



**EGE ÜNİVERSİTESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANTALYA İLİ BİBER YETİŞTİRİCİLİĞİNDE  
SORUN OLAN *Cucumber mosaic virus* (CMV) ve  
*Tomato spotted wilt virus* (TSWV) ETMENLERİNİN  
YAYGINLIĞININ BELİRLENMESİ ve BU  
ETMENLERİN SEROLOJİK, MOLEKÜLER ve  
BİYOLOJİK KARAKTERİZASYONU**

**Nihan GÜNEŞ**

**Tez danışmanı: Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ**

**Bitki Koruma Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi: 18.08.2016**

**Bornova-İZMİR**

**2016**

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**ANTALYA İLİ BİBER YETİŞTİRİCİLİĞİNDE  
SORUN OLAN *Cucumber mosaic virus* (CMV) ve  
*Tomato spotted wilt virus* (TSWV) ETMENLERİNİN  
YAYGINLIĞININ BELİRLENMESİ ve BU  
ETMENLERİN SEROLOJİK, MOLEKÜLER ve  
BİYOLOJİK KARAKTERİZASYONU**

**Nihan GÜNEŞ**

**Tez danışmanı: Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ**

**Bitki Koruma Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi: 18.08.2016**

**Bornova-İZMİR**

**2016**



Nihan GÜNEŞ tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “**Antalya İli Biber Yetiştiriciliğinde Sorun Olan *Cucumber mosaic virus* (CMV) ve *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) Etmenlerinin Yaygınlığının Belirlenmesi Ve Bu Etmenlerin Serolojik, Moleküler ve Biyolojik Karakterizasyonu**” bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 18.08.2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Başkanı : Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ**



**Raportör Üye : Prof. Dr. Semih ERKAN**



**Üye : Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ**





# EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Antalya İli Biber Yetiştiriciliğinde Sorun Olan *Cucumber mosaic virus* (CMV) ve *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) Etmenlerinin Yaygınlığının Belirlenmesi Ve Bu Etmenlerin Serolojik, Moleküler ve Biyolojik Karakterizasyonu**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

18/08/2016

Nihan GÜNEŞ



**ÖZET**

**ANTALYA İLİ BİBER YETİŞTİRİCİLİĞİNDE SORUN OLAN  
*Cucumber mosaic virus* (CMV) ve *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)  
ETMENLERİNİN YAYGINLIĞININ BELİRLENMESİ ve BU  
ETMENLERİN SEROLOJİK, MOLEKÜLER ve BİYOLOJİK  
KARAKTERİZASYONU**

GÜNEŞ, Nihan

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ

Ağustos 2016, 76 sayfa

Bu çalışmada 2015 yılı vejetasyon döneminde Antalya ili Kumluca, Demre, Serik ve Aksu ilçelerinde örtü altında ve açık alanda üretimi yapılan biber bitkilerinde enfeksiyona neden olan *Cucumber mosaic virus* ve *Tomato spotted wilt virus* adlı viral etmenlerinin yaygınlığının belirlenmesi ve etmenlerin serolojik, moleküler ve biyolojik karakterizasyonun gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaç için Kumluca ilçesinden 62, Demre ilçesinden 42, Serik ilçesinden 26 ve Aksu ilçesinden 18 virüs benzeri belirti gösteren örnek toplanmıştır. Uygulanan DAS-ELISA testi sonucunda toplanan 148 biber örneğinin 11'inde (%7.34) CMV ve 53'ünde (%35.81) TSWV enfeksiyonu olduğu saptanmıştır. Serolojik yöntemin sonuçları değerlendirilerek biyolojik testler yürütülmüştür. DAS-ELISA testi sonucunda pozitif bulunan örnekler CMV'nin RNA 1 ve RNA 3; TSWV'nin S RNA, M RNA ve L RNA segmentine ait bazı bölgelerine spesifik primerler kullanılarak RT-PCR testi ile çoğaltılmıştır. CMV izolatının farklı gen bölgelerinin gen bankasındaki diğer izolatlarla benzerlik oranları %90-96 arasında bulunurken, TSWV izolatının %92-98 arasında değişmiştir. TSWV izolatı Türkiye, İtalya ve İspanya'da biber bitkilerinde Tsw dayanıklılığını kıran izolatlar ile %92-97 arasında değişen oranda benzerlik göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), DAS-ELISA, RT-PCR.



**ABSTRACT**

**DETERMINATION OF PREVALENCE and SEROLOGICAL,  
MOLECULAR and BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF  
*Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)  
PROBLEM ON PEPPER GROWING IN ANTALYA**

GÜNEŞ, Nihan

MSc in Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ

August 2016, 76 pages

This study was conducted to determine the prevalence and serological, molecular and biological characterization of *Cucumber mosaic virus* and *Tomato spotted wilt virus* that cause infections in pepper plants growing in greenhouses and open fields during vegetation period of 2015 in Antalya province including Kumluca, Demre, Serik and Aksu districts. 62 samples from Kumluca, 42 samples from Demre, 26 samples from Serik and 18 samples from Aksu were collected from plants having virus-like symptoms. Out of collected 148 pepper samples 11 (%7.34) described as CMV and 53 (%35.81) as TSWV as a result of DAS-ELISA test. After the evaluation of the results from serological tests, biological assays were carried out by the selected virus isolates. Some regions on RNA 1 and RNA 3 of CMV; S RNA, M RNA and L RNA of TSWV of DAS-ELISA positive samples were amplified by RT-PCR with specific primers. Similarity rates of different regions of CMV isolate varied between %90-96 identity with other isolates and TSWV isolate varied between %92-98. TSWV isolate showed identity varied between %92-97 with Tsw resistance breaking isolates from Capsicum plants in Turkey, Italy and Spain.

**Keywords:** *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), DAS-ELISA, RT-PCR.



**TEŞEKKÜR**

Bu çalışma sürecinde bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan danışman hocam Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ'e, tez çalışmam boyunca yardımcı olan Prof. Dr. Hülya İLBİ'ye, Yrd. Doç. Dr. İsmail Can PAYLAN'a, Dr. Serkan ÖNDER'e, Zir. Yük. Müh. Ayşe ÇANDAR'a, Zir. Yük. Müh. Müge ERGÜN'e ve arazi çalışmalarımda yardımcı olan Dr. Aydın ATASAYAR'a, Dr. Duran ŞİMŞEK'e, Zir. Müh. Ali Murat YÜKSEL'e ve Zir. Müh. Murat YAVUZER'e çok teşekkür ederim. Tezimin her aşamasında bana destek olan Arş. Gör. Çiğdem ÖZKAN KAHRAMAN'a, Yüksel ALPER'e ve her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim.



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

|                                                               |       |
|---------------------------------------------------------------|-------|
| ÖZET .....                                                    | vii   |
| ABSTRACT .....                                                | ix    |
| TEŞEKKÜR .....                                                | xi    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                         | xv    |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....                                        | xviii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                          | xx    |
| 1. GİRİŞ .....                                                | 1     |
| 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....                                    | 6     |
| 2.1 <i>Cucumber mosaic virus</i> .....                        | 6     |
| 2.2 <i>Tomato spotted wilt virus</i> .....                    | 13    |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM.....                                    | 23    |
| 3.1 Materyal .....                                            | 23    |
| 3.1.1 Araştırmanın yürütüldüğü yer ve bitki örnekleri .....   | 23    |
| 3.1.2 Serolojik çalışmalarda kullanılan materyal .....        | 23    |
| 3.1.3 Biyolojik tanı çalışmalarında kullanılan materyal ..... | 24    |
| 3.1.4 Moleküler çalışmalarda kullanılan materyal .....        | 24    |

**İÇİNDEKİLER (devam)**

|                                                                | <u>Sayfa</u> |
|----------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.2 Yöntem.....                                                | 26           |
| 3.2.1 Simptomolojik gözlemler ve örnekleme .....               | 26           |
| 3.2.2 Biyolojik testler.....                                   | 27           |
| 3.2.3 Serolojik test (DAS-ELISA) yöntemi .....                 | 29           |
| 3.2.4 Moleküler test yöntemi .....                             | 31           |
| 4. BULGULAR.....                                               | 35           |
| 4.1 Belirtiler .....                                           | 35           |
| 4.2. Serolojik Testlerin Sonuçları .....                       | 37           |
| 4.3 Moleküler Testlerin Sonuçları .....                        | 39           |
| 4.4 Dizi Analizi ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları..... | 42           |
| 4.5 Biyolojik Testlerin Sonuçları .....                        | 50           |
| 5. SONUÇ VE TARTIŞMA .....                                     | 52           |
| KAYNAKLAR DİZİNİ .....                                         | 59           |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                 | 76           |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Şekil</u>                                                                                                                                                              | <u>Sayfa</u> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 1.1 Ülkelerin biber üretim miktarı yüzde oranları .....                                                                                                                   | 2            |
| 2.1 CMV etmeninin genom yapısı.....                                                                                                                                       | 8            |
| 2.2 TSWV etmeninin genom yapısı .....                                                                                                                                     | 15           |
| 3.1 Yetiştirilen test bitkilerinin çeşitli dönemlerine ait görüntüler .....                                                                                               | 28           |
| 3.2 Test bitkilerine mekanik inokulasyon uygulaması .....                                                                                                                 | 29           |
| 3.3 TNA ekstraksiyon aşamalarından bazıları .....                                                                                                                         | 32           |
| 4.1 Kumluca ve Demre ilçelerinde yapılan incelemelerde bitkilerde gözlenen bazı belirtilere ait görünüm .....                                                             | 36           |
| 4.2 Demre ilçesinde yapılan makroskobik incelemelerde yapraklarda gözlenen bazı belirtilere ait görünüm .....                                                             | 36           |
| 4.3 Kumluca ve Demre ilçelerinde yapılan makroskobik incelemelerde meyvelerde gözlenen bazı belirtilere ait görünüm.....                                                  | 37           |
| 4.4 CMV etmeninin için RNA1 segmenti için tasarlanmış primer çifti ile uygulanan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görüntülerinden bazıları..... | 39           |
| 4.5 CMV etmeninin için RNA3 segmenti için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görüntülerinden bazıları.....                        | 40           |
| 4.6 TSWV etmeninin S RNA segmenti için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görüntülerinden bazıları.....                           | 41           |

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

| <u>Şekil</u>                                                                                                                                                         | <u>Sayfa</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 4.7 TSWV etmeninin M RNA segmenti için tasarlanmış primer çifti ile uygulanan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümünden bazıları ..... | 41           |
| 4.8 TSWV etmeninin L RNA segmenti için tasarlanmış primer çifti ile uygulanan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümünden bazıları ..... | 41           |
| 4.9 RNA1 segmenti çoğaltılan CMV Demre izolatının dünya izolatlarıyla genetik benzerliklerinin belirlenmesi için çizilen filogenetik ağaç .....                      | 44           |
| 4.10 RNA3 segmenti çoğaltılan CMV Demre izolatının dünya izolatlarıyla genetik benzerliklerinin belirlenmesi için çizilen filogenetik ağaç .....                     | 45           |
| 4.11 S RNA segmenti çoğaltılan TSWV Aksu izolatının dünya izolatlarıyla genetik benzerliklerinin belirlenmesi için çizilen filogenetik ağaç .....                    | 47           |
| 4.12 M RNA segmenti çoğaltılan TSWV Aksu izolatının dünya izolatlarıyla genetik benzerliklerinin belirlenmesi için çizilen filogenetik ağaç .....                    | 48           |
| 4.13 L RNA segmenti çoğaltılan TSWV Aksu izolatının dünya izolatlarıyla genetik benzerliklerinin belirlenmesi için çizilen filogenetik ağaç .....                    | 50           |
| 4.14 TSWV ile mekanik inokule edilmiş <i>Capsicum annuum</i> bitkilerinin yapraklarında gözlenen klorotik ve nekrotik lekeler .....                                  | 51           |

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**ŞekilSayfa

|      |                                                                                                                     |    |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.15 | TSWV ile mekanik inokule edilmiş <i>Capsicum annuum</i><br>bitkilerinin yapraklarında gözlenen bronz lekeliik ..... | 51 |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>Çizelge</u>                                                                                                          | <u>Sayfa</u> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 1.1 Biber üretiminde lider ülkelerin üretim miktarları .....                                                            | 1            |
| 1.2 Ülkemizde bölgelere göre biber üretim miktarları, yüzde oranları<br>ve ekim alanları.....                           | 2            |
| 1.3 Akdeniz Bölgesinde illere göre biber üretim miktarları ve ekim<br>alanları .....                                    | 3            |
| 1.4 Antalya ilinde biber yetiştirilen ilçelerin üretim miktarları ve<br>ekim alanları .....                             | 4            |
| 3.1 Araştırmada toplanan bitki örneklerinin ilçelere göre dağılımı .....                                                | 23           |
| 3.2 Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan test bitkileri .....                                                  | 24           |
| 3.3 Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan test bitkileri ve<br>kullanıldıkları dönemler.....                    | 27           |
| 3.4 RT-PCR’da kullanılan primer çiftleri .....                                                                          | 33           |
| 4.1 Toplanan örneklerde ilçelere göre CMV ile enfeksiyon oranı .....                                                    | 37           |
| 4.2 Toplanan örneklerde ilçelere göre TSWV ile enfeksiyon oranı .....                                                   | 38           |
| 4.3 CMV etmeninin farklı bölgelerini çoğaltan primer çiftlerinin<br>hastalığı saptama yönünden karşılaştırılması .....  | 40           |
| 4.4 TSWV etmeninin farklı bölgelerini çoğaltan primer çiftlerinin<br>hastalığı saptama yönünden karşılaştırılması ..... | 42           |

## ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

| <u>Çizelge</u>                                                                                       | <u>Sayfa</u> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 4.5 RNA1 segmentine ait bölgesi çoğaltılan CMV izolatının karşılaştırıldığı dünya izolatları .....   | 43           |
| 4.6 RNA3 segmentine ait bölgesi çoğaltılan CMV izolatının karşılaştırıldığı dünya izolatları .....   | 44           |
| 4.7 S RNA segmentine ait bölgesi çoğaltılan TSWV izolatının karşılaştırıldığı dünya izolatları ..... | 46           |
| 4.8 M RNA segmentine ait bölgesi çoğaltılan TSWV izolatının karşılaştırıldığı dünya izolatları ..... | 47           |
| 4.9 L RNA segmentine ait bölgesi çoğaltılan TSWV izolatının karşılaştırıldığı dünya izolatları ..... | 49           |

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

| <u>Simgeler</u> | <u>Açıklama</u>               |
|-----------------|-------------------------------|
| A               | Adenin                        |
| bp              | Base pair                     |
| C               | Sitozin                       |
| dk              | Dakika                        |
| g               | Gram                          |
| G               | Guanin                        |
| kb              | Kilobase                      |
| mg              | Miligram                      |
| ml              | Mililitre                     |
| mm              | Milimetre                     |
| nm              | Nanometre                     |
| μl              | Mikrolitre                    |
| M               | Molar                         |
| mM              | Milimolar                     |
| pH              | Hidrojen iyonu konsantrasyonu |
| rpm             | Dakikadaki devir sayısı       |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

| <u>Simgeler</u>    | <u>Açıklama</u>                                                              |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| sn                 | Saniye                                                                       |
| T                  | Timin                                                                        |
| UV                 | Ultraviyole                                                                  |
| V                  | Volt                                                                         |
| °C                 | Santigrat Derece                                                             |
| <u>Kısaltmalar</u> |                                                                              |
| cDNA               | Complementer Deoksiribo Nükleik Asit                                         |
| CMV                | <i>Cucumber mosaic virus</i>                                                 |
| DAS-ELISA          | Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay                   |
| DNA                | Deoksiribo Nükleik Asit                                                      |
| dNTP               | Deoksinükleotit Tri Fosfat                                                   |
| FAO                | Food and Agriculture Organization (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü) |
| IC-RT-PCR          | Immunocapture Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction                |
| IgG                | Immunoglobulin G                                                             |
| Kb                 | Kilo base                                                                    |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

| <u>Kısaltmalar</u> | <u>Açıklama</u>                                                                  |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| NaI                | Sodyum İyodür                                                                    |
| NCBI BLAST         | National Center for Biotechnology Information, Basic Local Alignment Search Tool |
| NRB                | Dayanıklılık kırmayan tip                                                        |
| PVY                | <i>Potato virus Y</i>                                                            |
| RB                 | Dayanıklılık kıran tip                                                           |
| RdRp               | RNA dependent RNA polymerase                                                     |
| RFLP               | Restriction Fragment Length Polymorphism                                         |
| RNA                | Ribo Nükleik Asit                                                                |
| RNAse              | Ribonükleaz enzim                                                                |
| RT-PCR             | Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction                                  |
| Sat-RNA            | Satellit RNA                                                                     |
| SDS-PAGE           | Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis                        |
| ssRNA              | Tek Sarmallı RNA                                                                 |
| Sw-5 RB            | Sw-5 dayanıklılığını kıran tip                                                   |
| TAE                | Tris-Asetik Asit-EDTA                                                            |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

| <u>Kısaltmalar</u> | <u>Açıklama</u>                                            |
|--------------------|------------------------------------------------------------|
| TAS-ELISA          | Triple Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| TMV                | <i>Tobacco mosaic virus</i>                                |
| TNA                | Total Nükleik Asit                                         |
| Tsw RB             | Tsw dayanıklılığını kıran tip                              |
| TSWV               | <i>Tomato spotted wilt virus</i>                           |
| WT                 | Vahşi tip                                                  |



## 1. GİRİŞ

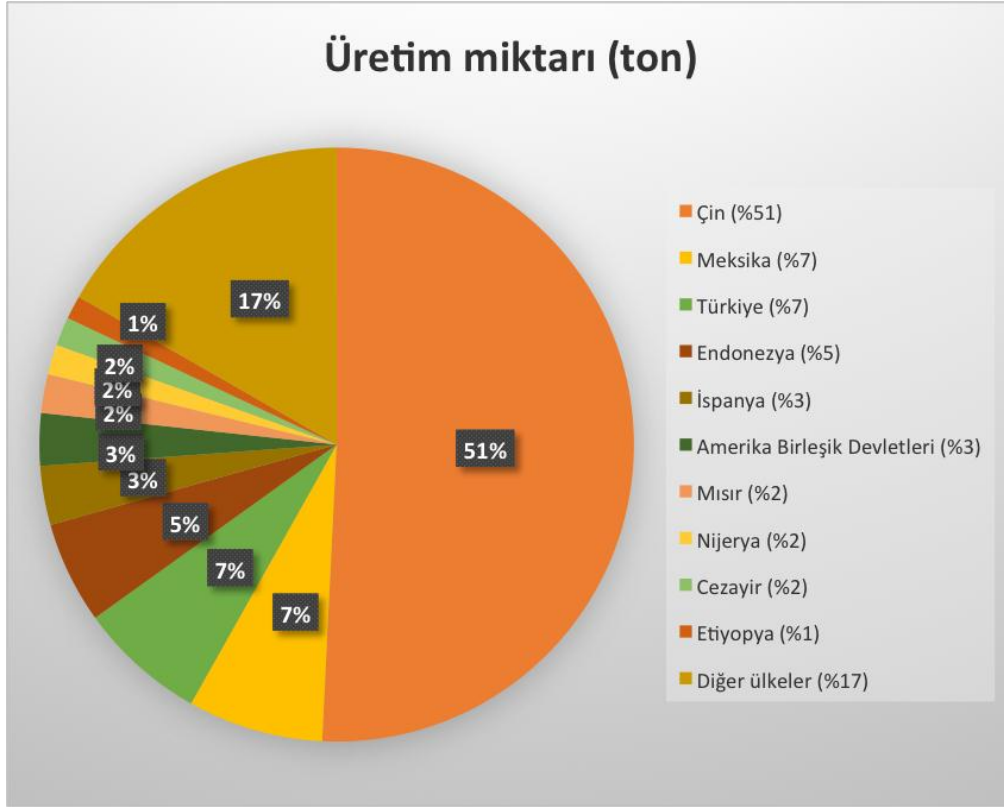
*Solanaceae* familyası *Capsicum* cinsi içerisinde yer alan biber bitkisinin (*Capsicum annuum*) anavatanı Amerika Kıtası olup dünyaya buradan yayıldığı kabul edilmektedir (Vural vd., 2000).

Dünya mutfağında baharatlandırma ve renklendirme özelliğinden dolayı yemeklerde sıklıkla kullanılan biber, sağladığı vitamin ve mineraller açısından insan sağlığı için önemlidir. Biber bitkisinin meyveleri mevsiminde çiğ ya da pişirilerek tüketilebildiği gibi dondurularak, konserve olarak, kurutularak ya da turşu olarak da öğünlerde yer almaktadır. Meyveler aynı zamanda işlenerek salça, sos, renklendirici madde olarak ya da toz halde kullanılabilir (Vural vd., 2000).

Dünya biber üretiminin yarısından fazlasını karşılayan Çin dünyadaki en büyük biber üreticisi ülke olup onu Meksika takip etmektedir. Türkiye ise üçüncü sırada yer alıp dünya biber üretiminde önemli paya sahip ülkeler arasındaki konumunu korumaktadır. Biber üretiminde lider ülkelerin üretim miktarları Çizelge 1.1’de, dünyadaki üretim miktarı yüzdeleri ise Şekil 1.1’de verilmiştir (FAO, 2014).

**Çizelge 1.1** Biber üretiminde lider ülkelerin üretim miktarları (FAO, 2014).

| Sıra | Ülke                        | Üretim miktarı<br>(ton) |
|------|-----------------------------|-------------------------|
| 1    | Çin                         | 15.800.000              |
| 2    | Meksika                     | 2.294.400               |
| 3    | Türkiye                     | 2.159.348               |
| 4    | Endonezya                   | 1.726.382               |
| 5    | İspanya                     | 999.600                 |
| 6    | Amerika Birleşik Devletleri | 889.269                 |
| 7    | Mısır                       | 655.442                 |
| 8    | Nijerya                     | 510.000                 |
| 9    | Cezayir                     | 482.471                 |
| 10   | Etiyopya                    | 400.000                 |
|      | <b>Dünya</b>                | <b>31.116.944</b>       |



**Şekil 1.1** Ülkelerin biber üretim miktarı yüzde oranları (FAO, 2014).

Ülkemizde biberin yoğun olarak yetiştirildiği bölgelerin başında %33'lük payla Akdeniz bölgesi gelmektedir. Çizelge 1.2'de biberin ülkemizde bölgelere göre üretim miktarları, yüzde oranları ve ekim alanları verilmiştir (TÜİK, 2014).

**Çizelge 1.2** Ülkemizde bölgelere göre biber üretim miktarları, yüzde oranları ve ekim alanları (TÜİK, 2014).

| Bölge              | Üretim miktarı (ton) | Yüzde | Ekilen alan (dekar) |
|--------------------|----------------------|-------|---------------------|
| Akdeniz            | 732.972              | 32.83 | 164.873             |
| Ege                | 368.561              | 16.51 | 142.683             |
| Batı Karadeniz     | 342.678              | 15.35 | 119.543             |
| Batı Marmara       | 248.554              | 11.13 | 102.350             |
| Güney Doğu Anadolu | 238.939              | 10.70 | 112.280             |
| Doğu Marmara       | 186.666              | 8.36  | 80.614              |
| Batı Anadolu       | 52.582               | 2.35  | 22.529              |
| Ortadoğu Anadolu   | 39.818               | 1.78  | 26.847              |
| Kuzeydoğu Anadolu  | 8.824                | 0.39  | 5.749               |
| Orta Anadolu       | 8.218                | 0.36  | 7.737               |
| Doğu Karadeniz     | 2.617                | 0.11  | 3.159               |
| İstanbul           | 1.879                | 0.08  | 1.374               |
| <b>Toplam</b>      | <b>2.232.308</b>     |       | <b>789.738</b>      |

Çoğunlukla salçalık, kapyra, dolmalık, sivri ve çarliston biber tiplerinin yetiştirildiği Akdeniz bölgesinde Antalya ili %47'lik payla biber yetiştiriciliği yönünden önemli bir yere sahiptir. Çizelge 1.3'de Akdeniz Bölgesinde biber yetiştirilen illerin üretim miktarları ve ekim alanları verilmiştir (TÜİK, 2014).

