

**T.C.  
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**DOMATESTE SW-5 DAYANIKLILIĞINI KIRAN TSWV  
İZOLATLARININ BELİRLENMESİ İÇİN REAL TIME PCR  
YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

**Tuğçe KOCAMAN**

**Danışman  
Prof. Dr. Bayram ÇEVİK**

**ISPARTA - 2019**



© 2019 [Tuğçe KOCAMAN]

TEZ ONAYI

**DOMATESTE SW-5 DAYANIKLILIĞINI KIRAN TSWV  
İZOLATLARININ BELİRLENMESİ İÇİN REAL TIME PCR YÖNTEMİ  
GELİŞTİRİLMESİ**

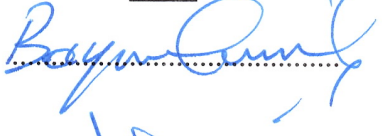
Tuğçe KOCAMAN tarafından hazırlanan bu tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

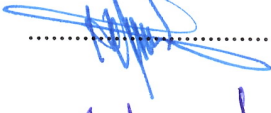
**Başkan**      **Prof. Dr. Bayram ÇEVİK**  
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi


**Üye**            **Dr.Öğr.Üyesi HAKAN FİDAN**  
Akdeniz Üniversitesi

**Üye**            **Doç. Dr. Handan ÇULAL-KILIÇ**  
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

İmza

  
.....

  
.....

  
.....

Yukarıdaki Jüri kararı Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ....../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

**Prof.Dr. Yusuf UÇAR**  
**Enstitü Müdürü**

## ETİK BEYANI

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak ve bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın hazırladığım bu tez çalışmasında;

Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

16/07/2019

**Tuğçe KOCAMAN**



## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER .....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	viii
1. GİRİŞ .....	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ .....	5
2.1. Domatesin Önemli Hastalık ve Zararları.....	7
2.2. TSWV Sınıflandırılması .....	9
2.3. TSWV Belirtileri.....	10
2.4. TSWV Ekonomik Önemi .....	11
2.5. TSWV Taşınması.....	13
2.6. TSWV Genom Yapısı .....	15
2.6.1. L RNA segmenti .....	16
2.6.2. M RNA segmenti .....	16
2.6.3. S RNA segmenti.....	17
2.7. TSWV Mücadelesi .....	17
2.8. TSWV'ne Dayanıklılık .....	19
2.9. Bitkilerde R Dayanıklılık Geni Mekanizması.....	20
2.10. TSWV <i>Sw-5</i> Dayanıklılık Geni .....	21
2.11. TSWV'ne Karşı <i>Sw-5</i> Gen Dayanıklılığının Belirlenmesi .....	22
2.12. TSWV'ne Karşı <i>Sw-5</i> Geni Dayanıklılığının Kırılması.....	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	27
3.1. Alan Çalışması .....	27
3.2. Total RNA İzolasyonu .....	30
3.3. Bitki Materyali .....	30
3.4. Mekanik İnokulasyon.....	31
3.5. Domateste <i>Sw-5</i> Dayanıklılık Geninin PCR Yoluyla Belirlenmesi.....	31
3.6. Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Reverse Transcription RT-PCR).....	32
3.7. Real-time RT-PCR (Gerçek Zamanlı PCR) Yöntemiyle TSWV'nin Belirlenmesi.....	33
3.8. Agaroz Jel Elektroforez .....	33
3.9. PCR Saflaştırması.....	34
3.10. TSWV NSm Geninin Klonlanması .....	34
3.11. Ligasyon .....	34
3.12. Transformasyon .....	34
3.13. Rekombinant Kolonilerin Seçimi.....	35
3.14. Rekombinant Bakteriyel Kolonilerin Belirlenmesi.....	35
3.15. Plazmit İzolasyonu .....	36
3.16. <i>EcoRI</i> Restriksiyon Enzimiyle Kesim .....	36
3.17. NSm Gen Dizisinin Belirlenmesi ve Karşılaştırılması .....	37
3.18. Real Time RT-PCR için Primer Tasarımı .....	37
3.19. Dayanıklılığı Kıran ve Kırmayan İzolatların Real Time RT-PCR Yoluyla Ayrılması .....	38

4. BULGULAR .....	40
4.1. Arazi Çalışmaları .....	40
4.2. Arazi Bölgelerinde TSWV'nin Tespit Edilmesi.....	40
4.3. Arazi Örneklerinde Sw-5 Dayanıklılık Geninin Belirlenmesi .....	42
4.4. Mekanik İnokulasyon.....	43
4.5. Mekanik İnokulasyon Yapılan Bitkilerde TSWV Test Edilmesi.....	46
4.6. Sw-5 Dayanıklılığını Kıran İzolatların NSm Genlerinin Klonlanması.....	47
4.7. Sw-5 Dayanıklılığını Kıran İzolatların NSm Genlerinin Dizilenmesi ve Dizi Analizleri .....	50
4.8. SYBR Green Bazlı Real-Time PCR Yöntemi Geliştirilmesi .....	58
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	63
KAYNAKLAR .....	67
ÖZGEÇMİŞ .....	80



## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

# DOMATESTE SW-5 DAYANIKLILIĞINI KIRAN TSWV İZOLATLARININ BELİRLENMESİ İÇİN REAL TIME PCR YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

Tuğçe KOCAMAN

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bayram ÇEVİK

Domates lekeli solgunluk virüsüne (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) karşı dayanıklılık, domateste Sw-5 dominant geniyle virüsünün hücreden hücreye hareket proteini kodlayan NSm geninin etkileşimiyle gerçekleşmektedir. Son yıllarda bu etkileşimi bozarak, domateste Sw-5 dayanıklılığını kıran (RB) TSWV izolatları belirlenmiştir. Dünyanın farklı bölgelerinden RB ve dayanıklılığı kırmayan (NRB) izolatların NSm gen diziliminin karşılaştırılması sonucunda iki nokta mutasyonunun Sw-5 dayanıklılığının kırılmasından sorumlu olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada Antalya ve Isparta illerinde domates üretim ve satış alanlarından TSWV belirtisi gösteren yaprak ve meyve örnekleri alınmış ve PCR, RT-PCR ve/veya real-time RT-PCR yöntemiyle testlenmiştir. Yapılan testlemeler sonucunda 57 şüpheli örneğin 46 tanesinin TSWV enfekteli olduğu enfekteli örneklerin 4 tanesinin Sw-5 geni içeren domates çeşitlerinden alındığı belirlenmiştir. Yapılan mekanik inokulasyon çalışmaları sonucunda dayanıklı bitkide inokulasyon yapan 13 farklı potasyel RB TSWV izolatı belirlenmiştir. Bu izolatalardan 6 tanesi seçilerek NSm genleri çoğaltılmış, klonlanmış ve olası mutasyonları belirlemek için dizilenmiştir. Yapılan amino asit dizi karşılaştırmalarında Türk izolatlarının NSm genleri kendi aralarında %96-99 dünyadaki izolatlarıyla ise %95-100 oranında benzerlik göstermiştir. Yapılan analizler sonucunda daha önce TSWV RB izolatlarında belirlenen nokta mutasyonlarının bu çalışmada kullanılan izolatlarında bulunmadığı belirlenmiştir. Ancak bu çalışmada elde edilen RB izolatlarının 287. amino asitinde glutamik asitin (E) aspartik asit (D) veya glisine (G) dönüştüğü mutasyonlar taşıdıkları tespit edilmiştir. Bu izolatların NSm genlerinin gen bankasında bulunan dünya izolatlarının NSm genleriyle karşılaştırıldığında E287D mutasyonunun sadece bu çalışmada belirlen TSWV RB izolatlarında bulunduğu görülmüştür. NSm geninin mutasyon içeren bölgesinin çoğaltılması için spesifik primer tasarlanarak mutasyonların ayrılması için SYBR Green bazlı real-time RT-PCR yöntemi geliştirilmiştir. Real-time RT-PCR çoğaltımını ve erime analizleriyle bulunan mutasyonların ayrılacağı ve bunları taşıyan izolatlarının dizileme yapmadan hızlı ve ekonomik bir şekilde tespit edilebileceği gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Dayanıklılığın kırılması, Erime analizleri, Filogenetik analiz, Hareket proteini, Nokta mutasyonları, SYBR Green

2019, 80 sayfa

## ABSTRACT

M.Sc. Thesis

# DEVELOPMENT OF REAL TIME PCR METHOD FOR DETERMINATION OF TSWV ISOLATES BREAKING TOMATO SW-5 RESISTANCE

Tuğçe KOCAMAN

Isparta University of Applied Sciences  
The Institute of Graduate Education  
Department of Physics

Supervisor: Prof. Dr. Bayram ÇEVİK

In tomato, resistant to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) is controlled by the interaction of *Sw-5* dominant gene in plant with the NSm cell-to-cell movement protein of the virus. In recent years, TSWV isolates breaking the *Sw-5* resistance by interfering this interaction have been identified. It has been reported that two point mutations in the NSm gene were identified by comparison of the NSm gene of the resistance breaking (RB) and non-resistance breaking (NRB) isolates are responsible for the breaking the *Sw-5* resistance. In this study, 57 leaf or fruit samples were collected from tomato production areas and local market in Antalya and Isparta province and samples were tested by PCR, RT-PCR and/or real-time RT-PCR methods. The results showed that 46 of the 57 suspected samples were infected with TSWV and four of the infected samples were taken from tomato cultivars with *Sw-5* resistance gene. As many as 13 different potential RB isolates were identified by mechanical inoculation to resistant and susceptible tomato cultivars. To determine possible mutations in the NSm gene, this gene was amplified from six selected RB isolates and it was cloned and sequenced. Comparison of amino acid sequences showed that while the NSm gene of Turkish isolates were 96-99% identical, they showed 95-100% sequence identity with world isolates. Analysis also determined that the previously identified point mutations were not present in the NSm genes of RB isolates identified in this study. However, a glutamic acid (E) to aspartic acid (D) or glycine (G) point mutation was identified in amino acid 287 of the NSm genes of RB isolates identified in this study. Comparison of the NSm genes of these isolates with the that of world isolates in the GenBank showed that these mutations were only present in Turkish isolates identified in this study. A SYBR Green based real-time RT-PCR method was developed for amplification of the the region of the NSm gene containing the identified mutations. The amplification and melting analysis of the 3' end of the NSm gene by real-time RT-PCR enabled differentiation of point mutations identified in this study and showed that TSWV isolates carrying these mutations can more quickly and economically be distinguished from wild type isolates without sequencing.

**Key Words:** Melting analyzes, Movement protein, Phylogenetic analysis, Point mutations, Resistance breaking, SYBR Green

2019, 80 pages



## **TEŞEKKÜR**

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, kendisine ne zaman danışsam bana zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle elinden gelenden fazlasını sunan, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da değerli bilgilerinden faydalanacağımı düşündüğüm danışman hocam Prof. Dr. Bayram ÇEVİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezime göstermiş oldukları katkılarından dolayı jüri üyelerim Dr. Öğr. Üyesi Hakan FİDAN ve Doç Dr. Handan ÇULAL-KILIÇ'a teşekkür ederim.

Arazi çalışmalarının yürütülmesinde bana katkısı olan ve manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim hayat tecrübesiyle bana yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. İsmail KARACA'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca arazi çalışmalarında örneklerimin temin edilmesinde katkıları olan Dr. Öğr. Üyesi Hakan FİDAN, Prof. Dr. Hakan AKTAŞ, Ziraat Yüksek Mühendisi Gözde ERKIŞ' a teşekkür ederim.

Labaratuvar ekip arkadaşlarım Ziraat Mühendisi Büşra ARSLAN ve Ziraat Mühendisi Deniz ERKAN başta olmak üzere tüm herkese yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Dostluğu ve manevi desteği ile benim devamlı yanımda olan Selin ÇOBAN'a teşekkür ederim.

Tezimi yaparken beni yalnız bırakmayan her koşulda yanımda olan ve bana güvenen aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

**Tuğçe KOCAMAN**  
ISPARTA, 2019

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. Yabani domates türlerinin Güney Amerika'da coğrafik dağılışı .....	6
Şekil 2.2. TSWV enfekteli bir bitki hücresinde elektronmikroskopik virion görüntüsü ile TSWV virüs partikülünün genomik yapısı .....	10
Şekil 2.3. Trips yaşam döngüsünün ve <i>Orthospovirus</i> iletiminin grafiksel gösterimi .....	14
Şekil 2.4. TSWV genomuna ait L, M, S segmentlerinin replikasyon stratejisi .....	16
Şekil 3.1. TSWV enfekteli Isparta deregümüne ait domates bitkileri.....	28
Şekil 4.1. TSWV enfekteli domates yaprağının CTAB solüsyonu ile ezilmesi.....	41
Şekil 4.2. Nükleik asit izolasyonu yapılan domates örneklerinin PCR sonuçlarına göre <i>Sw-5</i> geni içerip içermediğini gösteren jel görüntüsü .....	43
Şekil 4.3. Real time RT-PCR sonucunda pozitif çıkan TSWV örnekleri .....	44
Şekil 4.4. TSWV örneklerinin 1000 bç büyüklüğündeki NSm geni jel görüntüleri ..	47
Şekil 4.5. Antalya ve Isparta iline ait TSWV NSm genlerini içeren kolonilerden M13F-M13R primerleri kullanılarak çoğaltılan koloni PCR'dan yaklaşık 1200 bç uzunluğunda elde edilen bantların jel görüntüleri .....	49
Şekil 4.6. <i>EcoRI</i> restriksiyon enzimleriyle kesilen TSWV örneklerinin pGEM-T easy plazmitlerinin NSm genine ait 1200 bç büyüklüğünde jel görüntüleri .....	49
Şekil 4.7. Türkiye'deki farklı izolatlardan oluşan NSm geni amino asit dizi karşılaştırmaları .....	52
Şekil 4.8. Türkiye'deki ve dünyadaki farklı izolatlardan oluşan NSm proteinlerinin çoklu amino asit dizi karşılaştırmaları.....	56
Şekil 4.9. Antalya ve Isparta'dan elde edilen TSWV izolatlarının NSm proteinlerinin dünyanın farklı domates üretim bölgelerinden elde edilen ve gen bankası veritabanında bulunan TSWV izolatlarının NSm proteinleriyle karşılaştırılması sonucunda oluşturulan soy ağacı.....	57
Şekil 4.10. Farklı mutasyonları içeren TSWV NSm genlerinin PCR ile sentezlenmiş kalıp DNA'lar kullanılarak SYBR Green bazlı real time PCR yöntemiyle ayrılması.....	60
Şekil 4.11. Farklı mutasyonları içeren TSWV NSm genlerinin bitkiden elde edilen RNA kullanılarak SYBR Green bazlı real-time RT-PCR yöntemiyle ayrılması .....	61
Şekil 4.12. Araziden toplanan TSWV izolatlarının farklı mutasyonları içeren TSWV NSm genlerini SYBR Green bazlı real-time RT-PCR yöntemiyle ayrılması .....	62

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 2.1. Dünya'da en çok domates üreten ülkelerin yıllık üretim miktarları.....	5
Çizelge 3.1. Domates lekeli solgunluk virüsü enfekteli domates ile biber izolatlarının toplandığı bölgeler .....	29
Çizelge 4.1. Arazi çalışmasından alınan TSWV şüpheli örneğin nükleik asit miktarları ve A260/A280 değerleri .....	41
Çizelge 4.2. TSWV şüpheli 57 farklı örneğin RT-PCR ve real time PCR yöntemiyle testlenmesi sonuçları .....	45
Çizelge 4.3. TSWV mekanik inokulasyonu yapılan duyarlı ve dayanıklı domates bitkilerinin virüs bulaşan bitkilerin toplam bitkiye oranı .....	46
Çizelge 4.4. Klonlama yapılan TSWV örneklerinin gösterimi .....	48
Çizelge 4.5. Dizilemeye gönderilen örneklerin DNA dizi büyüklüğünü gösteren tablo .....	51
Çizelge 4.6. Türkiyedeki Nsm genine ait amino asit dizilimlerinin benzerlik oranları .....	51
Çizelge 4.7. Dünya'daki ve ülkemizdeki TSWV NSm geni amino asit dizilerinin benzerliğinin karşılaştırılması .....	55
Çizelge 5.1. TSWV dizilemeye gönderilen örneğin amino asit karşılığı.....	68

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Amp	Ampicilin
Avr	Avirülens
bp	Base pear
cDNA	Komplementer DNA
CTAB	Cetyltrimethyl-ammonium
dak	Dakika
Day.	Dayanıklı
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleotide Triphosphate
Duy.	Duyarlı
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FAO	Dünya gıda ve tarım teşkilatı
HR	Hipersensitif yanıt
IGR	İntergenik bölge
IPTG	İsopropyl-trigalactosidose
IRES	İç ribozomal giriş bölgesi
kb	Kilo base
kDa	Kilo dalton
M	Molar
ml	Mililitre
MP	Viral hareket proteini
MT	Milyon ton
N	TSWV nükleokapsid protein geni
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NRB	Dayanıklılığı kırmayan
NSm	Yapısal olmayan protein
ORF	Açık okuma çerçevesi
PTGS	Post-tanskripsiyonel gen sessizliği
RB	Dayanıklılığı kıran
RdRp	RNA'ya bağlı RNA polimeraz
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Riboksi Nükleik Asit
RNP	Ribonükleoprotein
rpm	Revolutions per minute (Devir/dakika)
RT-PCR	Reverse Transcription-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
sn	Saniye
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ssRNA	Tek sarmal ribonükleik asit
Sw-5	Domateste 9. kromozomda bulunan dayanıklılık geni
SYBR	Syber
TAE	Tris-asetat-EDTA
TSWV	Tomato spotted wilt virüs
UV	Ultraviyole
X-gal	5-bromo-4chloro-3-indoly-beta-D-galacto-pyranosid
°C	Santigrad derece
µl	Mikrolitre

## 1. GİRİŞ

Dünyada en çok üretimi yapılan ve tüketilen tarım ürünlerinin başında domates (*Solanum lycopersicum*) gelmektedir. Domatesin çok sayıda yabani ve kültüre alınmış akrabası bulunmaktadır. Galapagos Adaları, And Dağları (Rick, 1973; Taylor, 1986), Ekvator ve Bolivya'ya kadar uzanan birçok bölgede domates yetiştirilmektedir. Kültür domatesinin yabani akrabaları, deniz seviyesinden yüksekliğe bağlı olarak değişmektedir. Enlem derecesinden de etkilenerek geniş bir çeşitlilik göstermektedir. Türlerin gelişimi için, önemli bir gen havuzu oluşturmaktadır (Rick ve Holle, 1990). Domates ülke ekonomisinde çok önemli bir yeri olmakla birlikte çiftçimizin önemli gelir kaynaklarından birisini oluşturmaktadır. Domates günümüzde hem taze olarak tüketilmekte hem de salça, ketçap domates suyu, turşu, dondurularak veya kurutulularak da tüketilebilmektedir. Son yıllarda domatesin üretim miktarı artırılmış ve domatesten elde edilen işlenmiş ürünler de çeşitlendirilmiştir.

Kültür bitkilerinde yabancı otlar, hastalık ve zararlıların neden olduğu ürün kayıpları %31-42 arasında değişen değerlerden oluşmaktadır. Bu kayıplarının %14,1'i hastalıklar, %12,2'si yabancı otlar, %10,2'si zararlılardan meydana gelmektedir. Yıllık ürün kayıplarının ekonomik değeri ise 550 milyar dolar olmaktadır (Agrios, 2005). Domates yetiştiriciliğini sınırlayan önemli faktörler arasında; virüs, bakteri ve fungus gibi hastalık etmenleri sayılabilmektedir. Hastalık ve zararlıların yayılmasının kontrolünde üç strateji benimsenmektedir. Bunlar kimyasal uygulamalar, kültürel uygulamalar ve dayanıklı çeşit kullanımıdır. Kimyasal uygulamalar, bazı hastalık ve zararlıların yayılmasını önleyebilmesine rağmen çiftçiler için risk oluşturmakta, girdi maliyetlerini artırmakta ve kalıntı problemleri oluşturması nedeniyle kullanımı kısıtlanmaktadır. Kültürel uygulamalarla hastalık ve zararlı kontrolü her zaman tam anlamıyla yeterli olmamaktadır. Bu durumda, en ekonomik ve çevre dostu mücadele yöntemi dayanıklı çeşit kullanımıdır. Domates gibi yoğun olarak üretimi gerçekleştirilen bitkilerde birden fazla hastalık ve zararlı etmeni verim ve kalite yönünden büyük kayıplara yol açmaktadır. Birçok bitki türü ile çeşidi bir ya da birden fazla hastalık ve zararlıya karşı dayanıklılık göstermektedir. Özellikle melez çeşitlerin kullanımı sebze üretiminde çoklu dayanıklılığa sahip olmaktadır. Şimdiye kadar kültürü yapılan

domates bitkisine 15 adet dayanıklılık geni aktarılmıştır (Barone, 2004). Klasik ıslah metotlarıyla kültür çeşitlerine melezleme yoluyla hastalıklara karşı dayanıklılık aktarılabilmektedir. Bir etmene karşı dayanıklılığın aktarılması, hastalık ve zararlı sayısı fazla olan domates için genellikle yeterli olmamaktadır.

Günümüzde 30'dan fazla virüsün domateste hastalığa yol açtığı bilinmektedir (Zitter, 1997). Bu viral etmenlerin başında domates lekeli solgunluk virüsü (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) gelmektedir. TSWV subtropik bölgelerde yaygın görülmektedir (Mickowski, 1981). TSWV, kültür bitkilerinde büyük bir ekonomik öneme sahiptir. İlk 10 virüs arasından 2. sırada yer almaktadır (Scholthof vd., 2011). TSWV, *Bunyaviridae* familyası *Orthospovirus* cinsine dahil bir hastalık etmenidir (Francki vd., 1991). TSWV geniş bir konukçu aralığına sahip olup 69 dikotiledon bitki familyası, 15 monokotiledon bitki familyası ve Pteridofit'lerin 1 familyasına ait toplam 1090 bitki türü virüse konukçuluk etmektedir (Parrella vd., 2003). TSWV'nin önemli konukçuları arasında başta domates olmak üzere, tütün, marul, biber, patates, yer fıstığı, bakla, patlıcan, bezelye, börülce, pamuk, ıspanak, karnabahar, bamya, brokoli, kereviz, papaya, ananas, enginar, kolza bitkileri yer almaktadır (Anonymous, 2007). TSWV, domates bitkisinde; genç yaprakların bronzlaşması, yapraklarda küçük ve bol miktarda siyah lekelelenmeler, bitkide cücelik, gövdede siyah çizgiler, meyvede klorotik halkalı lekelenme, sürgün uçlarından geriye doğru ölümlere neden olarak kalite ve veriminin azalmasına yol açmaktadır. İnsanların bu besinleri tüketiminde tercih etmemesini sağlayarak, ekonomik değerini düşürmekte ve pazarlanmasını imkansızlaştırmaktadır. TSWV belirtilerinin geniş konukçu aralığında görülmesi ve vektörleri kontrol etmesi zor olduğundan, tarımsal üretimde önemli bir tehdit oluşturmaktadır. TSWV'nin neden olduğu zararı en aza indirmek için doğal R genlerinin tanımlanması önemli bir yaklaşımdır. Domateste bazı hastalık ve zararlılara dayanıklılık tek genle kontrol edilmektedir ve dominant (baskın) özellik göstermektedir. Domateste *S. peruvianum*'da bulunan dominant *Sw-5* geni, TSWV'ye karşı dayanıklılık kaynağı olarak belirlenmiştir. İlk olarak ticari bir domates çeşidi olan 'Stevens'e aktarılmıştır (Stevens vd., 1992). *Sw-5* dayanıklılık geni ticari domates çeşitlerine melezleme yoluyla aktarılmıştır. Bitki virüsleri, bitkilerde hareket için gerekli olan bir veya daha fazla proteini kodlamaktadır (Hull, 2002). Bitki virüs hareket proteinleri (MP) nükleik asitlere spesifik olarak bağlanmakta, plazmodesmata'yı modifiye etmekte veya protoplastların yüzeyinde

tübüllerin oluşumunu uyarmaktadır (Waigmann vd., 2004). Domateste *Sw-5b* dayanıklılık geninin kodlandığı protein TSWV'nin yapısal olmayan hareket protein NSm ile etkileştiği yani virüsün avirülens (Avr) faktörü olduğu belirlenmiştir (Hallwass vd., 2014). TSWV genomunda M RNA segmenti yapısal olmayan proteinlerden birini (NSm) kodlamaktadır (Hoffmann vd., 2001). NSm geni, *Orthospovirus*'lerin bitkiye adaptasyonunu ile bitki hücre duvarları arasındaki plasmodesmata yoluyla bitki içinde hareketini sağlamaktadır. NSm'lerin rolü, plasmodesmata yoluyla taşınması için oldukça büyük olan virüs partiküllerinin nükleokapsidler yardımı ile hücreden hücreye hareketinin kolaylaştırıcı borucukları oluşturmaktadır. TSWV trips hücrelerinde ve bitki protoplastlarda tübül yapıları oluşturmaktadır (Storms vd., 1995). TSWV NSm proteini, tübül oluşumu için gerekli 302 amino asitten oluşmaktadır. Hareket proteininin virüsün hücreden hücreye hareketi ve uzun mesafe hareketindeki fonksiyonu daha önceki çalışmalarda belirlenmiştir (Leastro vd., 2017). Domateste DNA-j protein homologlarının da TSWV etkileşiminde rol aldığı bildirilmiştir (Soellick vd., 2000). TSWV NSm'nin DNA-j benzeri protein, diğer plasmodesmata ikame proteinleri ve viral N gibi konukçu proteinleri ile etkileştiği görülmüştür. Tütün bitkisinde ve Arabidopsis'de DNA-j proteininin, zarflanmamış ribonükleokapsid yapılarının hücreden hücreye hareketini kolaylaştırıcı TSWV'nin hareket proteinleri ile etkileştiği görülmüştür. Bu nedenle hareket proteinlerinin engellenmesi, virüsün konukçunun içine yayılmasını önleyebilmektedir (Soellick vd., 2000). Son yıllarda bu etkileşimi bozarak, *Sw-5* dayanıklılığını kıran (RB) TSWV izolatlar ortaya çıkmıştır. Dayanıklılığı kıran (RB) ve kırmayan (NRB) izolatların NSm gen diziliminin karşılaştırılması sonucunda iki nokta mutasyonunun *Sw-5* dayanıklılığının kırılmasından sorumlu olduğu belirlenmiştir (Martinelli vd., 2014).

Son yirmi yılda, virüs üzerinde yüksek seleksiyon baskısı nedeniyle RB TSWV izolatları ortaya çıkmıştır, bu da *Sw-5b* geni dayanıklılığını tehdit etmektedir (Gordillo vd., 2008). TSWV RB ve NRB izolatlarının NSm genine ait nükleotid ve amino dizilerinin karşılaştırmalı analizi NSm proteininde 118. amino asit olan sisteinin (C118) tiroisine (Y118T) veya 120. amino asit olan trioninin (T120) asparajine (T120N) dönüşmesinin *Sw-5* dayanıklılığının kırılmasında etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır (Lopez vd., 2011). Bu mutasyonların TSWV'nün *Sw-5b* dayanıklılık proteini tarafından tanınmasına engel olmasına rağmen NSm hareket

proteini aktivitesine etki etmediği belirlenmiştir (Peiro vd., 2014). Bu alışmada Antalya ve Isparta illerinden arazi çalışmalarından toplanan domates çeşitlerinde dayanıklılığı kıran ve kırmayan TSWV izolatları moleküler çalışmalar yapılarak testlenmiştir. *Sw-5* dayanıklılık geni içeren Sedir ve içermeyen Alsancak domates fidelerine mekanik inokulasyon yapılmıştır. *Sw-5* dayanıklılık geni içeren ve *Sw-5* geni içermeyen duyarlı domates çeşitlerinde çoğalan RB TSWV izolatları belirlenmiştir. Elde edilen RB izolatlarının NSm gen dizilimleri belirlenerek ülkemizde ve dünyanın farklı üretim bölgelerinden elde edilen TSWV NSm gen dizilimleriyle karşılaştırılarak dayanıklılığın kırılmasında etkili mutasyonlar belirlenmiştir.









Dayanıklılığın kırılmasından sorumlu NSm gen mutasyonları sadece gen klonlama ve dizileme ile yapılmaktadır. Bu mutasyonları dizileme yoluyla belirlemek uzun süre aldığından ve maliyeti yüksek olduğundan daha hızlı, ucuz ve etkin bir yöntem geliştirilmesi gerekmektedir. Yapılan bu çalışmada Türk izolatlarında 287. amino asit bölgesinde dayanıklılığı kıran yeni mutasyonlar tespit edilmiştir. *Sw-5* dayanıklılığını kıran TSWV RB izolatlarının NSm geninde yeni bulunan bulunan nokta mutasyonlarından yararlanılarak gerçek zamanlı RT-PCR yöntemi geliştirilmiştir. SYBR Green ve bazlı real-time RT-PCR yöntemi geliştirilerek hedef bölgedeki mutasyonlara göre dayanıklılığı kıran ve kırmayan izolatların belirlenmesi sağlanmıştır.



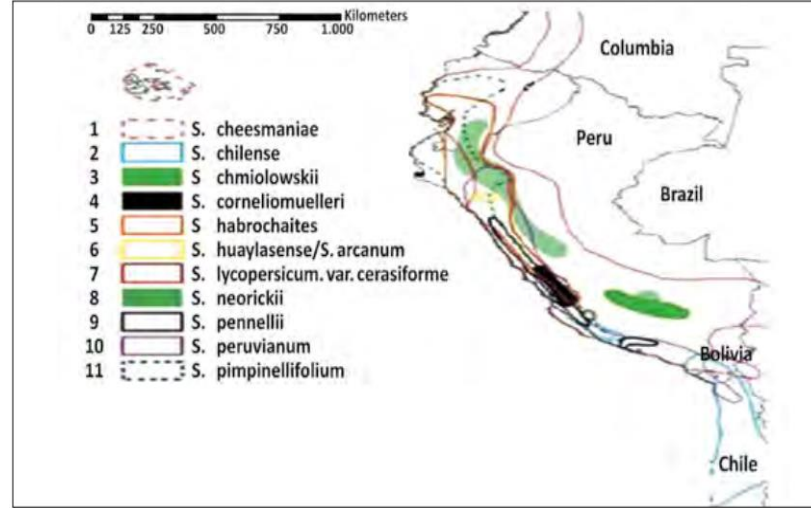
## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Domates (*Solanum lycopersicum* L.), dünya çapında büyük miktarlarda tarımsal üretimi gerçekleştirilen, *Solanaceae* familyasına ait önemli bir sebze türüdür (Peralta ve Spooner, 2005). Domatesin ilk kez kültüre alındığı ve tarımının Meksika veya Peru'da yaşayan yerli kabileleri tarafından Güney Amerika'da yapıldığı bilinmektedir. 16. yüzyılda Avrupa'ya, 18. yüzyılda Kuzey Amerika'ya getirildiği, daha sonra da tüm dünya üzerine yayıldığı kabul edilmektedir (Gould, 1983). Domatesin ucuz, bol vitaminli ve besleyici özellikte olması nedeniyle, dünyanın birçok yöresinde en çok üretilen sebzeler arasında yer almaktadır. Yıllık domates üretim miktarı 2017 yılı verilerine göre en fazla Çin (59.626.900 ton), Hindistan (20.708.000 ton) ve Türkiye'de (12.750.000 ton) yetiştirilmektedir (FAO, 2019). Domates üretimi 2017 yılı verilerine göre ülkemizde 187070 ha alanda 12.750.000 ton ile dünyada 3. sırada yer almaktadır (FAO, 2019). Domates üretiminin ülkelere göre dağılımına baktığımızda Çin ilk sırada yer alırken Özbekistan 9. sırada bulunmaktadır.

Çizelge 2. 1. Dünya'da en çok domates üreten ülkelerin yıllık üretim miktarları

Sayı	Ülke	Üretim milyon ton (MT)
1	 Çin	59.626.900
2	 Hindistan	20.708.000
3	 Türkiye	12.750.000
4	 ABD	10.910.990
5	 Mısır	7.297.108
6	 İran	6.177.290
7	 İtalya	6.015.868
8	 Brezilya	4.230.150
9	 Özbekistan	2.455.125

Kültür domatesinin yabani akrabalarının dağılımı deniz seviyesinden yüksekliğe bağlı olarak ve enlem derecesinden etkilenerek, geniş bir çeşitlilik göstermektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Yabani domates türlerinin Güney Amerika'da coğrafik dağılışı (Moyle, 2008)

Dünyada ve ülkemizde yüksek miktarda üretilen domates insan beslenmesinde oldukça önemli yere sahiptir. Domatesin bileşiminin önemli bir kısmını su oluşturmaktadır. Domatesin bileşiminin tipi, çeşidi, yetiştirme ortamı ve yetiştirildiği bölge gibi faktörlere göre değişiklik gösterebilmektedir (Thakur vd., 1996). Domates örtü altında turfanda olarak yetiştirilebilmesi nedeniyle her mevsimde tüketilebilmektedir. Domates A, B1, B2, C, K vitaminleri, niacin, protein, yağ, karbonhidrat, potasyum, kalsiyum ve demiri içermektedir. Domates taze olarak tüketildiği gibi, salça, domates suyu, konserve, turşu, reçel, ketçap gibi farklı birçok şekilde işlenmiş olarak da kullanılmaktadır (Ekinci, 1972). Domates üretimi, çiftçilerin önemli gelir kaynaklarından birisini oluşturmaktadır. Domatesin yetiştiriciliği özellikle Marmara, Ege ve Akdeniz Bölgeleri'nde fazla yapılmaktadır. Ülkemizin iklim şartlarının uygun olması, domatesi işleyecek sanayinin 1970'li yıllardan itibaren kurulmuş olması, domates yetiştiriciliğine yönelimi hızlandırarak Amerika ve İtalya gibi büyük üreticiler arasına girmemizi sağlamıştır (Vural, 2000). Türkiye'de üretilen yaklaşık 12 milyon ton domatesin %25-30'u işlenmekte, kalan miktarda taze olarak tüketilmektedir. 2018 yılı TÜİK verilerine göre domates üretimi 8.414.920 ton sofralık domates ve 3.735.080 ton işlenmiş domatesten oluşmaktadır (TÜİK, 2019). Domates, ılık ve sıcak iklimlerde yetişen bir bitkidir. Bu nedenle soğuklardan çok zarar görmektedir. Yetiştirildiği dönemde sıcaklık -2, -3 °C'ye düştüğünde bitkiler donarak ölebilmektedir. Domates yetiştiriciliğinde fide ekim döneminde don tehlikesi ortadan kalkmış olmalıdır. Yetiştirildiği yörede 5-6 ay süreyle yetiştiriciliğe uygun iklim olmalıdır. İklim uygunluğu dört aydan daha az

olursa, bitkiden beklenen verim alınmaz. Domateslerde normal bir gelişmenin meydana gelebilmesi için, sıcaklığın en az 16-19°C'lerde olması gerekmekte ve 15-28°C arasında en iyi gelişim görülmektedir. Döllenme en iyi 15-25°C sıcaklık olmakta 15°C'nin altında ve 35°C'nin üzerinde meyve bağlama azalmaktadır. Döllenme hava sıcaklığının 18-21°C, toprak ısısının 21°C'de olduğu şartlarda en iyi sonucu vermiştir. Ancak 30°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda da bitki gelişmesi devam etse de döllenme gerçekleşmemektedir. Çiçekler dökülmekte, meyveler çekirdeksiz ve küçük olmaktadır. Domatesin sıcaklık isteği gelişme dönemine göre farklılık göstermektedir. Ayrıca domates yetiştiriciliğinde gece ile gündüz arasında sıcaklık farkının 6-7°C olması gerekir. Gece-gündüz sıcaklık farkı, meyve bağlamayı olumlu yönde etkilemekte ve olgunlaşan meyvede renk maddeleri oluşumunu sağlamaktadır. Domates yetiştiriciliğinde uzun gün koşullarında salkım sayısı artar ışığın yetersiz olmasıyla gövde incelik ve zayıf kök gelişimi görülmektedir (Sevgican, 1999). Domates derin, geçirgen, su tutma kabiliyeti yüksek, humus ve zengin besin maddelerine sahip tınlı toprakları tercih etmektedir. Erken mahsul almada kumlu ve tınlı topraklar tercih edilmektedir. Sanayi domatesi yetiştiriciliğinde ise tınlı, killi veya killi-tınlı topraklarda daha iyi sonuç vermektedir. Havalanması iyi olmayan soğuk topraklar domates yetiştiriciliğine uygun değildir. Toprak pH'nın 5'den aşağı düşmesi istenmez ve böyle durumda mutlaka kireçleme yapmak gerekir. Domates yetiştiriciliği için en uygun toprak pH'ı 6-6,5 arasında olması istenir en iyi sonuç ise pH 6,5'da alınmaktadır (Anonim, 2006).

