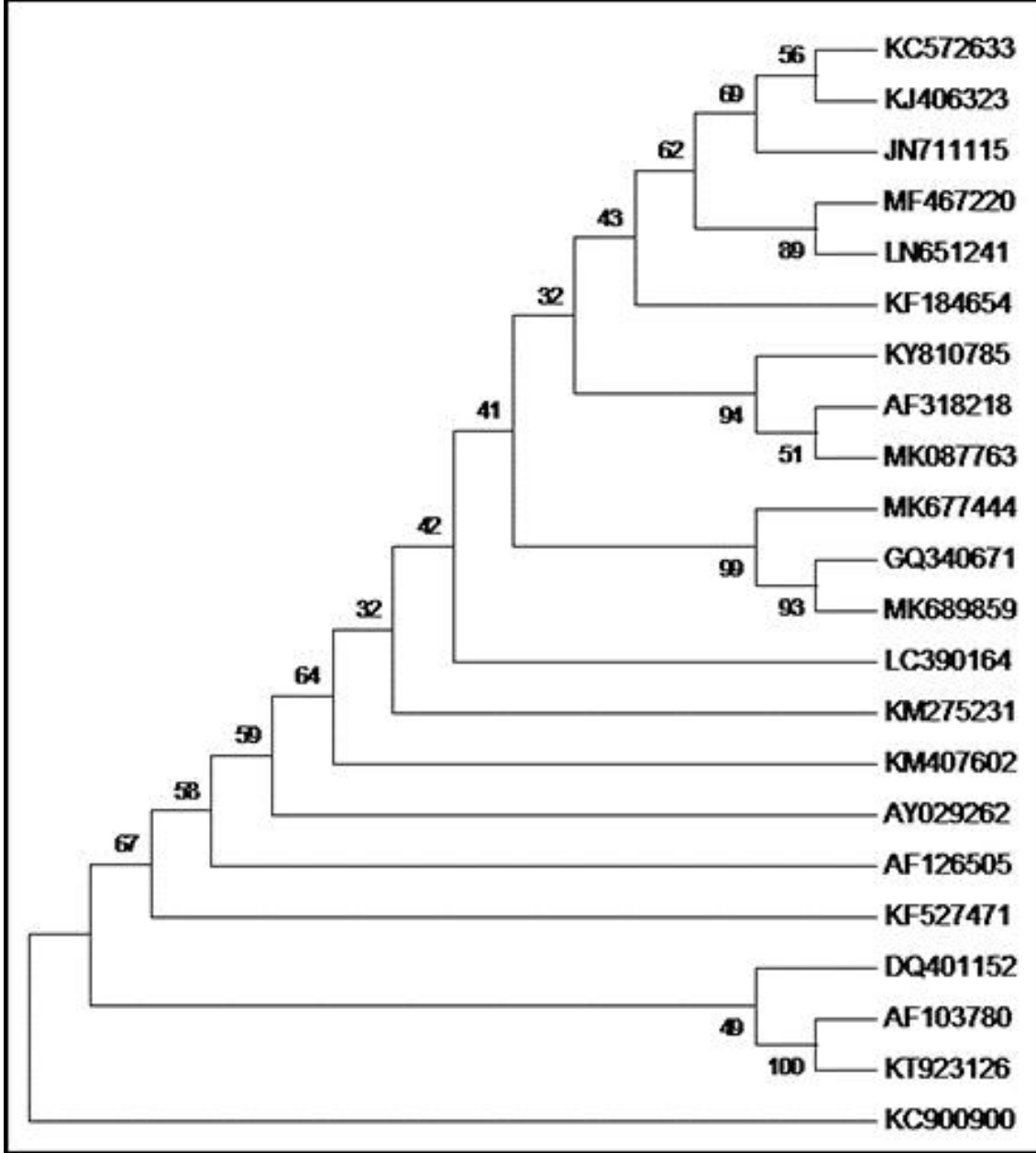
Baz sırası	Consensus	Substitution
124	C	A
150	T	C
156	G	A
168	A	G
221	A	G
246	A	G
261	A	T
300	G	A
326	A	G
363	C	T

Çizelge 4.6. TMV 307 nolu (MK689859) örneğin kılıf protein geninde meydana gelen yer değiştirme

Baz sırası	Consensus	Substitution
55	G	A
124	C	A
150	T	C
156	G	A
168	A	G
228	A	G
246	A	G
261	A	T
339	T	C
363	C	T

TMV Adıyaman izolatlarının Çizelge 4.3'te verilen dünya izolatları ile genetik ilişkisini ortaya koymak amacı ile 100 tekerrürlü olarak nükleik asit karşılaştırması sonucu elde edilen filogenetik ağaç Şekil 4.11'de verilmiştir. Filogenetik ağaç oluşturulurken *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) (KC900900) dış grup olarak kullanılmıştır. Oluşan bu grupta birbirine en çok benzeyen TMV Adıyaman 2

(MK689859) izolatu ile Sırbistan (GQ340671) ve Adıyaman 1 (MK67744) izolatu aynı grup içerisinde yer almıştır(Şekil 4.13).



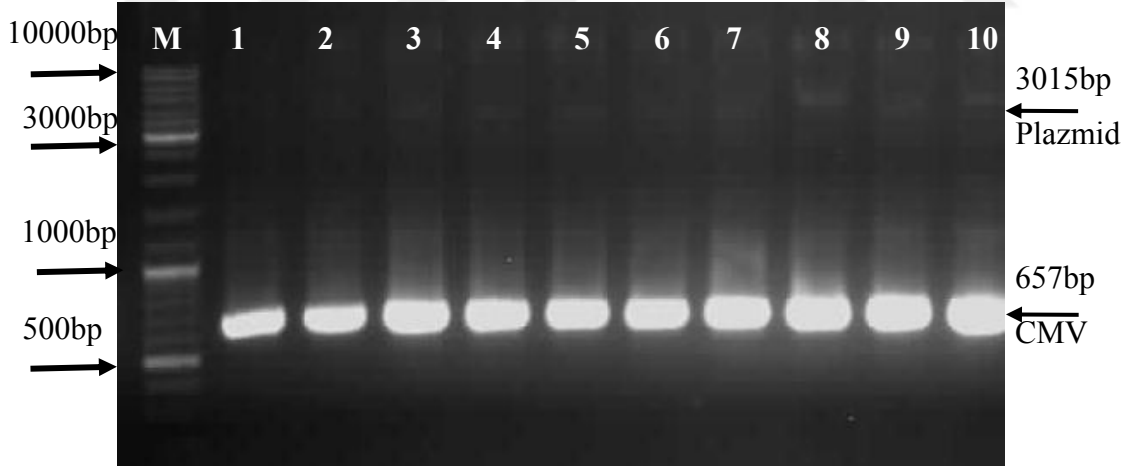
Şekil 4.13. TMV Adıyaman (MK677444 ve MK689859) izolatları ile dünyadaki TMV izolatlarının (Çizelge 4.3.) kılıf protein geninin nükleik ait dizisi 100 tekerrürlü olarak Neighbor joining yöntemiyle oluşturulan filogenetik ağacı.

Bu da soyağacında kullanılan izolatların birbirleri ile çok yakın benzerlik gösterdiği sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Oluşturulan soy ağacı dalları 32-100 arasında değişen bootstrap rakamlarıyla desteklenmiştir. Bu dallamanın tesadifü olmayıp istatistik açıdan

anlamli bulunmuştur. Elde edilen bu filogenik ağaç, TMV izolatlarının konukçuya bağı olup coğrafik orjinin temel alınmadığını göstermiştir. Oluşan bu farklılığın coğrafik dağılıştan olmayıp konukçu farklılığına bağı olduğu ortaya çıkmıştır.