**Çizelge 1.3** Akdeniz Bölgesinde illere göre biber üretim miktarları ve ekim alanları (TÜİK, 2014).

| Sıra | İller         | Üretim miktarı (ton) | Ekilen alan (dekar) |
|------|---------------|----------------------|---------------------|
| 1    | Antalya       | 343.739              | 44.748              |
| 2    | Mersin        | 259.833              | 48.343              |
| 3    | Hatay         | 592.78               | 33.740              |
| 4    | Adana         | 24.084               | 12.838              |
| 5    | Kahramanmaraş | 21.906               | 13.198              |
| 6    | Osmaniye      | 10.614               | 4.613               |
| 7    | Burdur        | 8.947                | 3.882               |
| 8    | Isparta       | 4.571                | 3.511               |
|      | <b>Toplam</b> | <b>732.972</b>       | <b>164.873</b>      |

Antalya ilinde 44.748 dekarlık alanda gerçekleştirilen biber üretiminin miktarları karşılaştırıldığında biber üretiminin büyük bölümünün %33 payla Kumluca, %25 payla Demre ve %11 payla Serik ilçelerinden karşılandığı görülmektedir. Çizelge 1.4'de Antalya ilinde biber yetiştirilen ilçelerin üretim miktarları ve ekim alanları verilmiştir (TÜİK, 2014).

**Çizelge 1.4** Antalya ilinde biber yetiştirilen ilçelerin üretim miktarları ve ekim alanları (TÜİK, 2014).

| Sıra          | İlçeler    | Üretim miktarı (ton) | Ekilen alan (dekar) |
|---------------|------------|----------------------|---------------------|
| 1             | Kumluca    | 116.490              | 9.730               |
| 2             | Demre      | 87.468               | 7.114               |
| 3             | Serik      | 39.483               | 7.625               |
| 4             | Kaş        | 25.444               | 2.892               |
| 5             | Manavgat   | 20.007               | 3.613               |
| 6             | Aksu       | 17.150               | 1.770               |
| 7             | Elmalı     | 8.560                | 4.220               |
| 8             | Kepez      | 7.178                | 1.605               |
| 9             | Korkuteli  | 5.700                | 1.100               |
| 10            | Alanya     | 5.251                | 2.460               |
| 11            | Muratpaşa  | 4.890                | 800                 |
| 12            | Finike     | 2.960                | 400                 |
| 13            | Gazipaşa   | 2.411                | 1.020               |
| 14            | Konyaaltı  | 375                  | 77                  |
| 15            | Döşemealtı | 161                  | 115                 |
| 16            | Gündoğmuş  | 136                  | 170                 |
| 17            | Kemer      | 60                   | 10                  |
| 18            | Akseki     | 14                   | 23                  |
| 19            | İbradı     | 1                    | 4                   |
| <b>Toplam</b> |            | <b>343.739</b>       | <b>44.748</b>       |

Ilık ve sıcak iklim sebzesi olan biber bitkisi besin ve organik maddelerce zengin, 6.0-6.5 pH'a sahip, tınlı ve tınlı-kumlu toprakları sevmektedir. Düzenli sulamaya ve gübrelemeye ihtiyaç duyan biber bitkisinden maksimum verim elde etmek için hastalık ve zararlı yönetimine ihtiyaç vardır (Vural vd., 2000).

Virüs hastalıkları bu patojenlere karşı kimyasal savaşın uygulanamayışı, kontrol yöntemlerinin genetik dayanıklılığa ya da viral hastalıkların yayılmasını engelleyen yöntemlere ve hastalıklı bitkilerin eradikasyonuna dayalı olmasından dolayı dünya biber üretimini sınırlandıran önemli faktörler arasında yer almaktadır. Dünya genelinde bitki materyallerinin ticaretinin artması çeşitli viral etmenlerin ve vektörlerinin yeni bitki plantasyonlarına girme riskini arttırdığı gibi, güncel kontrol yöntemleri yeni virüs etmenlerinin yanı sıra hali hazırda bulunan virüs etmenlerinin yeni ırklarını da kontrol etmede yetersiz kalmaktadır. Virüsün genomunda, konukçusunda veya vektöründe değişimin olması hastalığın önemini arttırabilmektedir. Ayrıca değişen iklim ve çevre koşulları da virüs etmenlerinin ve vektörlerinin yayılmasında etkilidir (Hanssen et al., 2010).

Farklı cinslere ait çok sayıda viral etmen biber bitkisini enfekte edebilmektedir. Bunlar arasında *Tobamovirus* cinsi gibi mekanik olarak taşınan ve stabilitesi yüksek virüsler olduğu gibi vektörlerle taşınan *Potyvirus*, *Cucumovirus* ve *Tospovirus* cinsine ait virüslerin zararı da sık ve şiddetli görülmektedir (Green and Kim, 1991). Bu virüsler arasında en yaygın olanlardan ikisi *Cucumovirus* cinsine ait *Cucumber mosaic virus* ve *Tospovirus* cinsine ait *Tomato spotted wilt virus*'tur. TSWV (*Tomato spotted wilt virus*) vektörü olan *Frankliniella occidentalis* ile dünyaya yayılmasıyla ve yerel TSWV izolatlarının tekrar kendini göstermesinden dolayı ciddi epidemilere neden olmuştur. Epidemilerin diğer nedeni de virüslere karşı dayanıklılığın kırılmasıdır. Bazı Akdeniz ülkelerinde biber bitkilerinde bulunan TSWV'ye karşı dayanıklılık geni Tsw, geliştirilmesinden birkaç yıl sonra kırılmaya başlanmıştır (Moury and Verdin, 2012).

Ülkemizde biber üretiminde önemli paya sahip Antalya ilinde yetiştiriciliği yapılan biber bitkilerinde bahsedilen virüs hastalıkları ile ilgili çalışmaların sınırlı olduğu veya viral etmenlerin durumunu saptamanın ötesine gidilemediği görülmüştür. Ayrıca, TSWV Akdeniz Bölgesi'nde önemli bir sorun olduğu için bu etmen üzerinde dayanıklılık çalışmaları yürütülmekte ve dayanıklı veya tolerant olarak geliştirilen çeşitler piyasada bulunmakta ve üreticiler tarafından kullanılmaktadır. Bununla beraber, bölgede viral hastalıklardan kaynaklanan şikayetlerin sürmekte ve TSWV nedeniyle oluşan semptomlara benzer belirtilerle karşılaşıldığı bazı kamu ve özel kurum yetkilileriyle yapılan görüşmeler neticesinde öğrenilmiştir. Gerçekleştirilen ön çalışmalarda, TSWV şikayeti ile gelen bazı örneklerde CMV enfeksiyonu saptanmıştır. Bu öngörüler doğrultusunda çalışmamızda Antalya ilinde biber üretiminin en yoğun yapıldığı üretim alanlarında surveyler yapılarak biber yetiştiriciliğinde sorun olan CMV ve TSWV etmenlerinin bulunma durumları belirlenmiş ve toplanan bitki örneklerinde bulunan virüslerin serolojik, biyolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmanın bu etmenlere karşı yapılacak dayanıklılık çalışmaları için ön araştırma ve karakterizasyonu yapılmış izolat temini niteliğinde olması ve literatüre katkı yapması amaçlanmıştır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Biberdeki virüs hastalıkları dünyadaki biber üretimini sınırlandıran ana nedenlerden biri haline gelmiştir. Çok sayıda virüs hastalığının biber bitkisini enfekte ettiği tespit edilmiştir (Green and Kim, 1991). Bu hastalıklar arasında bulunan CMV ve TSWV üzerine yapılan araştırmalar iki ana başlık halinde incelenmiştir.

### 2.1 *Cucumber mosaic virus*

Biber bitkisinin en önemli viral hastalıklarından birisi olan CMV, *Bromoviridae* familyasındaki *Cucumovirus* cinsinin en önemli üyelerinden birisi olup Doolittle (1920) tarafından ilk defa 1916 yılında hıyar bitkisinde rapor edilmiştir. Hem ılıman hem de tropik ve subtropik iklimlerde çok sayıda kültür bitkisinde kayıplara neden olan CMV, *Cucumovirus* cinsinin dünyada en çok yaygınlık gösteren türüdür (Loebenstein and Lecoq, 2012).

100'den fazla bitki familyası içinde 1200'den fazla bitki türünü enfekte ettiği (Edwardson and Christie, 1991; Ali and Kobayashi'den, 2010) tespit edilen CMV en geniş konukçu dizinine sahip virüslerden birisidir (Tomlinson, 1987). Neredeyse tüm kabakgillerde hastalığa eden olan etmen biber, domates, marul ve baklagiller gibi birçok önemli kültür bitkisini de enfekte edebilmektedir (Thomson and Procter, 1966; Zitter and Provvidenti, 1984; Iqbal et al., 2011). Glayöl, zambak, sümbül ve lale gibi birçok süs bitkisi de bu virüsün konukçuları arasındadır (Samuitienė and Navalinskienė, 2008).

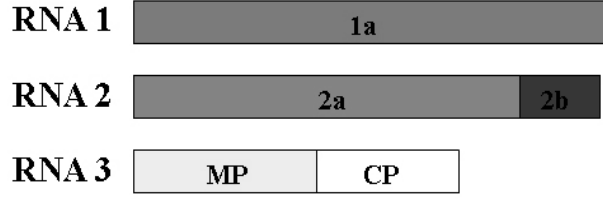
CMV, biber bitkisinde cüceliğe neden olmaktadır ve eğer bitkiyi gelişiminin ilk evrelerinde enfekte ederse bitkide cücelik daha şiddetli görülmektedir. İlerleyen gelişme döneminde enfekte ederse cücelik daha düşük şiddette görülmektedir. Yapraklarda kloroz, meşe yaprağı formu, halka lekeler, mozaik ve şekil bozukluklarına neden olan etmen, meyvelerde pazarlamaya uygun olmayacak şekilde halka lekeler ve şekil bozukluğuna neden olmaktadır (Zitter and Murphy, 2009; Loebenstein and Lecoq, 2012).

Geniş konukçu dizisinden dolayı birçok yabancı ot türü CMV kaynağıdır. Yabancı otlar, üretim dönemleri arasında yaprak bitlerinin ve virüsün ara konukçusu olarak etmenin kültür bitkilerine yayılmasına neden olmaktadır. Bu yabancı otlar arasında *Asclepias syriaca*, *Barbarea vulgaris*, *Stellaria media*, *Capsella bursa-pastoris*, *Portulaca oleracea* ve *Cyperus rotundus* bulunmaktadır. Enfekteli yabancı otlar çoğu zaman belirti göstermemektedir (Tomlinson et al., 1970; Bruckart and Lorbeer, 1976; Iqbal et al., 2011).

En yaygınları ve önemlileri *Myzus persicae* ve *Aphis gossypii* (Perry et al., 1998) olmak üzere 75'den fazla yaprak biti türü (Insecta: Hemiptera: *Aphidoidea*) CMV'yi non-persistent (stylet borne) olarak taşımaktadır (Palukaitis et al., 1992; Ali et al.'dan, 2006). Non-persistent taşıma gerçekleştiren yaprak bitleri genellikle beslenme sonucu virüsü bitkiden alıp kısa bir süre boyunca bünyesinde muhafaza etmektedir ve başka bir bitkiyle beslenme sırasında ise virüsü bitkiye bulaştırmaktadır (Watson, 1946).

Her biri yaklaşık 28 nm çapında olan üç küresel partikülden oluşan CMV (~8,600 nükleotit); RNA1 (~3,350 nükleotit), RNA2 (~3,050 nükleotit) ve RNA3 (~2,200 nükleotit) olmak üzere toplam 3 adet tek iplikli positif sense RNA molekülü (Şekil 2.1) içermektedir (Ding et al., 1994; Kumari et al., 2013). RNA1, viral genomun replikasyonu için gerekli olan metiltransferaz ve helikaz aktivitesine sahip 1a proteinini kodlarken RNA2, 2a proteinini ve 2b proteinini kodlamaktadır (Ding et al., 1994; Gal-On et al., 2000). 2a proteini viral genomun replikasyonundan sorumlu RNA-dependent RNA polimeraz (RdRp) enzimini kodlamaktadır (Hayes and Buck, 1990). 2b proteini RNA4A olarak bilinen RNA ipliğinden kodlanmaktadır ve bitkinin dayanıklılık mekanizmasını aktive etmek için vereceği sinyali dokulara ulaştırmasını engelleyerek etmenin bitkiyi enfekte etmesini sağlamaktadır (Ye et al., 2009). RNA3 ise 3a proteinini (hareket proteini) ve kılıf proteinini kodlamaktadır (Mossop and Francki, 1977). 3a proteini bitkinin hücreler arası ve bitki içindeki uzun mesafe hareketi için gereklidir (Ding et al., 1995). RNA3 partikülü RNA4 (~1,030 nükleotit) diye bilinen dördüncü RNA ipliğine sahiptir. RNA4, CMV'nin kılıf protein üretimi için kılıf protein genini kodlayan dördüncü subgenomik RNA ipliğidir ve virüsün yaprak bitleriyle taşınmasında direkt rol alan tek proteindir (Chen and Francki, 1990). Bundan

dolayı kılıf proteinde meydana gelen mutasyonlar farklı yaprak biti türleriyle taşınmadaki spesifikliği etkilemektedir. Yaprak biti türleri ve populasyonları CMV üzerinde sürekli olarak seçilime ve populasyon değişimine neden olmaktadır (Moury, 2004). Bazı CMV ırkları Satellit RNA (RNA5)'ları desteklemektedir. Sat-RNA (~335 nükleotit) replikasyon için tamamen CMV'ye bağımlı tek iplikli moleküllerdir (Richards et al., 1978; Kaper, 1982).



**Şekil 2.1** CMV etmeninin genom yapısı (Zitter and Murphy, 2009).

CMV ırkları arasındaki genetik çeşitlilik oldukça fazladır ve bundan dolayı CMV izolatları genomik RNA'larının benzerlik derecesine göre alt grup I ve alt grup II olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Palukaitis and Garcia-Arenal, 2003; Bonnet et al.'dan, 2005). Bu iki alt gruba ait izolatların nükleotit dizilerinin benzerlikleri %69-%77 arasında değişmektedir (Palukaitis and Garcia-Arenal, 2003; Loebenstein and Lecoq'dan, 2012). Alt grup I, IA ve IB olmak üzere birbiriyle yakınlık gösteren izolatların oluşturduğu iki gruba ayrılmaktadır (Roossinck et al., 1999). Alt grup IA ve II'deki izolatlar dünya genelinde dağılırken alt grup IB'deki izolatların neredeyse tamamı Doğu Asya'da dağılmaktadır (Loebenstein and Lecoq, 2012). Alt grup IB'ye ait sadece birkaç izolat İspanya'da (Bonnet et al., 2005), İtalya'da (Gallitelli, 2000; Loebenstein and Lecoq'dan, 2012) ve Kaliforniya'da (Lin et al., 2003) tespit edilmiştir. Loebenstein and Lecoq'a (2012) göre alt grup I ve II'ye ait izolatların yaygınlık durumu iklim koşullarına göre çeşitlilik göstermektedir. Alt grup I'e ait izolatların çoğu ılıman iklimlerden elde edilirken alt grup II'ye ait izolatların çoğu daha soğuk iklimlerden elde edilmiştir. Biber üretimi daha çok sıcak iklime sahip bölgelerde yaygınlık gösterdiğinden dolayı alt grup I'e ait izolatlardan daha çok etkilenmesi muhtemeldir.

CMV birçok kültür bitkisinde ve yabancı otta tohumla taşınmaktadır (Tomlinson and Carter, 1970; Bos and Maat, 1974; Yang et al., 1997). Tohumla taşınması enfekteli tohumlardan gelişen bitkilerin birincil hastalık kaynağı olması ve bu bitkilerden diğer bitkilere afitlerle taşınması yönünden epidemi oluşturmada önemli bir etkidir (Jones and Cowling, 1995).

Ali and Kobayashi (2010), yaptıkları çalışmada CMV'nin biber tohumlarıyla taşındığını tespit etmiştir. Bu çalışma ile alt grup IA'ya ait CMV-Fny (Fast New York) izolatıyla mekanik inokulasyon yapılan genç biber fideleri büyütülerek meyve tutumu sağlanmış ve elde edilen biber meyvelerinin tohumlarında CMV'nin %95-100 oranında taşındığı RT-PCR kullanarak belirlenmiştir. CMV'nin tohum kabuğunda %53-83 oranında, embriyoda %10-46 oranında enfeksiyon yaptığı, enfekteli tohumlardan elde edilen enfekteli bitki oranının ise %10-14 olduğu tespit edilmiştir.

CMV, deneysel olarak mekanik inokulasyon yöntemiyle taşınmaktadır. *Cucumis sativus*, *Nicotiana spp.* ve *Chenopodium spp.* gibi çeşitli bitkiler mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılmaktadır. Mekanik olarak taşınma etkinliği, inokulum hazırlanırken pH değişimini engelleyen ve virüs partikülünü koruyan tamponlar kullanılarak arttırılmaktadır (Iqbal et al., 2011).

İsrail'de CMV'nin konukçularını belirlemek için yapılan çalışmada biber bitkilerinde CMV'nin enfeksiyona neden olduğu tespit edilmiştir (Nitzany and Wilkinson, 1961). Meksika'da yetiştiriciliği yapılan biber bitkilerinde CMV enfeksiyonu tespit edilerek özellikle çiçeklenme döneminde zarara neden olduğu belirtilmiştir (Delgado Sanchez, 1974). Yeni Zelanda'da 1981-1983 yıllarında biber üretim alanlarından 50'şer bitki örneği alınarak yapılan çalışmada 1981 yılında %13, 1982 yılında %17, 1983 yılında %28.7 oranında CMV enfeksiyonu tespit edilmiştir. Etmenin %8.4 oranında verim kaybına neden olduğu ve ayrıca meyve büyüklüğü ile kalitesini olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir (Burgmans et al., 1986). Tayvan'da mozaik belirtisine sahip biber bitkilerinde (Chandrasrikul and Patrakosol, 1986) CMV enfeksiyonu tespit edilmiş olup Bosna Hersek'te yapılan çalışmada bu virüsün biber bitkilerinde hastalığa neden olduğu belirtilmiştir (Subasic et al., 1990). ABD'nin Florida eyaletindeki biber

Üretim alanlarında CMV'nin 1995 yılından itibaren neden olduğu şiddetli epidemiler %50'den fazla ürün kaybına neden olmuştur (Kucharek et al., 1998). İşpanya'nın farklı bölgelerindeki biber üretim alanlarında (Alonso-Prados et al., 1998) CMV enfeksiyonu tespit edilmiş olup Tunus'ta etmenin biber bitkilerinde neden olduğu enfeksiyon oranının %30-100 arasında değiştiği ve üretimi sınırlandıran başlıca viral etmenin CMV olduğu saptanmıştır (Mnari Hattab et al., 1999).

1986-1987 yıllarında Bangladeş'teki biber üretim alanlarında DAS-ELISA testiyle CMV enfeksiyonu tespit edilmiştir (Akanda et al., 1991). Küba'da Havana bölgesinde yetiştirilen biber bitkilerinde inokulasyon testleri, serolojik karakterizasyon ve virüs partiküllerinin özelliklerinin ve morfolojisinin incelenmesi yöntemleri kullanılarak CMV varlığı saptanmıştır (Castro et al., 1992). İşpanya'nın Murcia bölgesinde celik, mozaik, kabarcıklanma ve iplik yapraklılık simptomları gösteren biber bitkilerinde elektron mikroskopi ve poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak CMV enfeksiyonu tespit edilmiştir (Espn et al., 1994). ABD'nin Kaliforniya eyaletindeki biber üretim alanlarından alınan örneklerde nükleik asit hibridizasyonu, virion elektroforezi ve mekanik inokulasyon yöntemleriyle CMV'nin varlığı tespit edilmiştir (Rodriguez-Alvarado et al., 1995). Arjantin'in farklı bölgelerindeki ticari ve deneysel tarlalardan alınan biber örneklerinde celik, mozaik, iplik yapraklılık, yapraklarda ve meyvelerde şekil bozukluğu gösteren örneklerde RT-PCR testiyle CMV tespit edilmiştir (Atencio et al., 1997). Slovenya'da ELISA, elektron mikroskopi ve biyolojik indeksleme yöntemleriyle yapılan çalışmada biber bitkilerinde CMV varlığı tespit edilmiştir (Vozelj et al., 2003). Nijerya'da ELISA testiyle yapılan çalışmada biber bitkilerinde %22.14 oranında (Arogundade et al., 2012) CMV enfeksiyonu tespit edilmiş olup 2011 ve 2012 yıllarında Afrika Kıtası'nda bulunan Benin'de biber üretim alanlarında en sık görülen viral etmenlerden birinin CMV olduğu ELISA testiyle belirlenmiştir (Afouda et al., 2013).

Kore'de dolmalık biber seralarında mozaik ve/veya nekrotik simptomlar gösteren biber bitkileri tespit edilerek simptom gösteren ve göstermeyen bitkilerden alınan örneklerle çalışma gerçekleştirilmiştir. CMV enfeksiyonu etmene özgü ‘‘CTC ATG GAT GCT TCT CCG C’’ ve ‘‘CAA CTC AGA TCC

CGC CAC AGA'' primerleri kullanılarak saptanmıştır. 203 bp büyüklüğünde dizi elde edilerek Gen Bankasındaki diğer izolatlarla karşılaştırılmış ve CMV'nin RNA3 bölgesine ait kılıf proteiniyle %98 benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Mun et al., 2008).

Litvanya'da cücelik, mozaik, yaprak ve meyvelerde şekil bozukluğu belirtileri gösteren biber bitkilerinde biyolojik indeksleme, elektron mikroskopi ve RT-PCR yöntemleri kullanılarak CMV etmeni saptanmış olup RT-PCR yönteminde CMV'ye spesifik ''GCG CGA AAC AAG CTT CTT ATC'' ve ''GTA GAC ATC TGT GAC GCG A'' primerleri kullanılarak 540 bp büyüklüğünde çoğaltım elde edilmiştir (Zitikaitė and Samuitienė, 2009).

Hindistan'da yapılan çalışmada yapraklarda mozaik ve deformasyon, yapraklarda ve meyvelerde halka lekeler gösteren biber bitkilerinde CMV enfeksiyonu saptanmıştır. Elektron mikroskopi, DAS-ELISA ve Real-Time PCR kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada CMV'nin RNA3 bölgesine ait kılıf proteinine spesifik primerler kullanılarak yaklaşık 550 bp büyüklüğünde çoğaltım elde edilmiştir (Promil, 2012).

Hindistan'da biber üretim alanlarında DAS-ELISA, mekanik inokulasyon, DNA-RNA hibridizasyon ve RT-PCR yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada CMV enfeksiyonu tespit edilmiştir. Mekanik inokulasyon çalışmaları sonucunda *Cucumis sativus* bitkisinde beneklenme ve mozaik, *Chenopodium amaranticolor* bitkisinde klorotik lokal lezyonlar ve *Capsicum annuum* bitkisinde ise nekrotik halka lekeler ve mozaik şeklinde simptomların olduğu gözlenmiştir. İnokule edilen *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana glutinosa* ve *Vigna unguiculata* bitkilerinde belirti gözlenmemiştir. RT-PCR çalışmalarında ''GTA GAC ATC TGT GAC GCG'' ve ''GCG CGA AAC AAG CTT CTT ATC'' primer çifti kullanılarak etmenin RNA3 bölgesine ait kılıf protein geni üzerindeki 540 bp büyüklüğünde bölge çoğaltılarak klonlanmış ve dizisi belirlenmiştir. Sekans çalışmaları sonucu Gen Bankasındaki CMV altgrup II'e ait izolatlar ile %95-99 oranında benzerlik göstermiştir. Çizilen filogenetik ağaçta altgrup II'ye ait izolatlar ile beraber grup oluşturmuştur (Biswas et al., 2013).

Biberde CMV enfeksiyonlarını kontrol edebilmek için genetik dayanıklılıktan oldukça fazla yararlanılmaktadır. Biberlerde sadece bir tane etkili ana dayanıklılık geni tanımlanmıştır. Bu dominant dayanıklılık geni Cmr1, biberde P2 kromozomunda konumlanmış olup Kore'den elde edilen bir çeşitte tespit edilmiştir. Cmr1'in alt grup IA'a ait CMV izolatlarının sistemik hareketini sınırlandırdığı ancak Cmr1 taşıyan bitkilerin alt grup IB'e ait P1 izolatı tarafından enfekte edildiği belirtilmektedir (Kang et al., 2010; Loebenstein and Lecoq'dan, 2012). Benzer şekilde Güney Kore'de alt grup IA'da bulunan CMV izolatları dayanıklı biber çeşitlerini enfekte etmezken IB alt grubuna ait CMV izolatları dayanıklılığı kırarak dayanıklı biber çeşitlerini enfekte etmeye başlamıştır (Lee et al., 2006).