## **2.1. Domatesin Önemli Hastalık ve Zararları**

Domates üretiminde fide döneminden hasata kadar geçen dönem arasında fungal, bakteriyel ve viral hastalıklar bitkilerde ciddi ürün kaybına neden olmaktadır. Dünya Gıda ve Tarım Teşkilatı (FAO) tarafından yayınlanan istatistiklere göre her yıl dünya tarım ürünlerinin en az %12'lik bölümü (tarla ve depo koşullarında) patojen mikroorganizmaların neden olduğu bitki hastalıklarından ve %20'lik bölümü de böceklerden dolayı kaybedilmektedir (Agrios, 1997). Bu oran az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerde daha fazladır. Verim ve kaliteyi olumsuz etkileyen biyotik faktörler arasında; patojenler (funguslar, bakteriler, virüsler ve viroidler), zararlı hayvansal organizmalar (böcekler, akarlar, nematodlar, salyangozlar, sümüklü böcekler, kemirgenler, memeliler ve kuşlar) ve yabancı otlar sayılabilir. Hastalık,

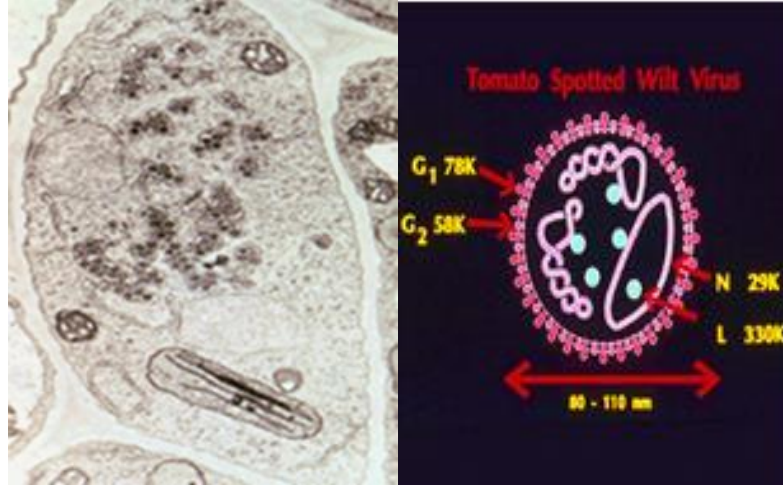
zararlı ve yabancı otlar; kültür bitkilerinde %25-30'a varan ürün kayıplarına neden olmaktadır. Yapılan araştırmalara göre bitki hastalıkları %60-75 oranında fungus ve bakteriler, %10-15 oranında virüs ve viroidler, %10 oranında ise diğer patojenler ve çevresel faktörler tarafından oluşturulmaktadır (Agrios, 1997).

Domateste görülen fungal, viral ve bakteriyel hastalık etmenleri kısaca sıralanmıştır. Domates bitkisinin yetiştirildiği üretim alanlarında görülen önemli fungal hastalık etmenleri; sebze kök çürüklüğü (*Pythium spp.*), mavi küf (*Penicillium spp.*), *Phytophthora parasitica*, geç yanıklık (*Phytophthora infestans*), kök boğazı çürüklüğü (*Rhizoctonia solani*), Phoma çürüklüğü (*Phoma destructiva*), yumuşak çürüklük (*Sclerotinia sclerotiorum*), kök boğazı hastalığı (*Verticillium dahliae*), kök boğazı hastalığı (*Verticillium albo-atrum*), sebzelerde külleme hastalığı (*Erysiphe spp.*), külleme (*Leveillula taurica*), kurşuni küf (*Botrytis cinerea*), yumuşak çürüklük (*Sclerotinia sclerotiorum*), yaprak yanıklığı (*Stemphylium solani*), domateste yaprak küfü (*Cladosporium fulvum*), siyah benek (*Colletotrichum coccodes*), *Alternaria* çürüklüğü (*Alternaria alternata*), erken yanıklık (*Alternaria solani*), yaprak lekesi (*Septoria lycopersici*) ve gövde çürüklüğü hastalığı (*Didymella lycopersici*)'dir (Kırbağ ve Parlak, 1996). Domates bitkisinin yetiştirildiği üretim alanlarında görülen önemli bakteriyel hastalıklar domateste bakteriyel kanser ve solgunluk (*Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*), domates bakteriyel benek (*Pseudomonas syringae pv. tomato*), domates bakteriyel kara leke (*Xanthomonas axonopodis pv. vesicatoria*), domates bakteriyel solgunluk (*Ralstonia solanacearu*), stolbur (*Phytoplasma türleri*), öz (gövde) nekrozu hastalığı (*Pseudomonas corrugata*), pembe göz (*Pseudomonas fluorescens*), domates öz nekrozu (*Pseudomonas viridiflava*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas mediterranea*), bakteriyel yumuşak çürüklük (*Erwinia carotovora subsp. carotovora* ve *Erwinia chrysanthemi*), siyah bacak hastalığı (*Erwinia carotovora subsp. atroseptica*)'dir (Scortichini, 1992). Domates üretim alanlarında görülen en önemli viral hastalık etmenleri; Hıyar mozayik virüsü (*Cucumber mosaic virüs, CMV*), Domates mozayik virüsü (*Tomato mosaic virüs, ToMV*), Patates Y virüsü (*Potato Y virüs, PVY*), Patates X virüsü (*Potato X virüs, PVX*), Domates sarı yaprak kıvrıcılık virüsü (*Tomato yellow leaf curl virüs, TYLCV*), Domates halkalı leke virüsü (*Tomato ring spot virüs, TRSV*) ve *Tomato spotted wilt virüs*'dür (Valizadeh vd., 2011).

Bitki virüsleri, birçok bitki türünde (bahçe bitkileri, süs bitkileri vb.) ürün kalitesini ve miktarını etkileyerek önemli derecede ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Taksonomik olarak bitki virüs vektörlerinin birçok çeşidi bulunmaktadır ve vektörler arasında nematodlar, funguslar artropodlar ve plasmodiophoridler sayılabilmektedir. Birçok bitki virüsünü taşıyan artropod vektörler, yaprak bitleri, beyazsinekler, yaprak pireleri, tripsler, kınkanatlılar, unlubitler, *Miridae* familyası üyesi böcekler ve akarlardır. Saptanan 200 vektör türünden çoğunluğunu oluşturması nedeniyle en yaygın görülen vektör grubu yaprak bitleridir. Yaklaşık 550 virüs türünde %55 yaprak bitleri, %11'i yaprakpireleri, %11'i kınkanatlılar, %9'u beyazsinekler, %7'si nematodlar, %5'i fungus ve plasmophoridler ve %2'si de tripsler, *Miridae* familyası üyesi böcekler, akarlar veya unlubitler ile taşınmaktadır (Andret-Link ve Fuchs, 2005). Bitki virüs hastalıkları dünyada bitkileri ve ürünlerini hastalandırarak önemli verim kayıplarına neden olmaktadır. Bu verim kayıplarında virüsün bitkiden bitkiye taşınması ve taşınma şekli büyük önem taşımaktadır. Örneğin, TSWV süs bitkileri ve sebzelerde bir milyar doların üzerinde bir ürün kaybından sorumludur. (Uhrig vd., 1999; Griep vd., 2000) TSWV, tripsler tarafından taşınmaktadır ve 84 familyaya ait binden fazla sayıda bitki türünü enfekte ettiğinden dolayı bitki virüsleri arasında en geniş konukçuya sahip olan bir virüstür (Parella vd., 2003). Yüz familyaya ait 1090 bitki türünü enfekte etmekte ve ekonomik anlamda ciddi kayıplara neden olmaktadır (Hanssen vd., 2010).

## 2.2. TSWV Sınıflandırılması

Domates lekeli solgunluk virüsü *Bunyaviridae* familyası, *Orthospovirus* cinsi içerisinde yer almaktadır (Uhrig vd., 1999). TSWV, negatif iplikçikli RNA virüslerini içeren tek genusta yer alan ve bitkilerde hastalık yapan etmendir. TSWV, 80-110 nm çapında lipit membran içeren küresel partiküllere sahiptir ve elektronmikroskop ile görülebilecek kadar küçük yapıdadırlar (Şekil 2.2). TSWV partikülü %70 protein, %20 lipit %5 nükleik asit (RNA) ve %5 karbonhidrat içermektedir (Adkins, 2000).



Şekil 2.2. TSWV enfekteli bir bitki hücresinde elektronmikroskopik virion görüntüsü ile TSWV virüs partikülünün genomik yapısı (Moyer vd., 1999)

### 2.3. TSWV Belirtileri

TSWV, tropik ve subtropik bölgelerde birçok bitki türlerinde ve yabancı otlarda enfeksiyon gerçekleştirmektedir (Wilson vd., 2000). TSWV seralarda 41 farklı süs bitkisini enfekte etmektedir (Sherman vd., 1998). TSWV, domates bitkisinde yapraklarda bronz renklenmeler, yapraklarda siyah ve çok küçük lekelenmeler, gövdede siyah çizgi şeklinde lekeler, meyvede klorotik halkalı lekelenmeler, deformasyon, sürgün uçlarından geriye doğru ölüm, bitkide solgunluk ve cücelik oluşumuna bağlı olarak verim ve kaliteyi olumsuz etkilemektedir.

Biberde, bodurluk, sararma, yapraklarda klorotik düzensiz lekeler, mozaik, sürgün ucunda nekrotik çizgiler meydana getirmektedir. Meyvede ise sarı lekeler, halkalanma, nekrotik çizgiler gözlenerek meyve tutumu düşürmektedir. Genç dönemde TSWV enfeksiyonu bitki gelişimini engeller. Bitkide bodurlaşma ve solgunluğa neden olmaktadır. Yapraklarda ise düzensiz ve nekrotik görüntü oluşturmaktadır. Geç dönemde TSWV enfeksiyonu görülen yapraklarda mor renkli damarlanmalar, mordan kahverengine dönen lekeler ve yaprak kenarlarından içe doğru kıvrılmalar görülmektedir (Şevik, 2015).

Marulda TSVV enfeksiyonu yaprakta kahverengi çizgiler şeklinde görülmektedir. İlerleyerek marulun göbek kısmını etkiler ve bitki gelişimini engeller. Tütün bitkilerinde, yapraklarda nekrotik lekeler, nekrotik çizgiler yapraklarda kuruma şeklinde belirtiler oluşmaktadır (Anonymous, 2007). TSWV enfeksiyonu sonucunda

oluşan belirtiler; konukçu bitkinin türü, çeşidi, gelişme dönemi, iklim şartları ve virüs irkına bağlı olarak değişebilmektedir (Adkins, 2000).

#### 2.4. TSWV Ekonomik Önemi

TSWV, kültür ve yabancı bitki türleri arasında geniş bir konukçu aralığına sahip bir virüsdür (Parella vd., 2003). TSWV, bir dizi tıbbi ve esansiyel-yağ taşıyan (aromatik) bitkilerin yanında Kasımpatı (*Chrysanthemum* sp.), Kışniş (*Coriandrum sativum*), Bahçe nanesi (*Mentha piperita*), Kıvrıcık nane (*Mentha spicata*), Kedi nanesi (*Nepeta cataria*), Fesleğen (*Ocimum basilicum*), Adaçayı (*Salvia* sp.), Kediotu (*Valeriana officinalis*) ve Mine çiçeği (*Verbena officinalis*) gibi bazı süs ve sebze bitkilerinde görülmüştür (Dikova, 2011). Pensilvanya'da ticari seralarda süs bitkisi yetiştirilen TSWV ile enfekteli bitkiler kayıt edilmiş daha önceden konukçusu olduğu raporlanmayan bitkilerde TSWV belirtileri tespit edilmiştir (Hausbeck vd., 1992). Yapılan çalışmada camgüzeli ve begonya bitkilerinde %95 enfekteli bulunmuştur. Sıklamen, camgüzeli ve cineraria bitkilerinde çok fazla enfekteli bitkiler tespit edilmiştir.

TSWV, ilk defa 1919 yılında Avustralya'da domatestede görülmüştür. 1920 yılına gelindiğinde, tüm Avustralya bölgelerinde TSWV bulunmuş ve o zamandan beri TSWV dünyanın birçok bölgesine yayılmıştır. 1926 yılında, Hawaii'de ananasda TSWV bulunmuştur. 1935 yılında Kaliforniya'da TSWV, salgın oluşturmuştur. 1938'de ise TSWV ilk defa seralarda yetiştirilen domates bitkilerinde bulunmuştur. Louisiana'da, TSWV ilk olarak 1972'de bulunduktan sonra 1988 yılına gelindiğinde, soya fasulyesinde bitki verimini %25 ile %75 arasında düşürdüğü belirlenmiştir. Florida'da, TSWV ilk olarak 1986 yılında mayıs ve haziran aylarında domates ve yer fıstığında tanımlanmıştır. Güney Georgia ve Kuzey Florida bölgesinde, TSWV 1990 yılında sonbaharda domates bitkilerinde %50'den fazla üretimi etkilemiş ve birçok mahsul için büyük bir tehdit oluşturmuştur. Öte yandan 1999 yılına kadar birkaç tütün alanında TSWV etkisi %50'den fazla artmıştır. Yer fıstığı için, çoğu tarladaki salgın oluşturmuş ve bazı alanlarda %7'yle sınırlı verim kayıpları olurken bazı fıstık ekim alanlarında bu etki %60-90 arasında olmuştur (Kucharek vd., 2000).

Brezilya'da TSWV biber virüsleri içerisinde en çok zarar veren virüslerden biri haline geldiği ve ortalama zararın %49-69 arasında olduğunu rapor etmiştir (Cupertino vd., 1984). TSWV 1940 yıllarında domates üretiminde %75-100 oranında verim kayıplarına neden olduğunu bildirilmiştir (Cho vd., 1989). 1989 yılında ABD ve Kanada'da TSWV, domates ve biberde %100'e varan ürün kayıplarına neden olmuştur (Gitaitis vd., 1998). 1971 yılında Teksas'ta yetiştirilen yer fıstıklarında TSWV bulunduktan sonra 1985 ve 1986'da Teksas'taki bazı yer fıstığı tarlaları TSWV yüzünden tahrip olmuştur. Teksas'ta üretilen yer fıstıklarında TSWV'nin etkisi 1987'den 1989'a kadar fazla belirgin olmadığı bildirilmiştir. Ancak 1990'da bazı yer fıstığı tarlalarındaki TSWV etkisi %50'nin üzerine çıktığı da rapor edilmiştir. Arjantin-Buenos Aires'de ise 1994-1995 yıllarında birçok arazide üreticiler domatesi hasat edememişlerdir. Benzer durum, TSWV enfeksiyonu sebebiyle marul bitkisinde de gözlenirken, biber üretimi ise %40 kayba uğramıştır. 1995-1996 yıllarında TSWV salgını, Buenos Aires ve Mendoza'da çok fazla ürün kayıplarına neden olmuştur (Gracia vd., 1999). 1986-1992 yıllarında ABD-Texas'da TSWV yer fıstığında %95'e oranlarında ürün kaybına neden olduğunu bildirmişlerdir (Hoffman vd., 1998).

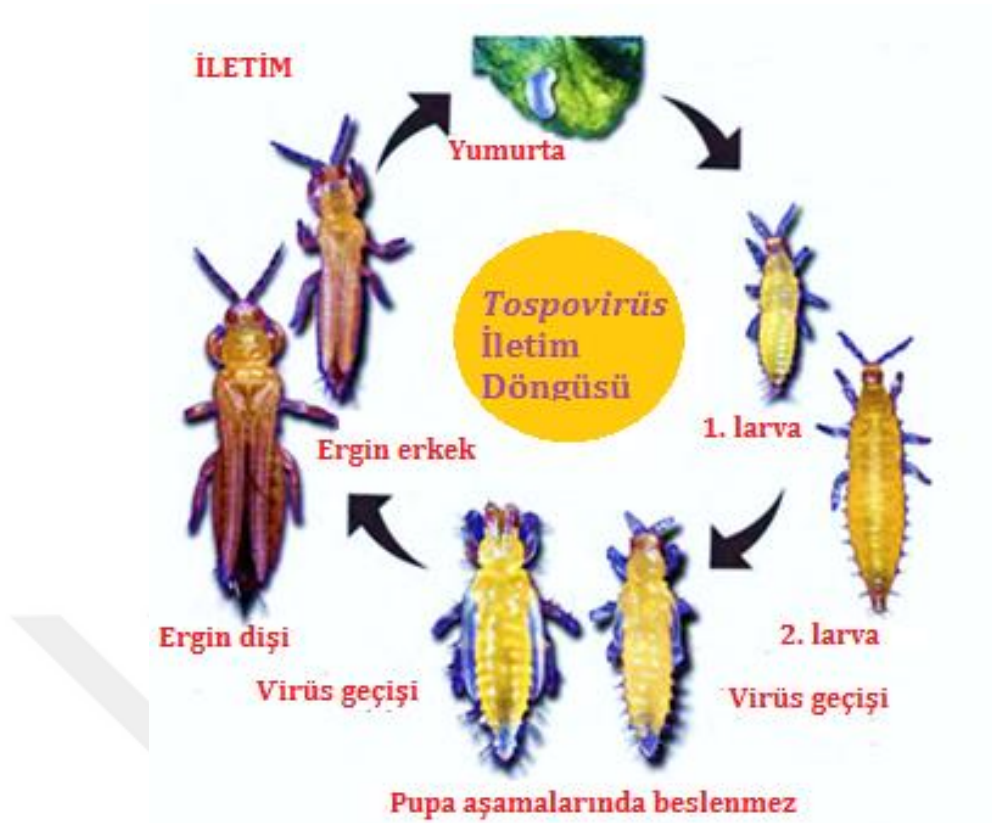
TSWV Georgia'da yerfıstığı, domates, biber ve tütün bitkilerinde üretimi sınırlayan en önemli hastalık etmenidir. Batı çiçek tripsi (*Frankliniella occidentalis*) ve Tütün tripsi (*Frankliniella fusca*) ile hastalık kolayca taşınmaktadır. Georgia'da TSWV kaybının yaklaşık 100 milyon dolar zarar meydana getirdiği bildirilmiştir (Jain vd., 1998). Georgia'da, TSWV belirtisi 1970 yılında tespit edilmiştir, ancak 1983'te arazi çalışma alanlarında bulunamamıştır. 1989'a kadar Güney Georgia'da TSWV, tütün, yer fıstığı ve domateste ciddi bir sorun haline gelmiştir. 1990 yılında, tütün yetiştirilen bazı alanlar TSWV salgını nedeniyle toprak sürülmüştür. TSWV'nin, 1997 yılında ABD-Georgia'da domateste yaklaşık 44 milyon dolar, biber, tütün ve yerfıstığında yaklaşık 100 milyon dolar ürün kaybına neden olduğunu bildirmişlerdir (Riley ve Pappu, 2000). 1999-2000 yıllarında Kenya'da TSWV, domateslerde %80 oranlarında verim kayıplarına yol açmıştır (Wangai vd., 2001). Ülkemizde TSWV, Samsun ilinde domateste %42,1 oranında ürün kaybına neden olmakta %95,5 oranında pazarlanabilir değerini düşürmektedir (Şevik ve Arli-Sokmen, 2012).



## 2.5. TSWV Taşınması

TSWV, birçok ülkede başta domates, biber, tütün, marul, patates, süs bitkileri olmak üzere birçok kültür bitkisinde tespit edilmiştir. TSWV, mekaniksel olarak ve tripslerle taşınmaktadır. Bitki virüsleri aşı, tohum veya böcek, akar, nematod gibi vektörler tarafından bitkilere yayılmaktadır (Raccah ve Fereres, 2009). Taşınma; kök kaynaşması, tohum ve polen ile olmamaktadır (Küçük, 2006). TSWV, bazı bitki tohumlarında, tohum kabuğunda düşük oranda taşınmaktadır. Bu yüzden TSWV'nin epidemiyolojisinde tohumla taşınma pek önemli değildir. TSWV, %1 gibi düşük bir oranla domates tohumuyla taşındığı bildirilmiştir (Le, 1970). Ayrıca, virüs yer fıstığı tohumları kabuğunda belirlenmesine rağmen tohumla taşınıp taşınmadığı bilinmemektedir (Bailey, 2003).

TSWV, *Thysanoptera* takımı *Thripidae* familyası içinde yer alan 3 cinse (*Trips*, *Frankliniella*, *Scirtotrips*) ait 9 trips türü ile sirkülatif ve propagatif olarak taşınmaktadır (Şevik, 2015). Bunlar arasında Soğan tripsi (*T. tabaci* Lindeman), Batı çiçek tripsi (*F. occidentalis* Pergande), Çiçek tripsi (*F. intonsa* Trybom), Tütün tripsi (*F. fusca* Hinds), Pamuk tripsi (*F. schultzei* Trybom), Soya fasulyesi tripsi (*T. Setosus* Moulton), Kavun tripsi (*T. palmi* Karny), Florida çiçek tripsi (*F. bisipinosa* Morgan) ve Biber tripsi (*S. dorsalis* Hood) yer almaktadır (Krisha-Kumar vd., 1993). Tripsler gelişmelerini 4 evrede tamamlamaktadır (Şekil 2.3). Bu evreler yumurta, larva, pupa ve ergin evreleridir. İlk larva yumurtadan 7 gün sonra çıkar. 6–7 gün beslendikten sonra pupa dönemine girerler. Pupa dönemi yaklaşık 3–4 gün sürerken, pupadan çıktıktan sonra ergin döneme giren tripsler beslenmeye devam ederler. Erginin yaşam süresi ortam sıcaklığına bağlı 20 ile 40 gün arasında değişmektedir. Optimum sıcaklık isteği 25–27°C ve nem isteği %70'dir (Şevik, 2007). TSWV'nin vektörde replikasyonu orta bağırsak ve salgı kanalları olmak üzere 2 aşamada gerçekleşmektedir (German vd., 1992).



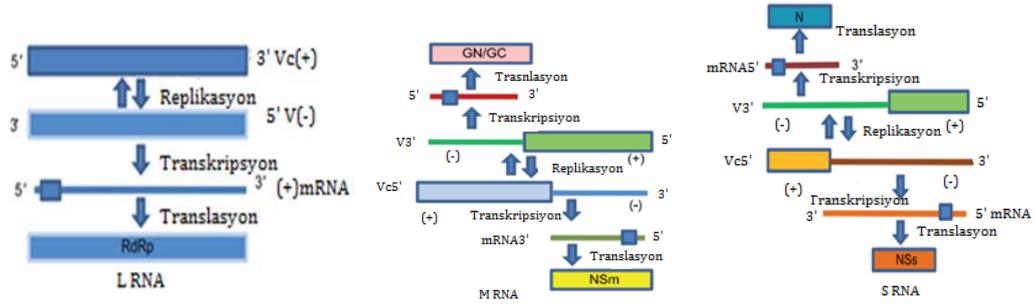
Şekil 2.3. Trips yaşam döngüsünün ve *Orthotospovirus* iletiminin grafiksel gösterimi (Whitfield vd., 2005)

Virüsün taşınabilmesi için vektör virüsü larva döneminde almalı ve pupa devresine girmeden önce virüs partiküllerinin salgı kanalları vasıtasıyla ortakanal epitel hücrelerini ve orta bağırsak kaslarını geçmeleri gerekmektedir. Tripsler, larva döneminde virüsü bünyesine alabilmeleri için, yaprak epidermal hücrelerinde 15-30 dakikalık yüzeysel beslenmeleri gerekmektedir. Bu durum, *T. tabaci* için en az 15 dakikalık bir sürede gerçekleşmekte ve beslenme süresi ne kadar uzarsa, virüsün taşınma etkisi daha da artmaktadır (Wijkamp ve Peters, 1993). Trips bünyesine alınan virüs, türe bağlı olarak 3–10 gün arası bir latent periyoda sahiptir. Trips virüsü aldıktan sonra, en çok 22–30 günde hastalığı taşıyabilmektedir. Tripsler virüsü bir kez kazandıktan sonra yaşam süresi boyunca virüsü taşıyabilmektedir (Nagata vd., 2002). Ancak virüs partikülleri vektör yumurtasına geçmemektedir (Wijkamp vd., 1996).

## 2.6. TSWV Genom Yapısı

TSWV, negatif iplikçikden oluşan RNA genomlu ve zarfı yapıya sahip bir virüsdür. Negatif iplikçikli RNA virüsleri ayrıca antisens iplikçikli RNA virüsleri olarak da bilinir. "Negatif iplikçikli virüs" terimi, viral genom segmentleri tarafından benimsenen kodlama stratejisinden türetilmiştir. Negatif iplikçikli RNA virüslerinin RNA molekülleri, mRNA görevi yapamadığından ilk olarak negatif RNA iplikçiğinden pozitif kodlayıcı RNA iplikçiği kopyalanır. Bu nedenle, amplifikasyon döngüsü sırasında negatif iplikçikli RNA virüslerinde, transkripsiyon ilk adımdır (Van knippenberg, 2005). Bunu yapabilmek için de virüs partikülünün içindeki viral polimerazı da taşımaktadır (Van Poelwijk vd., 1993). *Orthospovirus*'ler negatif iplikçikli RNA virüsleri grubu içinde, ambisense virüsleri denilen farklı bir alt grubu oluşturulur. Bunlar, hem pozitif hem de negatif iplikçikten protein sentezleyebilen çift kutuplu, en az bir genom segmentine sahiptir. TSWV genomu 3 gruba ayrılır. Bunlardan L RNA; 8,9 kb, M RNA; 4,9 kb S RNA; 2,9 kb (-) sens ve ambisens ssRNA molekülünden oluşmaktadır (Kaye vd., 2011) (Şekil 2.4).

M RNA ve S RNA stabil hairpin yapısı oluşturan A-U bakımından zengin intergenik bölgelere (IGR) sahiptir (de Haan vd., 1990). TSWV M ve S RNA'ların saç tokası yapılarının tepesinde bulunan korunmuş bir dizi, ambisens RNA segmentleri içindeki açık okuma çerçevelerinin (ORF'ler) transkripsiyon sonlandırılması için sinyal görevi yapmaktadır (de Haan vd., 1990). M RNA'sının IGR'si, S RNA'sının IGR'sine kıyasla daha küçüktür (Bhatt vd., 1999). Her genomik RNA segmentinin 5' ve 3' terminal 8 nükleotitleri (nt) herbiri korunmuş ve tamamlayıcı 5'-AGAGCAAU ve 3'-UCUCGUUA dizilerden oluşmaktadır. Virüs partiküllerinin oluşumu için ilk önce ribonükleoproteinlerin (RNP'ler) meydana gelmesi gerekmektedir. Bu RNP'ler, viral genomik RNA, N proteini ve L proteininin birkaç kopyasının içeren komplekslerdir (Elliott, 1990). Oluşturulan RNP'ler, virüs tarafından kodlanan glikoproteinleri içeren bir lipid membran zarfı içine alınmaktadır. RNP'ler TSWV'nin partüküllerinin oluşumunda hem yapısal ve düzenleyici rolüyle viral replikasyona yardımcı olmaktadır (Kainz vd., 2004). Viral genom, toplam altı olgun proteini kodlayan beş açık okuma çerçevesi (ORF) içermektedir.



Şekil 2.4. TSWV genomuna ait L, M, S segmentlerinin replikasyon stratejisi (de Aliva, 1992)

### 2.6.1. L RNA segmenti

L RNA 8,9 kb uzunluğunda negatif iplikçikli en büyük RNA segmentidir. L RNA monosistronik olup 331 kDa büyüklüğünde bir RNA-dependent-RNA polimerase (RdRp) proteini (L) kodlamaktadır (Adkins, 2000). L RNA replikasyon ilişkili aktiviteleri içeren çok işlevli RNA'ya bağlı RNA polimeraz (RdRp) veya L proteini kodlamakta ve konukçu tarafından kodlanan bazı faktörlerle iş birliği içinde çalıştığı düşünülmektedir (de Haan vd., 1991). Bu 330-kDa L proteini, transkriptaz, replikaz, helikaz, metiltransferaz ve endonükleaz gibi çeşitli enzimatik aktivitelere sahiptir (Adkins vd., 1995). RNA virüsleri, polimerazlarının proofreading okuma kabiliyetinin yetersizliği nedeniyle son derece yüksek mutasyon oranları göstermektedir (Moya vd., 2000). *Orthotospovirus*, hem negatif hem de ambisens kodlama stratejilerine sahip olduğundan, RNA'ya bağlı RNA polimerazın, yeni enfekte olmuş hücrelerde transkripsiyon ve replikasyonun oluşması için viral RNA ile birlikte taşınması gerekir (Soellick vd., 2000).

### 2.6.2. M RNA segmenti

M RNA, 4,9 kb büyüklüğünde ambisens RNA segmentidir. M RNA viral sense 33,6 kDa'luk NSm'yi ve viral komplementer sense de 127,4 kDa'luk membran glikoproteinleri G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>'yi kodlamaktadır. NSm zarf oluşturmamış virion olan ribonükleokapsit yapıların hücreden hücreye geçişini sağlayan hareket proteini görevi yapmaktadır (Storms vd., 1995). NSm bitki protoplastlarda tübül oluşumunun uyarılmasını sağlayarak virüsün bitki hücrelerinde hücreler arası bağlantı olan plasmodesmata yoluyla taşınmasını kolaylaştırır (Griffiths vd., 1992). NSm'nin heterolog ekspresyonu bu proteinin üretildiği trips dokusunda ve böcek (*Spodoptera*

*frugiperda*) hücrelerinin yüzeyinde benzer tübüller oluşturmaktadır. NSm proteini *E. coli*'deki üretilerek NSm proteininin protein-protein ve protein-RNA etkileşimlerini in vitro koşullarda araştırılarak proteinin fonksiyonunun moleküler temeli ortaya konulmuştur. NSm'nin spesifik olarak TSWV N proteini ile etkileşime girerek ve sekansa özgü olmayan bir şekilde tek iplikli RNA'yı bağlandığı belirlenmiştir. G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub> proteinleri, viral nükleokapsidlerle etkileşimi ve tomurcuklanmanın başlamasını kolaylaştırmak için taşıma yoluyla belirli bir hücrel membranda bağımsız olarak birirmektedir (Stephens ve Compans, 1988).

### 2.6.3. S RNA segmenti

S RNA 2,9 kb büyüklüğünde ambisens RNA segmentidir. S RNA 5' ucuna yakın viral (v) sens de 52,4 kDa büyüklüğünde yapısal olmayan (NSs) proteini ve 29 kDa büyüklüğünde viral komplementary (vc) sens'de N (Nükleokapsid) proteini kodlanmaktadır. NSs proteini, 1,7 kb'lık viral sens subgenomik RNA'dan sentezlenir. N proteini ise 1,2 kb'lık viral komplementary sens subgenomik RNA'dan sentezlenir. NSs proteini S RNA susturma mekanizmasının supresörü olarak görev yapmaktadır ve virüs enfekteli trips hücrelerinde kristal benzeri yapıları oluşturmaktadırlar. Virüs bitkinin post-transkripsiyonel gen sessizliğinin (PTGS) anti-viral tepkisine karşı korunmasını sağlar ve ayrıca TSWV ile enfekte olmuş bitkilerde simptom ifadesini etkilemektedir. TSWV NSs proteini negatif zincirli RNA virüslerinde tanımlanan ilk RNA susturma mekanizması supresörüdür. Bu protein, sense transgenine bağlı PTGS'yi baskılamıştır ama tersine çevrilmiş tekrarlanan transgenlere bağlı PTGS'yi baskılayamamıştır (Takeda vd., 2002).

### 2.7. TSWV Mücadelesi

Domates yetiştiriciliğinde domates lekeli solgunluk virüsü mücadelesi için 3 yöntem kullanılmaktadır. Bunlar kültürel, biyolojik, kimyasal ve vektörlerle mücadeledir.