4.4.2. CMV izolatlarının kılıf protein geninin karakterizasyonu

Kılıf protein geni karakterizasyonu için rastgele 61 ve 73 nolu CMV izolatları seçilmiştir. Kılıf protein geninin tamamı geni uçtan uca çoğaltacak şekilde dizayn edilen primerler kullanılarak RT-PCR ile çoğaltılmış ve pGEM-T Easy vektörüne klonlanmıştır. Klonlamanın başarılı olup olmadığı rekombinant plazmite yapılan PCR ile kontrol edilmiştir. Kılıf protein genini taşıyan plazmite çift yönlü DNA dizileme yapılmıştır. DNA dizisi elde edilen CMV Adıyaman1 izolatı MK704430 ve CMV Adıyaman 2 izolatı ise MK704430 ulaşım numarası ile NCBI gen bankasına (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) kaydedilmiştir. 61 ve 73 numaralı CMV Adıyaman izolatlarına ait kılıf protein geninin uzunluğu 657 bp (Şekil 4.14) uzunluğunda olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7).



Şekil 4.14. Saflaştırılmış plazmite uygulanan PCR'ın agaroz jel görüntüsü, M:Marker (100- 10000)bp, 1:61(1) nolu PCR yapılan rekombinant plazmit, 2:61(2) nolu PCR yapılan rekombinant plazmit, 3:31(3) nolu PCR yapılan rekombinant plazmit, 4:61(4)nolu PCR yapılan plazmit, 5:61(5) nolu PCR yapılan plazmit,6:73(1), 7:73(2) nolu PCR yapılan rekombinant plazmit, 8:73(3) nolu PCR yapılan rekombinant plazmit, 9:73(4) nolu PCR yapılan rekombinant plazmit, 10:73(5) nolu PCR yapılan rekombinant plazmit.

Çizelge 4.7. CMV 61 nolu izolatına ait kılıf protein geni dizisi

Baz sırası (bp)	Nükleik asit baz dizisi
1	atggacaaatctgaatcaaccagttctggtcgtaaccgtcgtcgtcgtccgcgtcgcggt
61	tcccgtccgcttctctctcctcctcggatgctacgtttagagtcttgtcgcaacagctttcg
121	cgacttaataagacgttagcagctggcgtcctactattaaccaccaacctttgtgggt
181	agtgagcgtgtaaactggatacacgttcacatctattaccctgaagccaccgaaaata
241	gaccgtgggtcttattatggtaaaagggtgctcctcctgattcagtcactgagttcgat
301	aagaagcttgtttcgcgcattcaaattcagttaatcctttgccgaaatttgattctacc
361	gtgtgggtgacggctcgtaaagttcctgcctcctcggacatgtccggtgcccatctct
421	gctatgttcgcggacggagcctcaccggactggttatcagtagccgcacccggagtt
481	caagctaacaacaaactggtgatgatctttcggcgtgagcgcgtgatattggcgacatg
541	agaaagtagccgtactcgtgtattcaaaagacgatgcactcgagacggatgaactagta
601	cttcagtcgacatcgagcaccacgtattcccacatctgggggtgctcccagctctga

Çizelge 4.8. CMV 73 nolu izolatına ait kılıf protein geni dizisi

Baz sırası (bp)	Nükleik asit baz dizisi
1	atggacaaatctgaatcaaccagttctggtcgtaaccgtcgtcgtcgtccgcgtcgcggt
61	tcccgtccgcttctctctcctcctcggatgctacgtttagagtcttgtcgcaacagctttcg
121	cgacttaataagacgttagcagctggcgtcctactattaaccaccaacctttgtgggt
181	agtgagcgtgtaaactggatacacgttcacatctattaccctgaagccaccgaaaata
241	gaccgtgggtcttattatggtaaaagggtgctcctcctgattcagtcactgagttcgat
301	aagaagcttgtttcgcgcattcaaattcagttaatcctttgccgaaatttgattctacc
361	gtgtgggtgacggctcgtaaagttcctgcctcctcggacatgtccggtgcccatctct
421	gctatgttcgcggacggagcctcaccggactggttatcagtagccgcacccggagtt
481	caagctaacaacaaactggtgatgatctttcggcgtgagcgcgtgatattggcgacatg
541	agaaagtagccgtactcgtgtattcaaaagacgatgcactcgagacggatgaactagta
601	cttcagtcgacatcgagcaccacgtattcccacatctgggggtgctcccagctctga

CMV Adıyaman izolatlarının kılıf protein geninin uzunluğu dünyada tespit edilen diğer izolatların kılıf protein gen uzunlukları ile aynı olduğu saptanmıştır. Gen bankası veri tabanına daha önce dünyanın farklı bölgelerinde tespit edilerek girilmiş 20 farklı izolat seçilmiştir (Çizelge 4.7.). CMV Adıyaman izolatları ile diğer 20 farklı izolat (Çizelge 4.5) arasındaki benzerlik oranları filogenetik analiz ile ortaya konulmuştur.

Çizelge 4.9. Gen bankasında bulunan CMV kılıf protein geninin ulaşım numarası, konukçu, ülke, gen ve uzunluğu konusundaki bilgiler

No	Ulaşım numarası	Konukçu	Ülke	Gen	Uzunluk
1	AJ242585	<i>Nicotina tabacum</i>	Çin	Kılıf protein	657 bp
2	MG251400		G.Kore	Kılıf protein	657 bp
3	AM396983		Hindistan	Kılıf protein	657 bp
4	AM048831	<i>Nicotina tabacum</i>	Vietnam	Kılıf protein	657 bp
5	AJ585086	<i>Lilium</i> sp	Hindistan	Kılıf protein	657 bp
6	AJ810258	<i>Cucurbita maxima</i>	Almanya	Kılıf protein	657 bp
7	AJ585522	<i>Capsicum</i> sp	Avustralya	Kılıf protein	657 bp
8	AJ304403	<i>Nicotina benthamiana</i>	Hollanda	Kılıf protein	657 bp
9	AB069971	<i>Musa sapientum</i>	Endonezya	Kılıf protein	657 bp
10	AB448696	<i>Solanum tuberosum</i>	Japonya	Kılıf protein	657 bp
11	AY450854	<i>Nicotina tabacum</i>	Yunanistan	Kılıf protein	657 bp
12	DQ0028851	<i>Cucumis sativus</i>	İran	Kılıf protein	657 bp
13	HQ829829	<i>Nicotina tabacum</i>	Çin	Kılıf protein	657 bp
14	MG021462	<i>Xanthosma</i> sp	Avustralya	Kılıf protein	657 bp
15	MF100856	<i>Pisum sativum</i>	Pakistan	Kılıf protein	657 bp
16	JF918966	<i>Nicotina tabacum</i>	ABD	Kılıf protein	657 bp
17	KM262647	<i>Nicotina tabacum</i>	İran	Kılıf protein	657 bp
18	KM207236	<i>Solanum lycopersicum</i>	Mısır	Kılıf protein	657 bp
19	KM516905	<i>Solanum melengona</i>	Bangladeş	Kılıf protein	657 bp
20	KX216873	<i>Musa</i> sp	D.Kongo	Kılıf protein	657 bp
21	MK704429	<i>Nicotina tabacum</i>	Türkiye	Kılıf protein	657 bp
22	MK704430	<i>Nicotina tabacum</i>	Türkiye	Kılıf protein	657 bp
23	KC900900	<i>Triticum aestivum</i>	Türkiye	Kılıf protein	603 bp