Türkiye'deki biber bitkilerinde elektron mikroskopi ve serolojik yöntemler kullanılarak (Yılmaz and Davis, 1985) CMV enfeksiyonu tespit edilmiş olup Samsun ilindeki biber üretim alanlarında Agar-Gel Double Diffüzyon ve ELISA yöntemleriyle saptanmıştır (Arlı, 1992). İzmir ilinde üretilen biber bitkilerinde CMV'nin yaygın görülen viral etmenlerden biri olduğu elektron mikroskopi, mekanik inokulasyon ve ELISA yöntemleriyle tespit edilmiştir (Gümüş, 1998). Hatay ili biber alanlarında CMV'nin biyolojik indeksleme ve ELISA testi ile %10.6-12.2 oranında bulunmuştur (Daplan, 2003). Samsun'daki biber üretim alanlarından toplanan örneklerde DAS-ELISA testi kullanılarak 1998 yılında 222 örnekte %7.7, 1999 yılında 91 örnekte %2 oranında CMV enfeksiyonu saptanmıştır (Arli-Sokmen et al., 2005). Hatay, Şanlıurfa, Kahramanmaraş ve Gaziantep illerindeki biber üretim alanlarında DAS-ELISA yöntemiyle %8.3 oranında CMV enfeksiyonu bulunmuştur (Buzkan et al., 2006). Tokat'ta biber üretim alanlarında yapılan çalışmada ELISA yöntemiyle CMV enfeksiyonu olduğu tespit edilmiştir (İlhan, 2011).

Adana, Mersin, Hatay ve Şanlıurfa illerinde üretimi yapılan biber bitkilerinde DAS-ELISA yöntemiyle CMV enfeksiyonu tespit edilmiş ve elde edilen izolatların RT-PCR ve RFLP analizleriyle alt grup IA'ya ait olduğu belirlenmiştir (Çağlar, 2006). Samsun ilinde yazlık sebze yetiştirilen alanlarda CMV'nin alt gruplarının belirlenmesi amacıyla 2012 ve 2013 yıllarında gerçekleştirilen çalışmada biber üretim alanlarında DAS-ELISA yöntemi ile CMV

enfeksiyonu bulunmuştur. CMV enfeksiyonundan en fazla etkilenen ürün grubunun biber (%31.1) olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada 2013 yılına ait CMV izolatlarının büyük kısmının (%67.6) alt grubu serolojik olarak belirlenememiş olup %27.8'inin alt grup I, %1.85'inin alt grup II ve %2.78'inin hem alt grup I hem de alt grup II ile karışık enfekteli olduğu saptanmıştır (Sarı, 2015).

2013 yılında Bursa, Yalova, İstanbul, Bilecik ve Sakarya illerinden toplanan biber örneklerinde DAS-ELISA ve Real-Time PCR yöntemleri kullanılarak %69 oranında CMV enfeksiyonu saptanmıştır. Örneklerle ait yapraklarda mozaik ve deformasyon gözlenmiştir. PCR çalışmalarında “GTA GAC ATC TGT GAC GCG A” ve “GCG CGA AAC AAG CTT CTT ATC” primer çifti kullanılarak etmenin RNA3 bölgesine ait kılıf protein geni üzerindeki bölge çoğaltılarak 540 bp büyüklüğünde bant elde edilmiştir (Uzunoğulları ve Gümüş, 2015).

## **2.2 *Tomato spotted wilt virus***

*Bunyaviridae* familyasında *Tospovirus* cinsine ait bir virüs olan TSWV ilk olarak 1915 yılında Avustralya'da domates bitkisi üzerinde tespit edilmiş olup (Brittlebank, 1919; Adkins'den, 2000) daha sonra viral orjinli olduğu ortaya koyulmuştur (Samuel et al., 1930; Adkins'den, 2000). 1980'den beri hızla ortaya çıkan ve coğrafik olarak yayılan etmen ekonomik olarak en önemli 10 bitki virüsü arasında gösterilmektedir. Etmenin ana vektörü olan batı çiçek tripsinin (*Frankliniella occidentalis*) tarımsal faaliyetler ve kıtalar arası ticaret ile dünya genelinde yayılması etmenin önemini artırmıştır (Goldbach and Peters, 1994; Adkins'den, 2000).

Geniş konukçu dizisine sahip olan etmen monokotiledon ve dikotiledon olmak üzere 80 familyaya ait 800'den fazla bitki türünü enfekte etmektedir. Tropik, subtropik ve ılıman bölgelerde yetiştirilen birçok meyve, sebze ve süs bitkisi türü TSWV'ye hassastır (Goldbach and Peters, 1994; Adkins'den, 2000). *Solanaceae* ve *Asteraceae* familyası bu etmene karşı duyarlı en geniş konukçu dizisine sahiptir (Prins and Kormelink, 1998; Adkins'den, 2000). TSWV enfeksiyonuna en duyarlı bitki türleri ise domates, biber, marul, patates, papaya, yer fıstığı, tütün ve krizantemdir (German et al., 1992; Adkins'den, 2000).

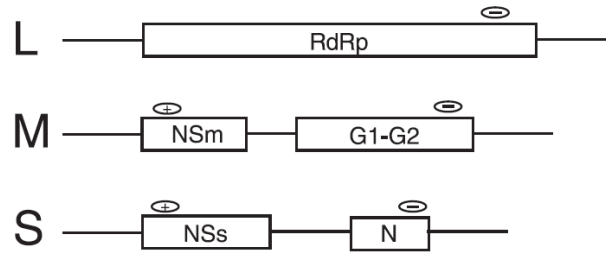
TSWV yapraklarda ve meyvelerde halka lekeler, kloroz, nekroz ve bitkide cücelik oluşturmakla beraber bu belirtiler kültür bitkisinin türüne, enfekte olduğu döneme ve çevresel koşullara bağlı olarak değişmektedir (German et al., 1992; Adkins'den 2000). Biber bitkisinde, bitki erken dönemde enfekte olduysa şiddetli cüceliğe, yapraklarda klorotik mozaik veya lekeler neden olmaktadır. Bitki geç dönemde enfekte olduysa nekrotik lekelerle sahip klorotik mozaik ve lekelerle neden olmaktadır. Etmen meyvelerde nekrotik halka lekeler ya da nekrotik çizgiler meydana getirmektedir (Turina et al., 2012).

Birçok yabancı ot türü üretim alanlarında çok miktarda bulunup çoğunun TSWV ile enfekteli olması ve etmenin vektörü olan tripslerin besin kaynağı olması nedeniyle TSWV kaynağı olarak önem taşımaktadır. Bu yabancı otlar arasında *Capsella bursa-pastoris*, *Chenopodium album*, *Portulaca oleracea*, *Stellaria media* ve *Solanum nigrum* bulunmaktadır (Cho et al., 1986).

TSWV bitkiden bitkiye çiçek tripsi (*Frankliniella intonsa*), batı çiçek tripsi (*Frankliniella occidentalis*), tütün tripsi (*Frankliniella fusca*), biber tripsi (*Scirtothrips dorsalis*), pamuk tripsi (*Frankliniella schultzei*), *Frankliniella zucchini*, soğan tripsi (*Thrips tabaci*), soya fasulyesi tripsi (*Thrips setosus*), kavun tripsi (*Thrips palmi*) gibi farklı trips türleriyle taşınabilmektedir (Amin et al., 1981; Mound, 2001). Birçok bitki türünün çeşitli kısımlarında beslenen polifag bir tür olan *Frankliniella occidentalis* dünya genelindeki yaygınlığından dolayı TSWV'nin en etkili vektörüdür (Goldbach and Peters, 1994; Adkins'den, 2000; Whitfield et al., 2008). Trips, TSWV'yi persistent olarak propagatif (vektör bünyesinde çoğalma özelliği) şekilde taşımaktadır. Trips, virüsü larva döneminde bünyesine aldıysa taşıyabilmektedir. Eğer larva döneminde almadıysa virüsü taşıyamamaktadır. Ergin dönemde enfekteli bitki üzerinde uzun süre beslense bile virüsü bünyesine alamamaktadır. 1. larva döneminde aldığı virüsü 2. larva veya ergin dönemde bitkiden bitkiye taşıyabilmektedir (Ullman et al., 1992).

Yapısında %5 nükleik asit (RNA), %70 protein, %20 lipit ve %5 karbonhidrat bulunan TSWV partikülleri 80-120 nm çapında ve küresel görünümündedir. TSWV genomu S RNA (2.9 kb), M RNA (4.8 kb) ve L RNA (8.9 kb) olmak üzere negatif sense ve ambisense ssRNA (tek sarmal) özellikte üç RNA

segmenti (Şekil 2.2) içermektedir. Her RNA molekülü koruyucu protein kılıf ile çevrelenmiştir (Adkins, 2000). L RNA, replikasyondan sorumlu RNA-dependent RNA polimeraz (RdRp) enzimini kodlamaktadır (Chapman et al., 2003). Ambisense özellikteki M RNA, virüsün hücreden hücreye taşınımını sağlayan ve virüsün fonksiyonel proteinlerinden biri olan negatif polaritedeki Nsm proteinini (hareket proteini) (Li et al., 2009) ve virüsün membran proteinleri olan pozitif polaritedeki G1 (Gc) ile G2 (Gn) proteinlerini kodlamaktadır. G1 ve G2 proteinleri virüsün hem bitkide hem de vektörü olan tripsin bünyesinde lokalizasyonunda ve çoğalmasında önemli bir rol oynamaktadır (Whitfield et al., 2008). S RNA, RNA susturulmasının baskılanmasında etkili olan pozitif polaritedeki Nss proteinini (Takeda et al., 2002) ve negatif polaritedeki kılıf proteinini (N) kodlamaktadır (Richmond et al., 1998).



Şekil 2.2 TSWV etmeninin genom yapısı (Tsompana et al., 2005).

TSWV'nin kültür bitkilerindeki zararını önlemek için başvurulan yöntemlerin başında dayanıklı çeşit kullanımı gelmektedir. TSWV'ye karşı dayanıklılığı sağlayan sadece iki gen bulunmuş olup bunlar ise domatesteki Sw-5 geni ve biberdeki Tsw genidir (Debreczeni et al., 2015). Biberde *Capsicum chinense* PI152225 ve PI159236 hatlarında bulunan dominant Tsw geni ile kontrol edilen dayanıklılık, aşırı duyarlılık reaksiyonu şeklinde kendini göstermektedir (Black et al., 1991). Tsw genine sahip ticari biber çeşitlerinin geliştirilip kullanılmasıyla beraber çeşitli ülkelerde dayanıklılığı kıran TSWV izolatlarının ortaya çıktığı görülmüştür. TSWV izolatları, bu genler tarafından oluşturulan dayanıklılığı kırma özelliklerine göre vahşi tip, Sw-5 dayanıklılığını kıran tip ve Tsw dayanıklılığını kıran tip olarak belirlenmiş olup üç biyotip olarak sınıflandırılmıştır. Vahşi tip, domatesteki Sw-5 genine ve biberde Tsw genine sahip bitkileri enfekte edememektedir. Sw-5 dayanıklılığını kıran tip, Sw-5 genine sahip

domates bitkilerini enfekte edebilmektedir ancak Tsw genine sahip biber bitkilerini enfekte edememektedir. Tsw dayanıklılığını kıran tip, Tsw dayanıklılığına sahip biber bitkilerini enfekte edebilmektedir ancak Sw-5 genine sahip domates bitkilerini enfekte edememektedir (Debreczeni et al., 2015). Tsw geni tarafından sağlanan dayanıklılığın yüksek sıcaklıklarda kırıldığı, bitkinin gelişme dönemine bağlı olduğu ve genç bitkilerin daha duyarlı olduğu saptanmıştır. Tsw dayanıklılığını kıran izolatların, Tsw genine sahip dayanıklı biber bitkilerini sistemik olarak enfekte ettiği tespit edilmiştir (Roggero, 2002).

TSWV'e dayanıklı biber çeşitlerinde dayanıklılığı kırmada Nss proteininin (de Ronde et al., 2013) ve N (nükleokapsit) proteininin (Lovato et al., 2008) rol aldığı belirlenmiştir. TSWV izolatları, koinfeksiyon sırasında genom segmentlerini birbirleriyle değiştirebilmektedir ve bu sürece "reassortment" denilmektedir. TSWV izolatlarının, S RNA segmentlerini birbirleriyle değiştirdiği saptanmıştır (Qiu et al., 1998).

TSWV, biber tohumunun testasını kontamine edebilmekte ancak embriyoda bulunmadığı için enfekteli tohumdan virüsle bulaşık bitki meydana gelmemektedir (Antignus et al., 1997).

TSWV, deneysel olarak mekanik inokulasyon yöntemiyle taşınmaktadır. *Solanaceae*, *Cucurbitaceae* ve *Chenopodiaceae* familyasına ait çeşitli bitkiler mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılmaktadır. TSWV ile mekanik inokulasyondan 10 gün sonra bitkilerde virüsün tipik semptomları gözlenmeye başlanabilmektedir (Gracia et al., 1999).

Yeni Zelanda'da 1981-1983 yıllarında biber üretim alanlarından 50'şer bitki örneği alarak yapılan çalışmada 1981 yılında %3.9, 1982 yılında %1.6, 1983 yılında %2.2 oranında TSWV enfeksiyonu tespit edilmiştir. TSWV'nin %2 oranında verim kaybına neden olduğu ayrıca meyve büyüklüğünü ve kalitesini olumsuz etkilediği tespit edilmiştir (Burgmans et al., 1986). Avustralya'da ELISA yöntemiyle gerçekleştirilen çalışmada bazı bölgelerde TSWV'nin biber bitkilerini %100 oranında enfekte ettiği saptanmıştır (Latham and Jones, 1997). 1990-1992 yılında yapılan çalışmada TSWV'nin ABD'de biber üretim alanlarında verim

kayıplarına neden olduğu saptanmıştır (Gitaitis et al., 1998). Çek Cumhuriyeti'ndeki biber üretim alanlarında 1992-1997 yıllarında yapılan çalışmada TSWV enfeksiyonunun oldukça yoğun olduğu elektron mikroskopi ve serolojik yöntemler kullanılarak belirlenmiştir (Mertelik and Mokra, 1998). Arjantin'de biber üretim alanlarında 1994-1996 yıllarında yapılan çalışmada DAS-ELISA yöntemi kullanılarak %40 oranında bulunan TSWV enfeksiyonunun üretim alanlarında biber meyvesini hasat edemeyecek kadar ciddi kayıplara neden olduğu saptanmıştır. Elde edilen izolatlar çeşitli test bitkilerine inokule edilmiş ve kullanılan biber bitkilerinde klorotik ve nekrotik lekeler, mozaik, nekroz ve nekrotik halka lekeler şeklinde belirtiler gözlenmiştir (Gracia et al., 1999).

İsrail'de örtüaltında ve açık alanda üretimi yapılan biber bitkilerinde 1994-1998 yıllarında yapılan çalışmada ELISA yöntemiyle TSWV enfeksiyonu saptanmıştır. Biber bitkilerinin yapraklarında klorotik lezyonlar, nekrotik lezyonlar, damar bantlaşması, rugoz ve kloroz gözlenirken meyvelerinde nekroz, gövdede nekrozla beraber cücelik gözlenmiştir (Gera et al., 2008). İsrail'de gerçekleştirilen bir diğer çalışmada cücelik, gövde nekrozu, klorotik ve nekrotik lekeler, damar bantlaşması, yapraklarda şekil bozukluğu ve kloroz gözlenen biber örneklerinde mekanik inokulasyon, DAS-ELISA, elektron mikroskopi, SDS-PAGE ve immunoblotting yöntemleriyle TSWV enfeksiyonu saptanmıştır (Antignus et al., 1997).

Kuzey Florida'da yetiştiriciliği yapılan Habanero (*Capsicum chinense*) ve Tobasca (*Capsicum frutescens*) türü biber bitkilerinden alınan örneklerde DAS-ELISA ve IC-RT-PCR yöntemleriyle TSWV varlığı tespit edilmiştir. Örneklerde yapraklarda nekrotik lekeler, meyvede halka lekeler ile şekil bozukluğu ve cücelik belirtileri gözlenmiştir. IC-RT-PCR çalışmalarında “ATG TCT AAG GTT AAG CTC” ve “TTA AGC AAG TTC TGT GAG” primer çifti kullanılarak etmenin S RNA bölgesinin nükleokapsit genine karşılık gelen 800 bp büyüklüğünde çoğaltım elde edilmiştir (Momol, 2000). Bulgaristan'ın farklı bölgelerinde örtü altından ve tarlalardan alınan biber örneklerinde mekanik inokulasyon, DAS-ELISA ve TAS-ELISA yöntemleriyle TSWV tespit edilmiştir (Hristova et al., 2001). Slovenya'da biber üretim alanlarında TSWV varlığı DAS-

ELISA, mekanik inokulasyon ve IC-RT-PCR yöntemleriyle tespit edilmiştir (Mavric and Ravnika, 2001).

Kore’de dolmalık biber seralarında mozaik ve/veya nekrotik simptomlar gösteren biber bitkileri tespit edilmiştir. Simptom gösteren ve göstermeyen bitkilerden alınan örneklerle gerçekleştirilen çalışmada TSWV enfeksiyonu etmene özgü “GAG ATT CTC AGA ATT CCC AGT” ve “AGA GCA ATC GTG TCA ATT TTA TTC” primerleri kullanılarak tespit edilmiştir. TSWV izolatının S RNA bölgesinin nükleokapsit proteininin sekansı Gen Bankasındaki diğer izolatlarla %100 benzerlik göstermiştir (Mun et al., 2008). Hindistan’da biber üretim alanlarında DAS-ELISA, RT-PCR yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada TSWV enfeksiyonu tespit edilmiştir. RT-PCR çalışmalarında “CCTTTAACAGT (A/T/G) GAAACAT” ve “CAT (A/T/G) GC (A/G) CAAGA (A/G) TG (A/G) TA (A/G) ACAGA” primer çifti kullanılarak 460 bp büyüklüğünde bant elde edilmiştir (Biswas et al., 2013).

TSWV’nin *Capsicum chinense* (PI152225)’den geri melezlemeyle geliştirilen dayanıklı ticari biber çeşitlerini sistemik olarak şiddetli şekilde enfekte ettiği tespit edilmiştir. Mekanik inokulasyon çalışmaları sonucu TSWV’ye dayanıklı ticari biber çeşidinin dayanıklılığı kıran TSWV izolatına karşı duyarlı olduğu bulunmuştur (Roggero et al., 2002).

İspanya’nın Almeria bölgesindeki biber üretim alanlarında 2003 yılında yapılan çalışmada, TSWV’ye dayanıklılık gösteren bazı biber çeşitlerinde TSWV enfeksiyonuyla ilişkili belirtiler gözlenmiş ve yapılan serolojik testlerde TSWV ile bulaşık olduğu saptanmıştır. Enfekteli bitkilerden elde edilen inokulum TSWV’ye karşı dayanıklı olan *Capsicum chinense* bitkisine (PI152225) mekanik inokulasyon yöntemiyle inokule edilmiş ve inokule edilen yapraklarda belirti gözlenmezken yeni çıkan yapraklarda inokulasyondan 4 gün sonra sistemik belirtiler gözlenmiştir ve ELISA ile bitkide TSWV’nin sistemik enfeksiyon yaptığı tespit edilmiştir. *Capsicum chinense* bitkisine Br01 ve P105 izolatları inokule edildiğinde ise inokule edilen yapraklarda nekrotik lekeler gözlenirken inokule edilmeyen yapraklarda sistemik belirtiler gözlenmiş ve ELISA ile testlenmesi sonucu TSWV saptanmamıştır. Bitkinin inokule edilmeyen üst

yapraklarından alınan yaprak örnekleri ile TSWV'nin S segmentini çoğaltmak için RT-PCR uygulaması yapılmış ve nükleokapsit genine karşılık gelen 800 bp büyüklüğünde PCR ürünü elde edilerek klonlanmış ve sekans analizi yapılmıştır. Elde edilen izolatın (AY598831) Gen Bankasındaki diğer TSWV izolatları ile nükleokapsit proteininin dizilimi karşılaştırıldığında Almeria'da 1995'te tanımlanan izolat (X94550) ile >%99 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmayla Tsw geninin dayanıklılığını kıran TSWV ırkı İspanya'da ilk defa saptanmıştır (Margarita et al., 2004).

Avustralya'da TSWV'ye karşı dayanıklılık sağlayan Tsw genine sahip biber çeşitlerinde TSWV enfeksiyonunun tipik belirtilerine rastlanmış ve birçok serada bitkilerin neredeyse %100'ünün enfekteli olduğu gözlenmiştir. ELISA testi ile örneklerin TSWV ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Enfekteli bitkilerden elde edilen 1438, 1439, 1440 ve 1441 nolu izolatlar, Tsw dayanıklılık genini taşıyan biber çeşitlerine ve *Capsicum chinense* genotiplerine (PI152225 ve PI159236) inokule edildiğinde aşırı duyarlılık reaksiyonu yerine şiddetli sistemik belirtiler gözlenmiştir. 1423 nolu TSWV izolatı ise Tsw geni taşıyan biber çeşitlerinde aşırı duyarlılık reaksiyonuna neden olmuş ve sistemik enfeksiyon oluşturmamıştır. Bu izolatın inokule edildiği bitkinin yeni çıkan yapraklarıyla ELISA testi gerçekleştirildiğinde virüs tespit edilememiştir. TSWV'nin S segmentini çoğaltmak için RT-PCR uygulaması yapılmış ve nükleokapsit genine karşılık gelen yaklaşık 1040 bp büyüklüğünde PCR ürünü elde edilerek sekans analizi yapılmıştır. Dayanıklılığı kıran 1438 ve 1439 nolu iki izolatın nükleokapsit genlerinin sekanslarının (AY818320 ve AY818321), 1423 nolu standart TSWV izolatının sekansı (AY879109) ile %97 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Sharman and Persley, 2006).

Macaristan'da, Tsw dayanıklılık genine sahip biber bitkilerinde TSWV'nin neden olduğu belirtilere benzer mozaik, yaprak deformasyonları ve halka lekeler gibi belirtiler gözlenmiştir. DAS-ELISA ve TAS-ELISA testleri sonucu bu bitkilerde TSWV varlığı tespit edilmiştir. İzolatın *Capsicum chinense* (PI152225) bitkisine inokulasyonu sonucu sistemik enfeksiyon gözlenmiştir. RT-PCR ile S segmenti çoğaltılan izolatın sekansı elde edilmiş ve dünyadaki diğer izolatlarla %95-97 oranında benzerlik gösterdiği bulunmuştur (Gabor et al., 2012).

Arjantin’de, TSWV’ye dayanıklı biber çeşitlerinde Tospovirüslerin neden olduğu simptomlara benzer belirtiler gözlenmiş ve bitkilerin %100’ünün enfekteli olduğu gözlenmiştir. Bitkilerin TSWV ile enfekteli olduğu ELISA yöntemiyle saptanmıştır. RT-PCR ile N gen bölgesi üzerinde 450 bp büyüklüğünde çoğaltım elde edilmiştir. Enfekteli bitkiden elde edilen TSWV-A2 izolatu Tsw geni taşıyan ticari biber çeşitlerine inokule edilmiştir. İnokulasyondan 2 hafta sonra tüm bitkilerde TSWV’nin tipik belirtilerine sahip sistemik enfeksiyon gözlenmiş ve RT-PCR çalışmaları sonucu TSWV varlığı saptanmıştır. Dayanıklılığı kıran TSWV-A2 izolatının N geni üzerinde 800 bp büyüklüğünde bölge çoğaltılarak sekansı elde edilmiş (KP719131) ve Güney Kore izolatlarıyla (EF195230 ve EF195224) %99 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır. TSWV-A2 izolatının, İtalya’da (Roggero et al., 2002) ve İspanya’da (Margaria et al., 2004) Tswv geni taşıyan biber bitkilerinde dayanıklılığı kırdığı rapor edilen izolatlarla ortak özellikler taşıdığı saptanmıştır (Ferrand et al., 2015).

Samsun’daki biber üretim alanlarından toplanan örneklerde 1998 yılında 222 örnekte %2.2, 1999 yılında 91 örnekte %9.2 oranında TSWV enfeksiyonu ELISA testi kullanılarak belirlenmiştir (Arli-Sokmen et al., 2005). Hatay ili biber alanlarında TSWV etmeni % 6.3-8.5 oranında biyolojik indeksleme ve ELISA testi ile saptanmıştır (Daplan, 2003). Adana, Mersin, Hatay ve Şanlıurfa illerinde üretimi yapılan biber bitkilerinde (Çağlar, 2006) ve Tokat’taki biber üretim alanlarında TSWV enfeksiyonu ELISA yöntemiyle saptanmıştır (İlhan, 2011).