Domateste kültürel mücadelede fidelerin dikimi ve bakım işlemlerinden önce ellerin bol sabun ve suyla yıkanıp çalışma süresince hijyen kurallarına dikkat edilmesi gerekir. Ayrıca sanitasyon uygulaması yapılmalıdır. Domates bitkileri, virüslerin konukçusu olan diğer bitkilerin yakınında yetiştirilmemelidir. Hastalıklı bitkiler

sökülerek tarladan uzaklaştırılmalı ve imha edilmelidir. TSWV'nin konukçusu olmayan bitki türleriyle en az 2 yıllık ekim nöbeti uygulanmalıdır. TSWV yayılmasında en önemli vektör tripslerdir. TSWV'nin diğer bitkilere tripslerle taşınması kolaylıkla gerçekleşmektedir. Trips vektörlere konukçuluk eden yabancı otların, fidelik, sera veya arazide ortadan kaldırılması gerekmektedir. Seralarda, tripsleri cezbedici etkiye sahip sarı ve mavi yapışkan tuzakların kullanılması da trips popülasyonunu azaltmada yaygın olarak kullanılmaktadır. Sarı veya mavi parlak bir levha ve bunun üzerine yapışkan madde sürülerek bitkilerin arasına yerleştirilmesi tripsle mücadeleye etkili olmaktadır. Bu şekilde trips popülasyonu ve TSWV enfeksiyonu azalmaktadır. Özellikle mavi çekici levhaların daha etkili olduğu belirtilmekte, bir tarafı mavi, diğer tarafı sarı levhalar diğer bazı zararlıları da çektikleri için tercih edilmektedir. Tripsleri çekmede hekzan içinde çözülmüş verbenone da kullanılmaktadır. Virüs vektörlerinin seraya girişi engellenmelidir. Seralarda kapı, pencere gibi doğal açıklıklarının kapatılmalıdır. Azotlu gübreler hastalıklara karşı duyarlılığı arttırdığı için dengeli ve ihtiyaca uygun gübreleme yapılmalıdır. Ultraviyole ışınları yansıtan alüminyum malçların kullanımı TSWV'nin primer enfeksiyonu azaltılmaktadır (Şevik, 2015).

Greenough vd. (1990), yaptıkları bir çalışmada, domates, biber ve tütün bitkilerinde plastik film malç kullanarak tripslerin ortamdan uzaklaştırması ile TSWV'nin etkinliği arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Domates yetiştirilen alüminyum yüzeyli plastik malçlı alanda %68 trips sayısı azalırken TSWV yoğunluğu da %64 azalmıştır. Biber yetiştirilen plastik malçlı alanda %60 trips sayısı azalırken TSWV yoğunluğu da %78 azalmıştır. Domates, biber ve tütünün birarada yetiştirildiği plastik malçlı alanda TSWV'nin yoğunluğu %60, trips sayısında %33 oranında azalma gözlenmiştir. 2000-2002 yılları arasında ABD-Florida'da yapılan bir başka çalışmada ise UV yansıtan malçların, her 3 yılda da trips kolonizasyonunu ve TSWV yoğunluğunu azalttığı belirlenmiştir (Momol vd., 2004). Kuzey Florida ve Güney Georgia'da domateslerin ana hastalıklarından birisi oldan TSWV kontrolü için virüsün ana vektörü olan Batı çiçek tripsi kontrolünde insektisit kullanımı bu hastalığın önlenmesinde etkili olmadığı, ayrıca insektisitler üreticiler için toksik ve pahalı olması nedeniyle entegre mücadelede de kullanılmadığı belirtilmiştir. TSWV'nin önlenmesinde UV'yi yansıtan malç örtüler, actigard gibi malzemelerin kombine ve ayrı kullanılması durumunda Actigard ve standart malç örtülerin

hastalığın azalmasında etkili olduğu, ancak metal malçlarla actigard uygulamasının etkili olmadığını gözlediklerini bildirmişlerdir. Spinosad, methamidophos kadar etkili bulunup özellikle hastalığın orta ve geç sezonlarında hastalığın yayılmasını azalttığı, metal malçların, actigard ve insektisitlerin beraber kullanılması TSWV'nin %76 kadar yayılmasını azalttığı belirtilmiştir (Momol vd., 2002).

Bitki patojeni virüsleri morfolojik yapıları, enfeksiyon öncesi taşınma mekanizmaları, enfeksiyon mekanizmaları, bitki içerisinde çoğalma ve yayılma yollarının kendine has özellikler taşımasından dolayı kimyasal mücadelesi mümkün olmamaktadır. Tripsler ile kimyasal mücadelede, insektisitler (pythrethroidler, carbamatlılar, klorlanmış hidrokarbonlar, organik fosforular) gerekli dozlarda kullanılabilir. Kontakt insektisitler tripslerin bitkide yerleştiği yere genellikle ulaşmaz, sistemik insektisitler ise virüs taşınmasını yeterince önleyecek hızda etki etmemektedir. Bu şekilde yapılan kimyasal uygulamalar ile trips popülasyonu azaltılarak virüsün yayılması engellenebilmektedir. Ayrıca predatör akar *Neoseiulus cucumeri*, ve predatör böcek *Orius spp.* türleri tripslere karşı biyolojik mücadelede başarıyla kullanılmaktadır (Anonymous, 2007).

## **2.8. TSWV'ne Dayanıklılık**

Günümüzde TSWV'ye karşı mücadelede en etkili yöntem dayanıklı veya toleran çeşitler kullanmaktır. TSWV'ye dayanıklı domates hibritlerinin kullanımı, virüsün oluşturacağı ekonomik kayıpların önüne geçilmesini sağlamaktadır. *Orthospovirus*'lere dayanıklılığı sağlayan virüsten kaynaklanan genleri içeren genetiği değiştirilmiş (transgenik) bitki geliştirilmiştir (Çandar ve Erkan 2011). *Orthospovirus*'lere karşı geliştirilmiş dayanıklı transgenik bitki türleri içinde krizantem, yerbıstığı, tütün ve domates yer almaktadır. Ancak transgenik bitkiler bugüne kadar bunlar ticari olarak yetiştirilememişlerdir. Tarla ve bahçe bitkilerinde *Orthospovirus*'lere karşı doğal dayanıklılık bulunmaktadır. Buna rağmen konukçu dayanıklılığını kıran virüs izolatlarının hızla ortaya çıktığı görülmüştür.

## 2.9. Bitkilerde R Dayanıklılık Geni Mekanizması

Bitkilerin dayanıklılık genlerinin patojenlere karşı aktive ettikleri savunma mekanizmaları birbirlerine benzemekte ve bu genle virüs, bakteri, fungus, nematod gibi etmenleri kontrol etmektedirler. Dayanıklılık genlerinin aktive ettiği savunma mekanizmaları patogeneze ilişkili (pathogenesis-related:PR) proteinler, reaktif süperoksitlerin oluşumu, konukçu hücre duvarının güçlendirilmesi, antimikrobiyal maddelerin oluşturulması gibi genel savunma mekanizmaları ve hipersensitif reaksiyonlar (hypersensitive response:HR) gibi patojene özelleşmiş gene-gen etkileşimine dayalı R genleri tarafından düzenlenen savunma mekanizmalarıdır.

Bitki dayanıklılık (R) proteinleri domain adında özel alanlardan oluşmaktadır. Biyokimyasal fonksiyonlarına göre R genleri 3 sınıfta toplanırlar. Birinci sınıf R genleri nükleotidlerin bağlandığı yer (nucleotidebinding site: NBS) ve leucine amino asidince zengin tekrarların bulunduğu (leucine-rich repeats: LRR) protein motiflerini içerir (Dangl ve Jones, 2001). NBS-LRR grubu proteinler farklı patojenlere karşı dayanıklılık sağlar. Bu proteinlerin amino ucuna (N-ucu) göre NBS-LRR grubu 2 alt gruba ayrılır. İkincil alt grupta CC-NBS-LRR tip proteinler bulunur. NBS-LRR proteinlerin N-ucuna protein domaini (coiled-coil: CC) bağlanır (Bent vd., 1994). Bitki R genlerinin yapısal olarak farklılaşması, patojenlerdeki Avr genlerinin çok çeşitli olması ve konukçu patojenden gelen Avr proteinlerini tanımlayarak R genin kontrol ettiği savunma mekanizmasını aktif hale getirmektedir (Meyers vd., 2005).

*Sw-5* “gen karşı gen” hipotezine göre TSWV dayanıklılık sağlayan dominant bir genidir. TSWV’de bitkideki *Sw-5* dayanıklılık geni tarafından tanınan bir Avr geni bulunmalıdır. Virüsler sadece (hücre içi) R proteinleri tarafından algılanmaktadır. Genellikle tek bir viral protein Avr, R geni aracılığıyla dayanıklılığın tetiklemesinden sorumludur (Hallwass vd., 2014). *Sw-5* geni bazlı dayanıklılık için, TSWV'nin yapısal olmayan hücreden hücreye hareketi proteini, NSm, Avr faktörü olarak tanımlanmıştır (Hallwass vd., 2014). R gen ürünü konukçuda Avr genini tanımakta ve bu proteindeki değişiklikleri algılayabilmektedir. Konukçu R proteinleri sahip olduğu hedef Avr proteinleri ve bunların fonksiyonlarını devamlı olarak izlemektedir. Patojenin Avr proteinleri konukçu hücrelerine girip hedef proteinleri tanımlar. R proteini savunma mekanizmasını aktif hale getirir ve dayanıklılığı oluşturur



(Van der Biezen ve Jones, 1998). Dayanıklılık genleri Avr proteinlerini tanıyarak savunma sinyali oluşturur. Dayanıklılık sürecini başlamaktadır. *Sw-5* geni konukçuda sistemik enfeksiyonları engelleyen enfeksiyon bölgelerinde HR tetiklenmesinden sorumludur. Patojenle ilişkili proteinler tarafından oluşturulan savunma tepkisi, saldırı bölgesindeki hücrelerde hızlı nekrozların görülmesini sağlar (Çetin, 2014). HR'da patojen ile temasa geçen konukçu hücre ve bu hücreyi çevreleyen komşu hücreler ölürek nekrotik lekeler şeklinde kurumaya yol açar (Mansfield, 1986). HR ile hücre duvarlarında değişimler, kalloz, fenolik polimerler, lignin, süberin, hidroksi proline zengin glikoproteinler ve antimikrobiyal bileşikler, fitoaleksinler sentezlenmekte ve enfeksiyon noktalarına lokalize olmaktadır. Bitki patojene karşı oluşturduğu tepkiyle, patojenin çoğalmasını ve yayılmasını engellemektedir. İkincil enfeksiyon durumundan da kendini koruyabilmektedir (Crute vd., 1985).

## **2.10. TSWV *Sw-5* Dayanıklılık Geni**

Bir bitkinin patojen enfeksiyonunu, etmenin çoğalmasını, hastalık gelişimini ve yayılmasını engellemesine “dayanıklılık” denilmektedir. Bu tür bitkilere dayanıklı bitki, patojenlere ise avirüent patojen denilmektedir. TSWV ekonomik açıdan önemli bir virüs olup buna karşı çeşitli dayanıklılık geliştirme yöntemleri araştırılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda yabani domates türlerinde bulunan *Sw-5* R genine bağlı dayanıklılık virüsün mücadelesinde etkin olarak kullanılmaktadır.

Domateste *Sw-5* ve biberde *Tsw* olmak üzere iki adet dominant genin TSWV'ne karşı dayanıklılık kazandırdığı belirlenmiştir (Stevens vd., 1991). *Sw-5*, birden fazla *Orthospovirus*'e karşı dayanıklılığı nedeniyle domates ıslahında en yaygın şekilde kullanılan TSWV dayanıklılık genidir (Stevens vd., 1992, 1994, 1995). Stevens vd. (1995), *Sw-5* genini taşıyan bitkilere hastalık etmeni TSWV'nin mekanik inokulasyonu yapıldığında bu bitkilerin hastalığa karşı dayanıklı oldukları tespit edilmiştir. Şimdiye kadar, TSWV dayanıklılığı için birkaç gen (*Sw-1a*, *Sw-1b*, *Sw-2*, *Sw-3*, *Sw-4*, *Sw-5*, *Sw-6* ve *Sw-7*) bildirilmiştir (Finlay 1953; Price vd., 2007). *Sw-2*, *Sw-3* ve *Sw-4* resesif genleri ve *Sw-1a* ile *Sw-1b* dominant dayanıklı genleri domateste ticari olarak kullanılmamıştır (Price vd., 2007). Ancak sadece *Sw-5b* geninin TSWV'ye karşı dayanıklılık kazandırmada gerekli ve yeterli olduğu belirlenmiştir (Spasova vd., 2001). *Sw-6* geni ise tripsle TSWV inokulasyonuna

karşı kısmi dayanıklılık kazandırdığı ve bu dayanıklılığın *Sw-5* genine göre daha az bir viral izolat grubuna karşı olduğu dolayısıyla daha dar bir aralık gösterdiği belirlenmiştir (Rosello vd., 1998, 2001). *Sw-5a* ve *Sw-5b* geni, sırasıyla 1245 ve 1246 amino asitten oluşan proteinleri kodlamaktadır. (Salmeron vd., 1994). *Sw-5* geninin moleküler yapısı büyük oranda domateste nematodu ve yaprak bitine karşı dayanıklılık sağlayan *Mi* genine ve daha az oranda ise *Pseudomonas syringae*'ye karşı dayanıklılık kazandıran domates *Pto* genine benzediği rapor edilmiştir (Spasova vd., 2001). *Sw-5* lokusu domates genomunda genetik haritalama ve kromozom yürüme (chromosome walking) yöntemleri kullanılarak klonlanmıştır. *Sw-5* geninin, domatesin 9. kromozomun telomerine çok yakın bölgesinde yer aldığı, RFLP markörleri CT220 ve CT71'nin yakınında ve bu markörlerle sıkı bir şekilde bağlantılı olduğu bulunmuştur. *Solanaceae* familyasının diğer üyelerinde ve domatesin yakın akraba türlerinde *Sw-5* geni kromozom 9'un diğer bölgelerinde veya kromozom 12'de yer aldığı bildirilmiştir (Garland vd., 2005). Tüm *Sw-5* genleri, CC (sarmal bobin) -NB (nükleotid bağlanması)-ARC (adaptör APAF-1, R proteinleri ve CED-4 arasında paylaşılmış) -LRR (lösün bakımından zengin tekrar) bölgeleri (domainleri) içermektedir (Meyers vd., 2003). Domates *Sw-5b* geni, günümüzde SD-CNL sınıfı olarak da bilinen *Solanaceae* domain (SD) -coiled-coil (CC) N-terminali ile NB-LRR reseptör protein ailesinin bir üyesini kodlamaktadır (de Oliveira vd., 2016).

## 2.11. TSWV'ne Karşı *Sw-5* Gen Dayanıklılığının Belirlenmesi

Domates ve yabani akrabalarında yapılan ilk çalışmalarda, hastalık etmeni virüsün bazı izolatlarına karşı *S. esculentum* ve *S. pimpinellifolium*'un genetik dayanıklılığa sahip olabileceği görülmüştür (Finlay, 1953). Dayanıklılığın varlığı *S. hirsutum*, *S. chilense* ve *S. peruvianum*' da da rapor edilmiştir. Ancak bunların içinde en etkili genetik dayanıklılık kaynağı *S. peruvianum* olarak tespit edilmiş ve farklı yerlerden toplanmış birçok biyotipi, TSWV'ye dayanıklılık göstermiştir (Paterson vd., 1989). *Sw-5* geni, birçok ülkede hastalığın farklı izolatlarına karşı dayanıklılık kaynağı olarak ticari çeşitlerin geliştirilmesinde kullanılmıştır. Virüs izolatları yerler arasında değişiklik göstermekte ve bir bölgedeki virüse dayanıklı bir çeşit diğer yerde virüs izolatlarına duyarlı olabilmektedir (Finlay, 1953). Polonya'daki *S. glandulosum*'un (Czuber ve Miczynski, 1981) ve bazı *S. peruvianum* çeşitlerinin Avustralya (Hutton

ve Peak, 1953) ve Polonya'da TSWV'ye dayanıklı olduğu bildirilmiştir. Güney Amerika'dan gelen yabancı domates çeşitleri büyük öneme sahip olmaktadır ve *S. peruvianum*, *S. chilense*, *S. hirsutum*, *S. pimpinellifolium*'un birçok dayanıklı ve duyarlı çeşitleri belirlenmiştir (Kumar ve Irulappan, 1991a, b, c). *S. chilense*'den (LA 1938) türetilen *S. esculentum* hattının Hawaii, Florida, Georgia ve Güney Afrika koşullarında TSWV'ye oldukça dayanıklı olduğu bulunmuştur. *Sw-5* geni, birçok coğrafi bölgeden TSWV izolatlarına ve hatta TCSV ve GRSV *Orthospovirus* üne karşı geniş dayanıklılık sağlamaktadır (Boiteux ve Giordano, 1993). TSWV'üne karşı dayanıklılık kaynaklarının belirlenmesi amacıyla yedi farklı *Lycopersicon* türünden 188 farklı genotip klasik testlemeye tabi tutulmuştur. Yapılan testlemeler sonucunda *S. cheesmanii*, *S. chimielewskii*, *S. hirsutum*, *S. parviflorum* ve *S. pennellii* türlerinde herhangi bir dayanıklılık kaynağı tespit edilememiştir. Ancak *S. peruvianum* türüne ait bazı genotiplerin TSWV'ye karşı dayanıklı olduğu belirlenmiş ve *S. chilense*'ye ait genotiplerin bazılarında da testlemede kullanılan bazı TSWV izolatlarına karşı dayanıklılık bulunduğu saptanmıştır (Stevens vd., 1994). Farklı dayanıklılık kaynaklarının bulunması amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada *S. peruvianum*'dan türetilmiş üç adet *S. esculentum* saf hattında (RDD, UPV1 ve UPV32) hastalığa karşı dayanıklılığın mekanik inokulasyon ile oluşup oluşmadığı araştırılmıştır. Çalışmada *Sw-5* genini ihtiva eden RDD ve diğer 2 hat hem mekanik inokulasyon hem de *F.occidentalis* ile inokule edilmiştir. Her 3 hat mekanik inokulasyon metodu ile yapılan testlemede dayanıklı çıkmıştır. RDD ve UPV1 trips inokulasyonu sonucunda da dayanıklı çıkmış ancak UPV32 kısmi bir dayanıklılık göstermiştir. Sonuç olarak *Sw-5* geninin dayanıklılığı izolatın agresifliğine göre değiştiği ve dayanıklılığı tam olarak garanti etmediği rapor edilmiştir (Rosello vd., 1997). Dört gerbera bitkisi TSWV'ye dayanıklılık geni içeren genleri transfer edilerek virüse karşı olan dayanıklılığı gözlemlendiğini belirtmiştir. Bu çalışmada 33 transgenik bitkiden 16 tanesi PCR ile taranmış ve serada fenotipik özellikleri gözlemlendiği bildirilmiştir. TSWV ile mekanik inokulasyondan 2-4 hafta sonra kontrol bitkilerinde virüsün tipik semptomlarının gözlemlendiği, transgenik bitkilerde ise herhangi bir hastalık semptomu görülmediği rapor edilmiştir. Transgenik olan ve olmayan bitkilerden arasında fiziksel olarak herhangi bir farklılık gözlenmediği bildirilmiştir (Korbin, 2005).

Son zamanlarda, 105 tane *Solanum* (*Lycopersicum*: *Solanaceae*) *Tomato spotted wilt virus*, *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Chrysanthemum stem necrosis virüs* (CSNV) ve *Groundnut ringspot virus* (GRSV) izolatlarına karşı reaksiyonları açısından değerlendirilmiştir (Dianese vd., 2011). *S. peruvianum* çeşitlerine geniş spektrumlu dayanıklılık gösteren *Orthospovirus*'ler bulunmuştur. Bunlar *S. pimpinellifolium*, *S. chilense*, *S. arcanum*, *S. habrochaites*, *S. corneliomuelleri* ve *S. lycopersicum*'dur. TSWV NSm geni, *Sw-5b*'in *Nicotiana benthamiana* transforme edilmiş ve *Sw-5*'e dayanıklı domateste HR'yi uyararak, *Sw-5b*'nin avirülens determinantı olarak tanımlanmıştır. TSWV, NSm proteininin *Sw-5* domates veya *Sw-5* transgenik *N. benthamiana* yapraklarındaki geçici ifadesi, HR yol açmıştır (Hallwass vd., 2014). 1969'da Opoka, TSWV'ye tamamen dayanıklı olan yabancı bir tütün türü olan *N. alata*'yı bildirmiştir. TSWV'ye dayanıklılık kazandıran lokus, bundan sonra RTSW olarak anılmıştır, *N. otophora* kullanılarak kültürlenmiş tütüne girilerek "Polalta" ıslah hattı elde edilmiştir. *N. tabacum*×*Polalta* melezlenmesinden türetilen F2 popülasyonunun segregasyon oranı, RTSW'nin TSWV'ye dayanıklılık kazandıran tek bir dominant gen olduğunu göstermektedir. TSWV'nin NSm proteininin, iki farklı geçici ifade sistemi kullanılarak RTSW bazlı dayanıklılığın Avr determinantı olarak etki ettiğini görülmüştür (Liu vd., 2018).

## 2.12. TSWV'ne Karşı Sw-5 Geni Dayanıklılığının Kırılması

Dayanıklı bir bitkide patojenin çoğalamamasının yarattığı baskıdan dolayı genetik yapısında değişiklik meydana gelerek dayanıklılığın ortadan kaldırılmasına "dayanıklılığın kırılması" denir. Virüs gibi obligat parazitler konukçuda çoğalamadığından yaşamlarını sürdüremezler. Bu nedenle bitkilerdeki dayanıklılık virüs üzerinde baskı unsuru olur. Dayanıklılığın virüse yapmış olduğu baskı sonucu genetik değişiklik meydana gelir ve dayanıklılığın üstesinden gelen ırklar meydana gelir. Patojenin Avr genindeki bir değişimle bitki R geni patojenin Avr genini tanınamakta ve normal hastalık seyri devam etmektedir.

Avustralya'dan gelen TSWV izolatları, *Sw-5* taşıyan domates bitkilerine karşı dayanıklılık göstermiştir, fakat, Tsw geni taşıyan *Capsicum chilense* üzerine inoküle edildiğinde bulaşıcı değildir (Latham ve Jones, 1998). Bununla birlikte, RB izolatları, aşırı duyarlılık tepkisi nedeniyle biber bitkilerinin aşılınmış yaprakları

üzerinde lokal lezyonlar ve sistemik bir enfeksiyon geliştirmiştir. Tsw tarafından sağlanan dayanıklılık, ELISA ile tespit edilemeyen seviyelerde virüs birikimini azaltmıştır, bazı durumlarda kısmen üstesinden gelinmiştir. Düşük viral birikim, virüsün, dayanıklı bitkilerin dokularındaki hareketini kısıtlayan bir mekanizmanın sonucu olabilmektedir (Soler vd., 1998). Rosello vd. (1999), *S. peruvianum*'dan gelen dayanıklılığın genetiğini incelemişlerdir ve UPV32' deki dayanıklılığın tek bir genin kontrolünde olduğunu belirtmişlerdir, bu genin dayanıklılık ve baskınlık seviyeleri *F. occidentalis* iletimi ve TSWV izolatu agresifliği ile bildirmiştir. Tamamlanmamış penetrasyon ve gen dozu etkisi ile kısmi olarak dayanıklılığın üstesinden gelmektedir. UPV32 geni, hem *Sw-5*'ten hem de UPV1 dayanıklılık geninden bağımsız olarak ayrılmıştır. UPV32 için önerilen dayanıklılık *Sw-6* dir (Rosello vd., 1999). *Sw-5* geni, dayanıklılığı aşırı duyarlılık tepkisine (primer enfeksiyon bölgelerinde lokal nekroz) dayanmaktadır ve meyve görüntüsünde ciddi zarara sebep olmaktadır (Aramburu vd., 2000). *Sw-5* ve UPV1 geni, *Sw-6*'dan daha yüksek dayanıklılık göstermiştir (Rosello vd., 2001). UPV1 heterozigot geni *Sw-5* heterozigot genine göre daha dayanıklı olmuştur. Stevens'ta baskın bir gen olan *Sw-5* ve *S. peruvianum Sw-6*'dan (*S. esculentum* hattından UPV32) oluşan dayanıklılık geni belirlenmiştir. İtalya'nın güneyinde yapılan bir çalışmada 2004 yılında yetiştirme alanlarından toplanan yaprak örneklerinde yapılan ELISA uygulamasıyla elde edilen bazı izolatlar testlemeye alınmıştır. T992 izolatu kullanılarak yapılan bitki inokulasyonlarında, virüs etmeninin *Sw-5*'in üstesinden gelerek dayanıklılığı aşabildiği gözlenmiştir (Ciuffo vd., 2005). Homojenlik deneyleri, orijinal numunelerin *N. glutinosa* üzerinde mekanik olarak inokulasyonu ile elde edilen lokal lezyonlardan biyolojik klonlar kullanılarak gerçekleştirmiştir ve ardından viral replikasyonu desteklemek için Boru çiçeği (*Datura stramonium*) bitkilerinde alt kültürlenme yapılmıştır. NRB klonlarından hiçbiri *Sw-5* taşıyan domates bitkilerinde sistemik enfeksiyon oluşturmamıştır, fakat tüm RB klonları sistemik enfeksiyona neden olmuştur (Aramburu vd., 2010). Kaliforniya'daki 2016 TSWV salgınında, mevsim başlarında bazı alanlarda hastalık %50 ile %80 seviyelerine ulaşmıştır. TSWV izolatları, sera denemelerinde test edilen tüm *Sw-5* dayanıklı domates çeşitlerinde, Kaliforniya'daki RB TSWV izolatlarının varlığını doğrulayan simptomlara yol açabilir ve bu hastalığa neden olabilir (Batuman vd., 2017).

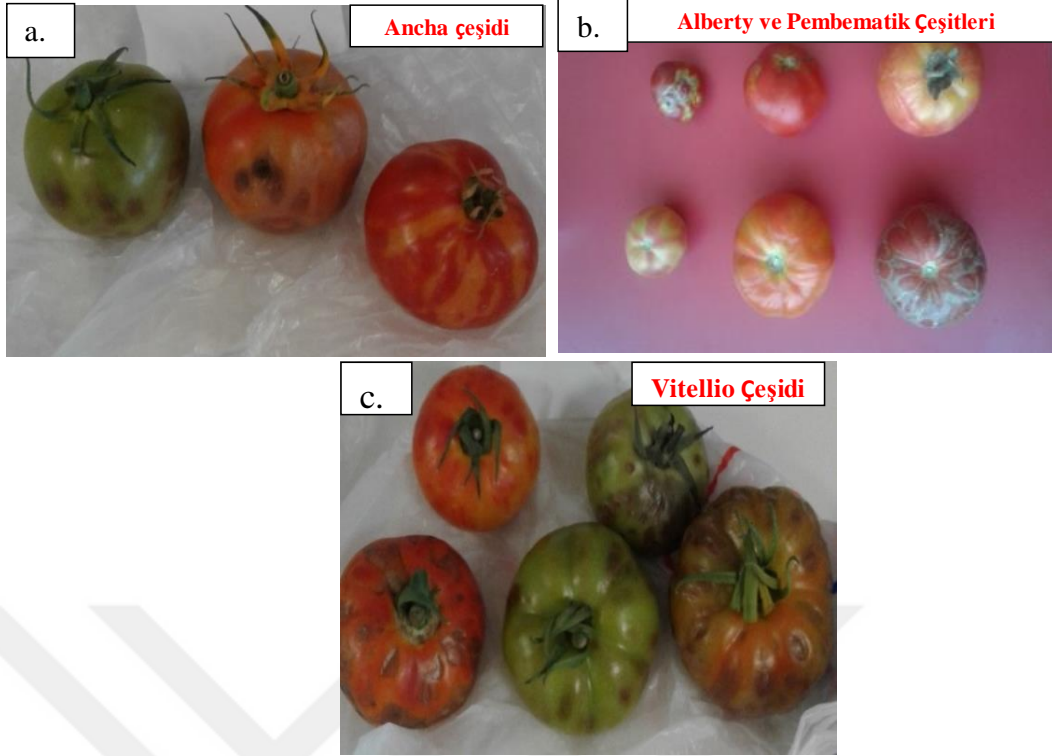
TSWV reassortantları üzerinde yapılan çalışmalar, dayanıklılığın üstesinden gelmede rol oynayan genetik determinantın M RNA ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Hoffmann vd., 2001). TSWV'nin NSm proteindeki iki amino asit sübstütüsyonunun Sw-5 dayanıklılığının üstesinden gelmekten sorumlu olabileceğini önermiştir (Lopez vd., 2011). İtalya, İşpanya, Avustralya, Güney Afrika, Hawaii ve son zamanlarda da Kaliforniya dahil olmak üzere dünya çapında birçok ülkede Sw-5 dayanıklılığını kıran (SRB) izolatları ortaya çıkmıştır (di Rienzo vd., 2018). TaqMan fluoresan problemlerine dayalı gerçek zamanlı PCR yöntemiyle; TSWV, PVY ve Pancar nekrotik sarı damar virüsü (BNYVV) gibi RNA virüs popülasyonlarında tek nükleotid poliformizi (SNP) varyantlarını tespit edebilen allelik ayırım tekniği olarak önerilmiştir (di Rienzo vd., 2018).



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Alan Çalışması

Projenin ana amacının domateste *Sw-5* dayanıklılığını kıran RB TSWV izolatları olması nedeniyle düzenli sürveyler yerine domates üretimi, satışı ve analizi yapılan yerlerden TSWV enfekteli olduğu düşünülen dayanıklı domates veya biber çeşitlerinden örnekler alınmıştır. Yapılan alan çalışmasında Isparta ilinde domatesin yaygın olarak yetiştirildiği Deregümü mevkiinde domates seralarından, biber üretiminin yapıldığı İslamköy çevresinden örnekler alınmıştır. Ayrıca Antalya’da biber üretiminin yaygın olarak yapıldığı Demre ilçesinden biber bitkileri, Muğlanın Fethiye ilçesinde domates üretiminin yaygın olarak yapıldığı seralarda yetiştirilen domates bitkilerinden örnekler alınmıştır. Bunlara ek olarak domates testlemelerinin yapıldığı ve Antalya Akdeniz Üniversitesi ve Antalya Zirai Karantina Müdürlüğünden örnek temin edilmiştir. Yapılan alan çalışmaları sonucunda toplam 57 adet TSWV şüpheli domates ve biber örneği alınıp toplanmıştır (Şekil 3.1). Arazi çalışmaları sonucunda örneklerin ikisi açık ve 55’i örtü altı üretim alanlarından olmak üzere toplam 57 örnek toplanmıştır. Toplanan 57 örneğin 14 tanesi biber 43 tanesi domates bitkilerinden alınmıştır. Isparta ilinden toplam 30 adet örneğin 19’u domates 11’i biber bitkisini kapsamaktadır. Bu domates meyvelerinden 13’ü Deregümü Köyü üretim seralarından 6 tanesi ise halk pazarından alınmıştır. Biber örneklerinden 5 bitki Isparta merkezden, 4 biber halk pazarından 2’si ise İslamköy açık üretim alanlarından alınmıştır. Örnekler Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Moleküler Biyoloji laboratuvarına getirilip, işlenerek analiz edilmiştir. Alınan izolatların isimleri, konukçuları ve alındıkları yerler Çizelge 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3. 1. TSWV enfekteli Isparta deregümüne ait domates bitkileri

- a. Ancha domates çeşidi
- b. Alberty ve Pembematik domates çeşitleri
- c. Vitellio domates çeşidi



Çizelge 3.1. Domates lekeli solgunluk virüsü enfekteli domates ile biber izolatlarının toplandığı bölgeler

İzolat Adı	Konukçuları	Kaynak	İzolat Adı	Konukçuları	Kaynak
TSWV1	Domates	Antalya Akdeniz Üniv. (Hakan Fidan)	TSWV29	Domates	Isparta (Pazar)
TSWV2	Domates	İzmir/Menemen	TSWV30	Domates	Isparta (Pazar)
TSWV3	Biber	Antalya Ziraî Karantina (Gözde Erkiş)	TSWV31	Domates	Isparta (Pazar)
TSWV4	Biber	Antalya Ziraî Karantina (Gözde Erkiş)	TSWV32	Domates	Isparta/Deregümü
TSWV5	Domates	Isparta/Deregümü	TSWV33	Domates	Isparta/Deregümü
TSWV6	Domates	Isparta/Deregümü	TSWV34	Biber	Isparta/İslamköy
TSWV7	Domates	Antalya/Demre	TSWV35	Biber	Isparta/İslamköy
TSWV8	Domates	Isparta (Pazar)	TSWV36	Domates	Isparta/Deregümü
TSWV9	Domates	Isparta (Pazar)	TSWV37	Domates	Isparta (Pazar)
TSWV10	Domates	Isparta (Pazar)	TSWV38	Domates	Isparta (Pazar)
TSWV11	Domates	Isparta (Pazar)	TSWV39	Domates	Antalya Akdeniz Üniv. (Hakan Fidan)
TSWV12	Biber	Isparta (Pazar)	TSWV40	Domates	Antalya Akdeniz Üniv. (Hakan Fidan)
TSWV13	Biber	Isparta (Pazar)	TSWV41	Domates	Antalya Akdeniz Üniv. (Hakan Fidan)
TSWV14	Biber	Isparta (Pazar)	TSWV42	Domates	Antalya Akdeniz Üniv. (Hakan Fidan)
TSWV15	Domates	Antalya Akdeniz Üniv. (Hakan Fidan)	TSWV43	Domates	Antalya Akdeniz Üniv. (Hakan Fidan)
TSWV16	Domates	Isparta (Pazar)	TSWV44	Domates	Isparta/Deregümü
TSWV17	Biber	Isparta Uygulamalı Bilimler Üniv. (Hakan Aktaş)	TSWV45	Domates	Isparta/Deregümü
TSWV18	Biber	Isparta Uygulamalı Bilimler Üniv. (Hakan Aktaş)	TSWV46	Domates	Muğla/Fethiye
TSWV19	Biber	Isparta Uygulamalı Bilimler Üniv. (Hakan Aktaş)	TSWV47	Domates	Muğla/Fethiye
TSWV20	Biber	Isparta Uygulamalı Bilimler Üniv. (Hakan Aktaş)	TSWV48	Domates	Antalya (Gözde Erkiş)
TSWV21	Biber	Isparta Uygulamalı Bilimler Üniv. (Hakan Aktaş)	TSWV49	Domates	Antalya (Gözde Erkiş)
TSWV22	Domates	Antalya Ziraî Karantina (Gözde Erkiş)	TSWV50	Domates	Antalya (Gözde Erkiş)
TSWV23	Domates	Antalya Ziraî Karantina (Gözde Erkiş)	TSWV51	Domates	Antalya (Gözde Erkiş)
TSWV24	Domates	Antalya Ziraî Karantina (Gözde Erkiş)	TSWV52	Biber	Antalya (Gözde Erkiş)
TSWV25	Domates	Antalya Ziraî Karantina (Gözde Erkiş)	TSWV53	Biber	Antalya (Gözde Erkiş)
TSWV26	Domates	Antalya Ziraî Karantina (Gözde Erkiş)	TSWV54	Domates	Isparta (Pazar)
TSWV27	Domates	Isparta (Pazar)	TSWV55	Domates	Isparta (Pazar)
TSWV28	Domates	Isparta (Pazar)	TSWV56	Domates	Antalya Akdeniz Üniv. (Hakan Fidan)
			TSWV57	Domates	Antalya Akdeniz Üniv. (Hakan Fidan)

### 3.2. Total RNA İzolasyonu

Seralardan toplanan domates ve biber örneklerinden alınan 0,2 g'lık taze yaprak dokusundan CTAB (Cetyltrimethyl-ammonium bromide) yöntemi ile total nükleik asit izolasyonu yapılmıştır (Li vd., 2008). Her yaprak örneği porselen havan içerisinde ve havaneli yardımı ile 1 ml CTAB konularak ezilmiştir. Elde edilen özüt 1,5 ml'lik ependorf tüplerine aktarılmıştır. Örneklere 2µl beta-mercaptoethanol eklenip örnekler vorteksenerek karıştırılmıştır. Tüpler 15 dakika süreyle -20°C'de tutularak 15 dakika soğutulup dondurulmuştur. Dondurulan örnekler 65°C'de 15 dakika süreyle tutularak çözdürülmüştür. Çözdürülen örnekler 10.000 g devirde 5 dakika santrifüj yapılarak çözünmeyen bitki dokuları çöktürülmüştür.