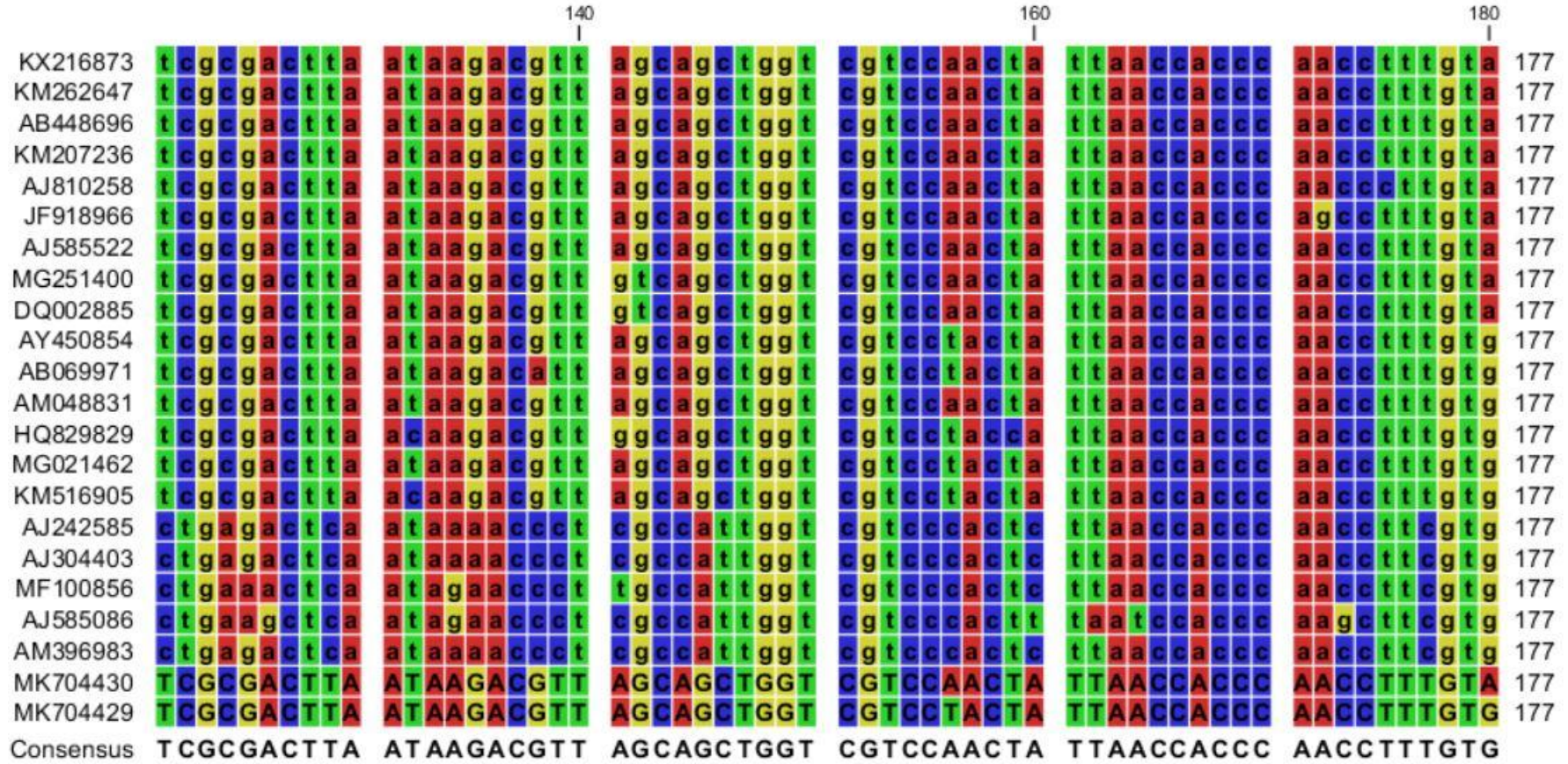
Yapılan çoklu nükleik asit karşılaştırmaları sonucu CMV Adıyaman (MK7444330) izolatının dünyada tespit edilen diğer izolatlar ile % 75-99.54 arasında, CMV Adıyaman (MK744429) izolatının dünyada tespit edilen diğer izolatlar ile %75.30-97.87 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. CMV Adıyaman izolatı (MK704429) % 97.87 oranı ile en çok Yunanistan (AY450854) izolatına en düşük ise % 74.17 oranda Hindistan izolatı (AM396893) ile benzerlik göstermektedir. Adıyaman izolatı (MK704430) % 99.54 oranı ile en çok Japonya (AB448696) izolatına en düşük ise % 75 oranda Hindistan izolatı (AJ585086) ile benzerlik göstermektedir (Şekil 4.15).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
AB448696	1	99,54	99,39	99,54	99,54	98,93	98,78	97,87	96,35	96,04	93,30	93,46	92,85	94,37	94,22	92,54	92,39	76,36	75,76	76,67	75,15	77,58
MK704430	2	99,54	99,24	99,39	99,39	98,78	98,63	97,72	96,19	96,19	93,46	93,30	92,69	94,22	94,06	92,09	92,24	76,21	75,61	76,52	75,00	77,42
KM207236	3	99,39	99,24	99,24	99,24	98,63	98,48	97,56	95,74	95,74	93,00	92,85	92,39	93,76	93,61	92,24	91,78	76,21	75,61	76,52	75,00	77,42
KM262647	4	99,54	99,39	99,24	100,00	99,39	99,24	98,02	96,19	96,19	93,76	93,61	93,00	94,22	94,37	92,39	92,24	76,21	75,61	76,52	75,00	77,42
KX216873	5	99,54	99,39	99,24	100,00	99,39	99,24	98,02	96,19	96,19	93,76	93,61	93,00	94,22	94,37	92,39	92,24	76,21	75,61	76,52	75,00	77,42
JF918966	6	98,93	98,78	98,63	99,39	99,39	98,63	97,41	95,89	95,89	93,76	93,61	93,00	93,61	94,06	91,78	91,63	76,06	75,45	76,36	74,85	77,27
AJ810258	7	98,78	98,63	98,48	99,24	99,24	98,63	97,26	95,43	95,43	93,00	92,85	92,24	93,46	93,61	91,63	91,48	76,36	75,76	76,67	75,15	76,97
AJ585522	8	97,87	97,72	97,56	98,02	98,02	97,41	97,26	96,35	96,04	93,91	93,76	92,39	94,37	94,22	92,54	92,24	76,82	76,21	77,12	75,61	78,03
DQ002885	9	96,35	96,19	95,74	96,19	96,19	95,89	95,43	96,35	98,78	92,54	92,54	91,63	93,91	93,76	91,63	91,32	77,27	76,36	77,27	76,06	78,03
MG251400	10	96,04	96,19	95,74	96,19	96,19	95,89	95,43	96,04	98,78	92,69	92,39	91,78	93,76	94,06	91,48	91,63	77,27	76,36	77,27	76,06	78,03
MK704429	11	93,30	93,46	93,00	93,76	93,76	93,76	93,00	93,91	92,54	92,69	97,87	96,35	94,82	93,61	94,22	93,61	76,52	75,91	76,67	75,30	77,73
AY450854	12	93,46	93,30	92,85	93,61	93,61	93,61	92,85	93,76	92,54	92,39	97,87	96,04	94,52	93,91	94,22	93,76	76,21	75,61	76,36	75,00	77,12
AB069971	13	92,85	92,69	92,39	93,00	93,00	93,00	92,24	92,39	91,63	91,78	96,35	96,04	94,06	93,30	93,61	93,30	77,42	76,52	77,27	76,21	78,33
AM048831	14	94,37	94,22	93,76	94,22	94,22	93,61	93,46	94,37	93,91	93,76	94,82	94,52	94,06	94,98	93,30	93,46	77,42	76,67	77,42	76,21	77,88
HQ829829	15	94,22	94,06	93,61	94,37	94,37	94,06	93,61	94,22	93,76	94,06	93,61	93,91	93,30	94,98	92,09	93,46	77,27	76,36	77,12	76,06	78,18
MG021462	16	92,54	92,09	92,24	92,39	92,39	91,78	91,63	92,54	91,63	91,48	94,22	94,22	93,61	93,30	92,09	96,04	75,30	74,39	75,15	74,09	76,21
KM516905	17	92,39	92,24	91,78	92,24	92,24	91,63	91,48	92,24	91,32	91,63	93,61	93,76	93,30	93,46	93,46	96,04	76,21	75,30	76,06	75,00	77,12
AJ242585	18	76,36	76,21	76,21	76,21	76,21	76,06	76,36	76,82	77,27	77,27	76,52	76,21	77,42	77,42	77,27	75,30	76,21	97,87	98,33	97,26	96,96
AJ304403	19	75,76	75,61	75,61	75,61	75,61	75,45	75,76	76,21	76,36	76,36	75,91	75,61	76,52	76,67	76,36	74,39	75,30	97,87	98,02	96,65	96,50
MF100856	20	76,67	76,52	76,52	76,52	76,52	76,36	76,67	77,12	77,27	77,27	76,67	76,36	77,27	77,42	77,12	75,15	76,06	98,33	98,02	97,72	96,65
AJ585086	21	75,15	75,00	75,00	75,00	75,00	74,85	75,15	75,61	76,06	76,06	75,30	75,00	76,21	76,21	76,06	74,09	75,00	97,26	96,65	97,72	95,59
AM396983	22	77,58	77,42	77,42	77,42	77,42	77,27	76,97	78,03	78,03	78,03	77,73	77,12	78,33	77,88	78,18	76,21	77,12	96,96	96,50	96,65	95,59

