ANKARA UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TOMATO CHLOROSIS VIRUS (ToCV) İZOLATLARININ ÖRTÜ PROTEİN GEN BÖLGESİNİN MOLEKÜLER OLARAK BELİRLENMESİ

Salisu SULLEY

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ANKARA
2016

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Salisu SULLEY tarafından hazırlanan **"Tomato Chlorosis Virus (ToCV) İzolatlarının Örtü Protein Gen Bölgesinin Moleküler Olarak Belirlenmesi "** adlı tez çalışması 15/01/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. İ. Özer ELİBÜYÜK
AnkaraÜniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. İ. Özer ELİBÜYÜK
Ankara Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı

1.Üye : Prof. Dr. F. Sara DOLAR
Ankara Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı

2. Üye : Doç. Dr. Nazlı Dide KUTLUK YILMAZ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim DEMİR
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

15.01.2016



Salisu SULLEY

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TOMATO CHLOROSIS VIRUS (ToCV) İZOLATLARININ ÖRTÜ PROTEİN GEN BÖLGESİNİN MOLEKÜLER OLARAK BELİRLENMESİ

Salisu SULLEY

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İ. Özer ELİBÜYÜK

Bu çalışma ile Antalya'nın beş farklı bölgesinden izole edilen ToCV'nin kılıf protein geninin ilk tam sekansı ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Virüs RNA'sı PureLink® RNA Mini Kit kullanılarak enfekteli domates bitkilerinden izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. Virüsün kısmi RNA2 genomu (1163 bp) ile tüm kılıf protein genini (774 bp) dizilemek için ToCV'ye özgü primerler tasarlanmıştır. Kılıf protein familyasının analizi ToCV kılıf proteininin Closter_coat protein superfamilya'ye (closter kılıf protein süperailesi) dahil olduğunu göstermiştir. Antalya'dan izole edilen beş ToCV izolatının kılıf protein dizilemesi bu bölgenin oldukça korunmuş olduğunu göstermiştir; Merkez ve Serik izolatlarının aminoasit sekansı % 100 benzer olarak bulunmuştur. Diğer ülke izolatları ile ToCV-Türkiye'nin sekans analizleri bizim izolatlarımızın Yunan izolatı ile büyük bir benzerlik gösterdiğini (% 99.22) göstermiş ve Neighbor Joining algoritması kullanılarak filogenetik ağaçta bir küme oluşturulmuştur. Filogenetik analiz ToCV'nin *Crinivirus* cinsinden bir virüs olduğunu tastiklemiş ve Tatlı patates klororotik cücelik virüsü'ne (*Sweet potato chlorotic stunt virus*, SPCSV) çok benzer olduğunu da ortaya koymuştur. Gelecekte yapılacak tüm genom analizi bizim izolatlarımız ile diğer ülke izolatlarının ilişkisini daha açık bir biçimde tanımlayacak ve genomik organizasyonunu da daha net değerlendirme olanağı verecektir.

Ocak 2016, 73 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Tomato chlorosis virus, Sweet potato chlorotic stunt virus, Crinivirus, Closterovirus,* Closter coat protein super family, Neigbour Joining, domates

ABSTRACT

Master Thesis

MOLECULAR ANALYSIS OF COAT PROTEIN REGION OF TOMATO CHLOROSIS VIRUS (ToCV) ISOLATES

Salisu SULLEY

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. İ. Özer ELİBÜYÜK

In this study, we report the first complete sequence and characterisation of the coat protein coding gene of *Tomato chlorosis virus* from five different districts in Antalya. The virus RNA was isolated and purified from infected tomato plants on the field using PureLink® RNA Mini Kit. ToCV specific primers were designed to sequence the partial RNA 2 genome (1163 bp) of the virus which included the full coat protein gene (774 bp). Analysis of the coat protein family confirmed that ToCV coat protein belongs to the Closter_coat protein super family. The coat protein sequence of the five isolates from Turkey proved to be highly conserved such that the amino acid sequence of Merkez and Serik isolates were found to be 100 percent similar. Sequence analyses of ToCV-Turkey with other isolates revealed the greatest identity with Greek isolate (99.22%), forming a cluster in the phylogenetic tree using the neighbour joining algorithm. Phylogenetic analysis confirmed assignment of ToCV in the genus *Crinivirus*, being most similar to *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV). Future studies on the complete genome will define more clearly it's the relatedness and genomic organisation to assess more definitively its relationship.