Daha sonra örneklerin sıvı kısımları alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. Örnekleri içeren tüplere 650 µl kloroform-izoamil alkol (24:1) solüsyonundan eklenmiştir. Karışım 15.000 g'de 10 dakika santrifüj yapılarak faz ayrımı sağlanmıştır. Santrifüj sonunda oluşan üç ayrı fazdan üstteki sıvı kısım (supernatant) mikropipet yardımıyla alınarak temiz tüpe aktarılmıştır. Sıvı faz üzerine 350 µl izopropanol eklendikten sonra karıştırılarak 15.000 g'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonucunda ependorf tüplerinin dibine oluşan pelletin üzerindeki sıvı kısmının dökülmesinin ardından %70'lik etil alkol ile yıkama yapılmıştır. Örnekler 15.000 g'de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra sıvı kısım dökülerek pellete kalmıştır. 15 dakika kurutma işlemi yapılmıştır. Kurutulan total nükleik asitler 50 µl 20 mM Tris-HCL solüsyonunda çözdürülmüştür. Son olarak elde edilen total nükleik asitlerin NanoDrop spektrofotometrede ölçülerek miktarları belirlenmiş ve %1'lik agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp görüntülenerek kalitesi belirlenmiştir.

### 3.3. Bitki Materyali

Çalışmada *Sw-5* geni içermeyen TSWV'ne duyarlılığı önceden belirlenmiş Yüksel tohum firmasından Alsancak F1 ve Yüksel tohum firmasından *Sw-5* genine sahip TSWV'ne dayanıklı Sedir F1 domates çeşitleri kullanılmıştır. Domates fideleri torf ve perlit karışımının içerisinde saksılara dikilip bitki büyütme kabininde sıcaklık, ışık ve nem kontrol altında 25±2°C sıcaklık ve %70±5 oransal nemde 16 saat fotoperiyot

uygulanarak yetiştirilmiştir. Domates çeşitlerinin tohumları viyollere ekilerek çimlendirilip fideler elde edilmiştir.

### 3.4. Mekanik İnokulasyon

Antalya ve Isparta illerinde yetiştirilen domates ve biber bitkilerinden toplanan ve TSWV ile enfekteli olduğu RT-PCR yöntemiyle belirlenen izolatlardan 11 tanesi seçilmiştir. TSWV'ye dayanıklı Sedir TSWV'ye duyarlı olan Alsancak domates çeşitlerinin fideleri yetiştirilmiştir. Yukarıda belirtildiği gibi daha sonra yetiştirilen fideler saksılara şaşırtılmıştır. 1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 500 ml saf su eklenerek potasyum fosfat tamponları hazırlanmıştır. Bu hazırlanan çözeltilerden 15,625 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9,625 ml K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> fosfat tamponu alınarak 0,5 g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 170 µl merchптоethanol eklenerek yeni bir şişeye aktarılmıştır. Her bir TSWV izolatu steril porselen havanda ezilmiş ve daha önceden karborandum tozu serpilmiş sağlıklı bitkilerin yapraklarına mekanik olarak inokule edilmiştir. 11 farklı TSWV izolatu 5'er tekerrürlü olarak Sedir ve Alsancak domates fidelerine mekanik inokulasyon yöntemi ile bulaştırılmıştır. Daha sonra inokulasyon yapılan bitkiler symptom gözlenmesi amacıyla kontrollü koşullarda muhafaza edilmiş, periyodik olarak gözlemlenmiş ve inokulasyondan 3-4 hafta sonra real time RT-PCR ve/veya RT-PCR yöntemiyle testlenmiştir.

### 3.5. Domateste *Sw-5* Dayanıklılık Geninin PCR Yoluyla Belirlenmesi

TSWV enfekteli olduğu düşünülen domates örneklerinden total nükleik asit izolasyonu yapılarak örneklerin *Sw-5* içerip içermediğini belirlemek amacıyla daha önce rapor edilen *Sw-5* genine spesifik primerler kullanılarak (Dianese vd., 2010) PCR yapılmıştır. Termal döngü cihazında 94 °C de 3 dak. ilk denatürasyon, 95 °C de 30 sn. denatürasyon 50°C'de 30 sn. primer bağlanması ve 72 °C'de 30 sn. primerlerin uzaması aşaması 39 döngü tekrar edecek şekilde PCR aşaması tamamlanmıştır. Domateste *Sw-5* geni içeren Sedir domates çeşidi ile *Sw-5* geni içermeyen Alsancak domates çeşidi pozitif kontrol olarak kullanılmış, negatif kontrol olarak ise su kullanılmıştır. PCR ürünleri %1,5'luk agaroz jel elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak UV altında sonuçlar görüntülenmiştir.

### 3.6. Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Reverse Transcription RT-PCR)

Toplanan örnekler ve inokulasyon yapılan dayanıklı ve duyarlı domates ve biber çeşitlerinde TSWV varlığı “Tersine Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyon” (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) yöntemiyle belirlenmiştir. Bu amaçla TSWV’nün nükleokapsid genine daha önce özel olarak tasarlanan ve TSWV tanısında kullanılan BC352 ve BC353 primerleri (Çevik ve Şahin-Çevik, 2018) ve RevertAid cDNA sentez kiti (Thermo Scientific) üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanılmıştır. Enfekteli bitki dokusundan veya inokulasyon yapılan domates bitkilerinden izole edilen total RNA’dan iki aşamalı RT-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan PCR sonucuna göre yaklaşık 750 bp büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir. RT aşamasında; her PCR tüpüne, 4,5 µl saflaştırılmış total RNA ve 0,5 µl random primer konularak 65°C’de 10 dak. bekletilmiştir, daha sonra tüpler buza alınmıştır. PCR tüplerinin üzerine, 2 µl 5X RT tampon çözeltisi, 0,5 µl 10mM dNTP, 0,25 µl RNase inhibitör (20U/µl), 0,5 µl RevertAid reverse transcriptaz ve 1,75 µl nükleazdan arı su eklenerek 10 µl RT karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım 25 °C 10 dak., 42°C’de 60 dak., 72°C’de 10 dak. olarak programlanmış termal döngü cihazında tutularak cDNA’ların sentezi yapılmıştır. PCR aşamasında cDNA’dan 2 µl alınarak bir PCR tüpüne konulmuştur. cDNA üzerine 16,25 µl nükleazdan arı su, 2,5 µl 10X *Taq* DNA polimeraz tamponu, 2,5 µl magnezyum klorür, 10 mM dNTP, 0,25 µl *Taq* DNA polimeraz, 0,5 µl ileri ve geri primer eklenerek PCR karışımı hazırlanmıştır. Tüpler termal döngü cihazında 95°C’de 3 dak. ilk denatürasyon, 95°C’de 30 sn. denatürasyon 55°C’de 30 sn. primer bağlanması ve 72°C’de 30 sn. primer uzaması aşaması 39 döngü tekrar edecek şekilde programlanan termal döngü cihazında PCR aşaması tamamlanmıştır. PCR ürünleri %1 lik agaroz jelde yöntemiyle ayrıştırılarak ultraviyole ışık altında bilgisayarda görüntülenmiştir. PCR sonucunda çıkan pozitif olduğu bilinen 13 örnek seçilmiştir daha sonra klonlamada kullanılmak üzere cDNA dan yeniden PCR yapılmıştır. Bu çalışmada NSm 5’ ve 3’ ucuna özel olarak tasarlanan BC402 5’-AGAGCAATCAGTGCATCAGAAATATACC-3’ ve BC403 5’-AAAGAGTCTTC GGACCAAAGTTTGGC-3’ ve primerleri ve *Ex Taq* DNA polimeraz enzimi (Takara) üretici firmanın önerisi doğrultusunda NSm geni çoğaltılmıştır. PCR karışımına 10X *Ex Taq* Buffer 2,5 µl, *Ex Taq* (5 unit/µl) enzimi 0,25 µl, 10 mM

dNTP 0,5 µl, 0,5 µl ileri ve geri primerleri 18,75 µl nükleazdan ari su ve 2 µl cDNA eklenerek yukarıdaki protokole göre DNA sentezlenmiştir.

### **3.7. Real-time RT-PCR (Gerçek Zamanlı PCR) Yöntemiyle TSWV'nin Belirlenmesi**

Total nükleik asit izolasyonundan 2 µl alınarak bir PCR tüpüne konulmuştur. Üzerine 10 µl 2x Master Mix, daha önce TSWV tanısı için tasarlanan BC366 HEX etiketli prob'dan 0,5 µl ve BC367 ileri ve BC369 geri primerleri (Çevik ve Şahin-Çevik, 2018) ileri ve geri primerleri, nükleazdan ari su eklenerek 20 µl'ye tamamlanmıştır. Tüpler CFX96 Touch termal döngü cihazında (Bio-Rad) 42°C'de 30 dak. 95 °C de 3 dak. ilk denatürasyon, 95°C'de 10 sn. denatürasyon 55°C'de 10 sn. primer bağlanması ve 72°C'de 10 saniye primer uzaması aşamasından oluşan 39 döngüden oluşmaktadır. Sonuçlar CFX manager programında görüntülenerek analiz edilmiştir.

### **3.8. Agaroz Jel Elektroforez**

100 ml 1x TAE tampon çözeltisi içeren erlenmayer içerisine 1 g agaroz ile konularak, agaroz eriyinceye kadar mikrodalga fırında ısıtılmıştır. Karışım bir süre soğumaya bırakıldıktan sonra; üzerine 1 µl etidyum bromür eklenerek jel kalıbına döküp katılaşması beklenmiştir. Jel katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkarılıp bu kısım jel kalıbıyla birlikte elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tanka, jelin yüzeyini 1-2 mm geçecek kadar 1x TAE tampon çözeltisi ilave edilmiştir. İlk kuyuya 1 kb DNA büyüklük markörü yüklenmiştir. Diğer kuyulara da NSm genini içeren PCR ürünleri 10 µl ve 2 µl 6x loading yükleme tamponu karıştırılarak kuyulara yüklenmiştir. Örnekler %1'lik agaroz jelinde 100 volt elektrik akımı uygulanarak 40 dakika elektroforez yapılarak ayrıştırılmıştır. Ayrıştırılan PCR ürünleri jel görüntüleme sisteminde ultraviyole ışık altında görüntülenerek analiz edilmiştir. Pozitif kontrol olarak TSWV ile enfekteli olduğu bilinen bir domates örneği ve negatif kontrol olarak ise su kullanılmıştır.

### **3.9. PCR Saflaştırması**

Çoğaltılan TSWV NSm geni içeren PCR rnleri EZ Coloum PCR pürifikasyon kiti (BioBasic, Kanada) retici firma nerisi doğrultusunda saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PCR rnlerinin 3 katı miktarda bağlanma tampon eklenmiştir. Daha sonra bu karışım kolona aktarılmış ve 2 dak. oda sıcaklığında bekletilmiştir. 2 dak. 10.000 rpm de santrifüj yılarak kolonun dibine ken sıvı dökülmüştür. 500 l yıkama tamponu eklendikten sonra 2 dak. 10.000 rpm santrifüj yapılmıştır. Yeniden yıkama tamponu eklenerek işlem tekrar edilmiş ve bir defa tüpler 2 dak. boş santrifüj yapılmıştır. Yeni ependorfa kolonlar yerleştirilmiştir. 50 l Elüsyon tampon eklenmiştir oda sıcaklığında 2 dk bekletilmiştir. 2 dak. 10.000 rpm santrifüj yapılmıştır. Örnekler kullanılıncaya kadar -20°C’de saklanmıştır.

### **3.10. TSWV NSm Geninin Klonlanması**

Dayanıklılığı kıran TSWV izolatların Sw-5 dayanıklılık geniyle etkileşime giren avr geni olan NSm geni polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. PCR rnleri saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırıldıktan sonra 6 rnek T-A klonlama yöntemi pGEM-T easy plazmit vektörüne klonlanmıştır.

### **3.11. Ligasyon**

2 l 5x T4 DNA ligaz tampon 1 l, T4 DNA ligaz enzimi, 1 l pGEMT easy vektörü ve 4 l, saflaştırılmış PCR ürünü 2 l nkeazdan ari su kullanılarak ligasyon karışımı oluşturulmuştur. Ligasyon karışımı 16 saat süreyle +4°C’de bekletilerek ligasyon işlemi yapılmıştır.

### **3.12. Transformasyon**

Ligasyon ürününden 5 l alınarak zerine -80°C’den dondurulmuş *Eschericia coli* JM109 competent bakteri hücresinden 25 l eklenmiştir. Karışım 30 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra su banyosunda 42°C’de 90 sn inkübasyon yapıldıktan sonra tekrar buza alınarak 3 dakika buzda bekletilmiştir.

### 3.13. Rekombinant Kolonilerin Seçimi

Transformasyon yapılan bakterilere 900 µl Lysogeny broth (LB) sıvı besi ortamı eklenerek 200 rpm devirde 37°C'de 1 saat çalkalamalı inkübatörde büyütülmüştür. Büyütülen bakterileri içeren ortam 5.000 rpm devirde 3 dakika santrifüj yapılarak bakteriler toplanmış, sıvı kısım atıldıktan sonra geriye kalan pellet 250 µl sıvı LB ortamında çözdürülmüştür. Elde edilen bakteriler 400 µl 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside (X gal), 500 µl isopropyl-trigalactosidose (IPTG), 200 µl Ampicilin (Amp) içeren seçici LB katı besiyerine ekilerek 37°C'de 1 gece inkübatörde bekletilerek büyütülmüştür. Çalışmada klonlama yapılan genleri içeren bakterilerin belirlenmesinde mavi-beyaz koloni seçimi yapılmıştır. Mavi-beyaz koloniler içerisinde TSWV NSm genini taşıyan pGEM-T easy plazmidini içeren bakteriler büyüyerek beyaz renkli kolonileri oluştururken, sadece pGEM-T easy plazmidini içerenler ise mavi renkli kolonileri oluşturmaktadır. Asıl istenilen koloniler, NSm genini içeren beyaz kolonilerdir. Oluşan kolonilerden her bir örnek için 5'er tane alınarak X-gal, Amp, IPTG içeren LB katı besiyerine bakteri çizimi yapılmış 37°C'de 1 gece bekletilmiştir.

### 3.14. Rekombinant Bakteriyel Kolonilerin Belirlenmesi

Klonlamanın doğrulanması için transformasyon yapılan ve büyütülen katı besiyerinde kolonilerden, PCR yapılarak kolonilerin rekombinant DNA'yı içerip içermediği tespit edilmiştir. TSWV NSm genini taşıyan pGEM-T easy plazmitlerini içerdiği düşünülen beyaz kolonilerin belirlenmesi için koloni PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Her bir izolat için en az 5 adet beyaz koloni seçilerek koloni PCR yöntemiyle test edilmiştir. 2,5 µl 10X PCR buffer, 2,5 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl 10 mM dNTP, 0,5 µl pGEMT easy plazmidinin T-A klonlama bölgesinin yaklaşık 200 bç üst ve alt kısmındaki bölgelere spesifik M13F ve M13R universal primerleri, 0,125 µl *Taq* DNA polimeraz eklenerek koloni PCR için karışım hazırlanıp PCR tüplerine konulmuştur. PCR tüplerine konulan karışıma çizilerek büyütülen beyaz renkli bakteri kolonilerinden pipet ucuyla alınarak bakteri kolonisi eklenmiştir. Bakteri eklenen koloni PCR karışımı 95°C 3 dak., 39 defa tekrarlanan 95°C'de 30 sn., 50°C'de 30 sn. ve 72°C'de 30 sn., 72°C'de 5 dak. PCR yapılmıştır. Koloni PCR'm tamamlanmasından sonra elde edilen PCR ürünleri 1 kb DNA büyüklük markörü ile

birlikte %1'lik agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir.

### **3.15. Plazmit İzolasyonu**

Koloni PCR sonuçlarından sonra TSWV NSm genini taşıyan pGEM-T easy plazmidini içerdiği kesin olarak belirlenen koloniler seçilerek plazmit izolasyonu yapılmıştır. Her bir izolat için koloni PCR'da pozitif sonuç veren 2 koloni seçilmiştir. Her bir TSWV izolatı için koloni PCR sonuçlarına göre seçilen koloniler, Amp (100 mg/ml) içeren 5 ml LB sıvı besi ortamına inokule edilerek 37 °C'de 16 saat 200 rpm hızda çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir.

Büyütülen bakterilerden BioBasic plazmit Mini prep kiti kullanılarak üretici firmanın önerisi doğrultusunda plazmit saflaştırması yapılmıştır. Bakteri inokulasyonu yapılan her örneğin 2 farklı kolonisi için 1,5 ml lik ependorflara örnekler tamamı 2 dak. 12.000 rpm'de çöktürme yapılmıştır. Üstte kalan kısım da her santrifüjden sonra dökülmüştür. 250 µl Resuspansiyon solüsyon eklenmiştir. 1 dak. oda sıcaklığında bekletilmiştir. 250 µl lisis solüsyon eklenmiştir. 1 dak. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ependorf tüplerindeki örnekler kolon tüpüne aktarılmıştır. 350 µl Nötüralizasyon solüsyon eklenerek 1 dak. oda sıcaklığında bekletilmiştir ve 5 dak. 12.000 rpm santrifüj yapılmıştır. Ependorf tüplerindeki örnekler kolona aktararak, 2 dak. 12.000 rpm santrifüj yapılmıştır. Kolona 500 µl yıkama solüsyonu eklenerek 2 dak. 12.000 rpm santrifüj yapılmıştır. Kolonun altındaki su döküldükten sonra bu işlem yeniden tekrarlanmıştır. Son olarak kolonlar 2 dak. 12.000 rpm boş santrifüj yapıldıktan sonra kolon yeni ependorf tüpüne yerleştirilmiştir. Kolona 50 µl nükleazdan arı su eklendikten sonra 2 dakika beklenerek kolon santrifüj yapılmıştır. Kolon atılarak plazmit saflaştırması tamamlanan örnekler kullanılıncaya kadar -20°C de saklanmıştır.

### **3.16. *EcoRI* Restriksiyon Enzimiyle Kesim**

Saflaştırılan pGEMT easy plazmit DNA'larından 1000 ng'ından 10 µl alınarak, 1 µl *EcoRI* enzimi (20.000 unit/ml), 2 µl 10X *EcoRI* tampon solüsyonu ve 7 µl steril saf su eklenerek bir tüp içerisinde toplam 20 µl'lik karışım hazırlanmıştır. Elde edilen bu



karışım 37°C'de 6 saat süreyle inkübatörde bekletilerek plazmitlerin *EcoRI* enzimiyle kesilme işlemi tamamlanmıştır. Kesilen DNA'lar incelendiğinde pozitif olan yaklaşık 3000 bç büyüklüğünde pGEM-T easy plazmit DNA'sı ve yaklaşık 1200 bç büyüklüğünde TSWV NSm genine ait bantlar görülmüştür. TSWV NSm genini içerdiği teyit edilen klonlar NSm gen dizilimini belirlemek amacıyla DNA dizileme işlemine tabi tutulmuştur.

### **3.17. NSm Gen Dizisinin Belirlenmesi ve Karşılaştırılması**

Saflaştırılan ve klonlanan PCR ürünleri Altıgenbio (İzmir) firmasına gönderilmiş universal M13F ve M13R primerleri kullanılarak DNA döngü dizileme cihazıyla çift yönlü olarak dizileme yapılmıştır. DNA dizilimi pGEM-Teasy plazmidinin T-A klonlama bölgesinin yaklaşık 200 bç üst ve alt kısmındaki bölgelere spesifik M13F ve M13R universal primerleri kullanılarak döngü dizileme yöntemiyle otomatik DNA dizileme cihazıyla yapılmıştır. Dizilemeye gönderilen 6 örnek sonuç vermiştir. Elde edilen DNA dizileri ayıklanıp birleştirilmiştir. Gen bankasında DNA ve protein veri tabanlarında araştırma yapılarak dünyanın farklı domates üretim bölgelerinden elde edilen TSWV izolatlarının NSm genlerine ait nükleotid ve amino asit dizilimleri elde edilmiştir. *Sw-5* dayanıklılığını kıran ve kırmayan Isparta ve Antalya ili domates üretim alanlarından elde edilen izolatların NSm genlerine ait nükleotid ve aminoasit dizileri Vector NTI programı (Invitogen, ABD) kullanılarak farklılıkları ve benzerlikleri karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalarla TSWV izolatlarının daha önce dayanıklılığı kıran izolatlarda belirlenen NSm gen mutasyonlarının varlığı, izolatların birbirleriyle benzerlik oranları belirlenmiştir. TreeView (Page, 1996) soyağacı görüntüleme programı kullanılarak TSWV izolatlarının birbiriyle yakınlık dereceleri ve genetik ilişkileri ortaya konulmuştur.

### **3.18. Real Time RT-PCR için Primer Tasarımı**

*Sw-5* dayanıklılığını kıran ve kırmayan TSWV izolatlarının belirlenmesini ve birbirinden ayrılmasını sağlamak için geliştirilecek olan real-time RT-PCR için TSWV NSm gen diziliminde bulunan farklılıklara göre kullanılarak primer tasarımı yapılmıştır. Bu amaçla bu çalışmada belirlenen TSWV izolatları ve dünyanın farklı bölgelerinden 100'den fazla izolatın NSm geni gen bankası veritabanlarından alınarak

yukarıda belirtildiği gibi çoklu nükleotit dizi karşılaştırması yapılmıştır. Yapılan çoklu karşılaştırma analizleri kullanılarak NSm geninde bulunan mutasyonların bulunduğu bölgeden yaklaşık 50-100 bp uzaklıkta tüm izolatlarda korunmuş dizilere özel bir ileri birde geri olmak üzere 20-25 nt uzunluğunda bir çift primeri tasarlanmıştır. Vectör NTI programında tasarlanan primerler BC453 TSWV NSm3' F 5'-AGCTTAAATCTT GAGAGATCAG-3' ve BC454 TSWV NSm3' R 5'-CATCAAAGATAACTGA GCAAC-3 olarak isimlendirilmiştir. Primerler sentez hizmeti veren firmalar aracılığıyla sentezletilerek ve gerçek zamanlı PCR çalışmalarında kullanılarak *Sw-5* dayanıklılığı kıran ve kırmayan TSWV izolatlarının ayırımında kullanılmıştır.

### **3.19. Dayanıklılığı Kıran ve Kırmayan İzolatların Real Time RT-PCR Yoluyla Ayrılması**

Yapılan çoklu amino asit dizi karşılaştırmaları sonucunda bu çalışmada elde edilen ve *Sw-5* dayanıklılığını kırdığı düşünülen izolatlar ile diğer izolatlar arasında farklılık gösteren 287. amino asitdeki değişikliklerin belirlenmesi için tasarlanan primerler kullanılarak bir real-time RT-PCR yöntemi geliştirilmiştir. Öncelikle dizileme yoluyla dayanıklılığı kırdığı belirlenen ve 287. amino asitte E287G ve E287D mutasyonunu taşıyan ve 287 amino asitte mutasyon taşımayan izolatların TSWV 11-3, 15-1 ve 33 klonlanan NSm genleri gen spesifik primeler kullanılarak PCR yöntemiyle plazmitlerden çoğaltılmıştır. Çoğaltılan NSm genleri kalıp olarak kullanılarak real-time PCR ve takiben erime analizlerinin optimizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla uygulanan SYBR Green I yönteminde 25 ng kalıp DNA üzerine 10 µl Ampliqone 2X SYBR Green PCR karışımı (Fermentas) 100 nmole BC453 ve BC454 primerleri eklenerek karışım nükleazdan arı su 20 µl'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan reaksiyonlar 95°C'de 3 dak. ilk denatürasyon, 95°C'de 10 sn. denatürasyon 50-60°C'de 10 sn. primer bağlanması ve 72°C'de 10 sn. primer uzaması aşaması 39 döngü tekrar edecek şekilde programlanan CFX96 Touch (BioRad) termal döngü cihazında çoğaltılmışlardır. Çoğaltım aşamasını takiben çoğaltılan NSm gen parçası 65°C- 95°C arasında saniyede 0,2- 0,5°C sıcaklık artışı yapılarak erimeye tabi tutulmuştur. Sonuçlar CFX Manager programında görüntülenerek çoğaltım eğrisi ve erime eğrisi olarak ayrı ayrı analiz edilmiştir. Çoğaltılan NSm geninin erime eğrilerine göre 287. amino asit pozisyonunda G, D ve E içeren TSWV izolatlarının

erime sıcaklıklarına göre birbirinden ayrılmaya çalışılmıştır. NSm genlerinin DNA kalıbında yapılan real-time PCR'ın optimizasyonundan sonra aynı işlemin RNA'dan yapılabilmesi için aynı izolatlarla enfekteli bitkilerden elde edilen total nükleik asit preparatından real-time RT-PCR yapılmıştır. Bu amaçla her bir izolatın total nükleik asitlerinden 3500 ng alınarak 20 nmole BC403 (NSm geni geri primeri) eklenerek 65°C'de 10 dakika denatüre edilerek buza alınmıştır. Daha sonra karışıma 5X RT tampon çözeltisi 200 µM dNTP, 5 U RNase inhibitör ve 20 U RevertAid reverse transcriptaz (Thermo) ve nükleazdan arı su eklenerek toplam 10 µl RT karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım 60 dak. süreyle 42°C'de tutularak cDNA'ların sentezi yapılmıştır. Sentezlenen cDNA'lardan 350 ng alınarak yukarıda belirttiği şekilde SYBR Green ile çoğaltım yapılmış ve erimeye tabi tutularak erime eğrileri ve erime sıcaklıkları karşılaştırılarak izolatların RNA'dan ayrımı yapılmıştır. Son olarak araziden toplanan ve NSm gen dizilimi bilinmeyen 7 farklı TSWV izolatına yukarıdaki gibi real-time-RT-PCR yapılmıştır.

## **4. BULGULAR**

### **4.1. Arazi Çalışmaları**

Bu çalışma 2017-2019 yılı üretim dönemlerinde Isparta ve Antalya illerinde domates üretim alanlarından örnekler alınarak yapılmıştır. Arazi çalışmalarından toplanan örneklerin çoğu Isparta ve Antalya illerinden alınırken birkaç örnek ise İzmir ve Muğla (Fethiye) ili olmak üzere bölge dışından alınmıştır. Arazi çalışmalarında domateslerde genç yaprakların bronz renge dönmesi, yapraklarda siyah lekelenmeler, bitkide solgunluk ve cücelik, sürgün uçlarından geriye doğru ölüm, meyvelerde klorotik halkalı lekelenme gibi TSWV belirtileri de gözlenmiştir. Virüs belirtisi gösteren toplam 57 bitkiden alınan yaprak ve meyve örnekleri total nükleik asit izolasyonunda kullanılmıştır.

### **4.2. Arazi Bölgelerinde TSWV'nin Tespit Edilmesi**

TSWV enfekteli olduğu şüphelenilen 57 adet bitki örneğinden CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) yöntemiyle total nükleik asit izolasyonu yapılmıştır (Şekil 4.1). İzolasyonda 22 tane domates yaprak, 19 tane domates meyve, 10 tane biber yaprak ve 6 tane biber meyve örneği kullanılmıştır. TSWV enfekteli olduğu düşünülen bitkilerin yaprak ve meyve dokularından yapılan izolasyon sonucunda toplanan örneklerden 54 tanesinden başarılı bir şekilde izolasyon yapılmıştır. Buna karşın 3 örnekte izolasyon yapılamamıştır. Total nükleik asit izolasyonu yapıldıktan sonra genomik DNA'nın miktarı ve saflığı NanoDrop (Thermo, ABD) spektrofotometrede ölçülerek belirlenmiştir. Total nükleik asit izolasyonunu yapılan 57 örnekte izole edilen total nükleik asit miktarları ve 260/280 değerleri çizelgede verilmiştir (Çizelge 4.1). Bu çizelge sonuçlarını incelediğimizde 18 örneğin konsantrasyonu 1000-4500 ng/μl aralığında değere sahip olduğu görülmektedir. Bu da örneklerden izolasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ve elde edilen nükleik asitlerin kaliteli olduğunu göstermektedir. Bunun yanında 4 örneğin konsantrasyonu 700-900 ng/μl civarında değerlerde olurken 21 örneğin konsantrasyonu 100-600 ng/μl civarında düşük konsantrasyon değerlerinden oluşmaktadır. Buna karşın 3 örneğin konsantrasyon değerleri ise çok düşük miktarda olduğu bu nedenle bunlardan izolasyonun başarısız olduğunu göstermektedir.



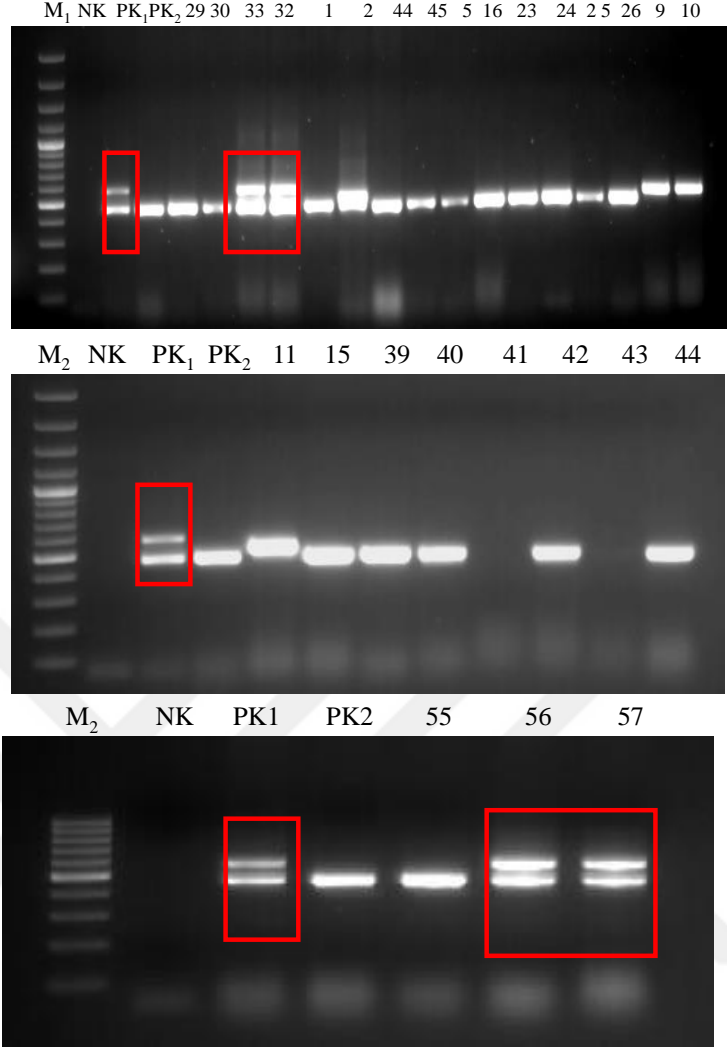
Şekil 4. 1. TSWV enfekteli domates yaprağının CTAB solüsyonu ile ezilmesi

Çizelge 4.1. Arazi çalışmasından alınan TSWV şüpheli örneğin nükleik asit miktarları ve A260/A280 değerleri

Örnek Adı	ng/µl	A260/280	Örnek Adı	ng/µl	A260/280
TSWV1	265,4	2,18	TSWV29	1166,4	2,13
TSWV2	342,4	2,21	TSWV30	719,2	2,11
TSWV3	437,5	2,10	TSWV31	1109,3	2,11
TSWV4	356,7	2,05	TSWV32	142,3	2,11
TSWV5	2537,8	2,10	TSWV33	155,6	2,13
TSWV6	1249,1	2,15	TSWV34	899,8	2,16
TSWV7	270,1	2,13	TSWV35	33,2	2,08
TSWV8	2083,9	2,20	TSWV36	981,3	2,02
TSWV9	139,8	2,12	TSWV37	283,5	2,19
TSWV10	208,9	2,05	TSWV38	34,81	1,09
TSWV11	280,5	2,15	TSWV39	1238,4	2,10
TSWV12	389,1	2,05	TSWV40	112,2	2,21
TSWV13	570,8	2,14	TSWV41	147,7	2,20
TSWV14	10,1	1,89	TSWV42	324,7	2,11
TSWV15	4528,4	2,18	TSWV43	269,2	2,16
TSWV16	257,3	2,14	TSWV44	3287,4	2,16
TSWV17	3179,9	2,09	TSWV45	1962,1	2,25
TSWV18	2684	2,07	TSWV46	239,3	2,15
TSWV19	3282,8	2,11	TSWV47	223	2,13
TSWV20	205,9	2,11	TSWV48	699,5	2,11
TSWV21	946,6	1,87	TSWV49	103,5	2,13
TSWV22	627,1	2,16	TSWV50	398,5	2,12
TSWV23	2600,6	2,20	TSWV51	564,7	2,13
TSWV24	232,4	2,14	TSWV52	126,7	2,13
TSWV25	2613,5	2,14	TSWV53	332,1	2,17
TSWV26	1039,7	2,16	TSWV54	356,1	2,10
TSWV27	142,3	2,11	TSWV55	1053,4	2,17
TSWV28	155,6	2,13	TSWV56	680,6	2,18
			TSWV57	4663	2,20

### 4.3. Arazi Örneklerinde *Sw-5* Dayanıklılık Geninin Belirlenmesi

Araziden toplanan örneklerin alındığı domates çeşitlerinin *Sw-5* genini taşıyıp taşımadığı PCR yöntemiyle genotiplendirme yapılarak belirlenmiştir. Yapılan PCR analizleri sonucunda TSWV duyarlı Alsancak çeşidinde sadece 464 bç uzunluğunda bir DNA çoğaltılırken dayanıklı Sedir çeşidinde ise biri *Sw-5* spesifik 574 bç ve diğeri 464 bç büyüklüğünde iki bant çoğaltılmıştır. Test edilen 57 örneğin sadece 4 (32, 33, 56 ve 57) tanesinden Sedire benzer biri *Sw-5* spesifik 574 bç ve diğeri 464 bç büyüklüğünde iki bant çoğaltılmıştır. Çoğaltılan bantlardan bu domates örneklerinin *Sw-5* geni bakımından heterozigot oldukları anlaşılmıştır. Geriye kalan bitkilerden 4 tanesinden (2, 9, 10 ve 11) sadece 510 bç büyüklüğünde bir bant çoğaltılırken diğerlerinden sadece 464 bç uzunluğunda bir bant çoğaltılmıştır. Bu sonuçlar her iki örnek grubunun da *Sw-5* spesifik 574 bç uzunluğundaki DNA bandını içermediği ve *Sw-5* geni taşımayan duyarlı çeşitler olduğunu göstermiştir. Ayrıca iki örnekten (41 ve 43) herhangi bir çoğaltım sağlanamamıştır (Şekil 4.2).