Şekil 4.15. CLC Workbench programı 6.7.1 ile CMV Adıyaman (MK704429 ve MK704430) izolatlarının dünyadaki CMV izolatlarının (Çizelge 4.4) kılıf protein genlerinin nükleik asit dizilerinin benzerlik oranları.

CLC Main Workbench 6.7.1 programı CMV Pairwise comparison modeli kullanılarak yapılan nükleik asit dizi karşılaştırmalarına (Şekil 4.15) göre MK704429 (73 nolu örnek) ulaşım numaralı örnekte kılıf protein geni üzerinde 657 nükleotit içerisinde 36 bazda (%7.5'lik) yer değiştirme (Çizelge 4.9) ve MK704430 (61 nolu örnek)) nolu ulaşım numaralı örnekte kılıf protein geninde 13 bazda (%2.7lik) yer değiştirme (Çizelge 4.10) tespit edilmiştir.





Şekil 4.16. CLC Workbench 6.7.1. programı ile CMV Adıyaman (MK704429 ve MK704430) izolatlarının dünyadaki diğer CMV izolatlarının (Çizelge 4.4) kılıf protein genlerinin nükleik asit dizilerinde meydana gelen yer değiştirmeler

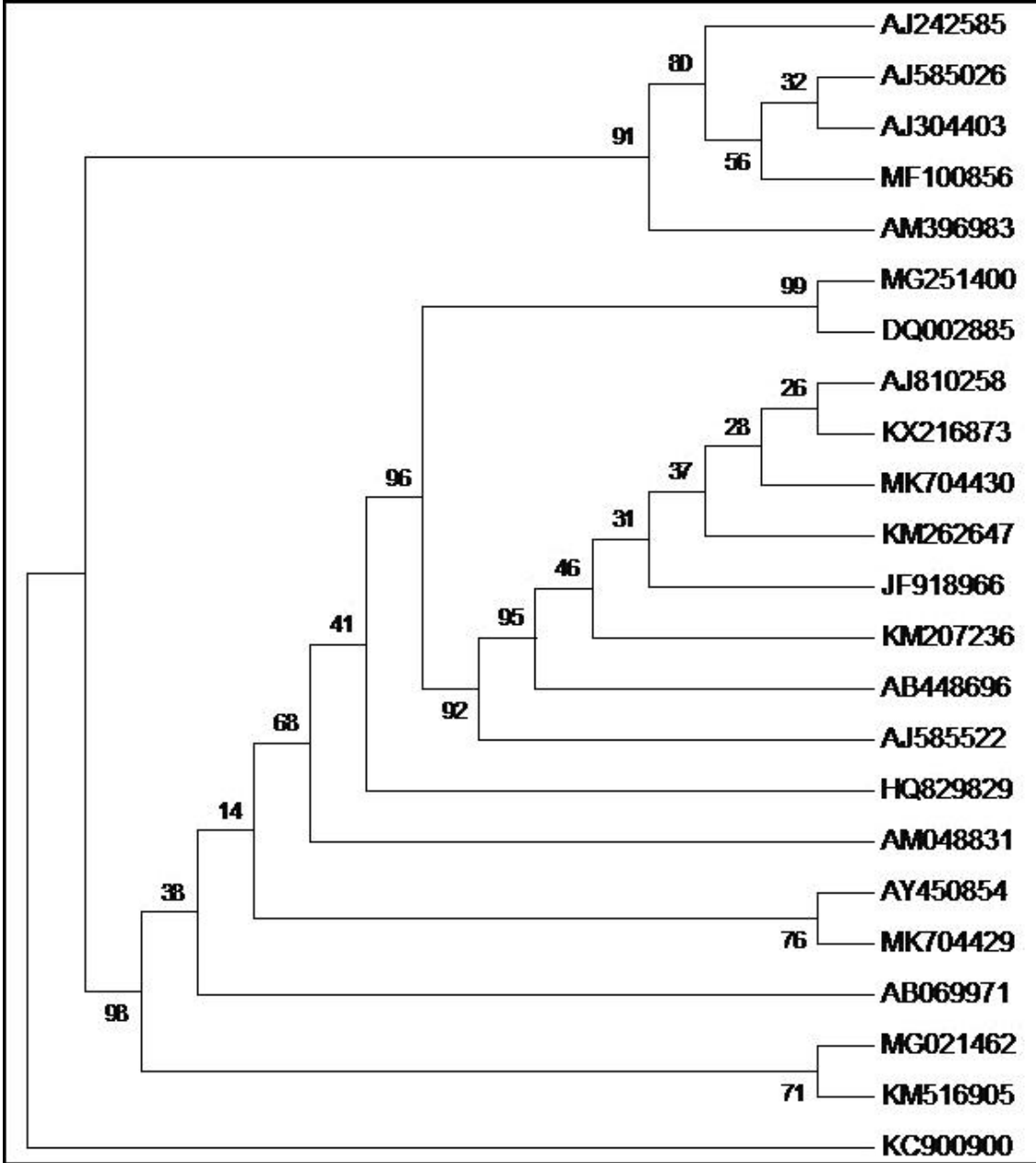
Çizelge 4.10. CMV 73 nolu (MK704429) örneğin kılıf protein geninde meydana gelen yer değiştirme.