Adana ve Mersin illerindeki biber üretim alanlarından toplanan 130 biber örneği ELISA yöntemiyle testlenmiş %30 oranında TSWV enfeksiyonu saptanmıştır. Enfekteli olduğu saptanan 69 örnekten 3 örnek kodlanarak mekanik inokulasyon, SDS-PAGE, virüs saflaştırma, virion analizi ve RT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İzolatlar mekanik inokulasyon çalışmalarında *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Gompherana globosa* bitkilerinde belirti oluşturmazken *Capsicum annum* bitkisi yapraklarında halka lekelerine, yapraklarda deformasyona ve kloroza neden olmuştur. TSWV’nin en karakteristik belirtileri *Nicotiana rustica* indikatör bitkisinde en kısa sürede ve en yoğun şekilde gözlenmiştir. İzolatlardan biri *Nicotiana glutinosa* bitkisinde kloroz ve bodurluk belirtilerine neden olurken diğer izolatlar belirti vermemiştir. İzolatlar *N. tabacum*

“Xanthii”, *N. tabacum* “Samsun”, “Samsun NN” indikatör bitkilerinde yapraklarda kıvrılma, deformasyon ve kloroz ile bodurluk oluştururken *N. tabacum* “Xanthi nc”, *N. tabacum* “Samsun NN” ve *N. rustica* bitkilerinin yapraklarında halka lekelerine de neden olmuştur. *Lycopersicon esculantum* bitkisinde ise yapraklarda deformasyon ve kloroz ile geriye ölüm symptomuna neden olmuştur (Küçük, 2006).

Antalya ili Merkez (Aksu, Kurşunlu, Çamköy, Altınova), Serik (Merkez, Çakallık) ve Kumluca (Merkez, Mavikent, Beykonak) ilçelerinden toplanan 345 biber bitkisi örneğinde ELISA, mekanik inokulasyon ve RT-PCR yöntemleriyle gerçekleştirilen çalışmada %91.6 oranında TSWV enfeksiyonu saptanmıştır. Enfekteli bitkilerde yapraklarda sararma, halka lekeler ve aşağı doğru kıvrılma ile meyvelerde halka lekeler tespit edilmiştir. Mekanik inokulasyon çalışmaları sonucu *Capsicum annuum* bitkisinde yaprak kıvrılması, yaprak deformasyonu, bodurlaşma, kloroz ve halka lekeler gözlenmiştir. RT-PCR çalışmalarında TSWV'ye spesifik “AAT TGC CTT GCA ACC AAT TC” ve “ATC AGT CGA AAT GGT CGG CA” primer çifti kullanılarak 276 bp büyüklüğünde ve Tospovirüslere spesifik “GAA TAT ATG ACA CCA TTG” ve “CCC AGA GCA ATC AGT GCA” primer çifti kullanılarak 514 bp büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir (Bozdoğan, 2009). Batı Akdeniz bölgesindeki sebze üretim alanlarında 2006-2007 yıllarında TSWV'nin varlığını belirlemek için DAS-ELISA yöntemiyle gerçekleştirilen çalışmada biber bitkilerinde %67.16 oranında TSWV enfeksiyonu tespit edilmiştir (Yardımcı ve Çulal Kılıç, 2009).

Samsun ilinde yapılan çalışmada biber alanlarından toplanan örneklerinin %25'inin TSWV ile bulaşık olduğu DAS-ELISA yöntemiyle tespit edilmiş ve enfekteli olan bitkilerde yaprakta klorotik halka lekeler ve merkezi nekrotik halka lekeler gözlenmiştir. Elde edilen biber izolatının test bitkilerine verilmesiyle *Nicotiana clevelandii*'de nekrotik lekeler; *Nicotiana glutinosa*'da nekrotik leke, mozaik ve şekil bozukluğu, *Nicotiana rustica*'da nekrotik leke, klorotik halka leke ve şekil bozukluğu; *Nicotiana tabacum* cv. “Xanthi-nc” bitkisinde nekrotik halka lekeler; *Nicotiana benthamiana*'da klorotik leke, kloroz ve şekil bozukluğuna neden olmuştur. İnokulasyon yapılan domates bitkisinde nekrotik lekeler, mozaik

ve bodurlaşma gözlenirken biber bitkisinde ise klorotik leke ve klorotik halka lekeler gözlenmiştir (Yıldırım, 2010).

Samsun’da örtü altında yetiştiriciliği yapılan TSWV’ye dayanıklı biber çeşidine ait bitkilerde virüs benzeri symptomlar gözlenmiş olup DAS-ELISA testi ile TSWV enfeksiyonu saptanmıştır. Enfekteli bitkiden izole edilen virüs *Capsicum annuum* bitkisinde çoğaltılmış ve TSWV’ye dayanıklı *Capsicum chinense* bitkisine (PI159236), TSWV’ye dayanıklı 10 farklı çeşit biber bitkisine ve kontrol için (duyarlı çeşit) *Capsicum annuum* cv. *Yolo Wonder* bitkilerine inokule edilmiştir. Dayanıklı bitkilerde inokule edilen yapraklarda nekrotik lekeler gözlenmemiş olup inokule edilmeyen yapraklarda inokulasyondan 4-7 gün sonra sistemik belirtiler gözlenmeye başlanmıştır. Dayanıklı çeşitlerde gözlenen belirtiler, duyarlı çeşitlerde gözlenen sistemik belirtilere benzerdir. TSWV izolatının (SC3-RB) nükleokapsit proteinini çoğaltmak için spesifik primerler kullanılmış ve 809 bp büyüklüğünde çoğaltım elde edilerek Gen Bankasına KM379141 kodu ile kaydedilmiştir. Elde edilen sekans Gen Bankasındaki izolatlarla karşılaştırılmış olup biberde dayanıklılığı kıran İtalya’daki P170RB (DQ431238) izolatıyla %99 ve İspanya’daki RB (AY598831) izolatıyla %97 benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Deligoz et al., 2014a).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Araştırmanın yürütüldüğü yer ve bitki örnekleri

Araştırma Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarı ve Viroloji Serası'nda yürütülmüştür.

Araştırmada kullanılan bitki örnekleri, Antalya ilinin biber yetiştiriciliği açısından önem taşıyan Kumluca, Demre, Serik ve Aksu ilçelerinden alınmıştır. Kumluca, Demre ve Aksu ilçelerinde örtü altından; Serik'ten ise örtü altı ve açık alandan örnek alınmıştır (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1** Araştırmada toplanan bitki örneklerinin ilçelere göre dağılımı.

| İlçe                | Kumluca | Demre | Serik | Merkez | Toplam     |
|---------------------|---------|-------|-------|--------|------------|
| Alınan örnek sayısı | 62      | 42    | 26    | 18     | <b>148</b> |

Örnekleme yapılan ilçelerde çarliston, dolmalık, kapy, macar, sivri, kıl, üçburun, jalapone ve şili biber tiplerinin yetiştirildiği görülmüştür.

##### 3.1.2 Serolojik çalışmalarda kullanılan materyal

DAS-ELISA yönteminde CMV, TSWV, TMV (*Tobacco mosaic virus*) ve PVY (*Potato virus Y*) virüs etmenleri için Bioreba firmasından temin edilen ticari tanı kitleri (antiserumlar, pozitif ve negatif örnekler) ve çözeltiler (kaplama, ekstraksiyon, konjugat, substrat ve yıkama çözeltileri) kullanılmıştır. 96 kuyucuk içeren ELISA tabakları, ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada Titertek Multiskan Plus MK II marka ELISA okuyucusu kullanılmıştır.

### 3.1.3 Biyolojik tanı çalışmalarında kullanılan materyal

Araziden toplanan biber örneklerinden DAS-ELISA yöntemiyle TSWV veya CMV ile bulaşık olduğu saptanan örneklerin taze bitki doku materyali olarak kullanıldığı mekanik inokulasyon çalışmalarında farklı familyalara ait test bitkileri (Çizelge 3.2) kullanılmıştır.

**Çizelge 3.2** Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan test bitkileri

| Türkçe adı | Bilimsel ismi                       | Familya              |
|------------|-------------------------------------|----------------------|
| Tütün      | <i>Nicotiana tabacum cv. xanthi</i> | <i>Solanaceae</i>    |
| Tütün      | <i>Nicotiana tabacum cv. havana</i> | <i>Solanaceae</i>    |
| Tütün      | <i>Nicotiana glutinosa</i>          | <i>Solanaceae</i>    |
| Hıyar      | <i>Cucumis sativus</i>              | <i>Cucurbitaceae</i> |
| Biber      | <i>Capsicum annuum</i>              | <i>Solanaceae</i>    |

Biyolojik tanı çalışmalarında kullanılan test bitkileri Viroloji Laboratuvarı ve Viroloji Serası'nda ve Bahçe Bitkileri Bölümü iklimlendirme odasında yetiştirilmiştir.

Mekanik inokulasyon çalışmaları porselen havan ve havan eli, 0,01 M fosfat tamponu çözeltisi, celite, ucu pamuklu kulak temizleme çubuğu, tülbent ve çeşme suyu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### 3.1.4 Moleküler çalışmalarda kullanılan materyal

#### 3.1.4.1 Total nükleik asit ekstraksiyonu aşamasında kullanılan materyal

ELISA testleri sonucunda CMV veya TSWV ile enfekteli olduğu saptanan örneklerin yapraklarından elde edilen bitki özsuvarı çalışma materyalini oluşturmuştur.

Total RNA ekstraksiyonu aşamasında; steril havan ve havan elleri, steril poşet, homojenizatör, tampon çözelti ve solüsyonlar (grinding buffer,  $\beta$ -Mercaptoethanol içeren ekstraksiyon tamponu, sarcosil solüsyonu, 6 M sodyum

iyodür (NaI), silika solüsyonu, ethanol, yıkama tampon çözeltisi, RNase'dan ari steril su), ependorf tüpler, ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları, Sigma D 37520 marka santrifüj, Heidolph Unimax 2010 marka sallayıcı platform, ETG MBT 250 marka ısıtıcı ve buz makinesi kullanılmıştır.

#### **3.1.4.2 cDNA sentezi aşamasında kullanılan materyal**

cDNA sentezi aşamasında, total RNA ekstraksiyonu çalışmaları sonucunda, CMV ve TSWV ile enfekteli bitkilerden elde edilen total nükleik asit ekstraktları materyal olarak kullanılmıştır.

cDNA sentezi, Thermo Scientific firmasından temin edilen cDNA sentez kitleri (10X RT Buffer, Nuclease-free H<sub>2</sub>O, 25X dNTP mix (100 mM), 10X RT Random Primers, MultiScribe™ Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor), steril PCR tüpleri, ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları ve PE Applied Biosystems Gene Amp PCR systems 9700 marka Thermal Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### **3.1.4.3 RT-PCR aşamasında kullanılan materyal**

RT-PCR aşamasında, cDNA aşamasında sentezlenen cDNA'lar kullanılmıştır.

RT-PCR işlemi Applied Biosystems firmasından temin edilen DreamTaq Green PCR Master Mix ve nuclease free su, CMV ve TSWV'ye spesifik primerler (10mM), PCR tüpleri, ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları ve PE Applied Biosystems Gene Amp PCR systems 9700 marka Thermal Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### **3.1.4.4 Çoğaltılmış PCR ürünlerinin analizinde kullanılan materyal**

Agaroz jel elektroforez aşamasında total RNA ekstraksiyonu işlemi sonucunda elde edilen CMV ve TSWV'ye ait total RNA'lar ile RT-PCR çalışmalarından elde edilen PCR ürünleri materyal olarak kullanılmıştır.

Örneklerin ve jellerin hazırlanıp boyanmasında agaroz, 1X TAE tampon çözeltisi, mikrodalga fırın, Fermentas marka 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific marka 6X DNA Loading dye ve ethidium bromide kullanılmıştır. Örneklerin agaroz jele yüklenmesi sırasında Owl A2 ve Owl B1 marka jel elektroforez düzeneği ve Consort E815 marka güç kaynağı kullanılmıştır. Jel fotoğrafları DNR Bio-Imaging marka Jel Dokümantasyon ve Analiz Sistemi kullanılarak çekilmiştir.

### **3.2 Yöntem**

#### **3.2.1 Simptomolojik gözlemler ve örnekleme**

Surveyler Türkiye İstatistik Kurumu 2014 verilerine göre, Antalya ilinde biber yetiştiriciliğinin üretim miktarı açısından %70'den fazlasının gerçekleştirildiği Demre, Kumluca ve Aksu ilçesinde örtüaltında; Serik ilçesinde örtüaltında ve açık alanda biber üretimi yapılan alanlarda 2015 yılının ilkbahar ve yaz aylarında gerçekleştirilmiştir.

Biber bitkilerinde CMV ve TSWV'nin tipik belirtileri aranmış ve virüs ile bulaşık olduğundan şüphelenilen biber bitkilerinin genç yaprakları toplanmıştır. Örnek alma sırasında her örnek için plastik torbalar numaralandırılarak örneğin alındığı yer, toplam alan, bitki çeşidi, tarih ve belirtiler örnek alma formuna kaydedilmiş ve laboratuvara getirilmiştir. Bu bitki dokuları yapılacak olan biyolojik, serolojik ve moleküler çalışmalarda kullanılıncaya kadar kısa bir süre için buzdolabında +4°C'de muhafaza edilip daha sonra derin dondurucuda saklanmıştır.

### 3.2.2 Biyolojik testler

Bu örnekler laboratuarda DAS-ELISA yöntemi ile testlendikten sonra CMV ve TSWV antiserumuna pozitif sonuç veren bitkilerin simptom gösteren genç yapraklarından alınan örnekler, konukçu reaksiyonlarının belirlenebilmesi için farklı familyalara ait test bitkilerine farklı dönemlerde (Çizelge 3.3) mekanik inokulasyon yöntemi ile aşılanmıştır (PVO, 2015). İnokulasyondan sonra simptomolojik gözlemlere devam edilmiştir.

**Çizelge 3.3** Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan test bitkileri ve kullanıldıkları dönemler.

| Türkçe adı | Bilimsel ismi                       | Dönem              |
|------------|-------------------------------------|--------------------|
| Tütün      | <i>Nicotiana tabacum cv. xanthi</i> | 4 yapraklı evre    |
| Tütün      | <i>Nicotiana tabacum cv. havana</i> | 4 yapraklı evre    |
| Tütün      | <i>Nicotiana glutinosa</i>          | 4 yapraklı evre    |
| Hıyar      | <i>Cucumis sativus</i>              | 2 kotiledonlu evre |
| Biber      | <i>Capsicum annuum</i>              | 4 yapraklı evre    |

#### 3.2.2.1 Test bitkilerinin yetiştirilmesi

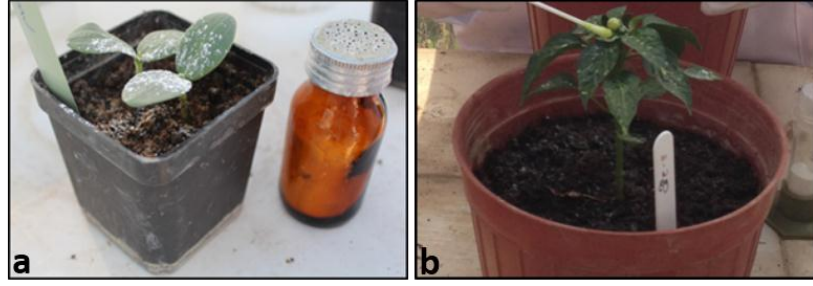
Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan test bitkilerinden tütün tohumları ve hıyar tohumları elenmiş fide toprağına ekilmiştir. Biber fideleri doğrudan plastik saksılara dikilmiştir (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1** Yetiştirilen test bitkilerinin çeşitli dönemlerine ait görüntüler a)Tütün tohumlarının çimlendirilmesi, b)Hıyar fideleri kotiledon yaprakları, c)Biber bitkileri.

### **3.2.2.2 Test bitkilerinin mekanik olarak inokulasyonu**

CMV veya TSWV antiserumuna karşı pozitif sonuç veren yaprak örnekleri 0,01 M Fosfat tamponu (pH:7) ile buz üzerindeki porselen havanda ezilmiştir. Elde edilen bitki özsuğu tülbent ile süzöldükten sonra dokuda yara açmak için üzerlerine celite serpişen test bitkilerinin yapraklarına ucu pamuklu kulak temizleme çubuğı ile inokule edilmiştir (Şekil 3.2). İnokulasyondan sonra celite ve bitki özsuğı artıklarını uzaklaştırmak için bitki yaprakları piset kullanılarak çeşme suyu ile yıkanmıştır. Bitkiler bir ay süre ile periyodik olarak kontrol edilmiş ve oluşın simptomlar kaydedilerek fotoğrafları çekilmiştir (Gümüş, 1998).



**Şekil 3.2** Test bitkilerine mekanik inokulasyon uygulaması a)Hıyar fidelerine mekanik inokulasyon uygulaması, b)Biber bitkilerine mekanik inokulasyon uygulaması.

### 3.2.3 Serolojik test (DAS-ELISA) yöntemi

CMV veya TSWV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen bitki örnekleri, CMV ve TSWV'nin varlığının ortaya konulması amacıyla Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbant Assay (DAS-ELISA) testi ile Clark and Adams (1977)'nin belirttiği şekilde testlenmiştir.

DAS-ELISA testlerinde kullanılan tabakların her birinde, örnek tampon çözeltisi, firmadan ticari olarak temin edilen negatif kontrol ve CMV ile TSWV için temin edilmiş ticari pozitif kontroller karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır.

DAS-ELISA yöntemi Bioreba AG firmasının önerdiği prosedüre göre uygulanmıştır. Testin uygulanmasında izlenen basamaklar aşağıdaki gibidir:

1. Etmene özgü spesifik IgG, firmanın bildirdiği prosedüre göre kaplama tamponunda 1:1000 oranında seyreltilmiş olarak ELISA tabaklarının her bir kuyucuğuna 100 µl eklenmiş ve tabaklar üzeri kapatılarak 34°C'de 3 saat inkube edilmiştir.
2. Tabaklar inkübasyondan sonra yıkama tamponu ile her yıkama 3'er dakika olacak şekilde 3 kere yıkanmış ve ters çevrilerek tabaklar boşaltılmış ve kağıt havlu üzerine vurularak kuruması sağlanmıştır.
3. Alt alta çiftler kuyucuk gelecek şekilde düzenlenmiş tabak planına göre pozitif ve negatif kontroller, tampon çözeltisi ve ekstraksiyon tamponu

ile 1/10 (g/ml) oranında hazırlanmış olan yaprak ekstraktı örnekleri her kuyucuklara 100'er µl eklenmiş ve tabaklar üzeri kapatılarak +4°C' de bir gece inkübasyona tabi tutulmuştur.

4. Tabaklar inkübasyondan sonra yıkama tamponu ile yukarıda anlatıldığı şekilde tekrar yıkanmıştır.
5. Yıkama işleminden sonra ise konjuge edilmiş IgG, konjugat tamponu içerisinde 1:1000 oranında seyreltilip her bir kuyucuğa 100 µl eklenerek 34°C'de 3 saat inkübe edilmiştir.
6. Tabaklar inkübasyondan sonra yıkama tamponu ile tekrar yıkanmıştır.
7. Son olarak tabakların her kuyucuğuna substrat tamponunda pNPP (para-nitrophenylphosphate) 1 mg/ml olacak şekilde hazırlanan çözeltiden 100'er µl ilave edilerek tabaklar 30-60 dakika oda sıcaklığında ışıksız ortamda inkübe edilmiştir.
8. Tabaklarda sarı renk oluşumu gözlenip kaydedilmiş ve ELISA okuyucusu ile tabaklar 405 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okunup sağlıklı kontrole göre en az iki kat veya daha fazla absorbans değer veren örnekler enfekteli olarak kabul edilmiştir.

Virüs benzeri simptom gösterdiği halde DAS-ELISA testi sonucu CMV ve/veya TSWV etmenlerine karşı pozitif sonuç vermeyen örnekler ayrıca PVY ve TMV etmenleri için DAS-ELISA testi ile testlenmiştir.

Pozitif sonuç veren örnekler ile RT-PCR çalışmalarına gidilmiştir.

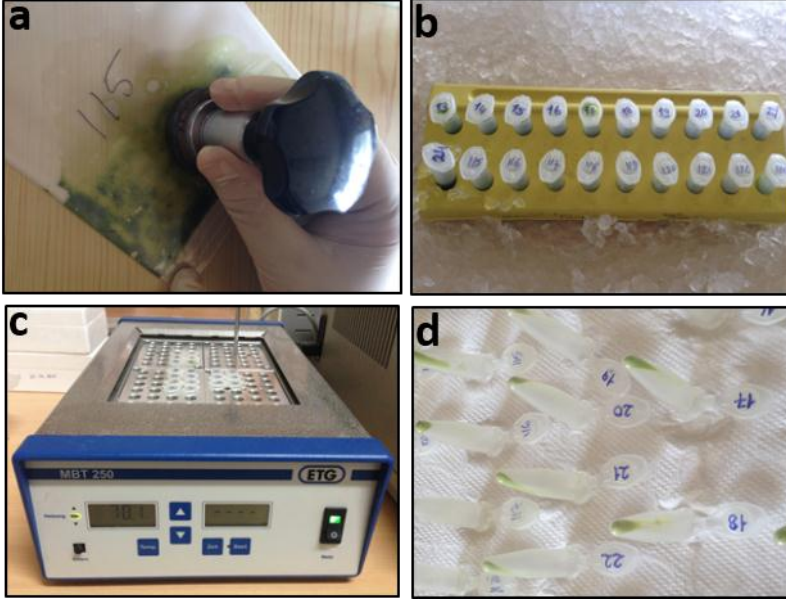
### 3.2.4 Moleküler yöntem

#### 3.2.4.1 Total nükleik asit (TNA) ekstraksiyonu

TNA ekstraksiyonunda silika metodu kullanılmıştır (Foissac et al., 2001). Her izolat için yaklaşık 100 mg/yaprak örneği steril poşet içine koyulup ezildikten sonra 2 ml grinding buffer ve 20 µl β-Mercaptoethanol içeren ekstraksiyon tamponu varlığında homojenize edilmiştir. 500 µl hacimde alınan ekstraktların üzerine 100 µl %10'luk sarcosil solüsyonu ilave edilmiştir. Tüpler blok ısıtıcıda 10 dakika süreyle 70°C'de inkübe edilmiş ve ardından 5 dakika süreyle buzda bekletilmiştir. Daha sonra 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj uygulanmıştır. Üst sıvıdan 300 µl alınarak yeni eppendorf tüplere aktarılacak içerisine 300 µl 6 M sodyum iyodür (NaI), 50 µl silika solüsyonu, 150 µl ethanol ilave edilmiştir. Karışım, sallayıcı platform üzerinde 10 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Tüplere 6.000 rpm'de 1 dakika santrifüj uygulandıktan sonra üstteki sıvı atılarak tüpün içinde kalan silika partiküllerinin yıkanması için 500 µl yıkama tampon çözeltisi eklenmiş ve 6.000 rpm'de 1 dakika santrifüj uygulanmıştır. Yıkama işlemi iki kere yapılmıştır ve yıkamadan sonra tüpler kurutma kağıdına ters çevrilerek konulmuştur. Silika partikülleri içeren tüplere 150 µl RNase'dan arı steril su eklenerek çözündürülmüştür. 70°C'de 4 dakika süreyle blok ısıtıcıda inkübe edilen tüplere 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj uygulanmıştır. Tüplerin üst kısmında kalan sıvıdan 100 µl alınarak yeni hazırlanan eppendorf tüplerine transfer edilmiştir (Şekil 3.3).

Agaroz jel elektroforez çalışmasıyla total RNA'ların varlığı kontrol edilmiştir.

Tüpler cDNA sentez ve RT-PCR uygulamaları yapılmaya kadar -20°C'de derin dondurucuda saklanmıştır.



**Şekil 3.3** TNA ekstraksiyon aşamalarından bazıları a)Yaprak örneğinin steril poşet içine koyulup ezilmesi, b)Tüplerin buzda bekletilmesi, c)Tüplerin blok ısıtıcıda inkübe edilmesi, d)Tüplerin kurutma kağıdına ters çevrilerek konulması.

### 3.2.4.2 Komplementer DNA (cDNA) sentezi

TNA ekstraksiyonu yapılan örneklerin cDNA sentezi yapılmıştır.