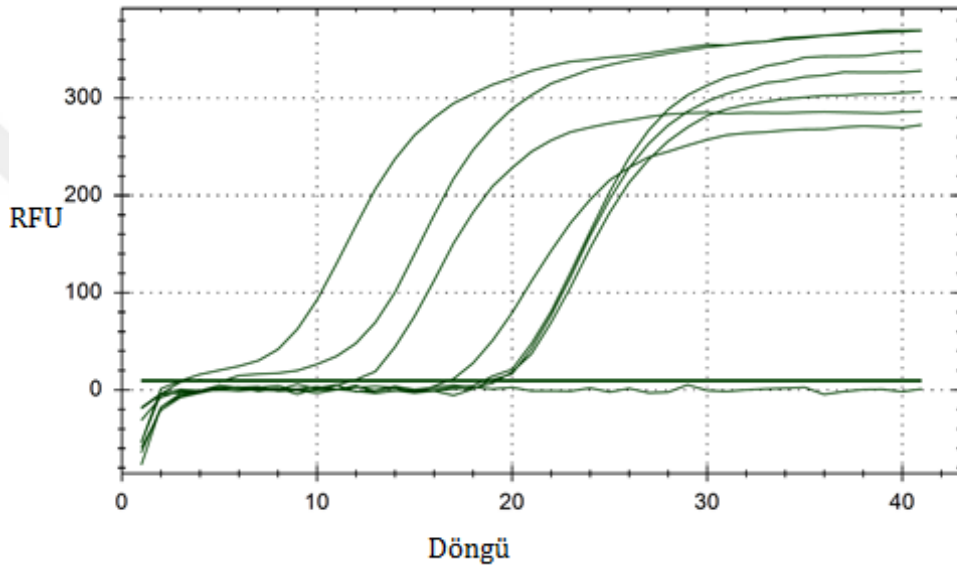
Şekil 4.2. Nükleik asit izolasyonu yapılan domates örneklerinin PCR sonuçlarına göre *Sw-5* geni içerip içermediğini gösteren jel görüntüsü

\*Şekilde kırmızı kare içine alınan örnekler *Sw-5* geni içeren domates örneklerinde dayanıklılık genini göstermektedir. M<sub>1</sub>: 1 kb Markör M<sub>2</sub>:100 bp plus Markör NK: Negatif kontrol PK<sub>1</sub>: Pozitif kontrol Sedir Dayanlı PK<sub>2</sub>: Pozitif kontrol Alsancak Hassas

#### 4.4. Mekanik İnokulasyon

*Sw-5* geni içeren TSWV'ye dayanıklı ve *Sw-5* geni içermeyen ve TSWV'ye duyarlı domates fideleri bu çalışmada kullanılmıştır. Toplam 86 farklı sağlıklı dayanıklı veya duyarlı domates bitkisine mekanik inokulasyonla TSWV izolatı bulaştırılmıştır. Daha sonra enfeksiyon yapılan dayanıklı ve duyarlı bitkilerde TSWV varlığını belirlemek amacıyla RT-PCR, yoğunluğunu belirlemek amacıyla ise real-time RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Dayanıklı ve duyarlı bitkilere 31 farklı izolatın inokulasyonu yapılmıştır. İnokulasyon yapılan toplam 31 adet TSWV izolatlarının 15 tanesi yaprak 16 tanesi ise domates meyvesinden elde edilmiştir. Geriye kalan sekiz örneğe TSWV

bulaştırılmamış ve testlemelerde negatif sonuç vermiş üç örnek ise test edilmemiştir. Mekanik inokulasyon yapılan bitkilerden RT-PCR sonucunda test edilen 28 adet bitkilerden 26 tanesinin TSWV enfekteli olduğu belirlenmiştir. Bu bitkilerden 38 tanesi real-time RT-PCR ile test edilmiş ve 28 bitkinin TSWV ile enfekte edildiği belirlenmiştir. Mekanik inokulasyon yapılan bitkilerin RT-PCR ve real time RT-PCR testlemelerinin sonucu Çizelge 4.2’de verilmiştir. Real time RT-PCR yapılan 7 farklı örneğin TSWV enfekteli çıktığını gösteren sonuçlar Şekil 4.3’de gösterilmiştir. Negatif kontrol olarak su kullanılmıştır.



Şekil 4.3. Real tie RT-PCR sonucunda pozitif çıkan TSWV örnekleri

\*TSWV 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16 numaralı domates meyvesi ve biberden izolasyon yapılan pozitif çıkan enfekteli örnekler NK: Negatif Kontrol RFU: Floresans unitesi Döngü: Döngü sayısı



Çizelge 4.2. TSWV şüpheli 57 farklı örneğin RT-PCR ve real time PCR yöntemiyle testlenmesi sonuçları

Örnek	TSWV Testleme Arazi örnekleri		Sw-5 geni Testleme	Mekanik inokulasyon	TSWV Testleme Mekanik inokulasyon	
	RT-PCR	Real-Time RT-PCR			RT-PCR	Real Time RT- PCR
					Duy./Day.	Duy./Day.
TSWV1	+	T.E	-	-	T.E	T.E
TSWV2	+	T.E	-	+	+/-	+/-
TSWV3	-	-	-	-	T.E	T.E
TSWV4	-	-	-	-	T.E	T.E
TSWV5	+	+	-	+	-/-	-/-
TSWV6	+	+	-	+	+/-	+/-
TSWV7	+	T.E	-	+	+T.E	+T.E
TSWV8	+	+	-	+	+/+	+/+
TSWV9	+	+	-	+	T.E/+	+T.E
TSWV10	+	+	-	+	T.E/+	+T.E
TSWV11	+	+	-	+	T.E/+	+T.E
TSWV12	+	+	-	+	T.E/+	+T.E
TSWV13	+	+	-	+	T.E/+	+T.E
TSWV14	+	+	-	+	T.E/+	+T.E
TSWV15	+	+	-	+	+/+	+T.E
TSWV16	+	+	-	+	T.E/+	+T.E
TSWV17	T.E	+	-	+	+T.E	+T.E
TSWV18	T.E	+	-	+	+T.E	+T.E
TSWV19	T.E	+	-	+	T.E/T.E	T.E/T.E
TSWV20	T.E	+	-	+	T.E/T.E	+T.E
TSWV21	T.E	+	-	+	T.E/T.E	+T.E
TSWV22	T.E	-	-	-	T.E	T.E
TSWV23	+	+	-	-	T.E	T.E
TSWV24	T.E	-	-	-	T.E	T.E
TSWV25	+	+	-	-	T.E	T.E
TSWV26	+	+	-	-	T.E	T.E
TSWV27	T.E	-	-	-	T.E	T.E
TSWV28	T.E	-	-	-	T.E	T.E
TSWV29	T.E	+	-	+	T.E/T.E	+T.E
TSWV30	T.E	+	-	+	T.E/T.E	-T.E
TSWV31	T.E	+	-	+	T.E/T.E	-/+
TSWV32	+	+	-	+	T.E/T.E	T.E/+
TSWV33	+	+	+	+	T.E/T.E	T.E/+
TSWV34	+	+	+	+	T.E/T.E	T.E/T.E
TSWV35	+	+	-	-	T.E	T.E
TSWV36	T.E	+	-	+	T.E/T.E	-T.E
TSWV37	+	+	-	+	-/-	+/+
TSWV38	T.E	+	-	+	T.E/T.E	+T.E
TSWV39	T.E	T.E	-	+	T.E/T.E	T.E/T.E
TSWV40	+	T.E	-	-	T.E	T.E
TSWV41	+	T.E	-	-	T.E	T.E
TSWV42	+	T.E	-	-	T.E	T.E
TSWV43	+	T.E	-	-	T.E	T.E
TSWV44	T.E	+	-	-	T.E	T.E
TSWV45	T.E	+	-	-	T.E	T.E
TSWV46	T.E	-	-	-	T.E	T.E
TSWV47	T.E	-	-	-	T.E	T.E
TSWV48	T.E	+	-	-	T.E	T.E
TSWV49	T.E	+	-	-	T.E	T.E
TSWV50	T.E	-	-	-	T.E	T.E
TSWV51	T.E	-	-	-	T.E	T.E
TSWV52	T.E	+	-	-	T.E	T.E
TSWV53	T.E	+	-	-	T.E	T.E
TSWV54	T.E	+	-	+	T.E/T.E	+/+
TSWV55	T.E	T.E	-	+	T.E/T.E	T.E/T.E
TSWV56	+	+	+	+	T.E	T.E/T.E
TSWV57	+	+	+	+	T.E	T.E/T.E

Duy:Duyarlı çeşit Day:Dayanıklı çeşit T.E: Test edilmeyen bitki  
 += TSWV enfekteli bitki -: TSWV enfekteli olmayan bitki

#### 4.5. Mekanik İnokulasyon Yapılan Bitkilerde TSWV Test Edilmesi

*Sw-5* geni içeren TSWV'ye dayanıklı ve içermeyen duyarlı domates çeşitlerine mekanik inokulasyon yapılması sonucunda TSWV enfekteli olan ve olmayan bitkiler belirlenmiştir. İnokulasyon yapılan bitkiler duyarlı ve dayanıklı çeşitlerde genellikle 3'er tekrür olacak şekilde seçilmiştir. TSWV inokulasyonu yapılan 35 duyarlı domates bitkisinden 28 tanesi mekanik inokulasyon sonrası yapılan testlemelerde TSWV enfekteli bulunmuştur. Öte yandan TSWV inokulasyonu yapılan 51 dayanıklı domates bitkisinden sadece 18 tanesi TSWV enfekteli bulunmuştur. Yapılan mekanik inokulasyon çalışmaları ve inokulasyon yapılan bitkilerin testlenmesi sonucunda dayanıklı 18 dayanıklı bitkide inokulasyon yapan ve *Sw-5* dayanıklılığını kırdığı düşünülen 13 farklı potasyel TSWV izolatu belirlemiştir.

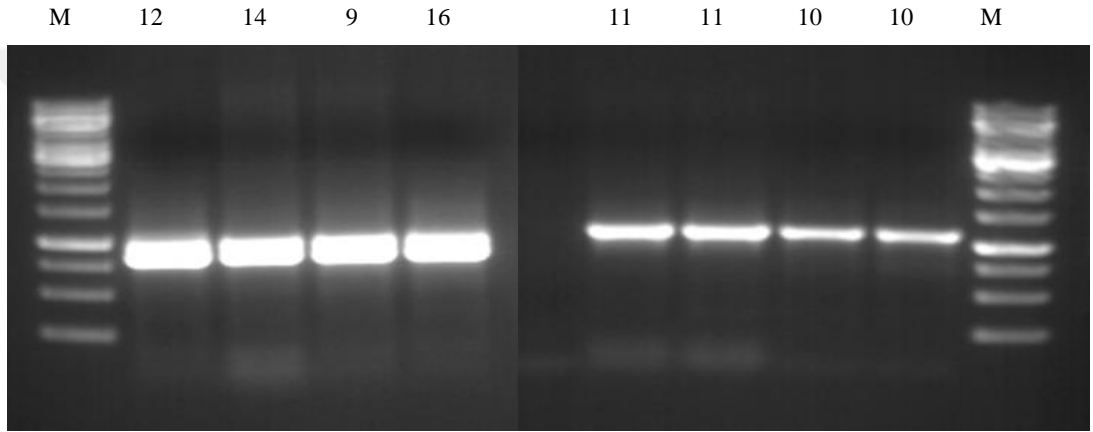
Çizelge 4.3. TSWV mekanik inokulasyonu yapılan duyarlı ve dayanıklı domates bitkilerinin virüs bulaşan bitkilerin toplam bitkiye oranı

Örnek Adı	Duyarlı Bitki (Vir./Toplam)	Dayanıklı Bitki (Vir./Toplam)	Örnek Adı	Duyarlı Bitki (Vir./Toplam)	Dayanıklı Bitki (Vir./Toplam)
TSWV1	T.E	T.E	TSWV29	0/1	0/1
TSWV2	5/5	0/5	TSWV30	0/1	T.E
TSWV3	T.E	T.E	TSWV31	0/1	1/2
TSWV4	T.E	T.E	TSWV32	T.E	3/3
TSWV5	3/3	0/3	TSWV33	T.E	2/2
TSWV6	0/3	0/3	TSWV34	T.E/3	T.E
TSWV7	3/9	T.E	TSWV35	T.E	T.E
TSWV8	3/3	1/3	TSWV36	0/1	T.E
TSWV9	1/1	1/1	TSWV37	0/5	0/5
TSWV10	1/1	1/1	TSWV38	T.E	T.E
TSWV11	1/1	1/1	TSWV39	T.E	T.E/3
TSWV12	1/1	1/1	TSWV40	T.E	T.E
TSWV13	1/1	1/1	TSWV41	T.E	T.E
TSWV14	1/1	1/1	TSWV42	T.E	T.E
TSWV15	0/2	1/2	TSWV43	T.E	T.E
TSWV16	1/1	1/1	TSWV44	T.E	T.E
TSWV17	1/1	T.E	TSWV45	T.E	T.E
TSWV18	T.E/1	T.E	TSWV46	T.E	T.E
TSWV19	1/1	T.E	TSWV47	T.E	T.E
TSWV20	1/1	T.E	TSWV48	T.E	T.E
TSWV21	1/1	T.E	TSWV49	T.E	T.E
TSWV22	T.E	T.E	TSWV50	T.E	T.E
TSWV23	T.E	T.E	TSWV51	T.E	T.E
TSWV24	T.E	T.E	TSWV52	T.E	T.E
TSWV25	T.E	T.E	TSWV53	T.E	T.E
TSWV26	T.E	T.E	TSWV54	3/3	3/3
TSWV27	T.E	T.E	TSWV55	T.E/3	T.E/3
TSWV28	T.E	T.E	TSWV56	T.E/1	T.E/3
			TSWV57	T.E/2	T.E/3

T.E: Test edilmeyen Vir: Virüs

#### 4.6. *Sw-5* Dayanıklılığını Kıran İzolatların NSm Genlerinin Klonlanması

Mekanik inokulasyon sonucunda hem duyarlı hem de dayanıklı domates çeşidinde enfeksiyon yapmasından dolayı *Sw-5* geni dayanıklılığını kırdığı düşünülen 13 örnek klonlama ve dizileme yapmak amacıyla seçilmiştir. Bu amaçla NSm genine spesifik primerler kullanılarak bu 13 örnekten TSWV NSm geni RT-PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Test edilen tüm örneklerden yaklaşık 1000 bç büyüklüğünde NSm geni çoğaltılmıştır. *Sw-5* dayanıklılığını kırdığı düşünülen TSWV izolatlarından 6 tanesinin RT-PCR yöntemiyle çoğaltılan NSm genleri Şekil 4.4’de gösterilmektedir.



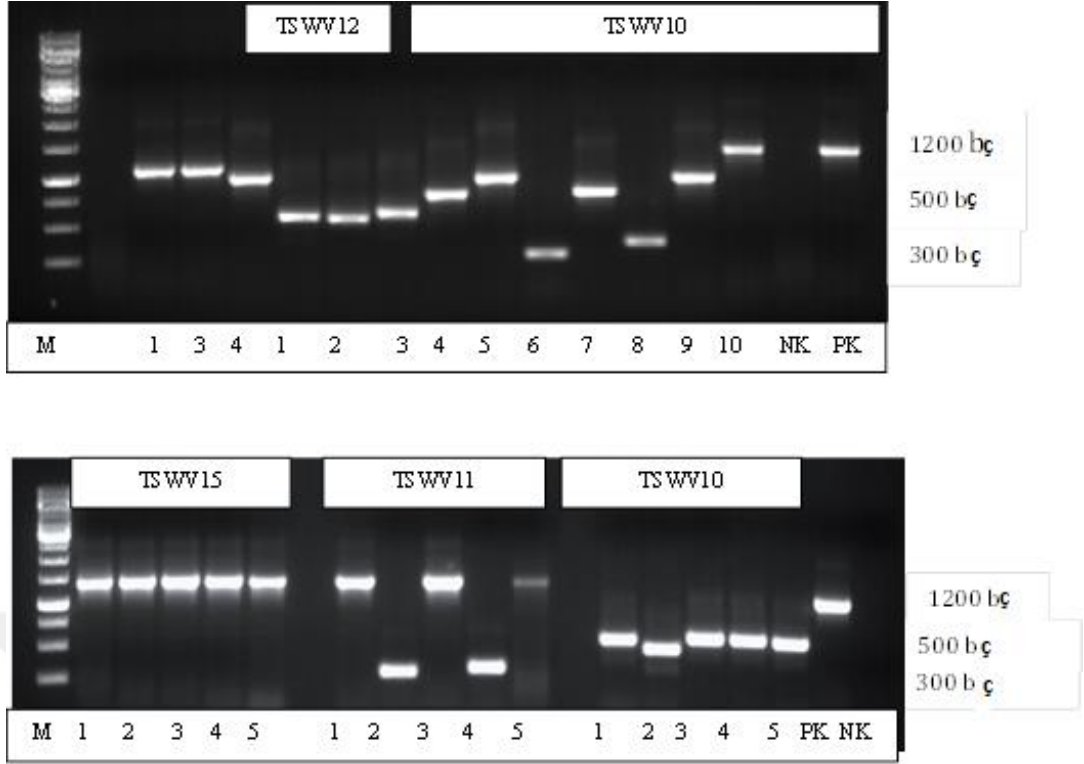
Şekil 4.4. TSWV örneklerinin 1000 bç büyüklüğündeki NSm geni jel görüntüleri

RT-PCR yapılarak NSm geni çoğaltılan örneklerin PCR ürünleri ve saflaştırılarak T-A klonlama yöntemiyle pGEM-T easy plazmit vektörüne klonlanmıştır. Saflaştırılan ve klonlanma yapılan örnekler Çizelge 4.4’de verilmektedir. TSWV NSm genini içeren pGEMT easy plazmitleri ısı şoku transformasyonu yoluyla *E. coli* bakterisinin JM109 ırkına aktarılmıştır. TSWV 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 numaralı örneklerin NSm genleri klonlama ve transformasyonu yapıldıktan sonra X-gal, Amp, IPTG içeren LB katı besiyerine ekilerek seleksiyon yapılmıştır. Her bir örnek X-gal, Amp, IPTG LB katı besiyeri 2’şer petriye yayma yapılarak mavi-beyaz seleksiyonu yapılmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda TSWV9 numaralı örnekte herhangi bir koloni oluşumu görülmezken diğer petrilere ise çok sayıda mavi ve beyaz renkli koloni oluştuğu görülmüştür. Yapılan klonlama çalışmalarında kullanılan izolatlar ve bunlardan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.4. Klonlama yapılan TSWV örneklerinin gösterimi

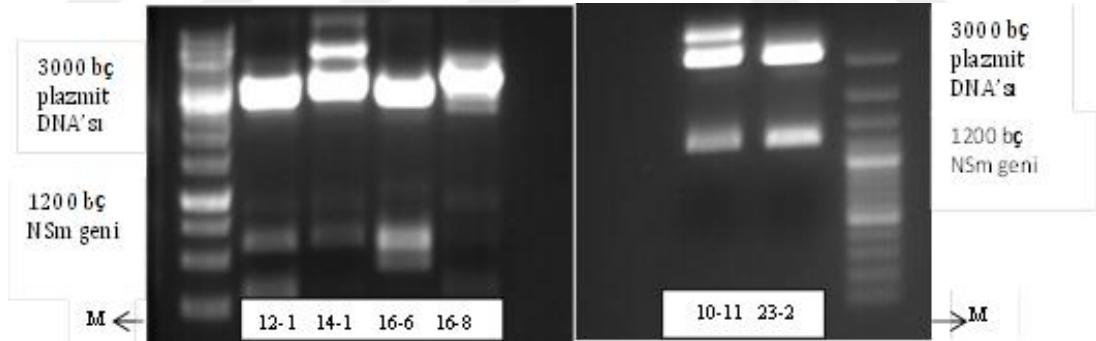
Örnek Adı	İzolasyon Yapılan Bitki	İzolasyon Yapılan Doku	PCR saflaştırma	T-A Klonlama
TSWV9	Mekanik inokulasyonlu Sedir	Yaprak	-	Başarısız
TSWV10	Mekanik inokulasyonlu Sedir	Yaprak	+	+
TSWV11	Mekanik inokulasyonlu Sedir	Yaprak	+	+
TSWV12	Mekanik inokulasyonlu Sedir	Yaprak	-	+
TSWV13	Mekanik inokulasyonlu Sedir	Yaprak	-	+
TSWV14	Mekanik inokulasyonlu Sedir	Yaprak	-	+
TSWV15	Orijinal domates bitkisi	Meyve	+	+
TSWV16	Mekanik inokulasyonlu Sedir	Yaprak	+	+
TSWV23	Orijinal bitki	Yaprak	-	Yapılmadı
TSWV32	Orijinal Domates bitkisi	Meyve	+	Yapılmadı
TSWV33	Orijinal Domates bitkisi	Meyve	+	Yapılmadı
TSWV40	Orijinal Bitki	Yaprak	+	Yapılmadı
TSWV41	Orijinal Bitki	Yaprak	+	Yapılmadı

Petri kaplarında üreyen kolonilerin TSWV NSm genlerini taşıyıp taşımadıklarını belirlemek amacıyla her bir örnek için 5 beyaz koloni seçilerek koloni PCR yapılmıştır. Yapılan koloni PCR’da negatif kontrol olarak kullanılan transformasyon yapılmamış bakteriden herhangi bir çoğaltım yapılmazken pozitif kontrol olarak kullanılan ve TSWV NSm genini içerdiği bilinen bakteriler yoluyla yaklaşık 1200 bç’lik bant çoğaltılmıştır. Her örnek için test edilen kolonilerin bazılarında yaklaşık 1200 bç NSm genini içeren bant çoğaltılırken bazılarında ise beklenen 1200 bç uzunluğundaki banttan daha küçük bantlar elde edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda 1200 bç uzunluğundan daha küçük olanlar NSm genini içermeyen koloniler olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5). Bu nedenle koloni PCR sonuçlarına göre sadece 1200 bç uzunluğunda bant oluşturan kolonilerle çalışmalara devam edilmiştir.



Şekil 4.5. Antalya ve Isparta iline ait TSWV NSm genlerini içeren kolonilerden M13F-M13R primerleri kullanılarak çoğaltılan koloni PCR'dan yaklaşık 1200 bç uzunluğunda elde edilen bantların jel görüntüleri

\*M: 1 kb Markör PK= Pozitif kontrol NK= Negatif kontrol



Şekil 4.6. *EcoRI* restriksiyon enzimleriyle kesilen TSWV örneklerinin pGEM-T easy plazmitlerinin NSm genine ait 1200 bç büyüklüğünde jel görüntüleri

\*M: 1 kb Markör

Her bir örnek için koloni PCR sonucunda 1200 bç bant oluşturan en az iki koloni seçilerek büyütülmüş ve bunlardan plazmit saflaştırması yapılmıştır. Her bir örnek için 2 farklı plazmit saflaştırması seçilerek *EcoRI* ile kesim enzimiyle kesilerek klonların TSWV NSm genini içerdikleri teyit edilmiştir. Kesilen plazmit DNA'ları agaroz jel elektforez yöntemiyle ayrıştırılıp görüntülediğinde kesilen DNA'lar yaklaşık 3000 bç büyüklüğünde pGEM-T easy plazmit DNA'sı ve yaklaşık 1200 bç büyüklüğünde TSWV NSm genine bu genin içerisinde *EcoRI* bulunan kesim

bölgelerinin de olduğu toplam büyüklükleri 1200 bç denk gelen bantlar görülmüştür. *EcoRI* kesim enzimiyle yapılan analiz sonucunda kesimin başarıyla gerçekleştiğini ve seçilen klonların istenilen plazmiti ve bunun içinde TSVV NSm genini içerdiğini göstermiştir (Şekil 4.6). TSWV NSm genini içerdiği teyit edilen plazmit DNA'ları NSm gen dizilimini belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

#### **4.7. Sw-5 Dayanıklılığını Kıran İzolatların NSm Genlerinin Dizilenmesi ve Dizi Analizleri**

Her bir örnek için TSWV NSm genini içerdiği teyit edilen bir plazmit DNA'sının dizilemesi yapılmıştır. Farklı izolatlardan çoğaltılan ve klonlanan NSm genlerinden 12 tanesi çift yönlü olarak dizilenmiştir. Klonlanan NSm genlerinden çift yönlü dizilenmesi sonucunda 130-1187 bç uzunluğunda diziler elde edilmiştir. NSm dizilemesi yapılan örnekler bunların klonları ve bu klonlardan ileri (F) ve geri (R) primerleriyle elde edilen dizi uzunlukları Çizelge 4.5'de verilmiştir. Dizileme işlemi başarılı olan ve yeterli uzunlukta NSm gen dizilimi elde edilen örneklerin iki yönlü dizileri Vectör NTI programında karşılaştırılarak birleştirilmiştir. Gen bankası veri tabanından referans olarak indirilen KU308370 NSm geni içeren izolatın başlangıç ve bitiş kodonun olduğu bölgeler belirlenerek geriye kalan diğer kısımlar çıkarılmış dizilemeye gönderilen örneklerle referans örnek baz alınarak ileri ve geri primerleriyle elde edilen diziler çift yönlü birleştirilmiştir. Yapılan birleştirmeler sonucunda 6 farklı TSWV izolatının (TSWV 10, 11, 12, 15, 32 ve 33) 909 bç uzunluğunda tüm NSm geni elde edilmiştir. Tüm gen dizilimi elde edilen NSm genlerinin translasyonu yapılarak 302 amino asit uzunluğunda dizilimleri elde edilmiştir. Öncelikli olarak bu çalışmada elde edilen ve dizilemesi yapılan 6 farklı TSWV izolatının NSm geninin amino asit dizileri birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Antalya ve Isparta illerinden alınan TSWV izolatlarının NSm proteinleriyle yapılan çoklu amino asit dizi karşılaştırması sonucunda TSWV izolatlarının NSm proteininin %95-99 arasında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Isparta ilinden alınan TSWV10-11, TSWV11-3 izolatları ve Antalya'dan alınan TSWV15-1 izolatı amino asit dizilimi düzeyinde %99 oranında benzerlik göstermişlerdir. Aynı şekilde Antalya TSWV15-1 izolatıyla Isparta TSWV11-3 izolatı sırasında da %99 amino asit dizilimi benzerliği görülmüştür. Isparta Deregümü köyünden alınan TSWV32 ve

TSWV33 izolatlarının %95 oranla en az aminoasit dizilimi benzerliği oranına sahip olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Dizilemeye gönderilen örneklerin DNA dizi büyüklüğünü gösteren tablo

Örnekler	Sonuç	DNA Dizi büyüklüğü
TSWV10-11	+	1207F-1128R
TSWV11-3	+	1146F-1036 R
TSWV12-2	-	1001F-1036R
TSWV14-1	-	715F-172R
TSWV15-1	+	1137F-1184R
TSWV16-6	-	1121F-1028R
TSWV16-8	-	721F-1037R
TSWV23-2	+	1178F-1137R
TSWV32	+	1190F-1187R
TSWV33	+	1190F-1186R
TSWV40	-	130F-5R
TSWV41	-	47F-30R

+: Çift yönlü dizi yapılan örnekler -:Çift yönlü dizilemeyen örnekler F: Forward R: Reverse

Çizelge 4.6. Türkiye'deki NSm genine ait amino asit dizilimlerinin benzerlik oranları

	TSWV15-1 NSm ANTALYA	TSWV11-3 NSm ISPARTA	TSWV32 NSm ISPARTA	TSWV33 NSm ISPARTA	TSWV23-2 NSm ISPARTA
TSWV10-11 NSm ISPARTA	<b>99</b>	<b>99</b>	96	96	98
TSWV15-1 NSm ANTALYA		<b>99</b>	96	96	98
TSWV11-3 NSm ISPARTA			96	97	98
TSWV32 NSm ISPARTA				<b>95</b>	96
TSWV33 NSm ISPARTA					96

Antalya ve Isparta illerinden alınan TSWV izolatlarının NSm proteinlerinin birbirleriyle çoklu karşılaştırılması Şekil 4.7'de verilmiştir. Şekil 4.7'de Antalya ve Isparta iline ait Türk izolatlarının NSm genine ait dizilimleri karşılaştırılmıştır. 287. aminoasit bölgesine bakıldığında 6 farklı izolattan 4 tanesi aspartik asit (D), 1 tanesi glutamik asit (E) 1 tanesi de glisin'den (G) oluşmaktadır. NSm genlerinin çoklu karşılaştırması incelendiğinde izolatların NSm genlerinin oldukça korunmuş olduğu ancak özellikle proteinin amino ve karboksil ucunda yoğunlaşan bazı farklılıkların

bulunduğu tespit edilmiştir. Farklılık gösteren bölgelerin izolatlara dağılımına bakıldığında bu farklılıkların her birinin sadece bir veya birkaç izolatla sınırlı olduğu belirlenmiştir.

			1	101
TSWV10-11	Nsm	ISPARTA	(1)	MLTLFGNKRKPSKAGKDEGFLVSLAHNGNVEVSKPWSSDEKLALTKAMDA SKGKILLNTEGTSSFGTYESDSITAESEGYDLSARMIVDTNHHISNWKND
TSWV15-1	Nsm	ANTALYA	(1)	MLTLFGNKRKPSKAGKDEGFLVSLAHNGNVEVSKPWSSDEKLALTKAMDA SKGKILLNTEGTSSFGTYESDSITAESEGYDLSARMIVDTNHHISNWKND
TSWV11-3	Nsm	ISPARTA	(1)	MLTLFGNKRKPSKAGKDEGFLVSLAHNGNVEVSKPWSSDEKLALTKAMDA SKGKILLNTEGTSSFGTYESDSITAESEGYDLSARMIVDTNHHISNWKND
TSWV32	Nsm	ISPARTA	(1)	--LFSVITGLFKSTIKDEGFLVSLAHNGNVEVSKPWSSDEKLALTKAMDA SKGKILLNTEGTSSFGTYESDSITAESEGYDLSARMIVDTNHHISNWKND
TSWV33	Nsm	ISPARTA	(1)	MLTLFGNKRKPSKAGKDEGFLVSLAHNGNVEVSKPWSSDEKLALTKAMDA SKGKILLNTEGTSSFGTYESDSITAESEGYDLSARMIVDTNHHISNWKND
TSWV23-2	Nsm	ISPARTA	(1)	MLTLFGNKRKPSKAGKDEGFLVSLAHNGNVEVSKPWSSDEKLALTKAMDA SKGKILLNTEGTSSFGTYESDSITAESEGYDLSARMIVDTNHHISNWKND
		Consensus	(1)	MLTLFGNKRKPSKAGKDEGFLVSLAHNGNVEVSKPWSSDEKLALTKAMDASKGKILLNTEGTSSFGTYESDSITAESEGYDLSARMIVDTNHHISNWKND
			102	202
TSWV10-11	Nsm	ISPARTA	(102)	LFVGNKGQANANKVIKICPTWDSRQKQMMISRVIVWCPTIPNPTGKLVVALVDPNMPSEKQVILKQQQTTIDPFCFVFLNWSIPKMNNTFENCQQLHLMC
TSWV15-1	Nsm	ANTALYA	(102)	LFVGNKGQANANKVIKICPTWDSRQKQMMISRVIVWCPTIPNPTGKLVVALVDPNMPSEKQVILKQQQTTIDPFCFVFLNWSIPKMNNTFENCQQLHLMC
TSWV11-3	Nsm	ISPARTA	(102)	LFVGNKGQANANKVIKICPTWDSRQKQMMISRVIVWCPTIPNPTGKLVVALVDPNMPSEKQVILKQQQTTIDPFCFVFLNWSIPKMNNTFENCQQLHLMC
TSWV32	Nsm	ISPARTA	(102)	LFVGNKGQANANKVIKICPTWDSRQKQMMISRVIVWCPTIPNPTGKLVVALVDPNMPSEKQVILKQQQTTIDPFCFVFLNWSIPKMNNTFENCQQLHLMC
TSWV33	Nsm	ISPARTA	(102)	LFVGNKGQANANKVIKICPTWDSRQKQMMISRVIVWCPTIPNPTGKLVVALVDPNMPSEKQVILKQQQTTIDPFCFVFLNWSIPKMNNTFENCQQLHLMC
TSWV23-2	Nsm	ISPARTA	(102)	LFVGNKGQANANKVIKICPTWDSRQKQMMISRVIVWCPTIPNPTGKLVVALVDPNMPSEKQVILKQQQTTIDPFCFVFLNWSIPKMNNTFENCQQLHLMC
		Consensus	(102)	LFVGNKGQANANKVIKICPTWDSRQKQMMISRVIVWCPTIPNPTGKLVVALVDPNMPSEKQVILKQQQTTIDPFCFVFLNWSIPKMNNTFENCQQLHLMC
			203	303
TSWV10-11	Nsm	ISPARTA	(203)	SQEYKKGVSFGSVMSWTKEFCDSPRADKDKSCMVF LNRAIRARSAQPIEACKLIIPKGNSEKQIKKQKELSSNLSVVEELFEGSDVAQLSFDI
TSWV15-1	Nsm	ANTALYA	(203)	SQEYKKGVSFGSVMSWTKEFCDSPRADKDKSCMVF LNRAIRARSAQPIEACKLIIPKGNSEKQIKKQKELSSNLSVVEELFEGSDVAQLSFDI
TSWV11-3	Nsm	ISPARTA	(203)	SQEYKKGVSFGSVMSWTKEFCDSPRADKDKSCMVF LNRAIRARSAQPIEACKLIIPKGNSEKQIKKQKELSSNLSVVEELFEGSDVAQLSFDI
TSWV32	Nsm	ISPARTA	(203)	SQEYKKGVSFGSVMSWTKEFCDSPRADKDKSCMVF LNRAIRARSAQPIEACKLIIPKGNSEKQIKKQKELSSNLSVVEELFEGSDVAQLSFDI
TSWV33	Nsm	ISPARTA	(203)	SQEYKKGVSFGSVMSWTKEFCDSPRADKDKSCMVF LNRAIRARSAQPIEACKLIIPKGNSEKQIKKQKELSSNLSVVEELFEGSDVAQLSFDI
TSWV23-2	Nsm	ISPARTA	(203)	SQEYKKGVSFGSVMSWTKEFCDSPRADKDKSCMVF LNRAIRARSAQPIEACKLIIPKGNSEKQIKKQKELSSNLSVVEELFEGSDVAQLSFDI
		Consensus	(203)	SQEYKKGVSFGSVMSWTKEFCDSPRADKDKSCMVF LNRAIRARSAQPIEACKLIIPKGNSEKQIKKQKELSSNLSVVEELFEGSDVAQLSFDI

Şekil 4.7. Türkiye'deki farklı izolatlardan oluşan NSm geni amino asit dizi karşılaştırmaları

Daha sonra dünyada ve Türkiye’de farklı domates üretim bölgelerinden elde edilen 22 farklı TSWV izolatlarının gen bankası veritabanlarında bulunan NSm genlerinin amino asit dizileri karşılaştırıldığında %95-%100 arasında değişen benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. En fazla amino asit dizi benzerliği (%100) AB010996 izolatı ile KU308372 Polonya, AY744482 AY744485 ve AF208498 ABD izolatları arasında görülmüştür. Aynı şekilde AY744486 ABD izolatı ve HM015511 İspanya izolatı arasında %100 benzerlik bulunmuştur. Türkiye izolatları dünyadaki izolatlarıyla karşılaştırıldığında en düşük amino asit dizi benzerlik oranının %95 olduğu görülmüştür. Bu çalışmada Isparta’dan belirlenen TSWV32 izolatı gen bankasından Sw-5 dayanıklılığını kıran izolat olarak kaydedilen Türkiye’de Antalya ilinden elde edilen MH367503 izolatı, HM015516 Avusturya izolatı, HM015521 İspanya izolatıyla en düşük (%95) benzerliği göstermiştir. Isparta Dereğümü köyünden alınan TSWV33 izolatı da yine aynı bölgeden alınmış olan TSWV32 izolatıyla %96 oranında düşük aminoasit dizi benzerliği göstermektedir. Ülkemizdeki 6 farklı TSWV izolatlarının dünyadaki izolatlarla karşılaştırıldığında en fazla amino asit diz benzerliğinin %99 oranında olduğu görülmektedir. Türkiyede Isparta’dan alınan TSWV11-3 ve TSWV10-11 izolatı, Antalya ilinden alınan TSWV23-2 izolatıyla AY744486 ABD izolatının amino asit diziliminde %99 oranında benzerlik görülmektedir (Çizelge 4.7). Antalya ve Isparta illerinden alınan TSWV izolatlarının NSm proteinlerinin dünya izolatlarının NSm geniyle çoklu



kaşılaştırılması Şekil 4.8’de verilmiştir. NSm geni içeren Türkiye ve dünyadaki toplam 22 farklı izolattan 7 tanesinin daha önce domateste *Sw-5* geni dayanıklılığının kırılmasından sorumlu 118. amino asitinde mutasyon olduğu görülmüştür (Şekil 4.8). Bu mutasyonu içeren izolatlar arasında daha önce Antalya’da tespit edilen MH367503 izolatu, ABD AF208496 izolatu ve İspanya HM015519, HM015517, HM015521, HM015515 izolatları, HM015516 Avustralya izolatları yer almaktadır. Ancak bu çalışmada Isparta ve Antalya’dan elde edilen TSWV izolatlarından hiçbirinin bu mutasyonu taşımadığı belirlenmiştir. NSm genlerinin çoklu kaşılaştırılmasını gösteren şekildeki mavi ile gösterilen alanlar amino asit dizilerinde farklılık olan bölgeleri sarı alanlar ise korunmuş amino asit dizi bölgelerini kapsamaktadır. Türk izolatlarında dünyadaki izolatlardan farklı olarak 287. aminoasit bölgesinde E287G ve E287D mutasyonlarını taşıdığı tespit edilmiştir. Bu mutasyonların *Sw-5* dayanıklılığını kırmadan sorumlu yeni mutasyonlar olabileceği düşünülmektedir. Ancak bunların dayanıklılığın kırılmasında önemli olup olmadıkları ayrıntılı olarak araştırılmalıdır.