Baz sırası	Consensus	Substitution
25	G	T
45	A	T
63	T	C
75	C	T
76	C	T
85	G	T
96	C	G
114	G	A
156	A	T
183	N	T
189	A	G
204	G	A
237	A	G
275	T	C
276	A	G
279	A	T
394	G	G
297	A	G
299	A	T
300	T	C
375	A	G
403	T	A
405	A	G
408	T	C
471	T	C
477	T	C
483	C	T
489	C	T
499	T	C
534	A	T
558	C	A
594	C	T
597	G	A
612	T	C
630	C	T
654	N	C

Çizelge 4.11. CMV 61 nolu (MK704430) örneğin kılıf protein geninde meydana gelen yer değiştirme.

Baz sırası	Consensus	Substitution
78	C	T
180	G	A
183	N	G
197	A	G
238	G	A
261	T	C
303	T	C
471	T	C
499	T	C
536	C	T
582	A	G
639	A	G
656	N	C

CMV Adıyaman izolatlarının Çizelge 4.4'te verilen dünya izolatları ile genetik ilişkisini ortaya koymak amacı ile 100 tekerrürlü olarak nükleik asit karşılaştırması sonucu elde edilen filogenetik ağaçlar Şekil 4.17'de verilmiştir. Filogenetik ağaç oluşturulurken *Barley yellow dwarf virus* (BYDV), (KC900900) dış grup olarak kullanılmıştır. Filogenetik analiz sonucunda iki farklı ana grup oluşmuştur. Birbirine en çok benzeyen CMV Adıyaman (MK704429) izolatı ile Yunanistan (AY450854) izolatı aynı grupta ve Adıyaman (MK704430) ile izolatı ise farklı grupta yer almıştır (Şekil 4.16.). Diğer izolatlar farklılık gösterdiği için farklı bir grup içerisine yerleşmiştir.



Şekil 4.17. CMV Adiyaman (MK704429 ve MK704430) izolatları ile dünyadaki CMV izolatlarının (Çizelge 4.4.) kılıf protein geninin nükleik ait dizisi 100 tekerrürlü olarak Neighbor joining yöntemiyle oluşturulan filogenetik ağacı

Bu da soyağacında kullanılan izolatların birbirleri ile fazla benzerlik göstermediği sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Oluşturulan soy ağacı dalları 14-99 arasında değişen bootstrap rakamlarıyla desteklenmiştir. Adiyaman izolatlarının iki farklı yerde dallanması bu izolatların CMV'nin farklı grupta yer almasından dolayı olduğu düşünülmektedir.

5. SONUÇ

Adıyaman ilinde tütünü infekteleyen virüsler ile ilgili bugüne kadar herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Adıyaman ili tütün üretim alanlarındaki tütün virüslerinin araştırılması için yapılan bu çalışma il kapsamında ve moleküler düzeyde yürütülen en kapsamlı survey çalışmasıdır. Ülkemizin tütün üretimi yapılan diğer illerinde böyle bir çalışmaya rastlanmamıştır. Adıyaman ilinde 2018 yılında tütün tarlalarından toplanan 450 tane taze tütün yaprak örneğindeki tütün virüsleri (TMV, CMV, TEV, TVBV, PVY)'nin varlığı multipleks RT-PCR yöntemleri ile araştırılmıştır. Test edilen 450 tütün yaprak örneklerinde TEV, TVBMV, PVY virüslerine rastlanmamıştır. Survey kapsamında toplanan 450 tane örneğin 40 tanesinde CMV (% 8.8), 25 tanesinde TMV (% 5.5), 1 tanesinde TMV + CMV(% 0.2) karışık infeksiyon tespit edilmiştir. Adıyaman ilinde tütün virüslerinin genel infeksiyon oranı %14.4 olarak tespit edilmiştir. Survey yapılan ilçelerden en çok Merkez ilçesi ve Çelikhan ilçesinde virüsler tespit edilmiştir. Merkez ilçesinde test edilen 165 örnekten 16 tanesinde CMV(% 9.6),8 tanesinde TMV(% 4.8) daha sonra Çelikhan ilçesinden toplanan 80 örnekten 14 tanesinde CMV(% 11.2) 6 tanesinde TMV(% 4.8), Kahta ilçesinden testlenen 65 örnekten 5 tanesinde CMV(% 7.6) 5 tanesinde TMV(% 7.6) Samsat ilçesinden toplanan örneklerden 3 tanesinde CMV(% 6.6) 3 tanesinde TMV(% 6.6) Besni ilçesinden toplanan örneklerden 2 tanesinde CMV(% 3.6) 2 tanesinde TMV(% 3.6) tespit edilmiştir. Tut ve Gerger ilçesinden toplanan örneklerden hiçbirinde virüs tespit edilememiştir. Yapılan bu çalışmada Adıyaman ili ve ilçelerinden test edilen örneklerde CMV virüsünün TMV virüsünden daha yaygın olduğu belirlenmiştir.

Adıyaman ilinde tespit edilen TMV ve CMV izolatları arasından rastgele seçilen iki izolat T-A klonlama yöntemi ile kılıf protein bölgelerinin tamamının karakterizasyonu yapılmıştır. Böylece çalışma sonucunda tespit edilen virüslerin kılıf protein genleri TMV Adıyaman 1 izolatı MK677444, TMV Adıyaman 2 izolatı MK689859, CMV Adıyaman 1 izolatı MK704429, CMV Adıyaman 2 izolatı MK704430 ulaşım numarası ile NCBI gen bankasına kaydedilmiştir. Adıyaman TMV izolatı kılıf protein geninin tamamının dünyada belirlenen diğer izolatlarda olduğu gibi 480 bp uzunluğunda olduğu DNA dizilemesi ile saptanmıştır. CLC Main Workbench 6.7.1 programı ile yapılan nükleotid dizi karşılaştırmaları sonucunda TMV Adıyaman 1

(MK67744) izolatu dünyadaki diğer izolatlar ile nükleotid düzeyinde % 74.58-99.17 arasında değişen, TMV Adıyaman 2 (MK689859) izolatu dünyadaki diğer izolatlar ile nükleotid düzeyinde %74.79-%99.38 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Adıyaman CMV izolatu kılıf protein geninin tamamının dünyadaki diğer izolatlarda olduğu gibi 657 bp uzunluğunda olduğu DNA dizilemesi ile ortaya konmuştur. CLC Main Workbench 6.7.1 programı ile yapılan nükleotid dizi karşılaştırmaları sonucunda CMV Adıyaman 1 (MK704429) izolatu dünyadaki diğer izolatlar ile nükleotid düzeyinde % 75.30-97.87 arasında değişen, CMV Adıyaman 2 (MK704430) izolatu dünyadaki diğer izolatlar ile nükleotid düzeyinde % 75-% 99.54 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Adıyaman ilinde yapılan bu çalışma ile tespit edilen tütün virüslerinin, bölgede tütün tarımını tehdit edecek düzeyde olmadığı tespit edilmiştir. Fakat şimdiden önlem alınmazsa virüs tütün üretim alanlarında ciddi bir sorun haline gelecektir. Bu alışma sonucunda elde edilen bulgular ışığında; Adıyaman için önemli bir tarla bitkisi olan tütünde tespit edilen virüslerin vektörlüğünü yapan yaprak biti ve tütün trips türlerinin kapsamlı bir çalışma ile ortaya konulması gerekmektedir.