Thermo Scientific firmasından temin edilen cDNA sentez kitleri kullanılmış ve firmanın belirttiği prosedür doğrultusunda cDNA sentezleri gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle göre steril PCR tüplerinin içerisine sırayla 2 µl 10X RT Buffer, 3.2 µl Nuclease-free H<sub>2</sub>O, 0.8 µl 25X dNTP mix (100 mM), 2 µl 10X RT Random Primers, 1 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 1 µl RNase Inhibitor eklenerek 10 µl mix elde edilmiştir. İçerisinde mix bulunan tüpün içerisine 10 µl total RNA eklenerek hacim 20 µl'e tamamlanmıştır. Kısa bir pipetajın ardından tüpler Thermal Cycler cihazına koyulup firmanın cDNA prosedürüne uygun spesifik program uygulanmıştır. Program 25°C'de 10 dk., 37°C'de 120 dk., 85°C'de 5 dk. şeklinde uygulanarak cDNA sentez aşaması tamamlanmıştır. Sentezlenen cDNA'lar, RT-PCR'da kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.2.4.3 Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)**

RT-PCR aşamasında Applied Biosystems firmasının önerdiği prosedüre göre 50 µl hacimde yapılmıştır. Steril PCR tüplerine 25 µl DreamTaq Green PCR Master Mix, 0.5 µl 10 µmolar Forward primer, 0.5 µl 10 µmolar Reverse primer, 2 µl cDNA ve 22 µl nuclease free su eklenerek toplam hacim 50 µl'e tamamlanmıştır. Tüpler Thermal Cycler cihazına yerleştirilerek test edilecek virüs için spesifik olan program uygulanarak çoğaltma işlemi gerçekleştirilmiştir.

RT-PCR çalışmalarında CMV etmeninin RNA1 ve RNA2 segmentine ait bölgeleri ve TSWV etmeninin MRNA ve LRNA segmentine ait bölgeleri çoğaltmak için primer çiftleri dizayn edilmiş olup CMV etmeninin RNA3 bölgesini (De Blas et al., 1994) ve TSWV etmeninin SRNA bölgesini (Nour et al., 2013) çoğaltmak için etmenlere özgü primerlerden yararlanılmıştır (Çizelge 3.4).

**Çizelge 3.4** RT-PCR'da kullanılan primer çiftleri.

| <b>Primer</b>                            | <b>Primer Dizilimi</b>                         | <b>Baz Uzunluğu</b> | <b>Literatür</b>       |
|------------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------|------------------------|
| <b>CMV RNA1 -F</b><br><b>CMV RNA1 -R</b> | TCGTTTGACATGCGTTTCTC<br>TTTAGCCGTAAGCTGGAT GG  | 626 bp              | Dizayn edildi          |
| <b>CMV RNA2-F</b><br><b>CMV RNA2-R</b>   | CCCCTATTCCGACAATGA TG<br>GTCTTCTTCCGCTGGTAA CG | 584 bp              | Dizayn edildi          |
| <b>CMV RNA3-F</b><br><b>CMV RNA3-R</b>   | GTAGACATCTGTGACGCGA<br>GCGCGAAACAAGCTTCTTATC   | 540 bp              | (De Blas et al., 1994) |
| <b>TSWV SRNA-F</b><br><b>TSWV SRNA-R</b> | ATGTCTAAGGTTAAGCTCAC<br>TTAAGCAAGTTCTGC GAGTT  | 777 bp              | (Nour et al., 2013)    |
| <b>TSWV MRNA-F</b><br><b>TSWV MRNA-R</b> | TGCTCACCATCCAACATTTT<br>CGAGAAGAAGAATCAACCATCC | 584 bp              | Dizayn edildi          |
| <b>TSWV LRNA-F</b><br><b>TSWV LRNA-R</b> | TGTCAAAATCACTGCCGATG<br>TTCCCCAAAACCCTGCTACT   | 567 bp              | Dizayn edildi          |

### **3.2.4.4 Agaroz jel elektroforezi**

PCR sonrası oluşan DNA fragmentlerinin analizi için %1'lik agaroz jel kullanılmıştır. 100 ml 1X TAE tamponu içine 1.5 g agaroz konularak karışım mikrodalga fırında 3.5 dakika bekletilerek eriyik haline getirilmiştir. Taraklar elektroforez tabağına yerleştirildikten sonra jel dökülmüş soğumaya bırakılmıştır.

Jel donduktan sonra taraklar dikkatlice çekilmiş ve tabak elektroforez cihazının tankına yerleştirilerek 1X TAE tampon çözeltisi jeli 1-2 mm geçecek şekilde ilave edilmiştir. İlk hücreye bantların moleküler büyüklüğünü belirlemek amacıyla marker (100 bp DNA Ladder) 6 µl yüklenmiştir. PCR ürünleri ise 10 µl alınarak 2 µl yükleme tamponu (6X DNA Loading dye) ile karıştırılmış ve diğer hücrelere yüklenmiştir. Elektroforez koşumu, 100 V'da yatay düzenekte 60 dakika süreyle ve 1X TAE tampon çözeltisi içerisinde uygulanmıştır.

#### **3.2.4.5 Jel görüntüleme cihazında sonuçların değerlendirilmesi**

Elektroforez işlemi sonunda Ethidium bromide ile saf su çözeltisinde boyanan jel, fazla Ethidium bromidi uzaklaştırmak için saf su içerisinde bekletilmiştir. Yıkanan jelin ortaya çıkan bantları UV ışık altında gözlenmiş ve DNR Bio-Imaging marka Jel Dokümantasyon ve Analiz Sistemi ile fotoğrafı çekilerek kaydedilmiştir.

#### **3.2.4.6 Sekans homolojisinin belirlenmesi ve filogenetik analiz**

RT-PCR çalışmalarında beklenen büyüklükte çoğaltılan gen bölgelerinin dizi analizleri, hizmet alımı şeklinde Genmar Teşhis Ürünleri AR-GE Lab. Hiz. San. Ve Tic. Ltd. Şti.' ye yaptırılmıştır.

Dizileme sonuçlarının dizi analizi Chromos Pro Programı ve CLC RNA Workbench Version 6.8.2 (CLC bio, Denmark) programı kullanılarak yapılmıştır. Virüslerin farklı konukçulardaki ve farklı ülkelerdeki izolatlarının nükleotit dizilerine gen bankasından BLAST programı ile ulaşılmıştır. Elde edilen dizilerin dünya izolatlarıyla benzerlik ve farklılıklarını göstermek adına filogenetik ağaçları CLC RNA Workbench Version 6.8.2 (CLC bio, Denmark) ve Vector NTI Software Programı (Invitrogen, USA) kullanılarak çizilmiştir.

#### 4. BULGULAR

Araştırma kapsamında, 2015 yılında Antalya'nın Kumluca, Demre, Serik ve Aksu ilçelerinde biber yetiştiriciliği yapılan alanlardan toplam 148 adet örnek toplanmıştır. Alınan örneklerde *Cucumber mosaic virus* (CMV) ve *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)'nin varlığı serolojik, biyolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmiştir.

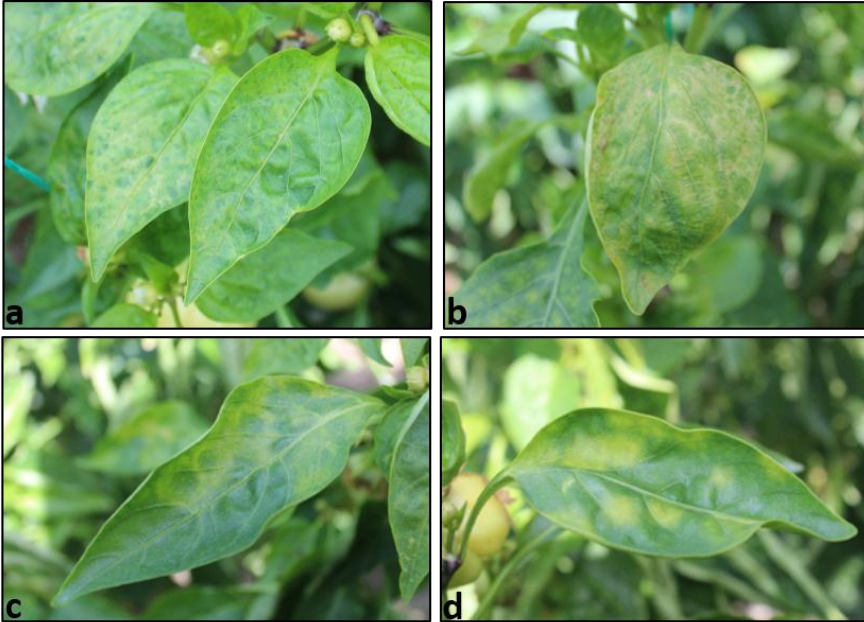
##### 4.1 Belirtiler

Survey çalışmaları sırasında, üretim alanlarındaki biber bitkileri makroskobik olarak incelenerek CMV ile TSWV'nin tipik belirtilerini gösteren ve virüs ile enfekteli olduklarından şüphelenilen bitkilerden örnekler alınmıştır.

Araştırma kapsamında alınan örneklerde arazide ve laboratuvarında yapılan görsel incelemeler sonucunda bitkilerde genel olarak cüceleşme ve sararma (Şekil 4.1a), yapraklarda şekil bozukluğu (Şekil 4.1b) ve tepe noktasında kıvrılma (Şekil 4.1c) olduğu tespit edilmiştir. Yapraklarda kloroz, klorotik ve/veya nekrotik lekeler (Şekil 4.2b), halka lekeler (Şekil 4.2c), mozaik ve/veya kabarcıklı mozaik (Şekil 4.2a), beneklenme (Şekil 4.2d), damarlar arasında renk açılması, küçülme ve kıvrılma gibi belirtilerin olduğu saptanmıştır. Meyvelerde küçülme, halka lekeler (Şekil 4.3a, b), çizgi şeklinde klorotik lekeler (Şekil 4.3c) ve şekil bozukluğu gözlenmiştir. Yapılan bu simptomatolojik incelemeler diğer tanılama yöntemleri için sadece bir ön basamak oluşturmuştur.



**Şekil 4.1** Kumluca ve Demre ilçelerinde yapılan incelemelerde bitkilerde gözlenen bazı belirtilere ait görünüm a)Sivri tipinde cüceleşme ve sararma, b)Macar tipinde yapraklarda şekil bozukluğu ve klorotik lekeler, c)Dolmalık tipinde tepe noktasında kıvrılma ve beneklenme.



**Şekil 4.2** Demre ilçesinde yapılan makroskobik incelemelerde yapraklarda gözlenen bazı belirtiler a)Macar tipinde mozaik, b)Dolmalık tipinde klorotik ve nekrotik lekeler, c)Dolmalık tipinde klorotik halka lekeler, d)Dolmalık tipinde beneklenme.



**Şekil 4.3** Kumluca ve Demre ilçelerinde yapılan makroskobik incelemelerde meyvelerde gözlenen bazı belirtilere ait görünüm a)Kapya tipinde halka lekeler, b)Kapya tipinde klorotik halka leke, c)Sivri tipinde çizgi şeklinde klorotik leke.

#### 4.2. Serolojik Testlerin Sonuçları

Çalışma kapsamında toplanan tüm biber örnekleri CMV ve TSWV etmenlerinin ticari tanı kitleri kullanılarak DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiştir.

Antalya’da gerçekleştirilen çalışmada Kumluca ilçesinden 62 örnek, Demre ilçesinden 42 örnek, Serik ilçesinden 26 örnek ve Aksu (Merkez) ilçesinden 18 örnek alınarak toplam 148 örneğin DAS-ELISA yöntemiyle testlenmesi sonucu elde edilen sonuçlar ilçe bazında Çizelge 4.1 ve 4.2’de verilmiştir.

**Çizelge 4.1** Toplanan örneklerde ilçelere göre CMV ile enfeksiyon oranı.

| İlçe                 | Testlenen toplam örnek sayısı | Enfekteli bulunan örnek sayısı | Sağlıklı bulunan örnek sayısı | Bulunma durumu (%) |
|----------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| <b>Kumluca</b>       | 62                            | 0                              | 62                            | 0                  |
| <b>Demre</b>         | 42                            | 8                              | 34                            | 19.04              |
| <b>Serik</b>         | 26                            | 3                              | 23                            | 11.53              |
| <b>Aksu (Merkez)</b> | 18                            | 0                              | 18                            | 0                  |
| <b>Toplam</b>        | <b>148</b>                    | <b>11</b>                      | <b>137</b>                    | <b>7.34</b>        |

Çizelge 4.1’de görüldüğü üzere Demre ilçesinden alınan 42 örneğin DAS-ELISA yöntemi ile testlenmesi sonucunda 8 örnekte CMV enfeksiyonu tespit edilmiş olup enfeksiyonun bulunma durumu %19.04 olarak belirlenmiştir. Serik ilçesinden alınan 26 örneğin testlenmesi sonucu 3 örnekte CMV enfeksiyonu tespit edilmiş olup enfeksiyonun bulunma durumu %11.53 olarak belirlenmiştir. Kumluca ve Aksu’dan alınan örneklerde CMV enfeksiyonu bulunmadığı tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.2** Toplanan örneklerde ilçelere göre TSWV ile enfeksiyon oranı.

| İlçe                 | Testlenen toplam örnek sayısı | Enfekteli bulunan örnek sayısı | Sağlıklı bulunan örnek sayısı | Bulunma durumu |
|----------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------|
| <b>Kumluca</b>       | 62                            | 12                             | 50                            | 19.35          |
| <b>Demre</b>         | 42                            | 10                             | 32                            | 23.80          |
| <b>Serik</b>         | 26                            | 14                             | 12                            | 53.84          |
| <b>Aksu (Merkez)</b> | 18                            | 17                             | 1                             | 94.44          |
| <b>Toplam</b>        | <b>148</b>                    | <b>53</b>                      | <b>105</b>                    | <b>35.81</b>   |

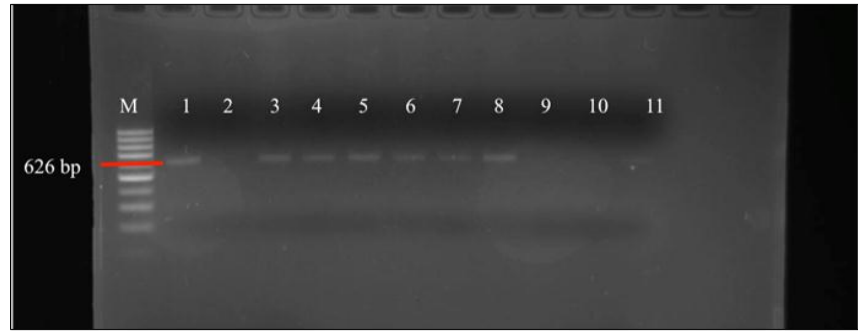
Çizelge 4.2’de görüldüğü üzere Kumluca ilçesinden alınan 62 örneğin DAS-ELISA yöntemi ile testlenmesi sonucunda 12 örnekte TSWV enfeksiyonu tespit edilmiş olup enfeksiyonun bulunma durumu %19.35 olarak belirlenmiştir. Demre ilçesinden alınan 42 örneğin testlenmesi sonucu 10 örnekte TSWV enfeksiyonu saptanmış olup enfeksiyonun bulunma durumu %23.80 olarak bulunmuştur. Serik ilçesinden alınan 26 örneğin testlenmesi sonucu 14 örnekte TSWV enfeksiyonu tespit edilmiş olup enfeksiyonun bulunma durumu %53.84 olarak belirlenmiştir. Aksu ilçesinden alınan 18 örneğin testlenmesi sonucu 17 örnekte TSWV enfeksiyonu saptanmış olup enfeksiyonun bulunma durumu %94.44 olarak bulunmuştur.

2015 yılında belirtilen ilçelerden alınan 148 örnekte DAS-ELISA yöntemi ile CMV enfeksiyonunun bulunma durumu %7.34, TSWV enfeksiyonunun bulunma durumu %35.81 olarak tespit edilmiştir. CMV ve TSWV’ye karşı pozitif sonuç vermeyen örnekler ayrıca TMV ve PVY etmenlerinin ticari tanı kitleri kullanılarak DAS-ELISA testi ile testlenmiş olup örneklerde TMV saptanmazken Kumluca’dan alınan 2 örnekte PVY enfeksiyonu saptanmıştır.

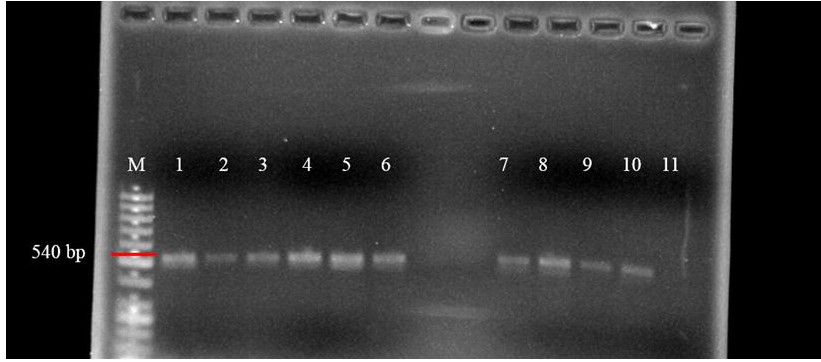
### 4.3 Moleküler Testlerin Sonuçları

DAS-ELISA testlerinde pozitif sonuç veren örneklerin genetik karakterlerinin ortaya konulması amacıyla RT-PCR çalışmalarında CMV için RNA1 ve RNA3 segmentlerini kodlayan genlerin farklı bölgeleri; TSWV için S RNA, M RNA ve L RNA segmentlerini kodlayan genlerin farklı bölgeleri spesifik primerler kullanılarak çoğaltılmıştır.

Yapılan RT-PCR çalışmaları sonucunda CMV etmeninin RNA 1 segmenti için 626 bp (Şekil 4.4) ve RNA 3 segmenti için 540 bp (Şekil 4.5) uzunluğunda bantlar elde edilmiştir. Dizayn edilen CMV RNA2-F ve CMV RNA2-R primer çiftinin sıcaklık döngüsü optimize edilemediği için CMV'nin RNA-2 segmentine ait bölge çoğaltılamamıştır.



**Şekil 4.4** CMV etmeninin için RNA1 segmenti için tasarlanmış primer çifti ile uygulanan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görüntülerinden bazıları 1-11: Örnekler (M: Marker).



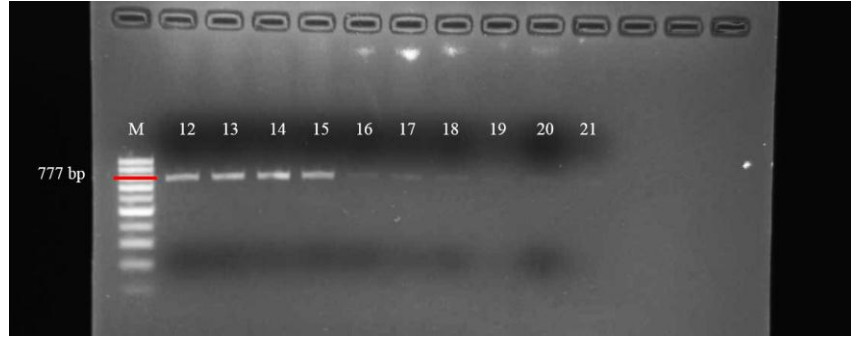
**Şekil 4.5** CMV etmeninin için RNA3 segmenti (De Blas et al., 1994) için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görüntülerinden bazıları 1-11: Örnekler (M: Marker).

CMV etmeninin farklı segmentlerine ait gen bölgelerini çoğaltmak için kullanılan primer çiftlerinin hastalığı saptama yönünden karşılaştırılması Çizelge 4.3'te verilmiştir.

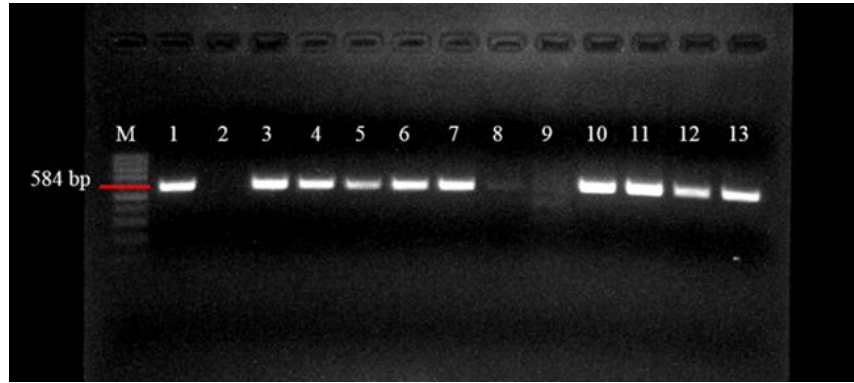
**Çizelge 4.3** CMV etmeninin farklı bölgelerini çoğaltan primer çiftlerinin hastalığı saptama yönünden karşılaştırılması.

| CMV etmeninin<br>çoğaltılan<br>bölgelerine<br>segmentler | Testlenen<br>örnek sayısı | Enfekteli<br>bulunan örnek<br>sayısı | Sağlıklı<br>bulunan örnek<br>sayısı | Bulunma<br>durumu |
|----------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|
| RNA1                                                     | 11                        | 7                                    | 4                                   | 63.63             |
| RNA3                                                     | 11                        | 10                                   | 1                                   | 90.90             |

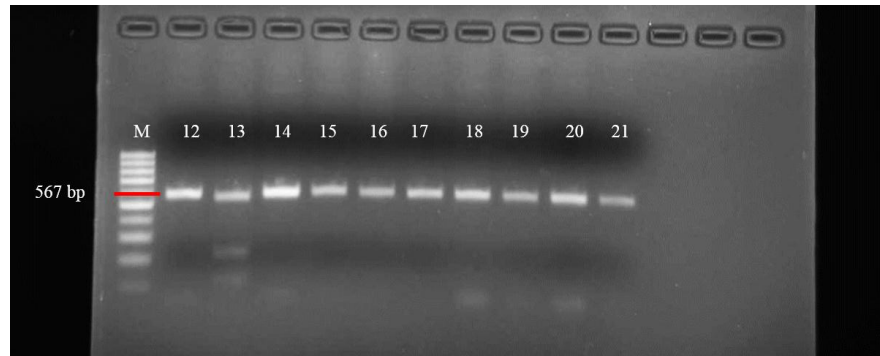
Yapılan RT-PCR çalışmaları sonucunda TSWV etmeninin S RNA segmenti için 777 bp (Şekil 4.6), M RNA segmenti için 584 bp (Şekil 4.7), L RNA bölgesi için 567 bp (Şekil 4.8) uzunluğunda bantlar elde edilmiştir.



**Şekil 4.6** TSWV etmeninin S RNA segmenti (Nour et al., 2013) için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görüntülerinden bazıları 12-21: Örnekler (M: Marker).



**Şekil 4.7** TSWV etmeninin M RNA segmenti için tasarlanmış primer çifti ile uygulanan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görüntülerinden bazıları 1-13: Örnekler (M: Marker).



**Şekil 4.8** TSWV etmeninin L RNA segmenti için tasarlanmış primer çifti ile uygulanan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görüntülerinden bazıları 12-21: Örnekler (M: Marker).

TSWV etmeninin farklı segmentlerine ait gen bölgelerini çoğaltmak için kullanılan primer çiftlerinin hastalığı saptama yönünden karşılaştırılması Çizelge 4.4'te verilmiştir.