Çizelge 4.7. Dünya'daki ve ülkemizdeki TSWV NSm geni amino asit dizilerinin benzerliğinin karşılaştırılması

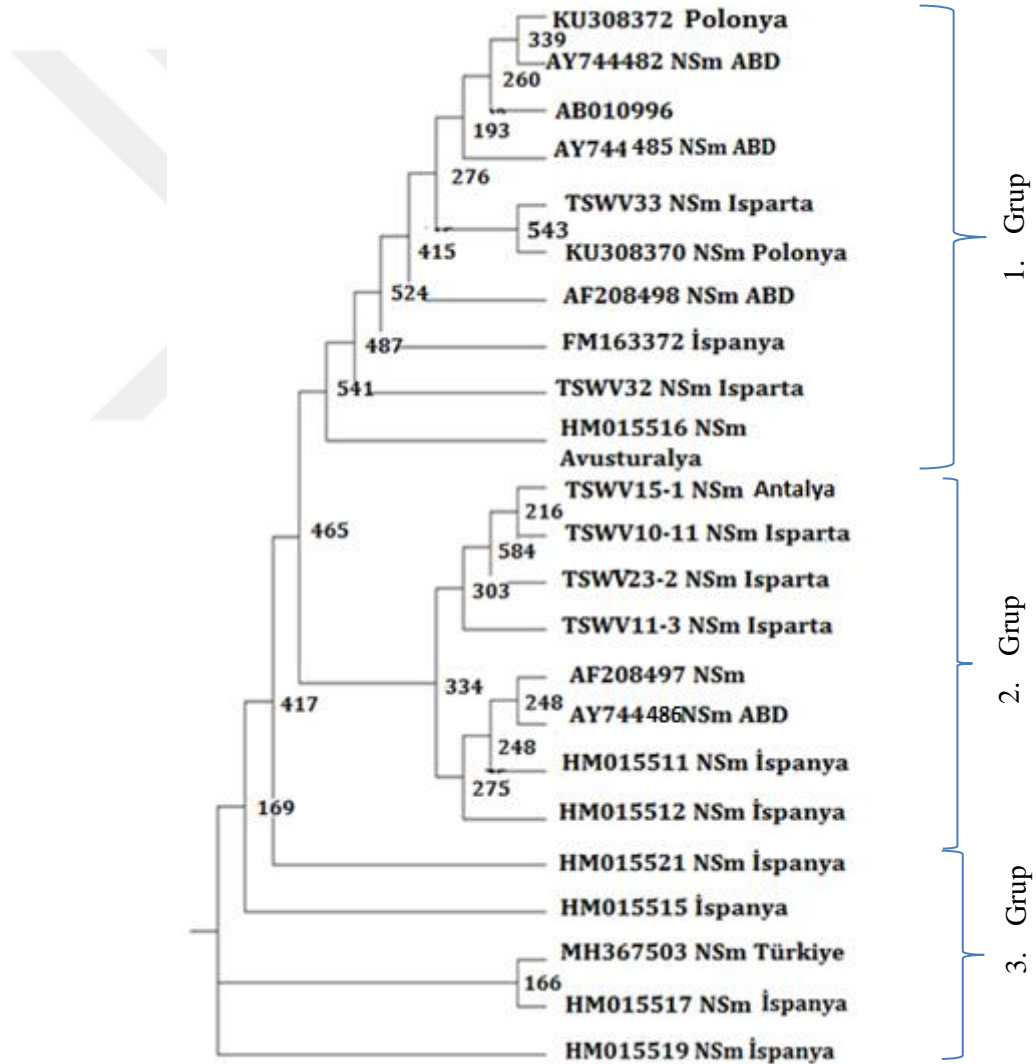
	TSWV15-1 NSm İSPARTA	TSWV10-11 NSm İSPARTA	TSWV23-2 NSm İSPARTA	TSWV33 NSm İSPARTA	TSWV32 NSm İSPARTA	AB010996 NSm	HM015512 NSm İSPANYA	AF208497 NSm	AY744486 NSm ABD	HM015511 NSm İSPANYA	KU308372 NSm POLONYA	AY744482 NSm ABD	KU308370 NSm POLONYA	AY744485 NSm ABD	FM163372 NSm İSPANYA	MH367503 NSm TÜRKİYE	AF208498 NSm ABD	HM015516 NSm AVUSTURALYA	HM015517 NSm İSPANYA	HM015519 NSm İSPANYA	HM015521 NSm İSPANYA	HM015515 NSm İSPANYA
TSWV11-3 NSm İSPARTA	99	99	98	97	96	98	99	99	99	99	98	98	96	98	98	98	98	97	99	99	99	99
TSWV15-1 NSm İSPARTA		99	98	96	96	98	98	98	99	99	97	97	96	97	97	98	97	97	98	98	98	98
TSWV10-11 NSm İSPARTA			98	96	96	98	98	98	99	99	97	97	96	98	97	98	97	97	98	98	98	98
TSWV23-2 NSm İSPARTA				96	96	97	98	98	98	99	97	97	96	97	97	97	97	97	98	98	98	98
TSWV33 NSm İSPARTA					<b>95</b>	99	97	97	97	97	98	98	98	98	98	96	98	96	97	97	96	97
TSWV32 NSm İSPARTA						96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	<b>95</b>	96	<b>95</b>	96	96	<b>95</b>	96
AB010996 NSm							98	98	98	99	<b>100</b>	<b>100</b>	98	<b>100</b>	99	97	<b>100</b>	97	98	98	98	98
HM015512 NSm İSPANYA								99	99	99	98	98	96	98	98	98	98	97	99	99	98	99
AF208497 NSm									99	99	98	98	96	98	98	98	98	97	99	99	98	99
AY744486 NSm ABD										<b>100</b>	98	98	97	98	98	98	98	98	99	99	99	99
HM015511 NSm İSPANYA											98	98	97	98	98	99	98	98	99	99	99	99
KU308372 NSm POLONYA												99	98	99	99	97	99	97	98	98	97	98
AY744482 NSm ABD													98	99	99	97	99	97	98	98	97	98
KU308370 NSm POLONYA														98	97	96	98	96	96	96	96	96
AY744485 NSm ABD															99	97	99	97	98	98	97	98
FM163372 NSm İSPANYA																97	99	97	98	98	97	98
MH367503 NSm TÜRKİYE																	98	97	99	99	98	99
AF208498 NSm ABD																		98	98	98	98	98
HM015516 NSm AVUSTURALYA																			98	98	98	98
HM015517 NSm İSPANYA																				99	99	99
HM015519 NSm İSPANYA																					99	99
HM015521 NSm İSPANYA																						99

	1	101
TSWV11-3 Nsm İSPARTA	(1)	MULTFGNKRPKSAGKDEPVLVSLARHNGNVEVSKPWSDDLALTKAMASGKILLITGTSSEFGYEDSDIIESEGYDLSARIVDTNHRISNKNK
TSWV15-1 Nsm ANTALYA	(1)	MULTFGNKRPKSAGKDEPVLVSLARHNGNVEVSKPWSDDLALTKAMASGKILLITGTSSEFGYEDSDIIESEGYDLSARIVDTNHRISNKNK
TSWV10-11 Nsm İSPARTA	(1)	MULTFGNKRPKSAGKDEPVLVSLARHNGNVEVSKPWSDDLALTKAMASGKILLITGTSSEFGYEDSDIIESEGYDLSARIVDTNHRISNKNK
TSWV23-2 Nsm İSPARTA	(1)	MULTFGNKRPKSAGKDEPVLVSLARHNGNVEVSKPWSDDLALTKAMASGKILLITGTSSEFGYEDSDIIESEGYDLSARIVDTNHRISNKNK
TSWV33 Nsm İSPARTA	(1)	MULTFGNKRPKSAGKDEPVLVSLARHNGNVEVSKPWSDDLALTKAMASGKILLITGTSSEFGYEDSDIIESEGYDLSARIVDTNHRISNKNK
TSWV32 Nsm İSPARTA	(1)	MULTFGNKRPKSAGKDEPVLVSLARHNGNVEVSKPWSDDLALTKAMASGKILLITGTSSEFGYEDSDIIESEGYDLSARIVDTNHRISNKNK
AB010996 Nsm	(1)	MULTFGNKRPKSAGKDEPVLVSLARHNGNVEVSKPWSDDLALTKAMASGKILLITGTSSEFGYEDSDIIESEGYDLSARIVDTNHRISNKNK
HM015512 Nsm İSPANYA	(1)	MULTFGNKRPKSAGKDEPVLVSLARHNGNVEVSKPWSDDLALTKAMASGKILLITGTSSEFGYEDSDIIESEGYDLSARIVDTNHRISNKNK
AF208497 Nsm	(1)	MULTFGNKRPKSAGKDEPVLVSLARHNGNVEVSKPWSDDLALTKAMASGKILLITGTSSEFGYEDSDIIESEGYDLSARIVDTNHRISNKNK
AY744486 Nsm AMERİKA BİRLEŞİK DEV.	(1)	MULTFGNKRPKSAGKDEPVLVSLARHNGNVEVSKPWSDDLALTKAMASGKILLITGTSSEFGYEDSDIIESEGYDLSARIVDTNHRISNKNK
AY744482 Nsm AMERİKA BİRLEŞİK DEV.	(1)	MULTFGNKRPKSAGKDEPVLVSLARHNGNVEVSKPWSDDLALTKAMASGKILLITGTSSEFGYEDSDIIESEGYDLSARIVDTNHRISNKNK
AY744485 Nsm AMERİKA BİRLEŞİK DEV.	(1)	MULTFGNKRPKSAGKDEPVLVSLARHNGNVEVSKPWSDDLALTKAMASGKILLITGTSSEFGYEDSDIIESEGYDLSARIVDTNHRISNKNK
AF208498 Nsm AMERİKA BİRLEŞİK DEV.	(1)	MULTFGNKRPKSAGKDEPVLVSLARHNGNVEVSKPWSDDLALTKAMASGKILLITGTSSEFGYEDSDIIESEGYDLSARIVDTNHRISNKNK
HM015516 Nsm AVUSTRALYA	(1)	MULTFGNKRPKSAGKDEPVLVSLARHNGNVEVSKPWSDDLALTKAMASGKILLITGTSSEFGYEDSDIIESEGYDLSARIVDTNHRISNKNK
HM015517 Nsm İSPANYA	(1)	MULTFGNKRPKSAGKDEPVLVSLARHNGNVEVSKPWSDDLALTKAMASGKILLITGTSSEFGYEDSDIIESEGYDLSARIVDTNHRISNKNK
HM015519 Nsm POLONYA	(1)	MULTFGNKRPKSAGKDEPVLVSLARHNGNVEVSKPWSDDLALTKAMASGKILLITGTSSEFGYEDSDIIESEGYDLSARIVDTNHRISNKNK
HM015521 Nsm İSPANYA	(1)	MULTFGNKRPKSAGKDEPVLVSLARHNGNVEVSKPWSDDLALTKAMASGKILLITGTSSEFGYEDSDIIESEGYDLSARIVDTNHRISNKNK
HM015515 Nsm İSPANYA	(1)	MULTFGNKRPKSAGKDEPVLVSLARHNGNVEVSKPWSDDLALTKAMASGKILLITGTSSEFGYEDSDIIESEGYDLSARIVDTNHRISNKNK
Consensus	(1)	MULTFGNKRPKSAGKDEPVLVSLARHNGNVEVSKPWSDDLALTKAMASGKILLITGTSSEFGYEDSDIIESEGYDLSARIVDTNHRISNKNK
	102	
TSWV11-3 Nsm İSPARTA	(102)	LVFVNGKQNKANKVLYPTWSSRQYMMISRIWVWPTIPNPTGRLVVALVDNPMSEKQILRGGQITDPICFVEYLNWISIPMNTFENCQILHMG
TSWV15-1 Nsm ANTALYA	(102)	LVFVNGKQNKANKVLYPTWSSRQYMMISRIWVWPTIPNPTGRLVVALVDNPMSEKQILRGGQITDPICFVEYLNWISIPMNTFENCQILHMG
TSWV10-11 Nsm İSPARTA	(102)	LVFVNGKQNKANKVLYPTWSSRQYMMISRIWVWPTIPNPTGRLVVALVDNPMSEKQILRGGQITDPICFVEYLNWISIPMNTFENCQILHMG
TSWV23-2 Nsm İSPARTA	(102)	LVFVNGKQNKANKVLYPTWSSRQYMMISRIWVWPTIPNPTGRLVVALVDNPMSEKQILRGGQITDPICFVEYLNWISIPMNTFENCQILHMG
TSWV33 Nsm İSPARTA	(102)	LVFVNGKQNKANKVLYPTWSSRQYMMISRIWVWPTIPNPTGRLVVALVDNPMSEKQILRGGQITDPICFVEYLNWISIPMNTFENCQILHMG
TSWV32 Nsm İSPARTA	(102)	LVFVNGKQNKANKVLYPTWSSRQYMMISRIWVWPTIPNPTGRLVVALVDNPMSEKQILRGGQITDPICFVEYLNWISIPMNTFENCQILHMG
AB010996 Nsm	(102)	LVFVNGKQNKANKVLYPTWSSRQYMMISRIWVWPTIPNPTGRLVVALVDNPMSEKQILRGGQITDPICFVEYLNWISIPMNTFENCQILHMG
HM015512 Nsm İSPANYA	(102)	LVFVNGKQNKANKVLYPTWSSRQYMMISRIWVWPTIPNPTGRLVVALVDNPMSEKQILRGGQITDPICFVEYLNWISIPMNTFENCQILHMG
AF208497 Nsm	(102)	LVFVNGKQNKANKVLYPTWSSRQYMMISRIWVWPTIPNPTGRLVVALVDNPMSEKQILRGGQITDPICFVEYLNWISIPMNTFENCQILHMG
AY744486 Nsm AMERİKA BİRLEŞİK DEV.	(102)	LVFVNGKQNKANKVLYPTWSSRQYMMISRIWVWPTIPNPTGRLVVALVDNPMSEKQILRGGQITDPICFVEYLNWISIPMNTFENCQILHMG
AY744482 Nsm AMERİKA BİRLEŞİK DEV.	(102)	LVFVNGKQNKANKVLYPTWSSRQYMMISRIWVWPTIPNPTGRLVVALVDNPMSEKQILRGGQITDPICFVEYLNWISIPMNTFENCQILHMG
AY744485 Nsm AMERİKA BİRLEŞİK DEV.	(102)	LVFVNGKQNKANKVLYPTWSSRQYMMISRIWVWPTIPNPTGRLVVALVDNPMSEKQILRGGQITDPICFVEYLNWISIPMNTFENCQILHMG
AF208498 Nsm AMERİKA BİRLEŞİK DEV.	(102)	LVFVNGKQNKANKVLYPTWSSRQYMMISRIWVWPTIPNPTGRLVVALVDNPMSEKQILRGGQITDPICFVEYLNWISIPMNTFENCQILHMG
HM015516 Nsm AVUSTRALYA	(102)	LVFVNGKQNKANKVLYPTWSSRQYMMISRIWVWPTIPNPTGRLVVALVDNPMSEKQILRGGQITDPICFVEYLNWISIPMNTFENCQILHMG
HM015519 Nsm İSPANYA	(102)	LVFVNGKQNKANKVLYPTWSSRQYMMISRIWVWPTIPNPTGRLVVALVDNPMSEKQILRGGQITDPICFVEYLNWISIPMNTFENCQILHMG
HM015521 Nsm İSPANYA	(102)	LVFVNGKQNKANKVLYPTWSSRQYMMISRIWVWPTIPNPTGRLVVALVDNPMSEKQILRGGQITDPICFVEYLNWISIPMNTFENCQILHMG
HM015515 Nsm İSPANYA	(102)	LVFVNGKQNKANKVLYPTWSSRQYMMISRIWVWPTIPNPTGRLVVALVDNPMSEKQILRGGQITDPICFVEYLNWISIPMNTFENCQILHMG
Consensus	(102)	LVFVNGKQNKANKVLYPTWSSRQYMMISRIWVWPTIPNPTGRLVVALVDNPMSEKQILRGGQITDPICFVEYLNWISIPMNTFENCQILHMG
	202	
TSWV11-3 Nsm İSPARTA	(203)	SEYKRGVSGVMSYWTKEFCDSPADKDKSCMVIPLNRAIRARSQAFIEACKLIIIPGNSEKQIKKQLELSSISRSVEEELGSDSVALSDFDI
TSWV15-1 Nsm ANTALYA	(203)	SEYKRGVSGVMSYWTKEFCDSPADKDKSCMVIPLNRAIRARSQAFIEACKLIIIPGNSEKQIKKQLELSSISRSVEEELGSDSVALSDFDI
TSWV10-11 Nsm İSPARTA	(203)	SEYKRGVSGVMSYWTKEFCDSPADKDKSCMVIPLNRAIRARSQAFIEACKLIIIPGNSEKQIKKQLELSSISRSVEEELGSDSVALSDFDI
TSWV23-2 Nsm İSPARTA	(203)	SEYKRGVSGVMSYWTKEFCDSPADKDKSCMVIPLNRAIRARSQAFIEACKLIIIPGNSEKQIKKQLELSSISRSVEEELGSDSVALSDFDI
TSWV33 Nsm İSPARTA	(203)	SEYKRGVSGVMSYWTKEFCDSPADKDKSCMVIPLNRAIRARSQAFIEACKLIIIPGNSEKQIKKQLELSSISRSVEEELGSDSVALSDFDI
TSWV32 Nsm İSPARTA	(201)	SEYKRGVSGVMSYWTKEFCDSPADKDKSCMVIPLNRAIRARSQAFIEACKLIIIPGNSEKQIKKQLELSSISRSVEEELGSDSVALSDFDI
AB010996 Nsm	(203)	SEYKRGVSGVMSYWTKEFCDSPADKDKSCMVIPLNRAIRARSQAFIEACKLIIIPGNSEKQIKKQLELSSISRSVEEELGSDSVALSDFDI
HM015512 Nsm İSPANYA	(203)	SEYKRGVSGVMSYWTKEFCDSPADKDKSCMVIPLNRAIRARSQAFIEACKLIIIPGNSEKQIKKQLELSSISRSVEEELGSDSVALSDFDI
AF208497 Nsm	(203)	SEYKRGVSGVMSYWTKEFCDSPADKDKSCMVIPLNRAIRARSQAFIEACKLIIIPGNSEKQIKKQLELSSISRSVEEELGSDSVALSDFDI
AY744486 Nsm AMERİKA BİRLEŞİK DEV.	(203)	SEYKRGVSGVMSYWTKEFCDSPADKDKSCMVIPLNRAIRARSQAFIEACKLIIIPGNSEKQIKKQLELSSISRSVEEELGSDSVALSDFDI
AY744482 Nsm AMERİKA BİRLEŞİK DEV.	(203)	SEYKRGVSGVMSYWTKEFCDSPADKDKSCMVIPLNRAIRARSQAFIEACKLIIIPGNSEKQIKKQLELSSISRSVEEELGSDSVALSDFDI
AY744485 Nsm AMERİKA BİRLEŞİK DEV.	(203)	SEYKRGVSGVMSYWTKEFCDSPADKDKSCMVIPLNRAIRARSQAFIEACKLIIIPGNSEKQIKKQLELSSISRSVEEELGSDSVALSDFDI
AF208498 Nsm AMERİKA BİRLEŞİK DEV.	(203)	SEYKRGVSGVMSYWTKEFCDSPADKDKSCMVIPLNRAIRARSQAFIEACKLIIIPGNSEKQIKKQLELSSISRSVEEELGSDSVALSDFDI
HM015516 Nsm AVUSTRALYA	(203)	SEYKRGVSGVMSYWTKEFCDSPADKDKSCMVIPLNRAIRARSQAFIEACKLIIIPGNSEKQIKKQLELSSISRSVEEELGSDSVALSDFDI
HM015519 Nsm İSPANYA	(203)	SEYKRGVSGVMSYWTKEFCDSPADKDKSCMVIPLNRAIRARSQAFIEACKLIIIPGNSEKQIKKQLELSSISRSVEEELGSDSVALSDFDI
HM015521 Nsm İSPANYA	(203)	SEYKRGVSGVMSYWTKEFCDSPADKDKSCMVIPLNRAIRARSQAFIEACKLIIIPGNSEKQIKKQLELSSISRSVEEELGSDSVALSDFDI
HM015515 Nsm İSPANYA	(203)	SEYKRGVSGVMSYWTKEFCDSPADKDKSCMVIPLNRAIRARSQAFIEACKLIIIPGNSEKQIKKQLELSSISRSVEEELGSDSVALSDFDI
Consensus	(203)	SEYKRGVSGVMSYWTKEFCDSPADKDKSCMVIPLNRAIRARSQAFIEACKLIIIPGNSEKQIKKQLELSSISRSVEEELGSDSVALSDFDI

Şekil 4.8. Türkiye'deki ve dünyadaki farklı izolatlardan oluşan NSm proteinlerinin çoklu amino asit dizi karşılaştırmaları  
 \*Dayanıklılığın kırılmasından sorumlu mutasyonlar kırmızı ok işaretiyle gösterilmektedir

Bu çalışmada Antalya ve Isparta'dan elde edilen TSWV izolatları dünyanın farklı domates üretim bölgelerinden elde edilen 22 farklı TSWV izolatlarının NSm genlerinin amino asit dizileri kullanılarak filogenetik analizler yapılmıştır. Yapılan filogenetik analizler sonucunda oluşan soy ağacı Şekil 4.9'da gösterilmektedir. Soy ağacı incelendiğinde karşılaştırılan TSWV izolatlarının 3 ana gruba ayrıldığı belirlenmiştir. Birinci grupta Polonya, İspanya, ABD, Avustralya, bu çalışmada elde edilen iki izolatu (TSWV32 ve 33) da içeren 10 TSWV izolatu yer almıştır. İkinci grupta ise dört tanesi İspanya ve ABD'den dört tanesi de bu çalışmada elde edilen izolatlardan oluşan toplam 8 izolat bulunmaktadır. Üçüncü grupta daha önce domateste *Sw-5* dayanıklılığını kırdığı rapor edilen bir Türkiye ve dört tane de İspanya izolatu bir araya gelmiştir. Bu gruptaki izolatlardan HM015515, HM015519,

HM015521 İspanya izolatları birbirlerinden farklı olup ayrı bir alt grup oluştururken MH367503 Türkiye ve HM015517 İspanya izolatları birbirlerine daha yakın alt grup oluşturduğu belirlenmiştir. Üçüncü grupta yer alan beş farklı izolatin tamamında 118. amino asit bölgesinde Sw-5 dayanıklılığını kıran C118Y mutasyonunun olduğu belirlenmiştir. Farklı TSWV izolatların NSm proteinlerinin karşılaştırılmasıyla oluşturulan soy ağacının 166-584 arasında değişen bootstrap değerlerine sahip olduğu ve bu değerlerin özellikle ana grupların olduğu yerlerde daha fazla olduğu görülmektedir. Bu da soy ağacındaki grupların tesadüf olmadığını dallanmaların çoğunun istatistiksel açıdan desteklendiğini göstermiştir.

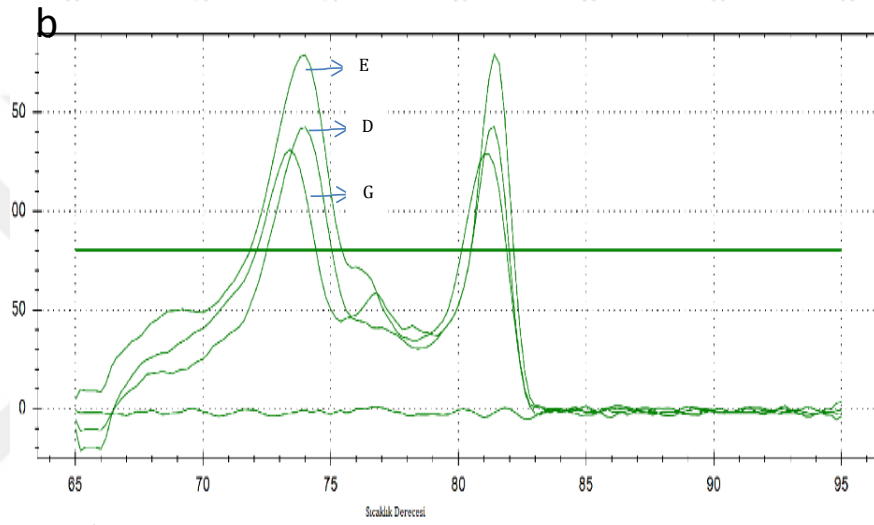
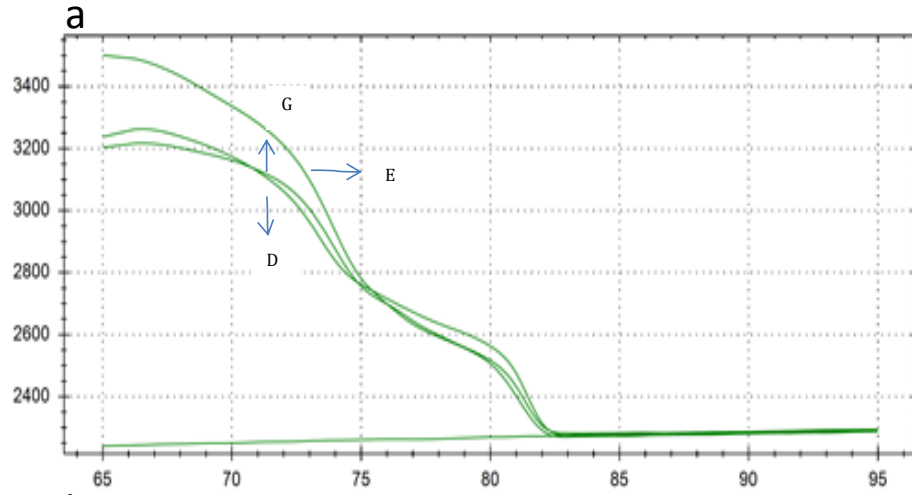


Şekil 4.9. Antalya ve Isparta'dan elde edilen TSWV izolatlarının NSm proteinlerinin dünyanın farklı domates üretim bölgelerinden elde edilen ve gen bankası veritabanında bulunan TSWV izolatlarının NSm proteinleriyle karşılaştırılması sonucunda oluşturulan soy ağacı

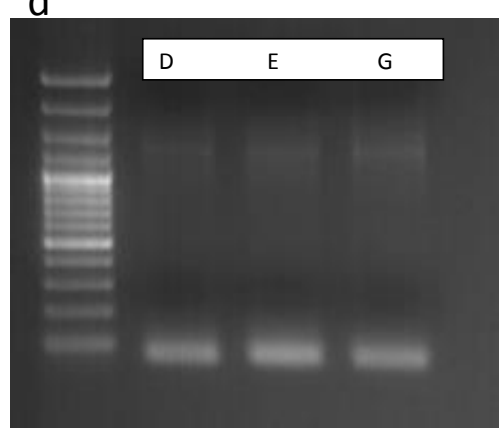
#### 4.8. SYBR Green Bazlı Real-Time PCR Yöntemi Geliştirilmesi

Isparta ve Antalya'dan elde edilen ve mekanik inokulasyonla *Sw-5* geni içeren Sedir domates çeşidine inokulasyon yapılan izolatların NSm gen dizilimleri belirlendiğinde tanımlanan mutasyonlar içermediği görülmüştür. Ancak elde edilen izolatların NSm geninin 287. amino asidinde iki farklı mutasyon olduğu ve bu mutasyonların gen bankasında bulunan TSWV izolatlarının NSm genlerinde bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu izolatların *Sw-5* geni içeren Sedir domates çeşidinde enfeksiyon yapması *Sw-5* dayanıklılığını kırmış olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle *Sw-5* dayanıklılığını kırdığı düşünülen izolatlardan NSm proteininin 287. amino asit pozisyonunda farklı amino asitleri içeren izolatlar seçilerek bu mutasyonları birbirinden ayıracak SYBR Green bazlı real-time PCR yöntemi geliştirilmiştir. Mutasyon taşıyan TSWV11, TSWV15, TSWV33 numaralı örneklerin klonlarının NSm genleri BC402 ve BC403 primerleriyle çoğaltılarak yaklaşık 1000 bç uzunluğunda tüm NSm geni çoğaltılmıştır. Çoğaltılan PCR ürünleri saflaştırmalarından sonra konsantrasyonları belirlenmiş ve her birinin konsantrasyonu 20 ng/μl eşitlenmiştir. Hazırlanan kalıp DNA'lardan 40 ng ve BC453-BC454 primerleri kullanılarak yapılan real-time PCR sonucunda 59,5°C annealing sıcaklığında her üç izolatın NSm genin de en iyi şekilde çoğaltıldığı ve erime analizlerinde bu genlerin erime sıcaklıklarının da birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.10). Yapılan analizler sonucunda iki erime pikinin olduğu ve bunlardan düşük olanın (73-75°C) NSm nin çoğaltılan kısmına büyük olanın (81-82°C) ise kullanılan kalıp DNA'ya ait olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.10). Kalıp DNA'ların erime sıcaklıklarında herhangi bir fark olmadığı ancak NSm geninin mutasyon taşıyan çoğaltılan kısmının ise izolatların NSm gen parçasının için farklı erime sıcaklıklarını sahip olduğu ve izolatları birbirinden ayrılabilen erime pikleri oluşturduğu gözlemlenmiştir. Sonuçlar yakından incelendiğinde 287. amino asit yerinde sırasıyla D ve E içeren TSWV15, TSWV33 74,00°C erime sıcaklığına sahipken aynı pozisyonda G taşıyan TSWV11 izolatının NSm gen parçası ise 73,40°C'de erimmiştir (Şekil 4.10). Bu sonuçlar mutant NSm genlerinin real-time PCR'la birlikte yapılan erime analizleriyle birbirlerinden ayrılabilceğini göstermiştir.