January 2016, 73 pages

Key Words: *Tomato chlorosis virus, Sweet potato chlorotic stunt virus, Crinivirus, Closterovirus*, Closter coat protein super family, Neigbour Joining, Tomato

TEŞEKKÜR

Öncelikle, bu çalışmada ilgisini, desteğini ve yardımlarını benden esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. İ. Özer ELİBÜYÜK'e (Ankara Üniversitesi-Bitki Koruma Anabilim Dalı) teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam süresince yardımlarıyla tez çalışmama önemli katkılarda bulunan Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü' nden sayın Dr. Mine GÜL ŞEKER'e, çalışmalarım sırasında her türlü yardımı ve manevi desteklerini benden esirgemeyen sayın Filiz RANDA ZELYÜT'e, sayın Araş. Gör. Yağmur TÜRKMEN'e ve Bitki Koruma Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkürü bir borç bilirim. Son olarak, tüm yaşamım boyunca olduğu gibi yüksek lisans çalışmam süresince de beni hep destekleyen, maddi-manevi her zaman yanımda olan ve sonsuz bir sabırla her türlü fedakarlığı gösteren değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

Salisu SULLEY

Ankara, Ocak 2016

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI
ETİK ..... **i**
ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **viii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **x**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xi**
1. GİRİŞ **1**
2. KURAMSAL TEMELLER **4**
2.1 Domates Virüsleri Hakkında Genel Bilgiler **4**
2.3 ToCV'nin Konukçuları **6**
2.4 ToCV'nin Domatesteki Belirtileri **6**
2.5 ToCV'nin Taşınması **7**
2.7 ToCV'nin Teşhisi **8**
2.8 ToCV Genomunun Tanımlanması **10**
2.9 ToCV'nin Kontrolü **11**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **13**
3.1 Materyal **13**
3.1.1 Örnek alma **13**
3.1.2 Total RNA izolasyonu **13**
3.1.3 RT-PCR çalışmaları **14**
3.1.4 Agaroz jel elektroforez çalışmaları **15**
3.1.5 DNA saflaştırılması **15**
3.2 Yöntem **16**
3.2.1 Örnek alma **16**
3.2.2 RNA izolasyonu **18**
3.2.2.3 Nanodrop'ta RNA ölçülmesi **19**
3.2.3 Primer tasarlaması **20**
3.2.4 Primerlerin sentezi **21**

3.2.5 RT- PCR çalışmaları **21**
3.2.6 PCR döngü programı **22**
3.2.7 Jel Elektoforez **23**
3.2.8 Jelden PCR Ürünlerinin Saflaştırılması **24**
3.2.9 Saflaştırılmış PCR ürünlerinin dizilenmesi **25**
3.3 Veritabanları, Yazılımlar ve Bilişimsel Dizinin Analizi **25**
3.3.1 Hizalama ve Dizinin Düzenlemesi **25**
3.3.2 ORF Analizi **26**
3.3.3 Protein Familya Sınıflandırması **26**
3.3.4 Sekans Hizalanması **26**
3.3.5 Filogenetik Analiz **27**
4. ARAŞTIRMA BULGULARI **29**
4.1 Örnek Alma **29**
4.2 RNA İzolasyon Çalışmaları **29**
4.2.1 Nanodrop'ta RNA ölçülmesi **29**
4.2.2 RNA jel elektroforezi **30**
4.3 Primerlerin Tasarlanması **31**
4.4 PCR Jel Görüntüleri **32**
4.5 Sekansların Doğrulanması ve Birleştirilmesi **32**
4.6 Dizilimin Analizi **33**
4.6.1 Dizilerin açıklaması **33**
4.6.2 Dizilerin kırpılması **34**
4.6.3 Kılıf protein familyasının tahmini **34**
4.6.4 İkincil yapının tahmin edilmesi **35**
4.6.5 Türkiye'deki izolatlar arası sekansların hizalanması **36**
4.6.6 Türkiye'deki izolatlar arası filogenetik ağaç **37**
4.6.7 Çoklu dizilerin hizalanması **38**
4.6.8 Dünyadaki ToCV izolatların ve *crinivirus* cinsilerin fiogenetik analizi **38**
5. TARTIŞMA VE SONUÇ **42**
5.1 RNA İzolasyonu **42**
5.2 Primerler **43**
5.3 Kılıf Proteinin Protein Familyası Tahmini **43**