**Çizelge 4.4** TSWV etmeninin farklı bölgelerini çoğaltan primer çiftlerinin hastalığı saptama yönünden karşılaştırılması.

| TSWV etmeninin<br>çoğaltılan<br>bölgelerine<br>ait<br>segmentler | Testlenen<br>örnek sayısı | Enfekteli<br>bulunan<br>örnek sayısı | Sağlıklı<br>bulunan örnek<br>sayısı | Bulunma<br>durumu |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|
| S RNA                                                            | 53                        | 29                                   | 24                                  | 54.71             |
| M RNA                                                            | 53                        | 39                                   | 14                                  | 73.58             |
| L RNA                                                            | 53                        | 20                                   | 33                                  | 37.73             |

#### 4.4 Dizi Analizi ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları

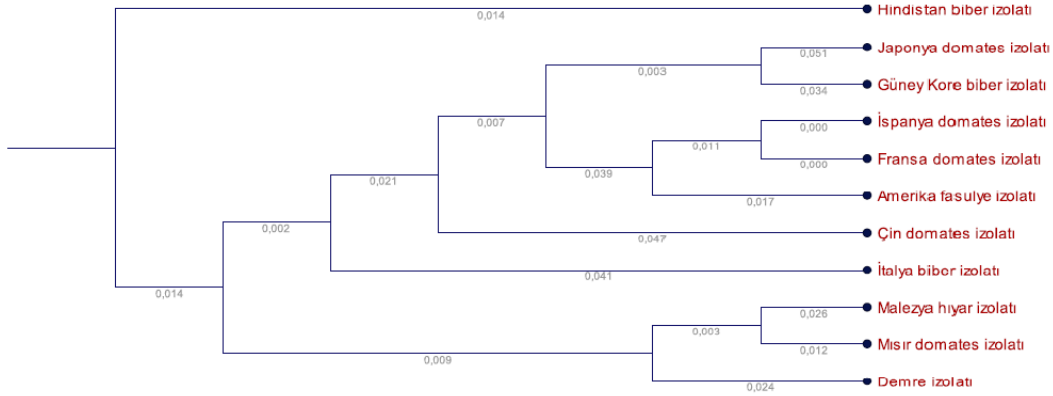
İzole edilen CMV ve TSWV etmenlerinin RT-PCR çalışmalarında çoğaltılan farklı bölgelerinin nükleotit dizilerinin tespiti hizmet alımı şeklinde Genmar Teşhis Ürünleri AR-GE Lab. Hiz. San. Ve Tic. Ltd. Şti.'ye yaptırılmıştır. Yürütülen çalışmada Antalya'dan izole edilen ve sekanslamaya gönderilen PCR ürünlerinden CMV etmeni Demre izolatu olarak isimlendirilirken, TSWV etmeni Aksu izolatu olarak adlandırılmıştır. Firmadan gelen nükleotit dizileri kullanılarak filogenetik analizler CLC RNA Workbench Version 6.8.2 (CLC bio, Denmark), NCBI BLAST ve Vector NTI Software Programı (Invitrogen, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

CMV izolatının RNA1 segmentine ait bölgenin çoğaltılmasıyla elde edilen dizi BLAST programı ile diğer ülkelere ait izolatlar ile karşılaştırılmıştır. CMV RNA1 bölgesinin karşılaştırıldığı dünya izolatları Çizelge 4.5'te verilmiştir.

**Çizelge 4.5** RNA1 segmentine ait bölgesi çoğaltılan CMV izolatının karşılaştırıldığı dünya izolatları.

| <b>Etmen ve gen bölgesi</b> | <b>Erişim numarası</b> | <b>İzolatın kaynağı</b> | <b>Konukçu</b> | <b>Literatür</b>                    |
|-----------------------------|------------------------|-------------------------|----------------|-------------------------------------|
| CMV etmeni RNA1 segmenti    | KT921314               | Mısır                   | Domates        | Fattouh et al., 2015                |
| CMV etmeni RNA1 segmenti    | JN054636               | Malezya                 | Hıyar          | Lee et al., 2011                    |
| CMV etmeni RNA1 segmenti    | KM272277               | Hindistan               | Biber          | Ashwathappa and Krishna Reddy, 2014 |
| CMV etmeni RNA1 segmenti    | HE962478               | İtalya                  | Biber          | Jacquemond, 2012                    |
| CMV etmeni RNA1 segmenti    | KC527794               | Güney Kore              | Biber          | Kim et al., 2014                    |
| CMV etmeni RNA1 segmenti    | EF216866               | Çin                     | Domates        | Liao et al., 2007                   |
| CMV etmeni RNA1 segmenti    | HF572914               | Amerika                 | Fasulye        | Thompson et al., 2015               |
| CMV etmeni RNA1 segmenti    | HE793683               | Fransa                  | Domates        | Morroni et al., 2013                |
| CMV etmeni RNA1 segmenti    | AM183117               | İspanya                 | Domates        | Aramburu et al., 2006               |
| CMV etmeni RNA1 segmenti    | AB368499               | Japonya                 | Domates        | Maoka et al., 2009                  |

CMV izolatının RNA1 segmentine ait bölgenin çoğaltılmasıyla elde edilen dizinin Çizelge 4.5'te verilen dünya izolatlarıyla filogenetik ağacı çizilmiş (Şekil 4.9) ve izolatın dünya izolatlarıyla benzerlik oranları incelenmiştir. Demre izolatının Mısır domates izolatıyla %96; Malezya hıyar izolatıyla %95; Hindistan biber izolatıyla %94; İtalya biber izolatıyla %92; Güney Kore biber, Çin domates ve Amerika fasulye izolatlarıyla %90; Fransa domates, İspanya domates ve Japonya domates izolatlarıyla %89 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Sözü edilen filogenetik ağaçtan izolatların birbirlerine olan yakınlık derecelerinin nasıl olduğunu anlamak mümkündür. İzolatların birbirleriyle bağlantısını sağlayan kollar üzerindeki rakamlar iki izolatın yakınlık derecesini ortaya koymaktadır.



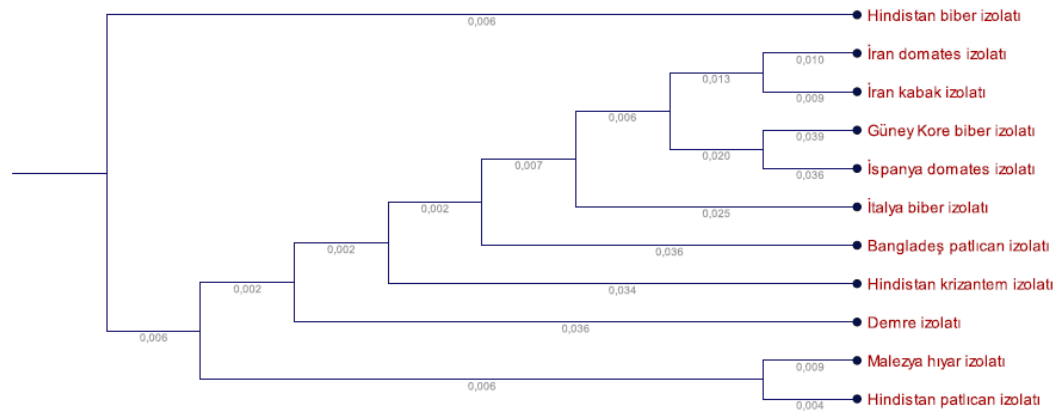
**Şekil 4.9** RNA1 segmenti çoğaltılan CMV Demre izolatının dünya izolatlarıyla genetik benzerliklerinin belirlenmesi için çizilen filogenetik ağaç.

CMV izolatının RNA3 segmentine ait bölgenin çoğaltılmasıyla elde edilen dizi BLAST programı ile diğer ülkelere ait izolatlar ile karşılaştırılmıştır. CMV RNA3 bölgesinin karşılaştırıldığı dünya izolatları Çizelge 4.6’te verilmiştir.

**Çizelge 4.6** RNA3 segmentine ait bölgesi çoğaltılan CMV izolatının karşılaştırıldığı dünya izolatları.

| Etmen ve gen bölgesi     | Erişim numarası | İzolatın kaynağı | Konukçu   | Literatür                           |
|--------------------------|-----------------|------------------|-----------|-------------------------------------|
| CMV etmeni RNA3 segmenti | JN054635        | Malezya          | Hıyar     | Lee et al., 2011                    |
| CMV etmeni RNA3 segmenti | GU906293        | Hindistan        | Patlıcan  | Raj et al., 2010                    |
| CMV etmeni RNA3 segmenti | KM272275        | Hindistan        | Biber     | Ashwathappa and Krishna Reddy, 2014 |
| CMV etmeni RNA3 segmenti | EF153733        | Hindistan        | Krizantem | Kumar et al., 2005                  |
| CMV etmeni RNA3 segmenti | HE962480        | İtalya           | Biber     | Jacquemond, 2012                    |
| CMV etmeni RNA3 segmenti | JX025989        | İran             | Kabak     | Nematollahi et al., 2012            |
| CMV etmeni RNA3 segmenti | JX025999        | İran             | Domates   | Nematollahi et al., 2012            |
| CMV etmeni RNA3 segmenti | KM516898        | Bangladeş        | Patlıcan  | Bagewadi et al., 2015               |
| CMV etmeni RNA3 segmenti | AM183116        | İspanya          | Domates   | Lopez et al., 2007                  |
| CMV etmeni RNA3 segmenti | KC527749        | Güney Kore       | Biber     | Kim et al., 2014                    |

CMV izolatının RNA3 segmentine ait bölgenin çoğaltılmasıyla elde edilen dizinin Çizelge 4.7’de verilen dünya izolatlarıyla filogenetik ağacı çizilmiş (Şekil 4.10) ve izolatın dünya izolatlarıyla benzerlik oranları incelenmiştir. Demre izolatının Malezya hıyar, Hindistan patlıcan ve Hindistan biber izolatlarıyla %95; Hindistan krizantem ve İtalya biber izolatlarıyla %94; İran kabak, İran domates ve Bangladeş patlıcan izolatlarıyla %92; İspanya domates ve Güney Kore biber izolatlarıyla %90 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.



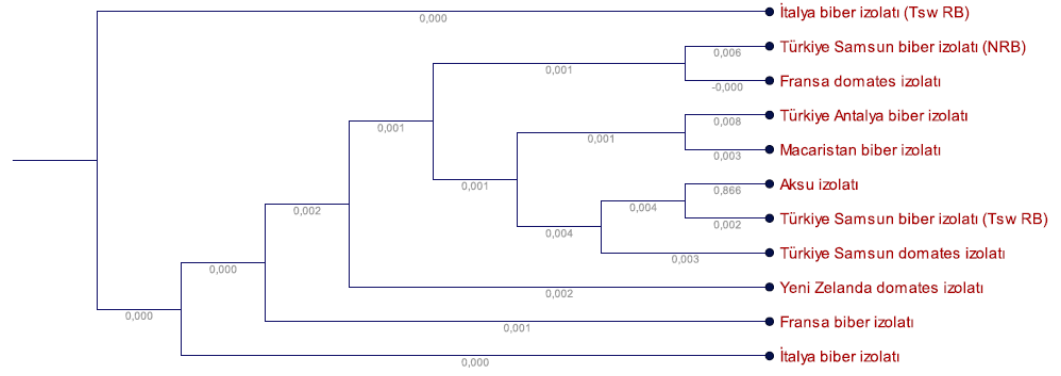
**Şekil 4.10** RNA3 segmenti çoğaltılan CMV Demre izolatının dünya izolatlarıyla genetik benzerliklerinin belirlenmesi için çizilen filogenetik ağaç.

TSWV izolatının S RNA segmentine ait bölgenin çoğaltılmasıyla elde edilen dizi BLAST programı ile diğer ülkelere ait izolatlar ile karşılaştırılmıştır. TSWV S RNA bölgesinin karşılaştırıldığı dünya izolatları Çizelge 4.7’te verilmiştir.

**Çizelge 4.7** S RNA segmentine ait bölgesi çoğaltılan TSWV izolatının karşılaştırıldığı dünya izolatları.

| Etmen ve gen bölgesi       | Erişim numarası | İzolatin kaynağı | Konukçu        | Literatür                      |
|----------------------------|-----------------|------------------|----------------|--------------------------------|
| TSWV etmeni S RNA segmenti | KT192623        | Türkiye, Samsun  | Domates        | Sin and Arli Sokmen, 2015      |
| TSWV etmeni S RNA segmenti | KM379141        | Türkiye, Samsun  | Biber (Tsw RB) | Deligoz et al., 2014a          |
| TSWV etmeni S RNA segmenti | KM407603        | Türkiye, Antalya | Biber          | Ozer et al., 2014              |
| TSWV etmeni S RNA segmenti | KC494501        | Yeni Zelanda     | Domates        | Timmerman-Vaughan et al., 2014 |
| TSWV etmeni S RNA segmenti | FR693058        | Fransa           | Domates        | Tentchev et al., 2011          |
| TSWV etmeni S RNA segmenti | FR693046        | Fransa           | Biber          | Tentchev et al., 2011          |
| TSWV etmeni S RNA segmenti | DQ431237        | İtalya           | Biber (Tsw RB) | Margaria et al., 2006          |
| TSWV etmeni S RNA segmenti | DQ431238        | İtalya           | Biber          | Margaria et al., 2006          |
| TSWV etmeni S RNA segmenti | KM379142        | Türkiye, Samsun  | Biber (NRB)    | Deligoz et al., 2014b          |
| TSWV etmeni S RNA segmenti | KJ649612        | Macaristan       | Biber          | Almasi et al., 2015            |

TSWV izolatının S RNA segmentine ait bölgenin çoğaltılmasıyla elde edilen dizinin Çizelge 4.7’de verilen dünya izolatlarıyla filogenetik ağacı çizilmiş (Şekil 4.11) ve izolatın dünya izolatlarıyla benzerlik oranları incelenmiştir. Aksu izolatının Samsun domates, Antalya biber, Yeni Zelanda domates, Fransa domates, Fransa biber ve İtalya biber izolatlarıyla %97 ve Macaristan biber izolatıyla %96 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen Antalya izolatının Samsun’da Tsw dayanıklılığını kırdığı tespit edilen biber izolatıyla (KM379141) ve İtalya’da Tsw dayanıklılığını kırdığı tespit edilen biber izolatıyla (DQ431237) %97 oranında ve Samsun’da dayanıklılığı kırmadığı tespit edilen biber izolatıyla (KM379142) %96 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır.



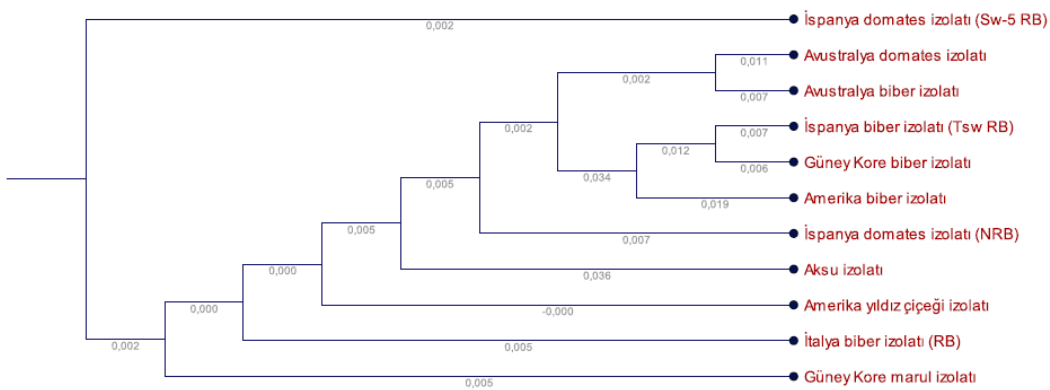
**Şekil 4.11** S RNA segmenti çoğaltılan TSWV Aksu izolatının dünya izolatlarıyla genetik benzerliklerinin belirlenmesi için çizilen filogenetik ağaç.

TSWV izolatının M RNA segmentine ait bölgenin çoğaltılmasıyla elde edilen dizi BLAST programı ile diğer ülkelere ait izolatlar ile karşılaştırılmıştır. TSWV M RNA bölgesinin karşılaştırıldığı dünya izolatları Çizelge 4.8’te verilmiştir.

**Çizelge 4.8** M RNA segmentine ait bölgesi çoğaltılan TSWV izolatının karşılaştırıldığı dünya izolatları.

| <b>Etmen ve gen bölgesi</b> | <b>Erişim numarası</b> | <b>İzolatın kaynağı</b> | <b>Konukçu</b>    | <b>Literatür</b>        |
|-----------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|
| TSWV etmeni M RNA segmenti  | AY744486               | Amerika                 | Yıldız çiçeği     | Tsompana et al., 2005   |
| TSWV etmeni M RNA segmenti  | HM015520               | İspanya                 | Domates (Sw-5 RB) | Lopez et al., 2011      |
| TSWV etmeni M RNA segmenti  | HM015512               | İspanya                 | Domates (NRB)     | Lopez et al., 2011      |
| TSWV etmeni M RNA segmenti  | KC261966               | Güney Kore              | Marul             | Lian et al., 2013       |
| TSWV etmeni M RNA segmenti  | HQ830185               | İtalya                  | Biber (RB)        | Margaria et al., 2014   |
| TSWV etmeni M RNA segmenti  | KT717692               | Avustralya              | Biber             | Moyle et al., 2015      |
| TSWV etmeni M RNA segmenti  | KM365065               | Avustralya              | Domates           | Wylie et al., 2015      |
| TSWV etmeni M RNA segmenti  | KP008133               | İspanya                 | Biber (Tsw RB)    | Debreczeni et al., 2015 |
| TSWV etmeni M RNA segmenti  | AY744489               | Amerika                 | Biber             | Tsompana et al., 2005   |
| TSWV etmeni M RNA segmenti  | KC261957               | Güney Kore              | Biber             | Lian et al., 2013       |

TSWV izolatının M RNA segmentine ait bölgenin çoğaltılmasıyla elde edilen dizinin Çizelge 4.8’de verilen dünya izolatlarıyla filogenetik ağacı çizilmiştir (Şekil 4.12) ve izolatın dünya izolatlarıyla benzerlik oranları incelenmiştir. Aksu izolatının Amerika yıldız çiçeği izolatıyla %97; Güney Kore marul ve Avustralya biber izolatlarıyla %96; Avustralya domates izolatıyla %95; Amerika biber ve Güney Kore biber izolatlarıyla %92 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Antalya izolatının İspanya’da Sw-5 dayanıklılığını kırdığı tespit edilen domates izolatıyla (HM015520) ve İspanya’da domateste Sw-5 ile biberde Tsw dayanıklılığını kırmadığı tespit edilen domates izolatıyla (HM015512) %96; İtalya’da dayanıklılığı kırdığı tespit edilen biber izolatıyla (HQ830185) %96 ve İspanya’da Tsw dayanıklılığını kırdığı tespit edilen biber izolatıyla (KP008133) %92 benzer olduğu tespit edilmiştir.



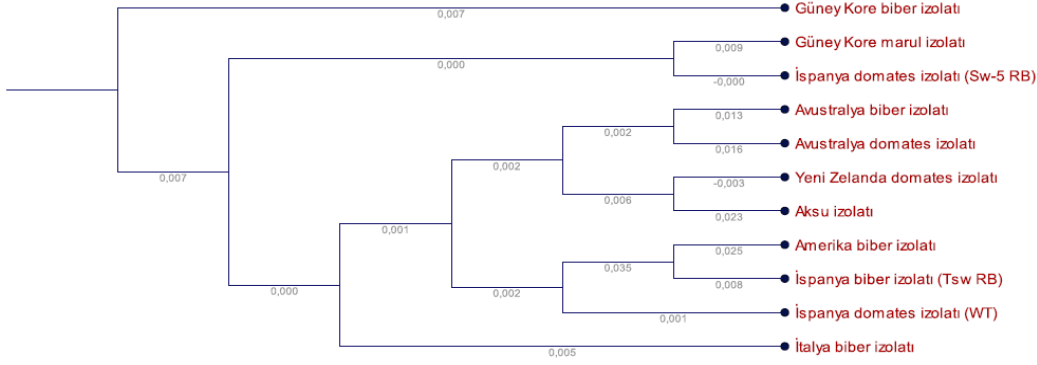
**Şekil 4.12** M RNA segmenti çoğaltılan TSWV Aksu izolatının dünya izolatlarıyla genetik benzerliklerinin belirlenmesi için çizilen filogenetik ağaç.

TSWV izolatının L RNA segmentine ait bölgenin çoğaltılmasıyla elde edilen dizi BLAST programı ile diğer ülkelere ait izolatlar ile karşılaştırılmıştır. TSWV L RNA bölgesinin karşılaştırıldığı dünya izolatları Çizelge 4.9’da verilmiştir.

**Çizelge 4.9** L RNA segmentine ait bölgesi çoğaltılan TSWV izolatının karşılaştırıldığı dünya izolatları.

| <b>Etmen ve gen bölgesi</b>   | <b>Erişim numarası</b> | <b>İzolatın kaynağı</b> | <b>Konukçu</b>       | <b>Literatür</b>                  |
|-------------------------------|------------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| TSWV etmeni<br>L RNA segmenti | KP008130               | İspanya                 | Domates<br>(Sw-5 RB) | Debreczeni et al., 2015           |
| TSWV etmeni<br>L RNA segmenti | KC494520               | Yeni<br>Zelanda         | Domates              | Timmerman-Vaughan<br>et al., 2014 |
| TSWV etmeni<br>L RNA segmenti | KJ575619               | İtalya                  | Biber                | Margaria et al., 2015             |
| TSWV etmeni<br>L RNA segmenti | KP008128               | İspanya                 | Domates<br>(WT)      | Debreczeni et al., 2015           |
| TSWV etmeni<br>L RNA segmenti | KC261965               | Güney<br>Kore           | Marul                | Lian et al., 2013                 |
| TSWV etmeni<br>L RNA segmenti | KT717691               | Avustralya              | Biber                | Moyle et al., 2015                |
| TSWV etmeni<br>L RNA segmenti | KM365064               | Avustralya              | Domates              | Wylie et al., 2015                |
| TSWV etmeni<br>L RNA segmenti | KC261956               | Güney<br>Kore           | Biber                | Lian et al., 2013                 |
| TSWV etmeni<br>L RNA segmenti | KP008132               | İspanya                 | Biber<br>(Tsw RB)    | Debreczeni et al., 2015           |
| TSWV etmeni<br>L RNA segmenti | KT160280               | Amerika                 | Biber                | Margaria and Rosa,<br>2015        |

TSWV izolatının L RNA segmentine ait bölgenin çoğaltılmasıyla elde edilen dizinin Çizelge 4.9’da verilen dünya izolatlarıyla filogenetik ağacı çizilmiş (Şekil 4.13) ve izolatın dünya izolatlarıyla benzerlik oranları incelenmiştir. Aksu izolatının Yeni Zelanda domates izolatlarıyla %98; İtalya biber ve Güney Kore marul izolatlarıyla %97; Avustralya biber, Avustralya domates ve Güney Kore biber izolatlarıyla %96 ve Amerika biber izolatıyla %92 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Antalya izolatının İspanya’da Sw-5 dayanıklılığını kırdığı tespit edilen domates izolatıyla (KP008130) %98 ve vahşi tip olduğu belirlenen domates izolatıyla (KP008128) %97 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır. İspanya’da Tsw dayanıklılığını kırdığı tespit edilen biber izolatıyla %94 (KP008132) benzer olduğu tespit edilmiştir.



**Şekil 4.13** L RNA segmenti çoğaltılan TSWV Aksu izolatının dünya izolatlarıyla genetik benzerliklerinin belirlenmesi için çizilen filogenetik ağaç.

#### 4.5 Biyolojik Testlerin Sonuçları

DAS-ELISA yöntemi ile testlendikten sonra CMV ve TSWV antiserumuna pozitif sonuç veren bitkilerin simptom gösteren genç yapraklarından alınan örnekler, virüslere duyarlı olduğu bilinen test bitkilerine uygun gelişme döneminde mekanik inokulasyon yöntemiyle uygulanmıştır.

Gerçekleştirilen mekanik inokulasyonlar sonucunda CMV izolatları hıyar bitkisinde belirtilere neden olmamıştır. TSWV izolatlarının biber bitkisinde klorotik, nekrotik lekelere ve TSWV etmeninin tipik belirtisi olan bronz lekeliliğe neden olduğu gözlenmiştir.



**Şekil 4.14** TSWV ile mekanik inokule edilmiş *Capsicum annuum* bitkilerinin yapraklarında gözlenen klorotik ve nekrotik lekeler a) Bitkinin genel görünümü, b) Yaprakta gözlenen belirtiler.



**Şekil 4.15** TSWV ile mekanik inokule edilmiş *Capsicum annuum* bitkilerinin yapraklarında gözlenen bronz lekeliç a) Bitkinin genel görünümü, b) Yaprakta gözlenen belirtiler.

İklim odasının yetersizliğinden dolayı *Nicotiana spp.* test bitkilerine ait çimlenen tohumlar etiole uğradıkları TSWV'nin tütün bitkilerine mekanik inokulasyonu gerçekleştirilememiştir.

## 5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Antalya ilinde son yıllarda virüslere dayanıklı biber çeşitlerinde virüs hastalıklarının görüldüğü yönünde bilgiler alınması üzerine araştırma kapsamında 2015 yılında Antalya ilinde biber yetiştiriciliği yapılan alanlardan alınan örneklerde CMV ve TSWV etmenlerinin simptomatolojik, biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler ile karakterizasyonu yapılmış ve etmenlerin bulunma durumları her ilçe için ayrı ayrı belirlenmiştir.