TSWV bir RNA virüsü olmasından dolayı bu yöntemin RNA'dan yapılmaya uyarlanması gerektiğinden yöntem öncesi RT uygulanarak RNA'dan cDNA sentezlenmiş real-time RT-PCR yapılmıştır. Yapılan real-time RT-PCR analizleri sonucunda 81 °C civarında erime gösteren kalıp DNA ortadan kaldırılmış ve farklı izolatların 74 °C civarında farklı erime pikleri oluşturmuştur (Şekil 4.11). Yapılan incelemede 287. amino asit yerinde sırasıyla D ve E, G taşıyan TSWV11, TSWV15 ve TSWV33 örneklerinin erime sıcaklığının sırasıyla 74,20 °C, 74,40 °C ve 75,60 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.11). Bu sonuçlar mutant NSm genlerinin real-time RT-PCR'la birlikte yapılan erime analizleriyle biri birlerinden daha etkin bir şekilde ayrılabilirliğini göstermiştir. Son araziden toplanan 7 farklı örnek birlikte olarak NSm gen dizilimi bilinen ve 287. amino asitinde mutasyon taşıyan 3 izolat ve mutasyon içermeyen referans izolatlarla birlikte real-time RT-PCR ve erime analizine tabi tutulmuştur. Sonuçlar incelendiğinde 287. amino asit yerinde sırasıyla G, D ve E içeren TSWV11, TSWV15 ve TSWV33 referans izolatların çoğaltılan NSm gen bölgesinin erime sıcaklığının sırasıyla 74,60 °C, 74,40 °C ve 75,80 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.12). Dizileme yapılmayan ve mutasyon taşıyıp taşımadığı bilinmeyen izolatların real-time RT-PCR çoğaltımı ve erime analizlerinin sonuçları TSWV26, 56 ve 57 izolatlarının TSWV11 referans izolatıyla aynı erime sıcaklığına sahip olduğu ve 287 amino asitinde G içerebileceğini yani E287G mutanlığı olduğunu göstermiştir (Şekil 4.12). Yapılan analizler ayrıca TSWV9 ve 29 izolatlarının TSWV15 referans izolatıyla aynı erime sıcaklığına (74,40 °C) sahip olduğu ve 287 amino asitte D taşıyabileceğini yani E287D mutanlığı olduğunu göstermiştir (Şekil 4.12). Aynı şekilde analiz edilen TSWV48 izolatının NSm geninin erime sıcaklığının mutasyon taşıyan ve taşımayan referans izolatlardan farklı (74,20°C) olduğu ve büyük olasılıkla 287. amino asitte veya çoğaltılan bölge içinde farklı bir mutasyona sahip olduğu işaret etmektedir. Bu sonuçlar test edilen 7 izolatın hepsinin dayanıklılığı kırmayan referans izolattan farklı olduğunu ve 6 tanesinin bu çalışmada 287. amino asitte bulunduğu belirlenen ve Sw-5 dayanıklılığının kırılmasıyla ilişkili olduğu düşünülen iki mutasyondan birini içerdiğini göstermiştir.

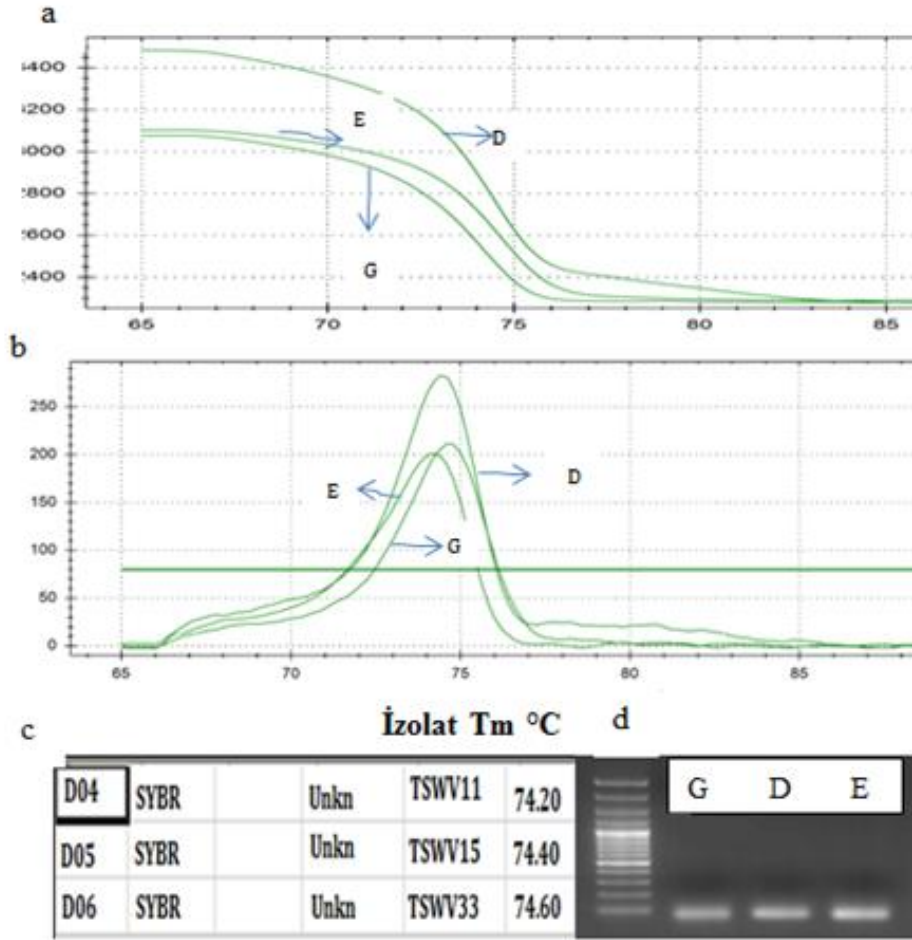


c	İzolat	Tm °C
	TSWV15	74.00
	TSWV15	81.40
	TSWV33	81.00
	TSWV33	74.00
	TSWV11	73.40
	TSWV11	81.40
		None



Şekil 4.10. Farklı mutasyonları içeren TSWV NSm genlerinin PCR ile sentezlenmiş kalıp DNA'lar kullanılarak SYBR Green bazlı real time PCR yöntemiyle ayrılması

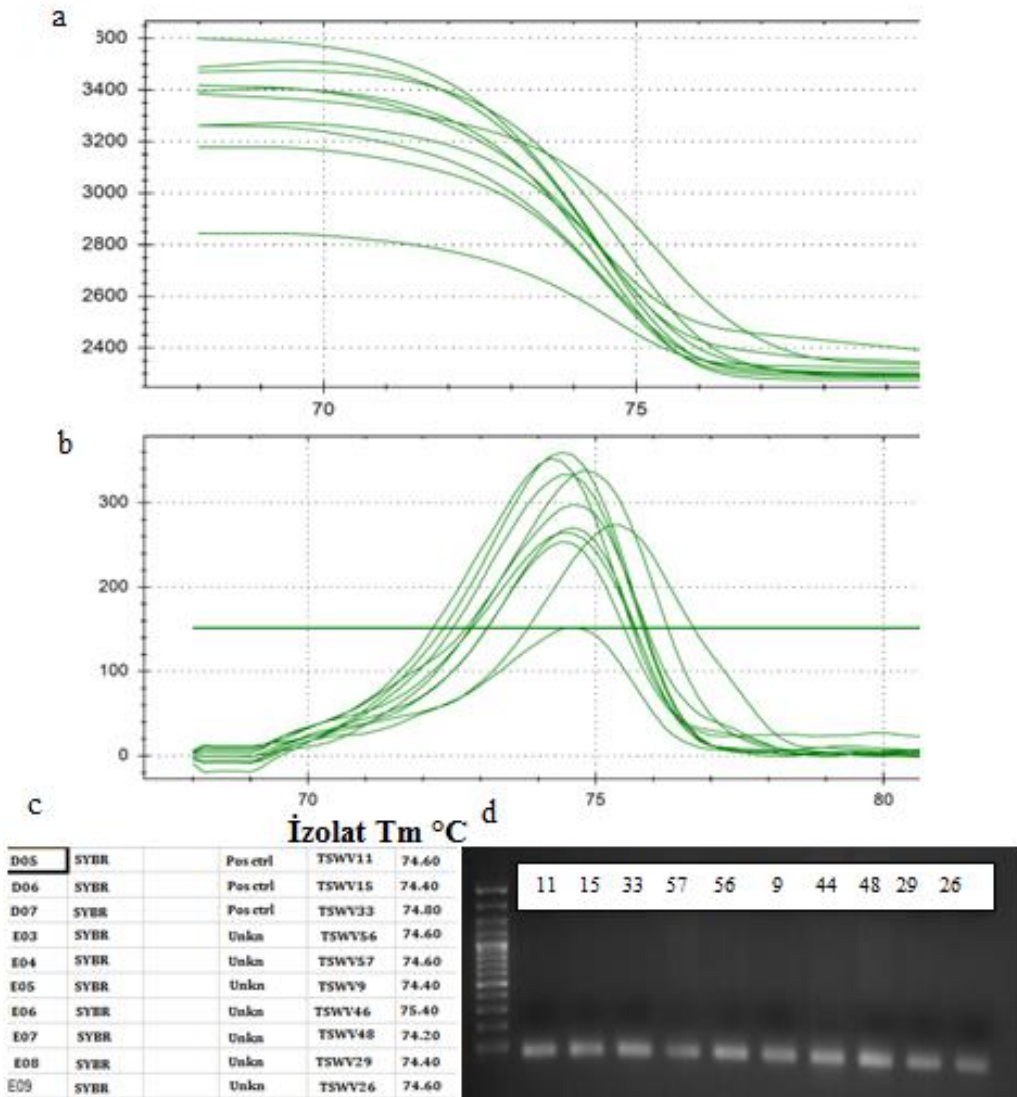
- \* a. TSWV örneklerinin erime eğrisini gösteren grafik
- \* b. TSWV örneklerinin erime noktasını ve miktarını gösteren grafik.
- \* c. TSWV örneklerinin erime sıcaklıklarını gösteren çizelge
- \* d. Real time PCR da çoğaltılan 89 bp büyüklüğündeki bölgenin jel görüntüsü
- \* D: Aspartik asit E: Glutamik asit G: Glisin



Şekil 4.11. Farklı mutasyonları içeren TSWV NSm genlerinin bitkiden elde edilen RNA kullanılarak SYBR Green bazlı real-time RT-PCR yöntemiyle ayrılması

- \* a. TSWV örneklerinin erime eğrisini gösteren grafik
- \* b. TSWV örneklerinin erime noktasını ve miktarını gösteren grafik.
- \* c. TSWV örneklerinin erime sıcaklıklarını gösteren çizelge
- \* d. Real time PCR da çoğaltılan 89 bp büyüklüğündeki bölgenin jel görüntüsü
- \* D: Aspartik asit E: Glutamik asit G: Glisin





Şekil 4. 12. Araziden toplanan TSWV izolatlarının farklı mutasyonları içeren TSWV NSm genlerini SYBR Green bazlı real-time RT-PCR yöntemiyle ayrılması

- \* a. TSWV örneklerinin erime eğrisini gösteren grafik
- \* b. TSWV örneklerinin erime noktasını ve miktarını gösteren grafik
- \* c. TSWV örneklerinin erime sıcaklıklarını gösteren çizelge
- \* d. Real time PCR da çoğaltılan 89 bp büyüklüğündeki bölgenin jel görüntüsü

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Isparta ve Antalya illeri domates üretim ve satış alanlarından toplanan 57 örnekten 54 tanesi TSWV varlığı için RT-PCR ve/veya real-time RT-PCR yöntemiyle testlenmiştir. Yapılan testlemeler sonucunda 54 örnekten 46 tanesinin TSWV ile enfekteli olduğu ve toplanan simptomatik bitkilerde enfeksiyon oranının %85,1 olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada Antalya ve Isparta illerini de kapsayan Batı Akdeniz Bölgesinde TSWV varlığı ELISA testleriyle tespit edilmiş ve yaygınlığı belirlenmiştir. Domateste TSWV enfeksiyon oranının %66,6 olduğu (Yardımcı ve Çulal-Kılıç, 2009), Antalya ilinde ise domateste TSWV enfeksiyon oranının %81 (Bozdoğan ve Kamberoğlu, 2015) olduğu belirlenmiştir. Sonuçlara bakıldığında Antalya ve Isparta illerinde TSWV enfeksiyonunun eskiden beri yaygın olduğunu göstermektedir. Bizim yaptığımız çalışmada ise enfeksiyon oranının daha önce aynı bölgelerde yapılan çalışmalardan daha fazla bulunmasının nedeninin önceki çalışmalarda kullanılan ELISA testine göre çok daha duyarlı RT-PCR ve real-time RT-PCR yöntemlerinin kullanılması olduğu düşünülmektedir. Sonuçlar karşılaştırıldığına tüm çalışmalarda enfeksiyon oranlarının yüksek olduğu ve serolojik yöntemlerin TSWV tespitinde etkin bir şekilde kullanılabileceği görülmektedir. Ancak kritik durumlarda ELISA negatif çıkan örneklerin RT-PCR veya real-time RT-PCR yöntemleriyle test edilmesi önerilir.

Bu çalışmada daha önce Antalya bölgesinde bulunduğu belirlenen domateste *Sw-5* dayanıklılığını kıran TSWV izolatlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. *Sw-5* dayanıklılık geni domatesin yabani türlerinden biri olan *Solanum peruvianum*'dan belirlenmiş ve daha sonra melezleme yoluyla ticari domates çeşitlerine aktararak TSWV dayanıklı domates çeşitleri elde edilmiştir (Stevens vd., 1991). *Sw-5* gene-karşı-gen etkileşimine göre çalışan dominant bir dayanıklılık geni olup farklı *Orthospovirus*'e karşı dayanıklılık sağlamadığından domateste dayanıklılık ıslahında kullanılan en yaygın gendir (Stevens vd., 1995). *Sw-5* genini taşıyan domates bitkileri TSWV ile mekanik inokulasyon yapılarak virüse karşı dayanıklı olup olmadıkları tespit edilmektedir (Gordillo vd., 2008). Ayrıca *Sw-5* geniyle bağlantılı moleküler markörler geliştirilmiş olup bu markörler kullanılarak domates çeşit ve hatlarının *Sw-5* genini taşıyıp taşımadıkları hızlı bir şekilde belirlenmektedir. Bu nedenle TSWV izolatlarının dayanıklılığı kıran izolat olarak

biyotiplendirilebilmesi için *Sw-5* dayanıklılık genini içeren domates bitkilerinin enfekte ederek onlarda çoğalması gerekmektedir. Bunun için bu çalışmada elde edilen örneklerin hepsi daha önce belirlenen moleküler markörle testlenerek TSWV enfeksiyonu görülen bitkilerin *Sw-5* dayanıklılık geni içerip içermedikleri yani potansiyel olarak dayanıklılığı kıran izolat olup olmadıkları belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda test edilen 55 örneğin sadece 4 tanesinin *Sw-5* dayanıklılık geni içerdiği belirlenmiş geriye kalanının *Sw-5* geni taşımadıkları yani dayanıklı olmadıkları belirlenmiştir. Ancak örnek alımları sırasında gerek yetiştiricilerden gerekse satıcıların verdikleri bilgilere göre toplanan örneklerin büyük çoğunluğunun TSWV'ye dayanıklı olduğu belirtilmiştir. Benzer şekilde daha önce yapılan bir çalışmada tohum/fide üretici veya satıcıları tarafından *Sw-5* dayanıklılığı içerdiği söylenen bazı izolatların yapılan testlemeler sonucunda *Sw-5* dayanıklılık geni içermediği belirlenmiştir (Koca, 2012). Bu nedenle domates çeşitlerinin *Sw-5* geni içerip içermedikleri moleküler markörler kullanılarak test edilmeli ve virüs inokülasyonu yapılarak da dayanıklılık teyit edilmelidir.

Antalya'da yapılan bir çalışmada moleküler markörlerle testlenerek dayanıklı veya duyarlı oldukları belirlenen domates çeşitlerine TSWV izolatı mekanik inokülasyon yapılarak inokülasyondan 20 gün sonra bitkilerde hastalık belirtileri incelenmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda dayanıklı bitkilerde herhangi bir hastalık belirtisi görülmezken duyarlı bitkilerde yaprak damarları arasında kahverengi renk değişimi ve beneklenmeler gözlenmiştir (Oğuz vd., 2009). İnokülasyon yapılan bitkilerde TSWV için ELISA testi uygulandığında belirti gösteren ve *Sw-5* geni içermeyen duyarlı bitkiler pozitif sonuç verirken *Sw-5* geni içeren dayanıklı bitkilerden negatif sonuç elde edilmiştir. Bu çalışmada ise bazı TSWV izolatlarıyla mekanik inokülasyon yapılan dayanıklı ve duyarlı bitkilerde enfeksiyondan 20-25 gün sonra bitkilerde TSWV belirtisi gözlenmiş her iki çeşitte de belirgin şekilde bitki boyunda kısıalma ve yaprakta klorotik lekelenmeler görülmüştür. Ayrıca yapılan RT-PCR ve/veya real-time RT-PCR testlerinde bu izolatlarla inokülasyon yapılan dayanıklı ve duyarlı domates çeşitlerinde virüs yoğunluğu genellikle yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar elde edilen ve mekanik inokülasyon yapılan TSWV izolatlarının bazılarının dayanıklılığı kıran izolatlar olabileceğini göstermiştir. *Sw-5* dayanıklılığını kıran TSWV izolatlarının varlığı 1998 tarihinden beri bilinmektedir (Latham ve Jones, 1998). *Sw-5* dayanıklılığını kıran izolatlar önceleri mekanik

inokulasyon çalışmalarıyla belirlenmemiştir. Daha sonra dayanıklılığı kıran izolatların moleküler karakterizasyonları yapılmaya başlanmış ve dayanıklılığın kırılmasının virüs genomunun M segmeniyle ilişkili olduğu bulunmuştur (Hoffmann vd., 2001). Yapılan çalışmalar sonucunda NSm geninin bitkide *Sw-5* geni tarafından tanınan ve avirülens faktörü olduğu belirlenmiştir (Peiró vd., 2014). *Sw-5* dayanıklılığını kıran ve kırmayan TSWV izolatların NSm genindeki genetik varyasyon ve evrimsel analizler NSm geninin 118 ve 120 amino asitlerinde meydana gelen C118Y veya T120N nokta mutasyonlarının dayanıklılığın kırılmasından sorumlu olduğu tespit edilmiştir (Lopez vd., 2011). Aynı mutasyonların dünyanın İspanya (Aramburu ve Martí, 2003; Lopez vd., 2011), İtalya (Ciuffo vd., 2005), Avustralya ve Kaliforniya, ABD’de (Batuman vd., 2017), Türkiye (Fidan ve Sarı, 2019) domatesten elde edilen *Sw-5* dayanıklılığını kıran TSWV izolatlarında bulunmuştur. Ancak yapılan bu çalışmada *Sw-5* geni taşıyan bitkileri enfekte eden ve dayanıklı bitkilerde çoğalabilen TSWV izolatları tespit edilmesine rağmen bu izolatların söz konusu mutasyonları içermediği belirlenmiştir.

Ülkemizde Isparta ve Antalya ilinden 6 farklı TSWV izolatlarının NSm genlerinin aminoasit dizilimleri belirlenmiştir. Bu aminoasit dizilimleri kendi aralarında ve dünyanın farklı ülkelerinden elde edilen ve gen bankası veri tabanlarından bulunan TSWV izolatlarıyla karşılaştırılmıştır. İzolatların kendi aralarında yapılan karşılaştırma sonucunda bu çalışmada dizilenen farklı TSWV izolatlarının NSm genlerin amino asit dizilimlerinin oldukça korunmuş olduğu ve izolatlar arasında sadece %1-4 aralık olduğu belirlenmiştir. Ülkemizde daha önce yapılan bir çalışmada domateste *Sw-5* dayanıklılığını kıran bir TSWV izolatu bulunmuş ve bu izolatın NSm dizilimi belirlenmiştir (Fidan ve Sarı, 2019). Bu çalışmada kullanılan TSWV izolatlarıyla daha önce çalışılan TSWV izolatlarının NSm genleri arasında sadece %1-3 oranında farklılık görülmüştür. Bu sonuçlar ülkemizde bulunan TSWV izolatlarının NSm genlerinin oldukça korunmuş olduğu ve bunlar arasındaki genetik varyasyonun amino asit düzeyinde %1-4 arasında olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada ve önceki çalışmada kullanılan izolatların tamamı Antalya ve Isparta bölgesinden ve domates bitkisinden elde edilmiştir. Ülkemiz TSWV izolatlarının NSm genlerinin genetik çeşitliliğinin belirlenmesi için farklı bölgelerden ve farklı konukçulardan elde edilen çok sayıda farklı TSWV izolatının tüm genomunun, N segmentinin veya NSm genlerinin dizilenerek karşılaştırılması gerekmektedir.

Antalya ve Isparta domates üretim bölgelerinden elde edilen 6 farklı TSWV izolatlarının gen bankası veri tabanlarında bulunan TSWV izolatlarının NSm genlerinin amino asit dizileri karşılaştırıldığında da NSm genlerinin %0-5 arasında değişen farklılık gösterdikleri belirlenmiştir. Bu sonuçlar ülkemiz TSWV izolatlarıyla dünya izolatlarının NSm genlerinde düşük oranda varyasyon olduğunu göstermiştir. Daha önce yapılan ve dünyanın farklı domates üretim bölgelerindeki izolatların karşılaştırılması sonucunda da benzer oranda dizi benzerlikleri görülmüş olup dünya genelinde TSWV izolatlarının NSm genlerinin oldukça korunmuş olduğu belirlenmiştir (Silva vd., 2001; Sivparsad, 2006; Kaye vd., 2011).

Bu çalışmada elde edilen TSWV izolatlarının dünya izolatlarıyla birlikte yapılan filogenetik analizler sonucunda oluşturulan soyağacına bakıldığında TSWV izolatları NSm genlerine göre üç grup altında toplanmıştır. Bu gruplandırmalar daha önce farklı TSWV izolatlarıyla yapılan analizlerden elde edilen filogenetik gruplarla benzerlik göstermektedir (Tsompana vd., 2005; Lopez vd., 2011). Gruplarla TSWV izolatların coğrafik dağılımları veya konukçu tercihleri arasında net bir bağlantı olmamakla birlikte birinci ve ikinci grupta farklı coğrafik bölgelerden ve farklı konukçulardan elde edilen TSWV izolatları yer almıştır. Buna karşın üçüncü grup sadece domates bitkisinden elde edilen izolatları içerirken virüslerin farklı ülkelerden elde edildiği görülmektedir. Bu çalışmada elde edilen TSWV izolatlarının NSm genlerine göre en fazla ikinci grupta toplandığı görülmüştür ve bu filogenetik grupla ilişkili olduğu belirlenirken bu izolatlardan sadece ikisi birinci grupta yer almıştır. Üçüncü gruba ait tüm izolatların tamamı *Sw-5* geni dayanıklılığını kıran izolatlardan oluşmakta olup daha önce Antalya'dan alınan ve *Sw-5* dayanıklılığını kırdığı belirlenen MH367503 izolatu da bu grupta yer almıştır. Ancak bu çalışmada karakterizasyonu yapılan TSWV izolatlarından hiçbiri bu grupta yer almamıştır. Sonuçlara göre çalışmada belirlenen dayanıklılığı kıran izolatların farklı filogenetik gruba dahil olduğunu ve daha önce NSm genindeki C118Y mutasyonu ile *Sw-5* dayanıklılığını kırdığı belirlenen TSWV izolatından farklı mutasyon(lar) taşıdıklarını göstermektedir. Farklı kıtalardan elde edilen izolatların filogenetik ilişkisinin, vektör tripslerin uzun mesafe göç kabiliyeti ile taşınmasında etkili olabileceği tartışılarak dayanıklılığı kıran TSWV izolatlarının İspanya'ya trips vektörleri ile taşınmış olabileceği belirtilmiştir (Lopez vd., 2011). Yapılan filogenetik analizler Antalya'da

daha önce rapor edilen ve *Sw-5* dayanıklılığını kıran TSWV MH367503 Antalya izolatının Avrupa kökenli olduğu ve büyük olasılıkla İspanya'dan gelmiş olabileceği düşünülmektedir. Ancak, TSWV NSm proteinleriyle ilgili yapılan başka bir çalışmada trips vücudunda biriken TSWV izolatlarının dayanıklılığın kırılmasıyla ilişkili olmadığı belirtilmiştir (Debreczeni vd., 2014).

Bu çalışmada *Sw-5* dayanıklılığını kıran Türk izolatlarında dünyadaki izolatlardan farklı olarak 287. amino asit bölgesinde E287G ve E287D mutasyonlarını taşıdığı tespit edilmiştir. NSm korunmuş olsa da proteinde meydana gelen birkaç mutasyon proteinin görevini yapamamasına neden olmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda NSm geni yüksek oranda korunmuş olsa da proteinin 118. amino asidinde meydana gelen C118Y mutasyonunun proteinin fonksiyonunu etkilediği ve *Sw-5* dayanıklılığının kırılmasına neden olduğu belirlenmiştir.

Türkiye izolatları ve dünyanın farklı bölgelerinden elde edilen 140 farklı izolatların NSm proteinleri karşılaştırıldığında 119 izolatın 287. amino asit bölgesinde glutamik asit (E), 11 tanesinde serin (S), 4 adet glisin (G), 4 adet aspartik asit (D) olduğu tespit edilmiştir. D içeren 4 izolatın tamamının bu çalışmada elde edilen Türk RB TSWV izolatları olduğu görülmektedir. NSm geninde E287D mutasyonunu taşıyan izolatların *Sw-5* geni içeren dayanıklı Sedir domates çeşidinde enfeksiyona yol açtığı görülmüştür ancak domateste *Sw-5* geni dayanıklılığını kırılmasının bu mutasyonla ilişkili olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Bu çalışmada dizilenen 6 TSWV izolatının NSm 287. aminoasit bölgesinde bulunan amino asit ve bunu kodlayan kodonların dizisi (Çizelge 5.1) verilmiştir. Bu çalışmada TSWV NSm geninde belirlenen mutasyonların virüsün hareket proteininin fonksiyonu ve *Sw-5* geni tarafından tanınmasına etkisi henüz araştırılmamıştır. Ancak mutasyon taşıyan izolatların *Sw-5* dayanıklılık genini taşıyan domates bitkilerini enfekte etmesi ve hastalık belirtilerine yol açması bu mutasyonun *Sw-5* dayanıklılığını kırmadan sorumlu yeni mutasyonlar olabileceğini işaret etmektedir. Ancak bunların dayanıklılığın kırılmasında önemli olup olmadıkları ayrıntılı olarak araştırılmalıdır.

Çizelge 5.1. TSWV dizilemeye gönderilen örneğin amino asit karşılığı

Örnek Adı	Aminoasit dizilimi	Nükleotid dizilimi	Kodon Karşılığı
TSWV10-11	D	G A T	G A U
TSWV11-3	G	G G T	G G U
TSWV15-1	D	G A T	G A U
TSWV23-2	D	G A T	G A U
TSWV32	D	G A T	G A U
TSWV33	E	G A G	G A G

D:Aspartik asit E:Glutamik asit G:Glisin (Aminoasit açılımı)

A:Adenin G:Guanin U:Urasil T:Timin (Nükleotid açılımı)

Bitki virüsleri kendilerine karşı geliştirilen dayanıklılığın üstesinden gelmek için mutasyon rekombinasyon ve reassortment (yeniden yapılanma) gibi çeşitli stratejiler kullanılmaktadır. Dayanıklılığı kıran TSWV izolatlarıyla yapılan bir çalışmada GARD programı kullanılarak virüs genomunda meydana gelen rekombinasyon araştırıldığında analiz edilen TSWV izolatlarının M segmentinde dayanıklılığın kırılmasıyla ilişkili rekombinasyon olayı bulunamamıştır. Negatif iplikçikli RNA virüslerinde rekombinasyon, pozitif iplikçikli RNA virüslerinden çok daha nadir olduğundan, TSWV için bunun beklenen bir sonuç olduğu belirtilmiştir (Chare ve Holmes, 2006). Buna karşılık, TSWV izolatları arasında RNA genom segmentleri arasında reassortment (yeniden yapılanma) olduğu ve bunun dayanıklılığı kıran TSWV izolatlarının gelişiminde rol oynayabileceği bildirilmiştir (Qiu ve Moyer, 1999). Birçok virüs konukçu etkileşiminde bitki virüslerinin dayanıklılığın kırılması virüsün farklı proteinlerde az sayıda amino asit değişmesiyle meydana gelen mutasyonla ilişkilendirilmiştir (Meshi vd., 1989; Tsuda vd., 1998; Karasawa vd., 1999; Matsumoto vd., 2009). Dünyanın farklı domates üretim bölgelerinden elde edilen *Sw-5* dayanıklılığını kıran ve kırmayan TSWV izolatlarının NSm genlerinin karşılaştırılması sonucunda 118. ve 120. amino asit pozisyonlarında C118T ve/veya T120N mutasyonların bulunduğu belirlenmiştir (Lopez vd., 2011). Bu mutasyonların *Sw-5* allelinin yaygın kullanımının nedeniyle virüse uygulanan pozitif seleksiyona sonucunda oluşabileceği ve dayanıklı çeşitlerde çoğalabilen virüslerin yani RB izolatu oluşabileceği belirtilmiştir (de Ronde vd., 2014). *Sw-5* geninin, HR tepkisi yoluyla *Orthotospovirus*'e dayanıklılık sağladığı bilinmektedir. Ancak tospoviruslerin NSm proteinlerinde meydana gelen C118Y mutasyonunun *Sw-5* dayanıklılık geninin NSm'yi tanımayı engellediği ve HR'yi başlatamayarak bitkilerde sistemik TSWV enfeksiyonlarına yol açtığı bildirilmiştir (Leastro vd., 2015). NSm

geni, *Sw-5* proteininin HR'yi tetiklememesi durumunda yani fonksiyonel bir *Sw-5* dayanıklılık geni yokluğunda veya C118Y mutasyonunun oluştuğunda NSm hücreden hücreye hareket proteini olarak virüsün plazmadezmata yoluyla komşu sağlıklı hücrelere geçmesini sağlamaktadır. Son yıllarda, NSm proteininin tübül oluşumu, virüsün hücreden hücreye hareketi ve bitki-konukçu simptomatolojisi ile ilgili TSWV kısımları belirlenerek gen üzerinde haritalandırılmıştır. Ayrıca *Orthospovirus*'lere karşı *Sw-5b* dayanıklılığının ortaya çıkmasında ve virüsün hücreden hücreye hareketi için NSm proteini tamamının gerekip gerekmediği analiz edildiğinde NSm'nin her iki ucundan da 50 amino asit kadar kesilip çıkarılmasının *Sw-5* aracılı HR'yi tetiklemek için avirulensi etkilemediği belirlenmiştir. Bu sonuçlar NSm geninin orta kısmının *Sw-5* geniyle etkileşimden sorumlu olduğu ve proteinin bölgesinde meydana gelen mutasyonların dayanıklılığın kırılmasına etkili olabileceğini göstermiştir. Daha önce *Sw-5* dayanıklılığını kıran TSWV izolatlarının NSm genlerinde bulunan C118T ve T120N mutasyonları söz konusu bölge içerisinde bulunmaktadır. Ancak bu çalışmada NSm geninde tespit edilen E287D mutasyonunu NSm geninin söz konusu bölgesinin dışında yer aldığı belirlenmiştir. Bu nedenle 287. amino asit bölgesindeki mutasyonun *Sw-5* dayanıklılığını kırılmasını ve içeren mutasyona uğrayan bölgelerin ve avirülensliği etkileyip etkilemediği araştırılmalıdır.

Dünyanın farklı domates üretim bölgelerinden elde edilen *Sw-5* dayanıklılığını kıran ve kırmayan TSWV izolatlarının NSm genlerinin karşılaştırılması sonucunda 118. amino asit pozisyonlarında tespit edilen nokta mutasyonuna C118T (Lopez vd., 2011) göre RB ve NRB izolatların tespit edilmesinde kullanılmıştır. Bu amaçla 2018 yılında yapılan bir çalışmada göre C118T mutanti ile normal TSWV izolatları arasında ayırım yapabilen yüksek çözünürlüklü erime (HRM) ve TaqMan yöntemiyle uygulanan iki RT-PCR bazlı genotipleme yöntemi geliştirilmiştir (di Rienzo vd., 2018). Geliştirilen yöntem ile C118T mutanti ile normal TSWV izolatları spesifik primer ve proplar kullanılarak etkin bir şekilde ayrılmıştır (di Rienzo vd., 2018). Ülkemizde bulunan RB TSWV izolatlarının blirlenmesi amacıyla bu yöntemin kullanılması düşünülmüştür. Ancak yukarıda belirtildiği gibi bu çalışmada elde edilen RB izolatların NSm genlerinde C118T mutasyonu bulunmadığından bu yöntem kullanılamamıştır. Elde edilen bulgular ülkemiz RB izolatlarında farklı mutasyonların bulunduğunu göstererek bu yöntemin ülkemizde bulunan izolatların taranmasında yeterli olmayacağı görülmüştür. Bu nedenle ülkemizde bulunan RB



TSWV izolatlarının belirlenmesi için daha önce geliştirilen yöntemle kullanılabilir yeni bir real-time RT-PCR yöntemi geliştirilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen yöntemde hedefe özel bir primer kullanımıyla real-time RT-PCR bazlı genotiplendirme analizi sağlanarak tek bir bazlık farklılığa dayalı olarak mutasyonların belirlenmesi sağlanmıştır. Gerek bu çalışmada gerekse daha önceki çalışmada geliştirilen yöntemler tek bazlık farklılıkların bile etkin, doğru ve tutarlı bir şekilde belirlenmesini sağlamıştır (di Rienzo vd., 2018). Daha önceki çalışmada viral sekans varyantlarının ayırt edilmesine uygulanan Custom TaqMan™ ve SNP Genotiplendirme testlerinin her ikisi birlikte kullanılmış ve her iki yaklaşımladabirki viral popülasyonlarının genotiplendirilmesi etkin bir şekilde yapılmıştır (di Rienzo vd., 2018). TaqMan testlerinin 50–70 TSWV RNA kopya aralığında tespit eşiğinde olduğu ve HRM'den daha güvenilir olduğu gösterilmiş (di Rienzo vd., 2018) olmasına rağmen 25 adet TSWV izolatının her iki yöntem ile genotiplendirilmesi doğru bir şekilde yapılmıştır. Bu nedenle yaptığımız çalışmada her iki yöntemi kullanmak yerine maliyeti daha düşük olan SYBR Green bazlı çoğaltım ve erime analizlerine dayalı genotiplendirme yöntemi tercih edilmiştir. Yapılan analizlerde gerek farklı mutasyonları taşıdığı bilinen DNA ve RNA örneklerinden real-time PCR ve iki aşamalı real-time RT-PCR yöntemi ve erime analizleri birlikte kullanılarak 287. pozisyonunda E, D ve G amino asitleri içeren örneklerin ayrımları etkin bir şekilde yapılmıştır. Daha sonra mutasyon taşıdığı bilinen örnekler ve bilinmeyen örnekler birlikte test edilerek doğrudan bitkiden alınan örneklerin mutasyon taşıyıp taşımadığı ve hangi mutasyonu taşıdığı belirlenmiştir. Bu nedenle bu çalışmada geliştirilen yöntem domateste TSWV RB izolatlarının hızlı bir şekilde belirlenmesinde kullanılabilir. Ayrıca bu yöntem söz konusu mutasyonları taşıyan TSWV RB izolatlarının dağılımı, yayılımı, taşınması ve yoğunluğuyla ilgili çalışmalarda da kullanılabilir.