- Solanacea familyası kültür bitkileri, yabancı otlar ve çok sayıda bitki türünü içermektedir. Bu bitkilerde çok sayıda virüs hastalığı olduğu bilinmektedir. Hastalığa yol açan bu virüslerin de başka çalışmalar ile belirlenerek bölgedeki virüslerin haritası ortaya konulmalıdır. Yürütölen bu çalışma aynı zamanda tütünde viral hastalıkların yayılmasında öneme sahip vektör böceklerin ortaya konacağı diğer çalışmalara ışık tutacak niteliktedir. Elde edilen bulgular uluslararası literatürde Türkiye'deki tütün virüs hastalıkları konusunda bilgi vermesi bakımından büyük önem taşımaktadır. Yapılan bu çalışma ışığında tütün bitkisinde farklı virüslerin sebep olduğu tekli veya karışık enfeksiyon durumları multipleks RT-PCR yöntemi ile hızlı, güvenilir ve uygun maliyetle teşhis edilebilecektir.

- Tütün virüsleri ile mücadelede yaprak bitleri ve tripslerle taşınan viral etmenlerin ara konukçusu olan solanacea familyasındaki yabancı otlar ile mücadele edilmesi büyük önem arz etmektedir. Tütün virüsleri ile mücadelede daha kesin çözüm için dayanıklı çeşit kullanılmasına dikkat edilmelidir.

- Tütün virüslerinin ilde ve bölgede epidemi yapmaması için yaprak biti ve trips popölasyonunun yoğun olduğu zamanlardan kaçınılması geç ekim ve ya erken ekim

yapılması, mümkün ya da vektörlere karşı uygun kimyasal ilaçlar ile ilaçlama yapılması gerekmektedir.





KAYNAKLAR

- Anonim, 2019. Monopartite, linear, ssRNA(+) genome of 6.3-6.5 kb. The 3'-terminus has a tRNA-like structure. The 5' terminus has a methylated nucleotide cap (m7G5'pppG). <https://viralzone.expasy.org/51>. Erişim tarihi: 09.06.2019.
- Arafati, N., Farzadfar, S., Pourrahim, R., 2013. Characterization of coat protein gene of Cucumber mosaic virus isolates in Iran. *Iranian Journal of Biotechnology* **11**(2): 109-114.
- Arlı-Sökmen, M., Mennan, H., Sevik, M. A., ve Ecevit, O., 2005. Occurance of viruses in field-grown pepper crops and some of their reservoir weed hosts in Samsun, *Turkey Phytoparasitica*, **33**: 347-358.
- Ayabakan, L. 2016. Kürtlerde tütün kültürü ve Kürtlerin tütün ekonomisinde İngiltere'nin rolü (1883-1923). *Vakanüvis-Uluslararası Tarih Araştırmaları Dergisi*, **1** (2): 14-29.
- Belçer, Ö. ve Açıköz, S. 2005. Ege ve Marmara bölgelerindeki zeytin fidanlıkları ve ağaçlarında görülen bazı virüs hastalıklarının ELISA testi ile saptanması. *ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, **2**(1): 79-84.
- Benner, C. P., Ve Kuhn, C.W.1985. Identification and incidence of pepper viruses in Northeastern Georgia. *Plant Dis.* **69**: 999-101.
- Bergervoet, J., Peters, J., 2008. Multiplex microsphere immuno-detection of *Potato virus Y*, *X* and *PLRV*. *Journal of Virological Methods*, **149**(1): 63-68.
- Bertolini, E., Olmos, A., Martínez, M. C., Gorris, M. T., Cambra, M., 2001. Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *Journal of Virological Methods*, **96**(1): 33-41.
- Bagley, C. A., 2001. *Controlling Tobacco Mosaic Virus in Tobacco Through Resistance* (doctoral thesis). State University, Polytechnic Institute, Virginia.
- Bhat, A. I., S. Siju., 2007. Development of a single-tube multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of *Cucumber mosaic virus* and *Pepper yellow mottle virus* associated with stunt disease of black pepper. *Current Science*, **23**(1): 973-976.
- Borio, G., (2001). The Tobacco Timeline. <http://www.tobacco.org/resources/history/TobaccoHistory21.html>, Erişim Tarihi: 24.04.2019.
- Bostan, H., ve Dursun, A. 2002. Kemaliye ve Yusufeli İlçelerindeki biber (*Capsicum annum* L.) üretim alanlarındaki bazı virüs hastalıklarının belirlenmesi/Identification of some virus diseases in pepper production areas in Kemaliye and Yusufeli Districts. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **33**(4): 391-392
- 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.
- Canning, E. S. G., Penrose, M. J., Barker, I., Coates, D., 1996. Improved detection of *Barley yellow dwarf virus* in single aphids using RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, **56**(2): 191-197.
- Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Rainer, J. E., Nguyen, P. N., Thomas, C., 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, **16**(23): 11141-11156.

- Chatzivassiliou, E. K., Efthimiou, K., Drossos, E., Papadopoulou, A., Poimenidis, G., Katis, N., 2004. A survey of tobacco viruses in tobacco crops and native flora in Greece. *European Journal of Plant Pathology*, **110**(10): 1011-1023.
- Chen, S., Gu, H., Wang, X., Chen, J., Zhu, W., 2011. Multiplex RT-PCR detection of Cucumber mosaic virus subgroups and Tobamoviruses infecting tomato using 18S rRNA as an internal control. *Acta Biochim Biophys Sin*, **43**(6):465-471.
- Crosslin, J. M., Hamm, P. B., Shiel, P. J., Hane, D. C., Brown, C. R., Berger, P. H., 2005. Serological and molecular detection of tobacco vein necrosis isolates of *Potato virus Y* (PVY N) from potatoes grown in the Western United States. *American Journal of Potato Research*, **82**(4): 263-269.
- Çiçek, Y., Yorgancı, U., 1991. Studies on the incidence of Tobacco mosaic virus on certified seed of tomato, pepper and eggplant in Aegean Region. *J.Turk. Phytopathol*, **20** (2-3): 57-68
- Çifçi, O. ve Ulubaş Serçe, Ç. 2014. Türkiye’de Mardin ili zeytin alanlarında bazı virüslerin serolojik ve moleküler tekniklerle araştırılması. *Bitki Koruma Bülteni*, **54**(3): 233246
- Çulal-Kılıç, H. ve Yardımcı, N. 2012. Burdur Çine Ovası fasulye alanlarında Hıyar mozaik virüsü. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **3**(2): 12-15.
- Dai, J., Cheng, J., Huang, T., Zheng, X., Wu, Y. 2012. A multiplex reverse transcription PCR assay for simultaneous detection of five tobacco viruses in tobacco plants. *Journal of Virological Methods*, **183**(1): 57-62.
- Deb, M., Anderson, J. M., 2008. Development of a multiplexed PCR detection method for *Barley and Cereal yellow dwarf viruses*, *Wheat spindle streak virus*, *Wheat streak mosaic virus* and *Soil-borne wheat mosaic virus*. *Journal of Virological Methods*, **148**(1): 17-24.
- Değirmenci, K., Uzunoğulları, N. 2007. Marmara Bölgesinde domates yetiştiricilik alanlarında sorun olan virüslerin belirlenmesi. *Bitki Koruma Bülteni*, **47**(1-4): 72-77.
- DiFonzo, C. D., Ragsdale, D. W., Radcliffe, E. B., Gudmestad, N. C., Secor, G. A. (1996). Crop borders reduce potato virus Y incidence in seed potato. *Annals of Applied Biology*, **129**(2): 289-302.
- Eckel, R.V.W., ve Lampert, E. P. 1993. Spatial and temporal analysis of Tobacco etch virus distribution and its relationship to aphid (Homoptera: Aphididae) vectors in Flue-Cured Tobacco. *J. Econ. Entomol.* **86**:11534-1545.
- Erkan, S., Gümüş, M., Paylan, İ.C., Duman, İ. ve Ergün, M. 2013. İzmir ili ve çevresindeki bazı kışlık sebzelerde görülen viral etmenlerin saptanması. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **50**(3): 311-322
- Fidan, H., Koç, G., Topçu, T. 2016. Anthurium sp.’de Tomato spotted wilt virus (TSWV) enfeksiyonu ve moleküler karakterizasyonu. *Alatırım*, **15**(2):28-36.
- Fulton, J.P. 1950. Studies on strains of cucumber virus I from spinach. *Phytopathology*, **40**:729-36.
- Ge, B., Li, Q., Liu, G., Lu, M., Li, S., Wang, H. 2013. Simultaneous detection and identification of four viruses infecting pepino by multiplex RT-PCR. *Archives of Virology*, **158**(6): 1181-1187.
- Görsoy, G., 2011. *Kahramanmaraş Biberlerinde Patates Y Virüsü (Pvy) Enfeksiyonlarının Tespiti ve İzolat Karakterizasyonu* (yüksek lisans tezi) KSÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.