Araştırma için Kumluca, Demre, Serik ve Aksu ilçelerindeki biber üretim alanlarından toplam 148 örnek toplanmıştır. Demre ilçesinden alınan 42 örnekten 8 örnekte dolmalık, kapyra ve üçburun tiplerinde ve Serik'ten alınan 26 örnekten 3 örnekte sivri tipinde CMV enfeksiyonu saptanmıştır. Kumluca ve Aksu ilçelerinde ise enfeksiyona rastlanmamıştır. CMV etmeni biber bitkilerinde cücelik, mozaik, kabarcıklanma ve iplik yapraklılık, yapraklarda ve meyvelerde şekil bozukluğu ile halka lekelerine neden olmaktadır (Espín et al., 1994; Atencio et al., 1997; Zitkai et al., 2009; Promil, 2012). Alınan örneklerde dolmalık, kapyra ve üçburun tiplerinde yapraklarda mozaik ve şekil bozukluğuna rastlanırken sivri tipinde yapraklarda mozaik, kabarcıklanma, şekil bozukluğu ve cüceliğe rastlanmıştır.

Biber üretim alanlarında CMV enfeksiyonu birçok ülkede elektron mikroskopi, biyolojik indeksleme, DAS-ELISA, RT-PCR gibi yöntemler kullanılarak belirlenmiş olup enfeksiyon oranlarının yıllara göre değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir (Burgmans et al., 1986; Vozelj et al., 2003; Biswas et al., 2013). Ülkemizde yapılan çalışmalarda çoğunlukla DAS-ELISA yöntemi kullanılmakla beraber biyolojik indeksleme, RT-PCR ve RFLP gibi yöntemler kullanılarak farklı illerdeki enfeksiyon oranları belirlenmiştir (Daplan, 2003, Çağlar, 2006). Bu çalışmada DAS-ELISA yöntemi ile Antalya ili biber üretim alanlarında CMV'nin bulunma oranının %7.34 olduğu saptanmıştır.

Biber bitkisinden izole edilen CMV etmeni mekanik inokulasyon çalışmaları sonucunda *Cucumis sativus* bitkisinde beneklenme ve mozaik belirtilerine neden olmaktadır (Zitkai et al., 2009; Biswas et al.,

2013). Bu çalışmada CMV ile enfekteli bulunan örneklerin hıyar bitkisinin Belth Alpha çeşidine mekanik inokulasyonu sonucu bitkide belirti çıkışı gözlenmemiştir. Iqbal et al. (2011), biber bitkisinden izole edilen CMV izolatu ile yaptıkları çalışmada hıyar bitkisinde inokulasyondan sonra simptom gözlenmediğini belirtmiştir. Mekanik inokulasyon çalışmalarında sera koşulları bu durumu etkileyebilmektedir.

Çalışma kapsamında izole edilen Demre izolatu, izolatu farklı gen bölgelerinin nükleotit dizilerinin belirlenmesi, dünya izolatlarıyla karşılaştırılması ve filogenetik ağaç oluşturulması için etmenin farklı gen bölgelerine özgü primerler kullanılarak RT-PCR ile çoğaltılmıştır. Elde edilen nükleotit dizimleri NCBI BLAST kullanılarak dünya izolatlarıyla kıyaslanmıştır. Bunun sonucunda izolatu RNA1 segmentine ait bölgenin çoğaltılmasıyla elde edilen dizinin dünya izolatlarıyla benzerliği %89-96 arasında değişmiştir. %96'lık benzeme oranıyla gen dizilimi Demre izolatu en yakın izolat olan KT921314 kodu ile kayıtlı “*Cucumber mosaic virus isolate HM3 segment RNA1, complete sequence*” izolatu JN054636 kodu ile kayıtlı “*Cucumber mosaic virus strain CLW2 putative RNA helicase and methyltransferase gene, complete cds*” izolatu ile aynı grupta yer almaktadır. İzolatu RNA3 segmentine ait bölgenin çoğaltılmasıyla elde edilen dizinin dünya izolatlarıyla benzerliği %90-95 arasında değişmiştir. %95'lik benzeme oranıyla Demre izolatu en yakın olan izolatlar arasında bulunan JN054635 kodu ile kayıtlı “*Cucumber mosaic virus strain CLW2 movement protein and coat protein genes, complete cds*” ve GU906293 kodu ile kayıtlı “*Cucumber mosaic virus clone KKG-K segment RNA3, complete sequence*” izolatları aynı grupta yer almaktadır. %95'lik benzeme oranıyla Demre izolatu yakın diğer bir izolat olan KM272275 kodu ile kayıtlı “*Cucumber mosaic virus strain KO segment RNA3, complete sequence*” izolatu ise ayrı bir grup oluşturmaktadır.

Kumluca ilçesinden alınan 62 örnekte 12 örnekte sivri, çarliston, şili ve jalapone tiplerinde TSWV enfeksiyonu bulunmuştur. Demre ilçesinden alınan 42 örnekte 10 örnekte kapyra ve Macar tiplerinde ve Serik'ten alınan 26 örnekte 14 örnekte dolmalık, sivri ve kıl biber tiplerinde saptanan etmen Aksu ilçesinden

alınan 18 örnekten 17 örnekte ıslah materyali olarak kullanılan tiplerde saptanmıştır.

Biber bitkilerinde kloroza, cüceliğe ve gövdede nekroza neden olan TSWV yapraklarda mozaik, klorotik lekeler, nekrotik lekeler, damar bantlaşması, rugoz ve şekil bozukluğu oluşturmaktadır (Antignus et al., 1997, Gera et al., 2008; Mun et al., 2008). Meyvelerde klorotik ve/veya nekrotik halka lekeler, nekrotik çizgilere ve şekil bozukluğuna neden olmaktadır (Momol, 2000; Turina et al., 2012). Alınan örneklerde çarliston tipindeki biber tiplerinde kloroz, tepe noktasında kıvrılma, yapraklarda klorotik ve nekrotik lekeler ile meyvelerde şekil bozukluğu görülmüştür. Kapyra tipindekilerde yapraklarda kloroz, halka leke ve mozaik belirtilerine rastlanırken meyvede nekrotik lekeler ve klorotik halka lekeler görülmüştür. Macar tipinde ise tepe noktasında kıvrılma, kloroz, beneklenme, mozaik, klorotik ve/veya nekrotik lekeler, kabarcıklaşma, şekil bozukluğu ve cücelik belirtileri tespit edilmiştir. Islah materyalinde kloroz, klorotik ve nekrotik lekeler, yapraklarda halka lekeler, şekil bozukluğu ve kıvrılma görülürken meyvelerde halka lekeler neden olmuştur. Sivri tipinde cücelik, kloroz, yapraklarda küçülme, kıvrılma, klorotik ve nekrotik lekeler, kabarcıklaşma, beneklenme ve meyvelerde şekil bozukluğuna neden olmuştur. Şili tipinde klorotik ve nekrotik lekeler, beneklenme, yaprakta ve meyvede şekil bozukluğuna neden olurken jalapone tipinde klorotik ve nekrotik halka lekeler neden olduğu görülmüştür. Dolmalık tipte kloroz, klorotik ve nekrotik lekeler gözlenirken kıl biber tipinde klorotik ve nekrotik lekeler, yapraklarda şekil bozukluğu ve kabarcıklaşmaya yol açmıştır.

TSWV etmeni dünyadaki biber üretim alanlarında %100'e ulaşan oranlarda enfeksiyona neden olabilmektedir (Latham and Jones, 1997; Ferrand et al., 2015). Enfeksiyonlar ülkemizde ve dünyada genellikle elektron mikroskopi, ELISA ve RT-PCR yöntemleri kullanılarak tespit edilmiştir (Antignus et al., 1997; Mavric and Ravnikar, 2001; Daplan, 2003; Küçük, 2006). Yardımcı ve Kılıç (2009) tarafından Batı Akdeniz bölgesinde %67.16 oranında tespit edilen TSWV enfeksiyonu Bozdoğan (2009) tarafından Antalya ili Merkez, Serik ve Kumluca ilçelerinde ELISA, mekanik inokulasyon ve RT-PCR yöntemleri kullanarak

%91.6 oranında saptanmıştır. Bu çalışmada TSWV'nin bulunma oranı DAS-ELISA yöntemi ile %35.81 oranında saptanmıştır.

TSWV etmeni mekanik inokulasyon çalışmaları sonucunda biber bitkilerinde cücelik, kloroz, mozaik, klorotik ve nekrotik lekeler, halka lekeler ve yapraklarda şekil bozukluğu şeklinde belirtilere neden olmaktadır (Gracia et al., 1999; Küçük, 2006; Bozdoğan, 2009). Bu çalışmada TSWV ile enfekteli bulunan örneklerin biber bitkilerine gerçekleştirilen mekanik inokulasyonu sonucunda yapraklarda klorotik, nekrotik lekeler ve bronz lekeli belirti belirlenmiştir.

Çalışma kapsamında izole edilen Aksu izolatu, izolatu farklı gen bölgelerinin nükleotit dizilerinin belirlenmesi, dünya izolatlarıyla karşılaştırılması, biberde Tsw dayanıklılığını kıran izolatlarla benzerliği olup olmadığının tespit edilmesi ve filogenetik ağaç oluşturulması için etmenin farklı gen bölgelerine özgü primerler kullanılarak RT-PCR ile çoğaltılmıştır. Elde edilen nükleotit dizilimleri NCBI BLAST kullanılarak dünya izolatlarıyla kıyaslanmıştır. Bunun sonucunda izolatu S RNA segmentine ait bölgenin çoğaltılmasıyla elde edilen dizinin dünya izolatlarıyla benzerliği %96 ve %97 olarak bulunmuştur. %97'lik benzeme oranıyla Aksu izolatu en yakın izolatlardan KT192623 kodu ile kayıtlı “*Tomato spotted wilt virus isolate SB-L19 nucleocapsid protein (N) gene, complete cds*” izolatu ve KM379141 kodu ile kayıtlı “*Tomato spotted wilt virus strain SC3-RB nucleocapsid protein (N) gene, complete cds*” izolatu aynı grupta yer almaktadır. %97'lik benzeme oranına sahip diğer izolatlar ise kendi aralarında farklı gruplar oluşturmaktadır. Aksu izolatu, biberde Tsw dayanıklılığını kırdığı tespit edilen KM379141 kodlu Samsun izolatu ve biberde Tsw dayanıklılığını kırdığı tespit edilen DQ431237 kodlu “*Tomato spotted wilt virus isolate p170 NSs and nucleocapsid genes, complete cds*” İtalya izolatu ile %97 oranında benzerlik göstermektedir. İzolatu M RNA segmentine ait bölgenin çoğaltılmasıyla elde edilen dizinin dünya izolatlarıyla benzerliği %92-97 arasında değişmektedir. %97'lik benzerlik benzeme oranıyla gen dizilimi en yakın olan izolat AY744486 kodu ile kayıtlı “*Tomato spotted wilt virus isolate NC-3 segment M, complete sequence*” izolatu olup kendi başına grup oluşturmaktadır. Aksu izolatu biberde Tsw dayanıklılığını kırdığı tespit edilen KP008133 kodlu “*Tomato spotted wilt virus isolate PVR segment M, complete sequence*” İspanya

izolatıyla %92 oranında benzerlik göstermektedir. İzolatın L RNA segmentine ait bölgenin çoğaltılmasıyla elde edilen dizinin dünya izolatlarıyla benzerliği %92-98 arasında değişmektedir. %98 oranında benzeyen KC494520 kodu ile kayıtlı “*Tomato spotted wilt virus isolate PFR13 RNA-dependent RNA polymerase (L) gene, partial cds*” izolatu Aksu izolatu ile grup oluşturunken KP008130 kodu ile kayıtlı “*Tomato spotted wilt virus isolate Pujol1TL3 segment L, complete sequence*” izolatu başka bir grup oluşturmaktadır. Aksu izolatu, biberde Tsw dayanıklılığını kırdığı tespit edilen KP008132 koduyla kayıtlı “*Tomato spotted wilt virus isolate PVR segment L, complete sequence*” İspanya izolatu ile %94 oranında benzerlik göstermektedir.

2015 yılında yürütölen bu çalışmanın tamamlanması ile Antalya ili biber üretim alanlarında enfeksiyon oluşturan CMV ve TSWV etmenlerinin bulunma durumları saptanmış olup serolojik, biyolojik ve moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Testlenen örneklerde çoğunlukla TSWV etmeninin enfeksiyona yol açtığı ve CMV etmeninin sanıldığı kadar yaygın olmadığı görölmüştür.

Araştırmadan elde edilen bulgular doğrultusunda aşağıdaki önerilerin yapılması uygun görölmüştür:

- Saptanan viral etmenlerin yayılmasında etkili olan vektör böcekler arasında bulunan yaprakbiti ve tripsler ile mücadele enfeksiyonların önlenmesinde önemli bir faktördür. CMV enfeksiyonunun düşük oranda tespit edilmesini etkileyen faktörler arasında üretim alanlarında yaprakbitine karşı gerçekleştirilen etkili ilaçlama programı önem taşımaktadır. TSWV enfeksiyonun yüksek oranda bulunmasının farklı nedenleri olabileceği gibi önemli sebeplerden biri tripse karşı mücadeleye tripsin zararı ortaya çıktıktan sonra başlanmasıdır. Üretim alanlarında tripslerin zararına karşı ayrıca biyolojik mücadele ajanlarının kullanıldığı gözlenmiştir. Bu durum hastalığın yayılmasını olumsuz yönde etkilemektedir çünkü biyolojik ajanın zararlıyı baskılaması için öncelikle zararlının belirli bir popölasyona ulaşması gerekmektedir. Tripsin popölasyonu

baskılanıncaya kadar bitkilerle beslenmesi sonucu etmen plantasyonda yayılmaktadır.

- Arazi çalışmasında bitkilerde gözlenen belirtiler dikkate alındığında hem CMV hem TSWV'nin bitkilerde genellikle cücelik, yapraklarda mozaik, kabarcıklı mozaik, yaprak ve meyvelerde şekil bozukluğu belirtilerine neden olduğu görülmüştür. TSWV ile enfekteli olan bitkilerde kloroz ve tepe noktasında kıvrılma belirtisinin yoğun olduğu ve yapraklarda beneklenme, klorotik ve nekrotik halka lekeler görüldüğü tespit edilmiştir. TSWV ile enfekteli bulunan bitkilerin meyvelerinde halka lekeler rastlanmıştır. Virüs benzeri belirti gözlenen bazı bitkilerde bahsedilen etmenler saptanamamış olup bu belirtilerin diğer bitki patojenleri veya abiyotik etkenler tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir.
- Yapılan bu çalışma ile DAS-ELISA ve RT-PCR testlerinin tanılamada güvenilir yöntemler olduğu ancak moleküler çalışmalarda kullanılan primer çiftlerinin her durumda %99'a yakın etkinlik göstermediği belirlenmiştir. Biyolojik indeksleme çalışmalarının bazı koşullarda beklenen sonuçları vermediği gözlenmiştir.
- Virüs hastalıklarına karşı savaşım yöntemlerinin kısıtlı olmasından dolayı kullanılan ticari biber çeşilerinin etmenlere karşı dayanıklılığını koruması veya dayanıklı yeni çeşitlerin geliştirilmesi yönünden dayanıklılık çalışmaları önemini korumaya devam etmektedir. Çalışmada CMV ve TSWV etmenlerinin gen dizimleri belirlenmiş ve bu diziler dünya izolatlarıyla karşılaştırılarak benzerlik oranları belirlenmiştir. Tsw dayanıklılığına sahip olduğu bilinen bazı biber çeşitlerinde TSWV enfeksiyonu saptanmıştır. Elde edilen TSWV izolatının farklı segmentlerine ait gen bölgelerinin dizilimlerinin belirlenerek biberde Tsw dayanıklılığını kıran dünya izolatları ve Samsun izolatı ile benzerlik göstermesi Aksu izolatının da Tsw dayanıklılığı kıran izolat olması yönündeki durumu destekler