## KAYNAKLAR

- Adams, M.J., Lefkowitz, E. J., King, A.M. Q., Harrach, B., Harrison, R.L., Knowles, N.J., Kropinski, A.M., Kuhn, M.K. H., Mushegian, A.R., Nibert, M. Sabanadzovic, S., Sanfaçon H., Siddell, S.G., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F.M, Gorbalenya, A.E., & Davison, A. (2017). Changes to taxonomy and the international code of virus classification and nomenclature ratified by the international committee on taxonomy of viruses. *Archives of Virology*, 162, 2505-2538.
- Adkins, S., Quadt, R., Choi, T.J., Ahlquist P. & German, T. (1995). An RNA-dependent RNA polymerase activity associated with virions of *Tomato spotted wilt virus*, a plant- and insect-infecting bunyavirus. *Virology*, 207, 308-311.
- Adkins, S. (2000). *Tomato spotted wilt virus*-positive steps towards negative success. *Molecular Plant Pathology*, 1, 151-157.
- Agrios, G.N. (1997). *Plant Pathology*, 4th Edition, Academic Press, San Diego.
- Agrios, G.N., (2005). *Plant Pathology*. Fifth Edition. Printed in the United States of America. 922.
- Andret-Link, P. & Fuchs M. (2005). Transmission specificity of plant viruses by vectors. *Journal of Plant Pathology*, 87(3), 153-165.
- Anonim (2006). Sebze Üretimi. [http://www.tarim.gov.tr/arayuz/9/icerik.asp?efl=tarim\\_sektor/index.htm&curdir=\sanal\\_kutuphane\tarim\\_sektor&fl=tarimsal\\_uretim.htm](http://www.tarim.gov.tr/arayuz/9/icerik.asp?efl=tarim_sektor/index.htm&curdir=\sanal_kutuphane\tarim_sektor&fl=tarimsal_uretim.htm) (Son erişim tarihi: 20.04.2019)
- Anonymous (2007). *Tomato Spotted Wilt Virus* [www.eppo.org/Quarantine/virus/](http://www.eppo.org/Quarantine/virus/) (Son erişim tarihi: 24.05.2019)
- Aramburu, J., Rodriguez, M. & Arino, J. (2000). Effect of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) infection on the fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants of cultivars carrying the *Sw-5* gene. *Journal Phytopathology*, 148, 569-574.
- Aramburu, J. & Martí, M. (2003). The occurrence in north-east Spain of a variant of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the *Sw-5* gene. *Plant Pathology*, 52(3), 407 – 407.
- Aramburu, J., Galipienso, L., Soler, S. & López, C. (2010). Characterization of *Tomato spotted wilt virus* isolates that overcome the *Sw-5* resistance gene in tomato and fitness assays. *Phytopathology Mediterranea*, 49, 342–351.
- Barone, A. (2004). Molecular Marker Assisted Selection for Resistance to Pathogens in Tomato. MAS in Plants. <http://www.fao.org/biotech/docs/Barone.pdf>. (Son erişim tarihi: 18.05.2019)

- Batuman, O., Turini, T. A., Oliveira, P.V., Rojas, M.R., Macedo, M., Mellinger, H. C., Adkins, S.T. & Gilbertson, R.L. (2017). First report of a resistance-breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* infecting tomatoes with the Sw-5 tospovirus-resistance gene in California. *Plant Disease*, 101(4), 637. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1371-PDN>
- Bailey, J. (2003). Investigations into possible seed transmission of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). North Carolina Peanut Research Project Reports.
- Bent, A.F., Kunkel, B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J., & Staskawicz, B.J. (1994). RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucinerich repeat class of plant disease resistance genes, 265, 1856-1860.
- Bhatt, A.I., Pappu, S.S., Pappu, H.R., Deom, C.M. & Culbreath, A.K. (1999). Analysis of the intergenic region of *Tomato spotted wilt Tospovirus* medium RNA segment. *Virus Resistance*, 61, 161-170.
- Boiteux, L.S. & Giordano, L.B. (1992). Screening lycopersicon germplasm for resistance to a Brazilian isolate of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). TGC Report No: 42, 13-14s
- Bozdogan, V. & Kamberoglu, 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.
- Chare, E.R. & Holmes, E.C. (2006). A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. *Archives Virology*, 151, 933-946 Doi 10.1007/s00705-005-0675-x
- Cho, J.J., Mau, R.F.L., German, T.L., Hartmann, R.W., Yudin, L.S., Gonsalves, D. & Providenti, R. (1989). A Multidisciplinary approach to management of *Tomato spotted wilt virus* in Hawaii. *Plant Disease*, 73, 375- 383.
- Ciuffo, M., Finetti-Sialer, M.M., Gallitelli, D. & Turina, M. (2005). First report in Italy of a resistance breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* infecting tomato cultivars carrying the Sw-5 resistance gene. New Disease Reports. The British Society for Plant Pathology, 10, 48. <http://www.bspp.org.uk/ndr>. (Son erişim tarihi: 19.05.2019)
- Crute, I.R., de Wit, P.J.G.M., & Wade, M. (1985). Mechanisms by which genetically control resistance and virulence influence host colonization by fungal and bacterial parasites.: In R.S.S. fraser (Eds.), *Mechanisms of Resistance of Plant Diseases*. (pp. 197-309)
- Cupertino, F.P., Lin, M.T. & Munoz, J.O. (1984). Perdas na produgao do pimentao induzidas pelo virus de vira-cabega do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira, Fortaleza*, 9, 395- 397.

- Czuber, B., & Miczynski, K.A. (1981). Reaction of cultivars and some wild species of tomato to infection by *Tomato spotted wilt virus*. *Zeszyty Problemowe Postepow Nauk Rolniczych*, 244, 109–116.
- Çandar, A. & Erkan, S. (2011). Bitkilerde Viral Etmenlere Karşı Genetik Dayanıklılık Mekanizmaları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, (9)3, 13-27.
- Çetin, Ş. (2014). *Erwinia amylovora enfeksiyonu sonucu farklı elma, armut ve ayva çeşitlerindeki konukçu protein miktarlarının belirlenmesi*. (Yüksek lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Çevik, B. & Sahin-Çevik, M. (2018). Dayanıklı ve Duyarlı Domates Çeşitlerinde Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (*Tomato Spotted Wilt Virus*, TSWV) Enfeksiyonu Sırasında Transkriptome ve Mikro RNA Analizleri. TUBİTAK Rapor No: 115O561, 75 s.
- Dangl, J.L. & Jones, J.D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411, 826–833.
- de Aliva, A.C. (1992). Diversity of *Tospoviruses*. Wageningen Agricultural University, Ph.D. Thesis, p136 Netherlands.
- Debreczeni, D.E., Rubio, L., Aramburu, J., Lo'pez, C., Galipienso, L., Soler, S., & Belliure, B. (2014). Transmission of *Tomato spotted wilt virus* isolates able and unable to overcome tomato or pepper resistance by its vector *Frankliniella occidentalis*. *Association of Applied Biologists*, 164, 182–189.
- de Haan, P., Wagemakers, L., Peters, D. & Goldbach, R. (1990). The S RNA segment of *Tomato spotted wilt virus* has an ambisense character. *Journal of General Virology*, 71, 1001-1007.
- de Haan, P., Kormelink, R., Resende, R.D.O., van Poelwijk, F., Peters D. & Goldbach, R. (1991). *Tomato spotted wilt virus* L RNA encodes a putative RNA polymerase. *Journal of General Virology*, 72, 2207-2216.
- De Oliveira A.S., Koolhaas, I., Boiteux, L.S., Caldararu, O.F., Petrescu, A.J., Resende, R.O. & Kormelink, R. (2016). Cell death triggering and effector recognition by *Sw-5* SD-CNL proteins from resistant and susceptible tomato isolines to *Tomato spotted wilt virus*. *Molecular Plant Pathology*, 17, 1442–1454.
- de Ronde, D., Pasquier, A., Ying, S., Butterbach, P., Lohuis, D. & Kormelink, R., (2014). Analysis of *Tomato spotted wilt virus* NSs protein indicates the importance of the Nterminal domain for avirulence and RNA silencing suppression. *Molecular Plant Pathology*, 15(2), 185–195.
- di Rienzo, V., Bubici, G., Montemurro, C. & Cillo, F. (2018). Rapid identification of tomato *Sw-5* resistance-breaking isolates of *Tomato spotted wilt virus* using high resolution melting and TaqMan SNP Genotyping assays as allelic

discrimination techniques. PLoS ONE 13(4), e0196738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196738>

- Dianese, E.C., Fonseca, M.E.N., Goldbach, R., Kormelink, R., Inoue-Nagata, A.K., Resende, R.O. & Boiteux, L.S. (2010). Development of a locus-specific, codominant SCAR marker for assisted-selection of the *Sw-5* (*Tospovirus* resistance) gene cluster in a wide range of tomato accessions. *Molecular Breeding*, 25, 133–142.
- Dianese, E.C., Fonseca, M.E.N., Inoue-Nagata, A.K., Resende, R.O., & Boiteux, L.S. (2011). Search in *Solanum* (section *Lycopersicon*) germplasm for sources of broad-spectrum resistance to four *Tospovirus* species, *Euphytica* 180, 307–319.
- Dikova, B., (2011). *Tomato spotted wilt virus* on some medicinal and essential oil-bearing plants in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 17(3), 306-313
- Ekinci, S., (1972). Özel Sebzeçilik, Ahmet Sait Matbaası, 132, 1-3, İstanbul.
- Elliot, R.M. (1990). Molecular biology of the *Bunyaviridae*. *Journal of General Virology*, 71, 501-522.
- FAO (2019). FAO Statistical Database. <http://faostat3.fao.org/home/E>. (Son erişim tarihi: 27.05.2019).
- Fidan H. & Sari N. (2019). Molecular characterization of resistance-breaking *tomato spotted wilt virus* (TSWV) isolate medium segment in tomato in Turkey. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(2), 5321-5339.
- Finlay, K.W. (1953). Inheritance of spotted wilt resistance in tomato. II. Five genes controlling spotted wilt resistance in four tomato types. *Australian Journal of Biology Science*, 6, 153-163.
- Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson D. L. & Brown, F. (1991). Classification and Nomenclature of Viruses. In: *Fifth Report of The International Committee on Taxonomy of Viruses* (pp.1-450).
- Garland, S., Sharman, M., Persley, A.D., & Mc. Grath, D. (2005). The development of an improved PCR-based marker system for *Sw-5*, an important TSWV resistance gene of tomato. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56, 285-289.
- German, T.L., Ullman, D.E. & Moyer, J.W., (1992). *Tospoviruses*: Diagnosis, Molecular Biology, Phylogeny And Vector Relationships. *Review of Phytopathology*, 30, 315-348.
- Gracia, O., de Borbon, C.M., Granval de Millan, N., & Cuesta, G. V. (1999). Occurrence of different *Tospovirus* in vegetable crops in Argentina. *Journal of Phytopathology*, 147, 223-227.

- Greenough, D.R., Black, L.L., Bond, W.P., (1990). Aluminum-Surfaced Mulch: An Approach to the Control of *Tomato spotted wilt virus* in Solanaceous Crops. *Plant Disease*, 74, 805-808.
- Griep, R.A, Prins, M., van Twisk, C., Keller, H.J.H.G, Kerschbaumer, R.J, Kormelink, R., Golbach, R.W. & Schots, A. (2000). Application of Phage display in selecting *Tomato spotted wilt virus* Specific single Chain antibodies (scFvs) for sensitive diagnosis in ELISA. *Phytopathology*, 90, 183-190.
- Gitaitis, R.D., Dowler, C.C., Chalfant, R.B. (1998). Epidemiology of *Tomato spotted wilt virus* in pepper and tomato in Southern Georgia. *Plant Disease*, 82, 752-756.
- Griffiths, G. & Rottier, P. (1992). Cell biology of viruses that assemble along the biosynthetic pathway. *Seminars Cell Biology*, 3, 367-381.
- Gordillo, L.F., Stevens, M.R., Millard, M.A. & Geary B. (2008). Screening two *Lycopersicon peruvianum* collections for resistance to *Tomato spotted wilt virus*. *Plant Disease*, 92(5), 694-704.
- Gould, W., A., (1983). *Tomato Production, Processing and Quality Evaluation*, Avi Publishing Company, Westport, Connecticut 445.
- Hallwass, M., de Oliveira, A.S., Dianese, E., Lohuis, D., Boiteux, L.S., Nagata, A. K., Resende, R. O., Kormelink, R. (2014). The *Tomato spotted wilt virus* cell-to-cell movement protein (NSm) triggers a hypersensitive response in *Sw-5* containing resistant tomato line and in *Nicotiana benthamiana* transformed with the functional *Sw-5b* resistance gene copy. *Molecular Plant Pathology*, 15(9), 871-880.
- Hanssen, I.M., Lapidot, M., Thomma, B.P. (2010). Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 23, 539-548.
- Hausbeck, M.K., Welliver, R.A., Derr, M.A. & Gildow, F.E. (1992). *Tomato Spotted Wilt Virus* Survey Among Greenhouse Ornamentals in Pennsylvania. *Plant Disases*, 76, 795- 800.
- Hoffmann, K., Geske, S. M. & Moyer, J. W. (1998). Pathogenesis of *Tomato spotted wilt virus* in peanut plants dually infected with Peanut mottle virus. *Plant Disease*, 82, 610-614.
- Hoffmann, K., Qiu, W.P. & Moyer, J.W. (2001). Overcoming host-and pathogen-mediated resistance in tomato and tobaccos to the M RNA of *Tomato spotted wilt virus*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 14, 242-249.
- Hull, R., (2002). *Matthews plant virology*, 4th Edition. Academic Press.

- Hutton, E.M., & Peak A.R. (1953). Spotted wilt development, resistant and susceptible Lycopersicon species, *Australian Journal of Agricultural Research*, 4, 160–167.
- Jain, R.K., S.S., Pappu, H.R., Culbreath, A.K., & Tood, J.W. (1998). Molecular Diagnosis of *Tomato Spotted Wilt Tospovirus* Infection of Peanut and Other Field and Greenhouse Crops. *Plant Disease*, 82, 900-904.
- Kainz, M., Hilson, P., Sweeney, L., DeRose, E. & German, T.L. (2004). Interaction between *Tomato spotted wilt virus* N protein monomers involves non-electrostatic forces governed by multiple distinct regions of the primary structure. *Phytopathology*, 94, 759- 65.
- Karasawa, A., Okada, I., Akashi, K., Chida, Y., Hase, S., Nakazawa, Nasu, Y., Ito, A. & Ehara, Y. (1999). One amino acid change in *cucumber mosaic virus* RNA polymerase determines virulent/ avirulent phenotypes on cowpea. *Phytopathology*, 89, 1186–1192.
- Kaye, A.C., Moyer, J.W., Parks, E.J., Carbone, I. & Cubeta, M.A., (2011). Population genetic analysis of Tomato spotted wilt virus on peanut in North Carolina and Virginia. *Phytopathology*, 101(1), 147-153.
- Kırbağ, S. & Parlak, Y., (1996). Elazığ'da Yetiştirilen Bazı Sebzelerde Görülen Fungusların Tespiti ve Önemli Bulunanın Biyolojisi ve Savaşı Üzerine Araştırmalar, *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(2), 69-81.
- Korbin, M. (2005). Assessment of Gerbera plants genetically modified with TSWV nükleocapsid gene. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research Volume*, 14, 85- 93.
- Koca, G. (2012). Farklı domates çeşitlerinde domates lekeli solgunluk virüsüne (*Tomato spotted wilt virus* = TSWV) dayanıklılık geninin markör destekli seleksiyon yöntemiyle belirlenmesi. (Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Krishna-Kumar, N.K., Ullman, D.E., & Cho, J.J. (1993). Evaluation of lycopersicon germ plasm for *Tomato spotted wilt tospovirus* resistance by mechanical and Trips transmission. *Plant Disease*, 77, 938-941.
- Kucharek, T., Brown, L., Johnson, F. & Funderburk, J. (2000). *Tomato Spotted Wilt Virus* of Agronomic, Vegetable, and Ornamental Crops. Plant Pathology Fact Sheet Circ-914
- Kulshrestha, S., Sharma, A. & Seth, C.A. (2013). Journal of Applied Horticulture, Molecular biology of *Tomato spotted wilt virüs*. *An update*, 15(2), 71-80
- Kumar, N. & Irulappan, I. (1991a). Breeding tomatoes for resistance to *tomato spotted wilt virus* (TSWV). Identification of sources of resistance., *South Indian Horticulture*, 39, 188–192.

- Kumar, N. & Irulappan, I. (1991b). Studies on *tomato spotted wilt virus* infection in tomato. *South Indian Horticulture*, 39, 45–47.
- Kumar, N. & Irulappan, I. (1991c). Breeding tomatoes resistant to spotted wilt virus: Genetic of disease resistance. *South Indian Horticulture*, 39, 346–349.
- Küçük, B. (2006). *Adana ve mersin illerinde domates lekeli solgunluk virüsü (tomato spotted wilt virus, TSWV) ’ nin değişik yöntemlerle saptanması* (Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Latham, L.J. & Jones R.A.C. (1998). Selection of resistance breaking strain of *tomato spotted wilt tospovirus*. *Annals of Applied Biology*, 133, 385–402.
- Le, T.S. (1970). *Tomato spotted wilt virus*. England Issued jointly by the Commonwealth Mycological Institute (CMI) and the Association of Applied Biologists (AAB)
- Leastro, M.O., Pallas, V., Resende, R.O. & Sanchez-Navarro, J.A., (2015). The movement proteins (NSm) of distinct tospoviruses peripherally associate with cellular membranes and interact with homologous and heterologous NSm and nucleocapsid proteins. *Virology*, 478, 39–49.
- Leastro, M.O., De Oliveira, A.S., Pallás, V., Sánchez-Navarro, J.A., Kormelink, R., & Resende, R.O. (2017). The NSm proteins of phylogenetically related tospoviruses trigger *Sw-5b*-mediated resistance dissociated of their cell-to-cell movement function. *Virus Resistance*, 240, 25–34.
- Li, R., Mock, R., Huang, Q., Abad, J., Hartung, J. & Kinard, G. (2008). A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *Journal of Virological Methods*, 154, 48-55.
- Liu, Y., Huang, C., Yu, H., Yuan, C., Zeng, J., Zhao, L., Tong, Z. & Tao X., (2018). Non-Structural Protein NSm of *Tomato Spotted Wilt Virus* Is an Avirulence Factor Recognized by Resistance Genes of Tobacco and Tomato via Different Elicitor Active Sites. *Viruses*, 10, 660, doi:10.3390/v10110660
- Lopez, C., Aramburu, J., Galipienso, L., Soler, S., Nuez, F., & Rubio, L. (2011). Evolutionary analysis of tomato *Sw-5* resistance-breaking isolates of *tomato spotted wilt virus*. *Journal of General Virology*, 92(1), 210–215.
- Martinelli, F., Grillone, G. & Sgroi, F. (2014). Proposal of a Genome Editing System for Genetic Resistance to *Tomato Spotted Wilt Virus*. *American Journal of Applied Sciences*, 11(11), 1904, 1913.
- Matsumoto, K., Johnishi, K., Hamada, H., Sawada, H., Takeuchi, S., Kobayashi, K., Suzuki, K., Kiba, A. & Hikichi, Y. (2009). Single amino acid substitution in the methyltransferase domain of *Paprika mild mottle virus* replicase proteins



confers the ability to overcome the high temperature-dependent Hk gene-mediated resistance in Capsicum plants. *Virus Resistance*, 140, 98–102.

- Mansfield, J.W. (1986). Recognition, elicitors and the hypersensitive reaction. In B. Lutenberg (Ed.), *Recognition in microbe-plant symbiotic and pathogenic interactions* (pp. 434).
- Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H. & Michelmore, R.W. (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *Plant Cell*, 15, 809–834, doi: 10.1105/tpc.009308
- Meyers, B.C, Kaushik, S. & Nandety, R.S. (2005). Evolving disease resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 129–134.
- Meshi, T., Motoyoshi, F., Maeda, T., Yoshiwoka, S., Watanabe, H. & Okada, Y. (1989). Mutations in the *tobacco mosaic virus* 30-kD protein gene overcome Tm-2 resistance in tomato. *Plant Cell*, 1, 515–522.
- Mickowski, J. (1981). Principales Maladies a Virus Sur Le Tabac. VIII. Intern Plant Protect Conference, Yugoslavia, 45-49.
- Momol, M.T., Funderburk, J.E., Olson, S., & Stavisky, J. (2002). Management of *Tomato Spotted Wilt Tospovirus* (TSWV) on Tomatoes with 60 UV-Reflective Mulch and Acibenzolar-S-methyl. Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Symposium of Thysanoptera Australian National Insect Collection, Canberra, 111-116.
- Momol, M.T., Olson, S., Funderburk, J.E., Stavisky, J., & Morois, J.J., (2004). Integred Management of *Tomato spotted wilt virus* on tomatoes. *Plant Disease*, 88, 882-890.
- Moya, A., Elena, S.F., Bracho A. & Miralles Barrio, R. (2000). The evolution of RNA viruses: a population genetics view. *Proceedings of the National Academy*, 97, 6967-6973.
- Moyer, J.W., German, T., Sherwood, J.L. & Ullman, D. (1999). An update on *Tomato spotted wilt virus* and Related *Tospoviruses*. APSnet Features. Online. doi: 10.1094/APSnetFeatures-1999-0499
- Moyle, L.C., & Nakazato, T. (2008). Comparative genetics of hybrid incompatibility. Sterility in two Solanum species crosses. *Genetics*, 179, 1437-1453.
- Nagata, T., Almedia, A.C.L., De Resende, R.O. & De Avila, A.C. (2002). The Transmission specificity and efficiency of tospoviruses. Trips and tospoviruses. Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Symposium on Thysanoptera. Australian National Insect Collection, July 2-7, Canberra, 45-46.
- Oğuz, A., Ellialtıoğlu Ş., Çelik, N., Kabaş, A., & Zengin, S. (2009). Bazı domates hatlarının domates lekeli solgunluk virüsü (tswv=*tomato spotted wilt*

*virus*)'ne karşıreaksiyonlarının mekanik inokulasyon yöntemi ile belirlenmesi. *Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi*, 26(1), 40-50.

- Page, R.D., (1996). TreeView. An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer applications in the biosciences*, 12(4), 357-358.
- Parrella, G., Gognalons, P., Gebre-Selassie, K., Vovlas, C. & Marchoux, G. (2003). An update of the host range of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of Plant Pathology*, 85, 227-264.
- Paterson, R.G., Scott, S.J. & Gergerich, R.C. (1989). Resistance in two *Lycopersicon* species to an Arkansas isolate of *tomato spotted wilt virus*. *Euphytica*, 43, 173-178.
- Peralta, I.E. & Spooner, D.M. (2005). Morphological characterization and relationships of wild tomatoes. (*Solanum* L. section *Lycopersicon*). *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 104, 227-257.
- Peiro, A., M.C., Canizares, L., Rubio, Lopez C. & Moriones E. (2014). The movement protein (NSm) of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the tomato Sw-5 gene-based resistance. *Journal of General Virology*, 88, 3016-3026. Doi: 10.1111/mpp.12142.
- Price, D. L., Memmott, F. D., Scott, J. W., Olson, S. M., & Stevens, M. R. (2007). Identification of molecular markers linked to a new *tomato spotted wilt virus* resistance source in tomato. *Tomato Genetics Coop Representative* <http://tgc.ifas.ufl.edu/vol57/html/vol57price.htm> (Son erişim tarihi: 21.05.2019)
- Qiu, W. & Moyer, J.W. (1999). *Tomato Spotted Wilt Tosspovirus* Adapts to the TSWV N Gene-Derived Resistance by Genome Reassortment. *Phytopathology*, 89 (7), 575-82. doi: 10.1094/PHYTO.1999.89.7.575
- Raccah, B. & Fereres, A. (2009). "Plant Virus Transmission by Insects. *In Encyclopedia of Life Science (ELS)*. (pp. 1-9)
- Rick, C.M. (1973). Potential Genetic Resources in Tomato Species. Clues from Observation in Native Habitats. Genes, Enzymes and Populations, *BasicLife Sciences*, 2, 255-269.
- Rick C.M. & Holle M. (1990). Andean *Lycopersicon esculantum* var. *Cerasiforme*-genetic variation and its evolutionary significance, *Economic Botany*, 44, 69-78.
- Riley, D.G & Pappu, H.R. (2000). Evaluation of tactics for management of trips-vectored *Tomato spotted wilt virus* in tomato, *Plant Disease*, 84, 847-852.

- Rosello, S., Diez, M. J., Lacasa, A., Jorda, C. & Nuez, F. (1997). Testing resistance to TSWV introgressed from *Lycopersicon peruvianum* by artificial transmission techniques, *Euphytica*, 98, 93-98.
- Rosello, S., Diez, M. J., & Nuez, F. (1998). Genetics of *tomato spotted wilt virus* resistance coming from *Lycopersicon peruvianum*. *European Journal of Plant Pathology*, 5, 499-509.
- Rosello, S., Soler, S., Diez, M.J., Rambla, J.L., Richarte, C., & Nuez, F. (1999). New sources for high resistance of tomato to the *tomato spotted wilt virus* from *Lycopersicon peruvianum*, *Plant Breeding*, 118, 425–429.
- Rosello, S., Ricarte, B., Diez, M. J., & Nuez, F. (2001). Resistance to *tomato spotted wilt virus* introgressed from *Lycopersicon peruvianum* in line UPV 1 may be allelic to *Sw-5* and can be used to enhance the resistance of hybrids cultivars, *Euphytica*, 119, 357-367.
- Salmeron, J.M., Oldroyd, G.E.D., Rommens, C.M.T., Scofield S.R., Kim, H.S., Lavelle, D.T., Dahlbeck, D. & Staskawicz, B.J. (1994). Tom ato Prf is a member of the leucine-rich repeat class of plantdisease resistance genes and lies embedded within the Pto kinasegene cluster. *Cell*,12, 86(1), 123-33.
- Scholthof, K.B.G, Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C. & Foster, G.D. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant Pathology, *Molecular Plant Pathology*, 12, 938-954.
- Scortichini, M. (1992). Considerations on the appearance of *Pseudomonas corrugata* as a new plant pathogen, *Plant Pathogenic Bacteria*, (pp. 149- 154).
- Sevgican, A. (1999). Örtüaltı Sebzeçiliği, Erzurum Üniversitesi Ziraat Fakültesi Basımevi, İzmir, s.302.
- Sherman, J.M, Moyer, J.W. & Daub, M.E. (1998). *Tomato spotted wilt virus* resistance in Chrysanthemum expressing the viral nucleocapsid gene, *Plant Disease*, 82,407-414.
- Silva, M.S., Martins, C.R.F., Bezerra, I.C., Nagata, T., De Avila, A.C. & Resende, R.D.O. (2001). Sequence diversity of NS M movement protein of *tospoviruses*, *Archives of virology*, 146(7), 1267-1281.
- Sivparsad, B. (2006). Isolation and molecular characterisation of Tomato spotted wilt virus (TSWV) isolates occurring in South Africa (Doctoral dissertation, University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg)
- Soler, S., Diéz, M.J. & Nuez, F. (1998). Effect of temperature and growth stage interaction on pattern of virus presence in TSWV-resistance accessions of *Capsicum chinense*, *Plant Disease*, 82, 1199–1204.

- Soellick, T.R., Uhrig, J.F., Bucher, G.L., Kellmann J.W. & Schreier P.H. (2000). The movement protein NSm of *Tomato spotted wilt virüs* (TSWV). RNA binding, interaction with the TSWV N protein and identification of interacting proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97, 2373- 2378.
- Spassova, M. I., Prins, T. W., Folkertsma, R. T., Klein-Lankhorst, R. M., Hille, J., Goldbach, R. W. & Prins, M. (2001). The tomato gene *Sw-5* is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco, *Molecular Breeding*, 7, 151-161.
- Stephens, E.B. & R.W. Compans, (1988). Assembly of animal viruses at cellular membranes. *Annual Review of Microbiology*, 42, 489- 516.
- Stevens, M. R., Scott, S. J. & Gergerich, R.C. (1991). Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica*, 59, 9–17.
- Stevens, M.R., Scott, S.J. & Gergerich, R.C. (1992). Inheritance of a gene for resistance to *tomato spotted wilt virus* (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica*, 59, 9–17.
- Stevens, M.R., Scott, S.J. & Gergerich, R.C. (1994). Evaluation of seven *Lycopersicon* species for resistance to *tomato spotted wilt virus*. *Euphytica*, 80, 79-84.
- Stevens, M. R., Lamb, E. M., & Rhoads, D.D. (1995). Mapping the *Sw-5* locus for *tomato spotted wilt virus*-resistance in tomatoes using rapd and rflp analyses. *Theoretical and Applied Genetics*, 90, 451–456.
- Storms, M.M., R. Kormelink, D. Peters, J.W. Van Lent & R.W. Goldbach (1995). The nonstructural NSm protein of *Tomato spotted wilt virus* induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology*, 214, 485-493.
- Şevik, M.A., (2007). Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV)'nün Samsun İlinde Domates Üretim Alanlarındaki Yayılış Durumunun ve Bazı Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi. (Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Şevik, M.A & Arli-Sokmen M. (2012). Estimation of the Effect of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) Infection on Some Yield Components of Tomato. *Phytoparasitica*, 40, 87-93.
- Şevik, M.A., (2015). Sebze Üretimini Tehdit Eden Viral Hastalık Etmeni: Domates lekeli solgunluk virüsü (*Tomato spotted wilt virus* – TSWV) *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5(2), 17-23, 2015

- Takeda, A., K. Sugiyama, H. Nagano, M. Mori, M. Kaido, K. Mise, S. Tsuda & T. Okuno, (2002). Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. *FEBS Letters*, 532, 75-79.
- Taylor, J.B. (1986). Biosystematic of the Tomato. In: *The Tomato Crop. A Scientific Basis for Improvement* (pp 1-34).
- Thakur, B.R., Singh, R.K., & Nelson, P.E., (1996). Quality Attributes of Processed Tomato Products. *A review, Food Reviews International*, 12(3), 375-401.
- TUIK (2019). Bitkisel Üretim İstatistikleri. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>. (Son erişim tarihi: 26.05.2019)
- Tsompana, M., Abad, J., Purugganan, M. & Moyer, J. W. (2005). The molecular population genetics of the *Tomato spotted wilt virüs* (TSWV) genome. *Moleculer Ecology*, 14, 53–66.
- Tsuda, S., Kirita, M. & Watanabe, Y. (1998). Characterization of a pepper mild mottle *tobamovirus* strain capable of overcoming the L3 gene-mediated resistance, distinct from the resistance-breaking Italian isolate. *Moleculer Plant Microbe Interactions*, 11, 327–331.
- Uhrig, J.F., Soellick, T.R., Minke, C.J., Philipp, C., Kellman, J.W. & Schreier, J.W. (1999). Homotypic interaction and multimerization of nucleocapsid protein of *Tomato spotted Wilt Tospovirus*: Identification and characterization of two interacting domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(1), 55-60.
- Valizadeh, M., Valizadeh, J. & Jafar, M. (2011). Identification, distribution and incidence of important tomato and cucurbits viruses in Southeast of Iran. *American Journal of Plant Physiology*, 6(5), 242-251.
- Van der Biezen, E.A, & Jones, J.D., (1998). The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Current Biology*, 8, 226–227.
- Van Knippenberg, I., Lamine, M., Goldbach, R. & Kormelink, R. (2005). *Tomato spotted wilt virus* transcriptase in vitro displays a preference for cap donors with multiple base complementarity to the viral template. *Virology*, 335, 122-130.
- Van Poelwijk, F., Boye, K., Oosterling, R., Peters, D. & Goldbach, R. (1993). Detection of the L protein of *Tomato spotted wilt virus*. *Virology*, 197, 468-470.
- Vural, H., Eşiyok, D. & Duman, İ. (2000). *Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme)*. (Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü)

- Yardımcı, N. & Çulal-Kılıç H. (2009). *Tomato spotted wilt virus* in vegetable growing areas in the west mediterranean region of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 8, 4539-4541.
- Waigmann, E., Ueki, S., Trutnyeva, K. & Citovsky, V. (2004). The ins and outsof nondestructive cell-to-cell and systemic movement of plant viruses. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23, 195– 250
- Wangai, A.W., Mandal, B., Pappu, H. & Kilonzo, S. (2001). Outbreak of *Tomato spotted wilt virus* in Tomato in Kenya. *Plant Disease*, 85, 1123.
- Whitfield, A.E., Ullman D.E. & German, T.L. (2005). *Tospovirus*-trips interactions. *Annual Reviews in Phytopathology*, 43, 459-489.
- Wijkamp, I., & Peters, D. (1993). Determination of the median latent period of two tospoviruses in *frankliniella occidentalis* using a novel leaf disk assay. *Phytopathology*, 82, 986-991.
- Wijkamp, I., Goldbach, R. & Peters, D. (1996). Propagation of *Tomato spotted wilt virus* in *Frankliniella occidentalis* does neither result in pathological effects nor in transovarial passage of the virus. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 81, 285-292.
- Wilson, C.R, Wilson, A.J. & Pethybridge, S.J., (2000). First report of *Tomato spotted wilt virus* in common *Agapanthus*. *Plant Disease*, 84, 491-941.
- Zitter, T.A., (1997). Diseases caused by viruses. *Compendium of Tomato Diseases*, (pp 31-42).

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Tuğçe KOCAMAN  
Doğum Yeri ve Yılı : KADIKÖY, 1993  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce  
E-posta : tugcekocaman0111@hotmail.com

### Eğitim Durumu

Lise : Fethiye Fatih Anadolu Lisesi, 2011  
Lisans : SDÜ, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma, 2012-2016  
Yüksek Lisans : ISUBÜ, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma, Moleküler Biyoloji  
2016-halen

### Yayınlar

Çevik, B., Şahin-Çevik M., Karaca, İ. & Kocaman T. (2018). Isparta ve Antalya *Trialeurodes vaporariorum* populasyonlarının moleküler karakterizasyonu. Türkiye VII. Bitki Koruma Kongresi, 14-17 Kasım, Muğla.

Yorulmaz-Salman, S. & Kocaman T. (2017). *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'nin karanfil populasyonlarında abamectin ve spiroadiclofen'e karşı duyarlılık düzeyleri. Türkiye Entomoloji bülteni, 7(2), 135-142.