- Gümüş, M., Erkan, S. ve Tok, S. 2004. Bazı kabakgil türlerinin tohumlarındaki viral etmenlerin saptanması üzerinde araştırmalar. *Ege Üniv. Ziraat Fakültesi Dergisi*, **41**(1): 49-56.
- Hai-Ying, W. A. N. G., Zhang, C. S., Yu-Yuan, L., 2009. Rapid detection of *Tobacco mosaic virus* from crude samples on an oscillatory-flow reverse transcription-polymerase chain reaction microfluidics. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, **37**(9): 1286-1290.
- Herold, F., 1970. Tobacco Etch Virus in Venezuela. *Plant Dis. Rep.*, **54**:344
- Hu, X., He, C., Xiao, Y., Xiong, X., Nie, X., 2009. Molecular characterization and detection of recombinant isolates of *Potato virus Y* from China. *Archives of Virology*, **154** (8): 1303-1312.
- Ito, T., Ieki, H., Ozaki, K. 2002. Simultaneous detection of six citrus viroids and Apple stem grooving virus from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, **106**(2): 235-239.
- Janczur, K. L., Nakhla, M. K., Charkowski, A. O., 2006. Multiplex detection of *Potato virus S*, *Potato virus X*, and *Potato virus Y* by non-radioactive nucleic acid spot hybridization in potato tissue culture plantlets. *American Journal of Potato Research*, **83**(6): 495-501.
- Kamberoglu, M. A., Bilge, A., 2011. Occurrence of Tomato spotted wilt virus in lettuce in Cukurova region of Turkey. *International Journal of Agriculture and Biology*, **13**(3): 431-434
- Kameya-Iwakı, M., Murakami, K., Ito, S., Hanada, K. ve Tanaka, S. 2000. Semipersistency of Myzus persicae transmission of cucumoviruses systemically infecting leguminous plants. *Journal of General Plant Pathology*, **66**(1): 64-67.
- Kaper, J.M ve Waterworth, H.M. 1981. Cucumoviruses, *HandBook of Plant Virus Infections*, **3**: 257-263.
- Karabacak, K. 2017. Türkiye’de tütün tarımı ve coğrafi dağılışı. *Coğrafi Bilimler Dergisi*, **15**(1): 27-48.
- Kogovšek, P., Gow, L., Pompe-Novak, M., Gruden, K., Foster, G. D., Boonham, N., Ravnıkar, M., 2008. Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of *Potato virus Y* isolates. *Journal of Virological Methods*, **149**(1): 1-11.
- Koprulu, O., Alkan, B. ve Alkan, I., 2009, An overview of tobacco economy in the world and in Turkey, *Journal of Applied Sciences Research*, **5**(10): 1780-1784.
- Kumar, S., Udaya Shankar, A. C., Nayaka, S. C., Lund, O. S., Prakash, H. S. 2011. Detection of Tobacco mosaic virus and Tomato mosaic virus in pepper and tomato by multiplex RT-PCR. *Letters in applied microbiology*, **53**(3): 359-363.
- Kurtoğlu, A., Korkmaz, S. 2018. Çanakkale ili ıspanak üretim alanlarındaki Hıyar Mozaik Virüsü (Cucumber Mosaic Virus; CMV) enfeksiyonunun belirlenmesi ve moleküler karakterizasyonu. *The Journal of Turkish Phytopathology*, **47**(2): 43-51.
- Kwon, J. Y., Hong, J. S., Kim, M. J., Choi, S. H., Min, B. E., Song, E. G., 2014. Simultaneous multiplex PCR detection of seven cucurbit-infecting viruses. *Journal of Virological Methods*, **5**: 133-139.
- Laird, E. F. Jr., ve Dickson, R. C., 1963. Tobacco Etch Virus and Potato Virus Yin Pepper, their host plants and insect vectors in Southern California. *Phytopathology*, **53**: 48-52

- Liu, Y., Wang, Z., Qian, Y., Mu, J., Shen, L., Wang, F., Yang, J., 2010. Rapid detection of *Tobacco mosaic virus* using the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method. *Archives of Virology*, **155**(10): 1681-1685.
- Li, N., Wang, X., Zhou, G., Dong, J. 2006. Molecular variability of the coat protein gene of *Potato virus Y* from tobacco in China. *Acta Virologica*, **50**(2): 107.
- Lockhart, B. E. L., Mason, S. L., Johnson, D. A., Mollov, D. S. 2010. First Report of Tobacco etch virus infection in Coleus in the United States. *Plant Disease*, **94**(7): 921-921.
- Martin, R., Myers, L., Mc Donald, S., ve Ravlin, F.W., 1998. Seasonal Incidence of Hot Pepper Pests in Major Hot Pepper (*Capsicum* Spp.) Producing Areas in Jamaica. *Proceedings of The Third IPM CRSP Symposium*. Blacksburg Virginia, USA.
- Maoka, T., Hayano, Y. S., Iwasaki, M., Yoshida, K., Masuta, C. 2010. Mixed infection in tomato to ensure frequent generation of a natural reassortant between two subgroups of *Cucumber mosaic virus*. *Virus Genes*, **40**(1): 148.
- Mc Glashan D.H., Polston, J.E., Ve Maynard, D.N., 1993. A Survey of Viruses affecting Jamaican 'Scotch Bonnet' pepper *capsicum chinense* (Jacq.). Proc. *Internat. Soc. Trop. Agric.* **37**: 25-30.
- McGovern, R. J., Polston, J. E., Ve Mullahey, J. J., 1994. *Solanum viarum*-weed reservoir of plant-viruses in Florida. *Int J Pest Manage.* **40** (3): 270-273.
- Mumford, R. A., Walsh, K., Barker, I., Boonham, N. 2000. Detection of Potato mop top virus and Tobacco rattle virus using a multiplex real-time fluorescent reverse-transcription polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, **90**(5): 448-453.
- Nie, X., Singh, R. P., 2000. Detection of multiple potato viruses using an oligo (dT) as a common cDNA primer in multiplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, **86**(2):179-185.
- Nutter, F. W. Jr., Ve Kuhn, C. W., 1989. Epidemiological importance of six solanaceous weed host in the Tobacco Etch Virus/Bell Pepper. *Phytopathology* **79**: 375.
- Nutter, F. W. Jr., Ve Kuhn, C. W., All, C. N., 1989. Modells to estimate yield losses in bell pepper caused by Tobacco Etch Virus epidemics. *Phytopathology* **79**: 1213.
- Özaydın, (2010). *Çukurova Bölgesindeki Yetiştirilen Patateslerdeki Virolojik Sorunlar*. (yüksek lisans tezi) Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Palloix, A., Abak, K., Daubeze, A.M., Güldür, M. E., Ve Gebre, K.G., 1994. Survey of pepper diseases affecting the main production regions of Turkey with special interest in viruses and potyvirus pathotypes. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, **13**: 78-81.
- Park, W. M., Lee, G. P., Ryu, K. H., Park, K. W. 1999. Transmission of tobacco mosaic virus in recirculating hydroponic system. *Scientia horticulturae*, **79**(3-4): 217-226.
- Parlaklar, E., 2010, *Manisa-Akhisar Yöresindeki Toprakların Bazı Temel ve Mühendislik Özellikleri ile Tütün Verimi ve Kalitesi Arasındaki İlişkiler*, (yüksek lisans tezi), EÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Purcifall, D.B. Ve Hiebert, E., 1982. Tobacco Etch Virus. *Cmi/Aab Description of Plant Viruses*, **258**: 7-9
- Roossinck, M.J. 2002. Evolutionary history of Cucumber Mosaic Virus deduced by phylogenetic analyses. *Journal of Virology*, **76**(7): 3382-3387.