niteliktedir. İzolatın Tsw dayanıklılığını kırdığının belirlenebilmesi için izolat ile dayanıklı ve dayanıksız biber çeşitlerinde çeşit reaksiyon denemesine gidilerek izolatın dayanıklı biber çeşitlerinde sistemik enfeksiyon yapıp yapmadığının belirlenmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adkins, S.**, 2000, *Tomato spotted wilt virus*-positive steps towards negative success, *Molecular Plant Pathology*, 1(3):151-157 pp.
- Afouda, L.A.C., Kotchofa, R., Sare, R., Zinsou, V. and Winter, S.**, 2013, Occurrence and distribution of viruses infecting tomato and pepper in Alibori in northern Benin, *Phytoparasitica*, 41(3):271-276 pp.
- Akanda, A.M., Tsuno, K., Maeda, T. and Wakimoto, S.**, 1991, *Cucumber mosaic virus* in Bangladesh, *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 35(3-4):151-159 pp.
- Ali, A., Li, H., Schneider, W.L., Sherman, D.J., Gray, S., Smith, D. and Roossinck, M.J.**, 2006, Analysis of genetic bottlenecks during horizontal transmission of *Cucumber mosaic virus*, *Journal of Virology*, 80(17):8345-8350 pp.
- Ali, A. and Kobayashi, M.**, 2010, Seed transmission of *Cucumber mosaic virus* in pepper, *Journal of Virological Methods*, 163:234-237 pp.
- Almasi, A., Csillery, G., Csomor, Z., Nemes, K., Palkovics, L., Salanki, K. and Tobias, I.**, 2015, Phylogenetic analysis of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) NSs protein demonstrates the isolated emergence of resistance-breaking strains in pepper, *Virus Genes*, 50(1):71-78 pp.
- Alonso-Prados, J.L., Aranda, M.A., Malpica, J.M., García-Arenal, F. and Fraile, A.**, 1998, Satellite RNA of *Cucumber mosaic cucumovirus* spreads epidemically in natural populations of its helper virus, *Phytopathology*, 88:520-524 pp.
- Amin, P.W., Reddy, D.V.R. and de Ghanekar, A.M.**, 1981, Transmission of *Tomato spotted wilt virus*, causal agent of bud necrosis of peanut, by *Scirtothrips dorsalis* and *Frankliniella schultzei*, *Plant Disease*, 65:663-665 pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Antignus, Y., Lapidot, M., Gnaim, N., Cohen, J., Lachman, O., Pearlsman, M., Raccach, B. and Gera, A.,** 1997, Biological and molecular characterization of *Tomato spotted wilt virus* in Israil, *Phytoparasitica*, 25(4):319-330 pp.
- Aramburu, J., Galipienso, L. and Lopez, C.,** 2006, Return of a *Cucumber mosaic virus* isolate belonging to subgroup IB in the northeastern Spain and comparative fitness with isolates of other groups, Universidad Politecnica de Valencia (unpublished).
- Arlı, M.,** 1992, Samsun ilinde yetiştirilen biberlerde (*Capsicum annum L.*) zararlı virüslerin biyolojik ve serolojik yöntemlerle saptanması, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 48s.
- Arli-Sokmen, M.A., Mennan, H., Sevik, M.A. and Ecevit, O.,** 2005, Occurrence of viruses in field-grown pepper crops and some of their reservoir weed hosts in Samsun, Turkey, *Phytoparasitica*, 33(4):347-358pp.
- Arogundade, O., Balogun, O.S. and Kareem, K.T.,** 2012, Occurrence and distribution of *Pepper veinal mottle virus* and *Cucumber mosaic virus* in pepper in Ibadan, Nigeria, *Virology Journal*, 9:79 p.
- Ashwathappa, K.V. and Krishna Reddy, M.,** 2014, Molecular characterization of *Cucumber mosaic virus* isolated from *Capsicum annum L.*, Indian Institute of Horticultural Research (unpublished).
- Atencio, F.A., Gracia, O., Mendoza, E.E.A., Zandomeni, R. and Grau, O.,** 1997, Detection of both subgroups I and II of *Cucumber mosaic cucumovirus* and their satellite RNAs on pepper in Argentina, *Plant Disease*, 81(6):695 p.
- Bagewadi, B., Hossain, S., Fayad, A. and Naidu, R. A.,** 2015, First Report of *Cucumber mosaic virus* from eggplant (*Solanum melongena*) in Bangladesh, *Plant Disease*, 99(2):293 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Biswas K., Hallan V., Zaidi A.A. and Pandey, P.K.,** 2013, Molecular evidence of *Cucumber mosaic virus* subgroup II infecting *Capsicum annuum* L. in the Western region of India, *Current Discovery*, 2(2):97-105 pp.
- Black, L.L., Hobbs, H.A. and Gatti, J.M.,** 1991, *Tomato spotted wilt virus* resistance in *Capsicum chinense* PI 152225 and 159236, *Plant Disease*, 75:863 p.
- Bonnet, J., Fraile, A., Sacristán, S., Malpica, J.M. and García-Arenal, F.,** 2005, Role of recombination in the evolution of natural populations of *Cucumber mosaic virus*, a tripartite RNA plant virus, *Virology*, 332:359-368 pp.
- Bos, L. and Maat, D.Z.,** 1974, A strain of *Cucumber mosaic virus*, seed-transmitted in beans, *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 80(4):113-123 pp.
- Bozdoğan, V.,** 2009, Antalya ilinde domates, biber ve marul yetiştirilen alanlarda Domates lekeli solgunluk virüsü (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)' nün saptanması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, 75s.
- Bruckart, W.L. and Lorbeer, J.W.,** 1976, *Cucumber mosaic virus* in weed hosts near commercial fields of lettuce and celery, *Phytopathology*, 66(3):253-259 pp.
- Burgmans, J.L., Fry, P.R. and Sunde, R. G.,** 1986, Peppers: survey of virus diseases of *Capsicum annuum* in Hawke's Bay and Poverty Bay, *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 14:459-463 pp.
- Buzkan, N., Demir, M., Öztekin, V., Mart, C., Çağlar, B.K. and Yilmaz, M.A.,** 2006, Evaluation of the status of capsicum viruses in the main growing regions of Turkey, *EPPO Bulletin*, 36:15-19 pp.
- Castro, M., Alonso, X. and Garcia, E.,** 1992, Detection and characterization of *Cucumber mosaic virus* (CMV) from pepper plants (*Capsicum annuum*) in Cuba, *Proteccion de Plantas*, 2(1):7-14 pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chandrasrikul, A. and Patrakosol, P.,** 1986, Virus diseases of horticultural crops in Thailand, *Plant virus diseases of horticultural crops in the tropics and subtropics*, 1986:7-11 pp.
- Chapman, E.J., Hilson, P. and German, T.L.,** 2003, Association of L Protein and in vitro *Tomato spotted wilt virus* RNA-dependent RNA polymerase activity, *Intervirology*, 46:177-181 pp.
- Chen, B. and Francki, R.I.B.,** 1990, *Cucumovirus* transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein, *Journal of General Virology*, 71:939-944 pp.
- Cho, J.J., Mau, R.F.L., Gonsalves, D. and Mitchell, W.C.,** 1986, Reservoir weed hosts of *Tomato spotted wilt virus*, *Plant Disease*, 70:1014-1017 pp.
- Clark, M.F. and Adams, A.N.,** 1977, Characteristic of microplate method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34:475-483 pp.
- Çağlar, B.K.,** 2006, Hıyar mozaik virüsü (CMV)'nün kavun (CMV-K), domates (CMV-D), biber (CMV-B) izolatlarının biyolojik, serolojik, moleküler yöntemlerle karakterizasyonu ve satellit-rna'lerin virüs üzerindeki etkisi, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, 89s.
- Daplan, N.,** 2003, Hatay ili biber alanlarındaki viral hastalık etmenleri ile oranlarının saptanması ve farklı biber tiplerinin virüslere karşı tepkilerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, 48s.
- De Blas C., Borza M.J., Saiz M. and Romero, J.,** 1994, Broad spectrum detection of *Cucumber mosaic virus* (CMV) using the polymerase chain reaction, *Journal of Phytopathology*, 141:323-329 pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Debreczeni, D.E., López, C., Aramburu, J., Darós, J.A., Soler, S., Galipienso, L., Falk R.B. and Rubio, L.,** 2015, Complete sequence of three different biotypes of *Tomato spotted wilt virus* (wild type, tomato Sw-5 resistance-breaking and pepper Tsw resistance-breaking) from Spain, *Archives of Virology*, 160(8):2117-2123 pp.
- Delgado Sanchez, S.,** 1974, Viruses attacking capsicum crops in Mexico; their implications, identification, transmission and control measures, *Agricultura Tecnica en Mexico*, 3(9):317-325 pp.
- Deligoz, I., Sokmen, M.A. and Sari, S.,** 2014a, First report of resistance breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* (*Tospovirus; Bunyaviridae*) on resistant sweet pepper cultivars in Turkey, *New Disease Reports*, 30:26 p.
- Deligoz, I., Arli Sokmen, M. and Sari, S.,** 2014b, Molecular characterization of Tsw-resistance breaking and non-resistance breaking field isolates of *Tomato spotted wilt virus* from pepper in Turkey, Faculty of Agriculture Ondokuz Mayıs University (unpublished).
- de Ronde, D., Butterbach, P., Lohuis, D., Hedil, M., van Lent, J.W. and Kormelink, R.,** 2013, Tsw gene-based resistance is triggered by a functional RNA silencing suppressor protein of the *Tomato spotted wilt virus*, *Molecular Plant Pathology*, 14:405-415 pp.
- Descriptions of Plant Viruses,** 2014, “DPV Name Index”, <http://www.dpvweb.net/dpv/dpvnameidx.php> (Erişim Tarihi: 05 Kasım 2014)
- Ding, S.W., Anderson, B.J., Haase, H.R. and Symons, R.H.,** 1994, New overlapping gene encoded by the *Cucumber mosaic virus* genome, *Virology*, 198(2):593-601 pp.
- Ding, B., Li, Q., Nguyen, L., Palukaitis, P. and Lucas, W.J.,** 1995, *Cucumber mosaic virus* 3a protein potentiates cell-to-cell trafficking of CMV RNA in tobacco plants, *Virology*, 207(2):345-353 pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Doolittle, S.P.**, 1920, The mosaic disease of cucurbits, *United States Department of Agriculture Bulletin*, 879:69 p.
- Espín, A., Alcázar, M.D., Egea, C. and Candela, M.E.**, 1994, Defensive response of two *Capsicum annuum* cultivars of different sensitivity to an isolate of *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Fitopatología*, 29(3):178-187 pp.
- FAO**, 2014, Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E> (Erişim Tarihi: 26.Ocak 2016)
- Fattouh, F.A., Ratti, C. and Rabie, M.I.**, 2015, Assessment of viral load and biodiversity in *Lycopersicon esculantum*, Microbiology-Faculty of Science, Alexandria University (unpublished).
- Ferrand, L., García, M.L., Resende, R.O., Balatti, P.A. and Dal Bó, E.**, 2015, First report of a resistance-breaking isolate of *Tomato spotted wilt virus* infecting sweet pepper harboring the Tsw gene in Argentina, *Plant Disease*, 99:12 p.
- Foissac, X., Svanella-Dumas, L., Dulucq, M.J., Candresse, T. and Gentit, P.**, 2001, Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR), *Acta Horti*, 550:37-43 pp.
- Gabor, B., Krizbai, L., Horvath, J. and Takacs, A.**, 2012, Resistance breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) on resistant pepper cultivars in Hungary, Proceedings of the International Symposium on Current Trends in Plant Protection, Belgrade, Serbia, 239-241 pp.
- Gal-On, A., Canto, T. and Palukaitis, P.**, 2000, Characterisation of genetically modified *Cucumber mosaic virus* expressing histidine-tagged 1a and 2a proteins, *Archives of Virology*, 145(1):37-50 pp.
- Gera, A., Kritzman, A., Cohen, J., Raccah, B. and Antignus, Y.**, 2008, *Tospoviruses* infecting vegetable crops in Israel, *Eppo Bulletin*, 30(2):289-292 pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gitaitis, R.D., Dowler, C.C. and Chalfant, R.B.**, 1998, Epidemiology of *Tomato spotted wilt virus* in pepper and tomato in Southern Georgia, *Plant Disease*, 82:752-756 pp.
- Gracia, O., de Borbon, C. M., Granvel de Millan, N. and Cuesta, G. V.**, 1999, Occurrence of different *Tospovirus* in vegetable crops in Argentina, *Journal of Phytopathology*, 147:223-227 pp.
- Green, S.K. and Kim, J.S.**, 1991, Characteristics and control of viruses infecting peppers, a literature review, Asian Vegetable Research and Development Centre, Technical Bulletin, Taipei, 60 p.
- Gümüş, M.**, 1998, İzmir ilinde biberlerdeki viral hastalık etmenlerinin ve oranlarının saptanması ve bazı biber çeşitlerinin bu virüslere reaksiyonlarının belirlenmesi üzerine araştırmalar, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, 118s.
- Hanssen, I.M., Lapidot, M. and Thomma, B.P.H.J.**, 2010, Emerging viral diseases of tomato crops, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23:539-548 pp.
- Hayes, R.J. and Buck, K.W.**, 1990, Complete replication of a eukaryotic virus RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA polymerase, *Cell*, 63(2):363-368 pp.
- Hristova, D., Karadjova, O., Yankulova, M., Heinze, C. and Adam, G.**, 2001, A survey of *Tospoviruses* in Bulgaria, *Journal of Phytopathology*, 149:745-749 pp.
- Iqbal, S., Ashfaq, M. and Shah, H.**, 2011, Biological characterization of Pakistani isolates of *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV), *Pakistan Journal of Botany*, 43(6):3041-3047 pp.
- İlhan, S.**, 2011, Tokat'ta domates ve biber tarımı yapılan alanlarda görülen virüs hastalıkları ve fizyolojik bozuklukların belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 66s.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jacquemond, J.M.**, 2012, Sequence of infectious cDNA clones of RNAs1, 2 and 3 of CMV strain, INRA, Station de Pathologie Vegetale (unpublished).
- Jones, R.A.C. and Cowling, W.A.**, 1995, Resistance to seed transmission of *Cucumber mosaic virus* in narrow-leaved lupins (*Lupinus angustifolius*), *Crop and Pasture Science*, 46(7):1339-1352 pp.
- Kaper, J.M.**, 1982, Rapid synthesis of double-stranded *Cucumber mosaic virus*-associated RNA 5: mechanism controlling viral pathogenesis?, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 105(3):1014-1022 pp.
- Kim, M.K., Seo, J.K., Kwak, H.R., Kim, J.S., Kim, K.H., Cha, B.J. and Choi, H.S.**, 2014, Molecular genetic analysis of *Cucumber mosaic virus* populations infecting pepper suggests unique patterns of evolution in Korea, *Phytopathology*, 104(9):993-1000 pp.
- Kucharek, T.A., Purcifull, D.E., Christie, R.G. and Perkins, K.D.**, 1998, The association of severe epidemics of cucumber mosaic in commercial fields of pepper and tobacco in north Florida with inoculum in *Commelina benghalensis* and *C. communis*, *Plant Disease*, 82(10):1172 p.
- Kumar, S., Srivastava, A. and Raj, S.K.**, 2005, Molecular detection of *Cucumber mosaic virus* in chrysanthemum cultivars, *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 40:205-211 pp.
- Kumari, R., Bhardwaj, P., Singh, L., Zaidi, A.A. and Hallan, V.**, 2013, Biological and molecular characterization of *Cucumber mosaic virus* subgroup II isolate causing severe mosaic in cucumber, *Indian Journal of Virology*, 24(1):27-34 pp.
- 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 Bitki Koruma Anabilim Dalı, 72s.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Latham, L.J. and Jones, R.A.C.,** 1997, Occurrence of *Tomato spotted wilt tospovirus* in native flora, weeds and horticultural crops, *Australian Journal of Agricultural Research*, 48(3):359-369 pp.
- Lee, M.Y., Lee, J.H., Ahn, H.I., Kim, M.J., Her, N.H., Choi, J.K., Harn, C.H. and Ryu, K.H.,** 2006, Identification and sequence analysis of RNA3 of a resistance-breaking isolate of *Cucumber mosaic virus* from *Capsicum annuum*, *Plant Pathology Journal*, 22:265-270 pp.
- Lee, W.W., Roff, M. and Othman, R.Y.,** 2011, Genomic analysis of *Cucumber mosaic virus* strain CLW2 from Malaysia suggests a subgroup IB virus with a unique deletion in the methyltransferase domain of the 1a replicase protein that does not affect replication, Centre for Research in Biological for Agriculture (CEBAR), University of Malaya (unpublished).
- Li, W., Lewandowski, D.J., Hilf, M.E. and Adkins, S.,** 2009, Identification of domains of the *Tomato spotted wilt virus* NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology, *Virology*, 390:110-121 pp.
- Lian, S., Lee, J.S., Cho, W.K., Yu, J., Kim, M.K., Choi, H.S. and Kim, K.H.,** 2013, Phylogenetic and recombination analysis of *Tomato spotted wilt virus*, *PLoS ONE*, 8:(5)E63380.
- Liao, Q., Chen, J., Du, Z., Zhang, H. and Wu, P.,** 2007, Construction of a full-length cDNA clone of RNA1 of *Cucumber mosaic virus* isolate Cb7, Institute of Bioengineering, Zhejiang Sci-Tech University (unpublished).
- Lin, H. X., Rubio, L., Smythe, A., Jiminez, M. and Falk, B.W.,** 2003, Genetic diversity and biological variation among California isolates of *Cucumber mosaic virus*, *Journal of General Virology*, 84:249-258 pp.
- Loebenstein, G. and Lecoq, H.,** 2012, Viruses and virus diseases of the vegetables in the Mediterranean Basin, Academic Press-Elsevier, Amsterdam, 595p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lopez, C., Aramburu, J., Galipienso, L. and Nuez, F.,** 2007, Characterisation of several heterogeneous species of defective RNAs derived from RNA 3 of *Cucumber mosaic virus*, *Archives of Virology*, 152(3):621-627pp.
- Lopez, C., Aramburu, J., Galipienso, L., Soler, S., Nuez, F. and 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 pp.
- Lovato, F.A., Inoue-Nagata, A.K., Nagata, T., de Avila, A.C., Pereira, L.A.R. and Resende, R.O.,** 2008, The N protein of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) is associated with the induction of programmed cell death (PCD) in *Capsicum chinense* plants, a hypersensitive host to TSWV infection, *Virus Research*, 137:245-252 pp.
- Maoka, T., Hayano, Y.S., Iwasaki, M., Yoshida, K. and Masuta, C.,** 2009, Mixed infection in tomato to ensure frequent generation of a natural reassortant between two subgroups of *Cucumber mosaic virus*, *Virus Genes* (in press).
- Margaria, P., Ciuffo, M. and Turina, M.,** 2004, Resistance breaking strain of TSWV *Tospovirus*, (*Bunyaviridae*) on resistant pepper cultivars in Almeria Spain, *Plant Pathology*, 53:795 p.
- Margaria, P., Ciuffo, M. and Turina, M.,** 2006, Molecular characterization of resistance-breaking strains of *Tomato spotted wilt virus* (*Tospovirus*, *Bunyaviridae*) infecting resistant pepper carrying the TSW gene, Italy (unpublished).
- Margaria, P., Bosco, L., Vallino, M., Ciuffo, M., Mautino, G.C., Tavella, L. and Turina, M.,** 2014, The NSs protein of *Tomato spotted wilt virus* is required for persistent infection and transmission by *Frankliniella occidentalis*, *Journal of Virology*, 88(10):5788-5802 pp.
- Margaria, P. and Rosa, C.,** 2015, First complete genome sequence of a *Tomato spotted wilt virus* isolate from the United States and its relationship to other TSWV isolates of different geographic origin, *Archives of Virology* (in press).

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Margaria, P., Miozzi, L., Rosa, C., Axtell, M.J., Pappu, H. R. and Turina, M.,** 2015, Small RNA profiles of wild-type and silencing suppressor-deficient *Tomato spotted wilt virus* infected *Nicotiana benthamiana*, *Virus Research*, 208:30-38 pp.
- Mavric, I. and Ravnika, M.,** 2001, First report of *Tomato spotted wilt virus* and *Impatiens necrotic spot virus* in Slovenia, *Plant Disease*, 85(12):1288 p.
- Mertelik, J. and Mokra, V.,** 1998, *Tomato spotted wilt virus* in ornamental plants, vegetables and weeds in the Czech Republic, *Acta Virologica*, 42:347-351 pp.
- Mnari Hattab, M., Ezzaier, K., Gebre Selassie, K., Marchoux, G. and Gognalon, P.,** 1999, Surveys of viruses affecting pepper (*Capsicum annuum* L.) in Tunisia, Abstracts of papers presented at the VIIth International Plant Virus Epidemiology Symposium, Almeria, 143-144 pp.
- Momol, M. T.,** 2000, First report of *Tomato spotted wilt virus* in Habanero and Tabasco peppers in Florida, *Plant Disease*, 84(10):1154 p.
- Morrone, M., Jacquemond, M. and Tepfer, M.,** 2013, Deep sequencing of recombinant virus populations in transgenic and nontransgenic plants infected with *Cucumber mosaic virus*, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(7):801-811 pp.
- Mossop, D.W. and Francki, R.I.B.,** 1977, Association of RNA 3 with aphid transmission of *Cucumber mosaic virus*, *Virology*, 81(1):177-181 pp.
- Mound, L.A.,** 2001, So many thrips—so few *tosspoviruses*, Thrips and *Tospoviruses*: Proceedings of the VII. International Symposium on Thysanoptera, Reggio Calabria, 15-18 pp.
- Moury, B.,** 2004, Differential selection of genes of *Cucumber mosaic virus* subgroups, *Molecular Biology and Evolution*, 21:1602-1611 pp.
- Moury, B. and Verdin, E.,** 2012, Viruses of pepper crops in the Mediterranean basin: a remarkable stasis, *Advances in Virus Research*, 84:127-162 pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Moyle, R., Pretorius, L., Dalton-Morgan, J., Persley, D. and Schenk, P.,** 2015, Complete genome sequence of an Australian *Tomato spotted wilt virus* isolate, Agriculture and Food Sciences, University of Queensland, (unpublished).
- Mun, H.Y., Park, M.R., Lee, H.B., and Kim, K.H.,** 2008, Outbreak of *Cucumber mosaic virus* and *Tomato spotted wilt virus* on bell pepper grown in Jeonnam Province in Korea, *The Plant Pathology Journal*, 24(1):3-96 pp.
- Nematollahi, S., Sokhandan Bashir, N., Rakhshandehroo, F. and Zamanizadeh, H.,** 2012, Molecular characterization of *Cucumber mosaic virus* isolates on the basis of CP, MP and 2b genes reveals evidence of phylogenetic position and symptomolgy, Azad University College of Agriculture and Natural Resources (unpublished).
- Nitzany, F.E. and Wilkinson, R.E.,** 1961, The identification of *Cucumber mosaic virus* from different hosts in Israel, *Phytopathologia Mediterranea*, 1(2):71-76 pp.
- Nour, S.M., Maleki, M. and Ghotbi, T.,** 2013, Biological and serological detection of TSWV on three commercial cultivars *Chrysanthemum morifolium* in Markazi province of Iran, *Annals of Biological Research*, 4(4):112-119 pp.
- Ozer, M., Sipahioglu, H.M. and Usta, M.,** 2014, The survey of some tomato viruses in tomato production fields in Van Lake basin by RT-PCR method, Plant Protection, University of Yuzuncu Yil (unpublished).
- Perry, K.L., Zhang, L. and Palukaitis, P.,** 1998, Amino acid changes in the coat protein of *Cucumber mosaic virus* differentially affect transmission by the aphids *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*, *Virology*, 242:204-210 pp.
- Promil, K.,** 2012, Detection of *Cucumber mosaic virus* in bell pepper crop from himachal Pradesh, *Plant Disease Research*, 27(1):71-80 pp.
- PVO,** 2015, Plant Viruses Online, <http://pvo.bio-mirror.cn/sppindex.htm> (Erişim tarihi: 08 Ocak 2015)

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Qiu, W.P., Geske, S.M., Hickey, C.M. and Moyer, J.W.,** 1998, *Tomato spotted wilt tospovirus* genome reassortment and genome segmentspecific adaptatin, *Virology*, 244:186–194 pp.
- Raj, S.K., Gautam, K.K., Snehi, S.K. and Khan, M.S.,** 2010, *Cucumber mosaic virus* isolate causing mosaic disease in eggplant (*Solanum melongena* L.) in India, National Botanical Research Institute (unpublished).
- Richards, K.E., Jonard, G., Jacquemond, M. and Lot, H.,** 1978, Nucleotide sequence of *Cucumber mosaic virus*-associated RNA 5, *Virology*, 89(2):395-408 pp.
- Richmond, K.E., Chenault, K., Sherwood, J.L. and German T.L.,** 1998, Characterization of the nucleic acid binding properties of *Tomato spotted wilt virus* nucleocapsid protein, *Virology*, 248:6-11 pp.
- Rodriguez-Alvarado, G., Kurath, G. and Dodds, J.A.,** 1995, Heterogeneity in pepper isolates of *Cucumber mosaic virus*, *Plant Disease*, 79(5):450-455 pp.
- Roggero, P.,** 2002, Infection of Tospoviruses in pepper and control by resistant plants, *Biológico*, 64(2):179-181 pp.
- Roggero, P., Masenga, V. and Tavella, L.,** 2002, Field isolates of *Tomato spotted wilt virus* overcoming resistance in pepper and their spread to other hosts in Italy, *Plant Disease*, 86:950-954 pp.
- Roossinck, M.J., Zhang, L. and Hellwald, K.H.,** 1999, Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of *Cucumber mosaic virus* RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups, *Journal of Virology*, 73(8):6752-6758 pp.
- Samuitienė, M. and Navalinskienė, M.,** 2008, Occurrence of *Cucumber mosaic cucumovirus* on ornamental plants in Lithuania, *Zemdirbyste-Agriculture*, 95(3):135-143 pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sarı, S.**, 2015, Samsun ilinde yetiştirilen yazlık sebzelerde enfeksiyon oluşturan *Cucumber mosaic virus* (CMV) izolatlarının karakterizasyonu ve konukçu-simptom-Satellit RNA ilişkilerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, 143s.
- Sharman, M. and Persley D.M.**, 2006, Field isolates of *Tomato spotted wilt virus* overcoming resistance in *Capsicum* in Australia, *Australasian Plant Pathology*, 35:123-128 pp.
- Sin, B. and Arli Sokmen, M.**, 2015, Sequence analysis of the nucleocapsid gene (N) of *Tomato spotted wilt virus* infecting tomato crops in the Middle Black Sea Region of Turkey, Faculty of Agriculture Ondokuz Mayıs University (unpublished).
- Subasic, D., Rusak, G. and Milicic, D.**, 1990, *Cucumber mosaic virus* obtained from pepper (*Capsicum annuum* L.) in Bosnia and Herzegovina, *Acta Botanica Croatica*, 49:7-12 pp.
- Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S. and Okuno, T.**, 2002, Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*, 532:75-79 pp.
- Tentchev, D., Verdin, E., Marchal, C., Jacquet, M., Aguilar, J.M. and Moury, B.**, 2011, Evolution and structure of *Tomato spotted wilt virus* populations: evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes, *Journal of General Virology*, 92(PT4):961-973 pp.
- Thomson, A.D. and Procter, C.H.**, 1966, *Cucumber mosaic virus* in lettuce, *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 9(1):142-144 pp.
- Thompson, J.R., Langenhan, J.L., Fuchs, M and Perry, K.L.**, 2015, Genotyping of *Cucumber mosaic virus* isolates in western New York State during epidemic years: Characterization of an emergent plant virus population, *Virus Research*, 210:169-177 pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tomlinson, J.A. and Carter, A.L.**, 1970, Studies on the seed transmission of *Cucumber mosaic virus* in chickweed (*Stellaria media*) in relation to the ecology of the virus, *Annals of Applied Biology*, 66(3):381-386 pp.
- Tomlinson, J.A., Carter, A.L., Dale, W.T. and Simpson, C.J.**, 1970, Weed plants as sources of *Cucumber mosaic virus*, *Annals of Applied Biology*, 66:11-16 pp.
- Tomlinson, J.A.**, 1987, Epidemiology and control of virus diseases of vegetables, *Annals of Applied Biology*, 110(3):661-681 pp.
- Timmerman-Vaughan, G.M., Lister, R., Cooper, R. and Tang, J.**, 2014, Phylogenetic analysis of New Zealand *Tomato spotted wilt virus* isolates suggests likely incursion history scenarios and mechanisms for population evolution, *Archives of Virology*, 159(5):993-1003 pp.
- Tsompana, M., Abad, J., Purugganan, M. and Moyer, J.W.**, 2005, The molecular population genetics of the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) genome, *Molecular Ecology*, 14(1):53-66 pp.
- Turina, M., Tavella, L. and Ciuffo, M.**, 2012, *Tospoviruses* in the Mediterranean area, *Advances in Virus Research*, 84:403-437 pp.
- TÜİK**, 2014, “Bitkisel Üretim İstatistikleri” <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim tarihi: 26 Ocak 2016)
- Ullman, D.E., Cho, J.J., Mau, R.F.L., Wescot, D.M. and Custer, D.M.**, 1992, A midgut barrier to *Tomato spotted wilt virus* acquisition by adult western flower thrips, *Phytopathology*, 82:1333-1342 pp.
- Uzunoğulları, N. ve Gümüş, M.**, 2015, Marmara bölgesi’nde bazı kültür bitkilerinde doğal enfeksiyona neden olan hıyar mozaik virüsü (*Cucumber mosaic virus*, CMV)’nün tespiti, *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 16(1):9-15 pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vozelj, N., Petrovic, N., Novak, M.P., Tusek, M., Mavric, I. and Ravnikar, M.,** 2003, The most frequent viruses on selected ornamental plants and vegetables in Slovenia, Zbornik predavanj in referatov 6.Slovenskega Posvetovanje o Varstvu Rastlin, Zrece, 300-304 pp.
- Vural, H., Eşiyok, D. and Duman, İ.,** 2000, Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme), Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 440 s.
- Watson, M.A.,** 1946, The transmission of beet mosaic and beet yellows viruses by aphides; a comparative study of a non-persistent and a persistent virus having host plants and vectors in common, *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 133(871):200-219 pp.
- Whitfield, A.E., Kumar, N.K.K., Rotenberg, D., Wyman, E.A., Zeitlow, C., Willis, D.K. and German, T.L.,** 2008, A soluble form of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) Gn (Gn-S) inhibits transmission of TSWV by *Frankliniella occidentalis*, *Phytopathology*, 98(1):45-50 pp.
- Wylie, S.J., Zhang, C., Long, V., Roossinck, M.J., Koh, S.H., Jones, M.G., Iqbal, S. and Li, H.,** 2015, Differential responses to virus challenge of laboratory and wild accessions of Australian species of *Nicotiana* and comparative analysis of RDR1 gene sequences, *PLoS ONE*, 10(3):E0121787.
- Yang, Y., Kim, K. S. and Anderson, E.J.,** 1997, Seed transmission of *Cucumber mosaic virus* in spinach, *Phytopathology*, 87(9):924-931 pp.
- Yardımcı, N. ve Çulal Kılıç, H.,** 2009, *Tomato spotted wilt virus* in vegetable growing areas in the West Mediterranean region of Turkey, *African Journal of Biotechnology*, 8(18):4539-4541 p.
- Ye, J., Qu, J., Zhang, J.F., Geng, Y.F. and Fang, R.X.,** 2009, A critical domain of the *Cucumber mosaic virus* 2b protein for RNA silencing suppressor activity, *FEBS letters*, 583(1):101-106 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Yıldırım, H.**, 2010, Samsun ilinde farklı kültür bitkilerinde domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV)'nün bulaşıklık durumunun belirlenmesi ve bazı ticari domates çeşitlerinde dayanıklılığı kıran TSWV varyantlarının araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuzmayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, 86 s.
- Yılmaz, M.A. and Davis, R.F.**, 1985, Identification of viruses infecting vegetable crops along the Mediterranean Sea coast in Turkey, *The Journal of Turkish Phytopathology*,14:1-8 pp.
- Zitikaitė, I. and Samuitienė, M.**, 2009, Detection and characterization of *Cucumber mosaic virus* isolated from sweet peppers, *Sodininkystė ir Daržininkystė*, 28(3):281-288 pp.
- Zitter, T.A. and Provvidenti, R.**, 1984, Virus diseases of cucurbits, Vegetables IPM Fact Sheet, New York State IPM Program.
- Zitter, T.A. and Murphy, J.F.**, 2009, *Cucumber mosaic virus*, *The Plant Health Instructor*, DOI: 10.1094/PHI-I-2009-0518-01.

## **ÖZGEÇMİŞ**

Araştırmacı 03.04.1991 tarihinde Antalya’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Antalya’da tamamladı. 2009 yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümüne girdi. 2013 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim dalı, Fitopatoloji Bilim dalında yüksek lisans eğitime başlayan araştırmacı, 2014 yılında aynı bölüme Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı çerçevesinde Araştırma Görevlisi olarak atandı. Halen Bitki Virolojisi Bilim Dalı alanındaki çalışmalarına devam etmektedir.