- Sekin, S., ve Peksüslü, A. (1995). Ege Tütün Genotiplerinin Agronomik Özellikleri ***1.Milli Tütün Komitesi. Bilimsel Araştırma Alt Komitesi***, **13**: 25-27.
- Sertkaya, G. 2015. Hatay ili marul ve ıspanak alanlarında bazı virüslerin araştırılması. ***Journal of Agricultural Faculty of Mustafa Kemal University***, **20**(1): 7-12
- Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Berenji, J., Krstić, B., 2011. Status of tobacco viruses in Serbia and molecular characterization of tomato spotted wilt virus isolates. ***Acta Virologica***, **55**(4):337-347.
- Sivük, U. G. H. A. H., Ataseven, Y., Gül, U., Arısoy, H., Sivük, H., Ataseven, Y. 2009. Alternatif ürün projesi kapsamında tütün ve bazı ürünler arasında kârlılık karşılaştırmaları. ***Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi***, **6**(3): 215-226.
- Tian, Y. P., Liu, J. L., Yu, X. Q., Lei, L. P., Zhu, X. P., Valkonen, J. P. T., Li, X. D. 2007. Molecular diversity of *Tobacco vein banding mosaic virus*. ***Archives of Virology***, **152**(10): 1911-1915.
- Tian, Y. P., Liu, J. L., Zhang, C. L., Liu, Y. Y., Wang, B., Li, X. D., Valkonen, J. P. T. 2011. Genetic diversity of *Potato virus Y* infecting tobacco crops in China. ***Phytopathology***, **101**(3): 377-387.
- The Tobacco Atlas, 2010, <http://www.tobaccoatlas.org/growing.html>. Erişim Tarihi: 28.03.2019
- Thompson, J. R., Wetzel, S., Klerks, M. M., Vašková, D., Schoen, C. D., Špak, J., Jelkmann, W., 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. ***Journal of Virological Methods***, **111**(2): 85-93.
- TÜİK, 2017. Bitkisel ürün istatistikleri <http://www.tuik.gov.tr/Gosterge.do?id=3751> Erişim Tarihi: 11.10.2017
- Uga, H., Tsuda, S., 2005. A one-step reverse transcription-polymerase chain reaction system for the simultaneous detection and identification of multiple tospovirus infections. ***Phytopathology***, **95**(2): 166-171.
- V. Regenmortel, M. H. V., Burckard, J., 1980. Detection of a wide spectrum of *Tobacco mosaic virus* strains by indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). ***Virology***, **106**(2): 327-334.
- Yang, Y., Correll, J.C., Morelock, T.E., ve Anderson, E.J. 1993, Characterization of a seed-transmitted of cucumber mosaic virus (CMV) isolate from spinach (*Spinacia oleracea*), ***Phytopathology***, **83**:1403.
- Yıldız, A., 2016. ***Türkiye’de Biberlerde Tütün Yanıklık Virüsü (Tobacco Etch Virus, TEV)’in Genetik Karakterizasyonu ve Pvr Alelleri ile İlişkisi*** (yüksek lisans tezi basılmamış). KSÜ, EÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Wang, Wei, L., 2010. Establishment and application of multiplex RT-PCR for simultaneous detection of five watermelon viruses ZYMV, WMV, TMV, SqMV and CMV. ***Acta Phytopathologica Sinica***, **40**(1): 27-32.
- Xu, H., Nie, J., 2005. Detection and identification of tomato isolates of *Potato virus Y*-potato tuber necrotic strain in tomato fruit by RT-PCR, RFLP and sequence analysis. ***Phytopathology***, **95**(6): 125-128
- Zitter, T.A. ve Murphy, J.A. 2009. Cucumber mosaic. ***The Plant Health Instructor***, **10**(1094): 2009-051801.
- Zhang, J., Wang, R., Song, J., Luo, Z., Yang, J., Lin, F. 2013. One- step Multiplex RT- PCR for simultaneous detection of four viruses in tobacco. ***Journal of Phytopathology***, **161**(2): 92-97.



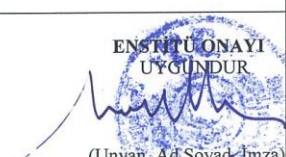
- Zhang, Z., Fang, Q., Wu, Z., 1998. The occurrence and distribution of main *solanaceae* crops viruses in. *Yunan Journal University Natural Sciences*, **5**(20): 128-131.
- Zein, H. S., Miyatake, K., 2009. Development of rapid, specific and sensitive detection of *Cucumber mosaic virus*. *African Journal of Biotechnology*, **8**(5): 751-759.



ÖZ GEÇMİŞ

1992 yılında Adıyaman'ın Merkez ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adıyaman'da tamamladı. 2013 yılında girdiği Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nden 2016 yılında Ziraat Mühendisi ünvanı ile mezun oldu. 2016 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.



T.C VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU	
Tarih: 11.11.2019	
Tez Başlığı / Konusu: ADIYAMAN İLİ TÜTÜN ÜRETİM ALANLARINDAKİ BAZI TÜTÜN VİRÜSLERİNİN MULTİPLEKS RT-PCR YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI VE BAZI VİRÜS İZOLATLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU	
<p>Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 67 sayfalık kısmına ilişkin, 11.11.2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulamaları alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 11 (On Bir) dir.</p> <p>Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kabul ve onay sayfası hariç, - Teşekkür hariç, - İçindekiler hariç, - Simge ve kısaltmalar hariç, - Gereç ve yöntemler hariç, - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - Tezden çıkan yayınlar hariç, - 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words) <p>Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.</p> <p>Gereğini bilgilerinize arz ederim.</p>	
11.11.2019 Tarih ve İmza 	
<p>Adı Soyadı: Abidin GÜNAY Öğrenci No: 169101073 Anabilim Dalı: Bitki Koruma Programı: Fitopatoloji Statüsü: Y. Lisans <input checked="" type="checkbox"/> Doktora <input type="checkbox"/></p>	
DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR
 Dr. Öğr. Üyesi Mustafa USTA	 (Unvan, Ad Soyad, İmza) Prof. Dr. Suat SENSÖY Enstitü Müdürü