5.4 İkincil Yapı Tahmini....43
5.5 Türk İzolatlarının Filogenetik Analizi....44
5.6 Dünyadaki ToCV Izolatların ve *Crinivirus* Cinsilerin Fiogenetik Analizi....45
KAYNAKLAR....47
EKLER....59
EK 1 ToCV ve TICV'nin Bulunduğu Ülkeler ve İlk Saptanış Tarihleri....59
EK 2 Beş ToCV İzolatının Kılıf Protein Sekansı....61
EK 3 SIAS (Sequence Identity and Similarity) sunucusu kullanılarak Türk izolatları arasındaki benzerlik oranları....64
EK 4 SIAS (Sequence Identity and Similarity) sunucusu kullanılarak Türk ve dünya izolatları arasındaki benzerlik oranları: a. Identity Results, b. Global Similarity (Blosum62) Results....65
EK 5 Dünyadaki ToCV izolatların kılıf proteini amino asit dizileri kullanılarak çoklu dizilerin hizalanması....68
EK 6 SAIS sunucusu kullanılarak ToCV Türk izolatı ile dünyadaki Crinivirus cinsi virüslerin benzerlik oranları: a. Identity Results, b. Global Similarity (Blosum62) Results....70
EK 7 Crinivirüs cinsi virüsleri kılıf proteini amino asit dizileri kullanılarak çoklu dizilerin hizalanması....73
ÖZGEÇMİŞ....73

KISALTMALAR DİZİNİ

3D model	Three-dimensional model
AMV	*Alfafa mosaic virus*
AYV	*Anthriscus yellows*
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BnYDV	*Bean yellow disorder virus*
bp	Base pair
BPYV	*Beet pseudo-yellows virus*
BYVaV	*Blackberry yellow vein associated virus*
CABI	Centre for Agriculture and Bioscience International
CDD	Conserved Domain Database
cDNA	Complementary DNA
CMV	*Cucumber mosaic virus*
CP	Coat protein
CPm	Coat protein minor
CSYDV	*Cucurbit yellow stunting disorder virus*
CTV	*Citrus trestiza virus*
DEPC	diethylpyrocarbonate
dH_2O	Distilled water
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleotide
DVCV	*Diodea vein chlorosis virus*
DİE	Devlet İstatistik Enstitüsü
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization
Hel	Helicase
HMM	Hidden Markov Model
Hsp70h	Heat shock protein 70 homologue
LCV	Lettuce chlorotic virus
LIYV	*Lettuce infectious yellows virus*
MEAM1	Middle East–Asia Minor 1
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
MT	Metil transferase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCBI CD-Search	NCBI Conserved Domain Search
OD	Optical density
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
Pfam	Protein family
PSSM	Position Specific Scoring Matrices
Pro	Proteinase
PSI-BLAST	Position-specific-iterated BLAST
PVY	*Potato virus* Y
PYVV	*Potato yellow vein virus*
RdRp	RNA dependent RNA polymerase
RNA	Ribonucleic acid

RPS-BLAST	Reversed Position Specific BLAST
rRNA	Ribosomal RNA
RT-PCR	Reverse-Transcription PCR
SPaV	*Strawberry pallidosis associated virus*
SPCSV	*Sweet patato chlorotic stunt virus*
ssRNA	Single-Stranded RNA
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TEV	Tobacco etch virus
TICV	*Tomato infectious chlorosis virüs*
TMV	*Tobacco mosaic virus*
ToCV	*Tomato chlorosıs virus*
ToMV	*Tomato mosaic virus*
TSWV	*Tomato spotted wilt virüs*
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
TM	Melting temperature
TYLCV	*Tomato yellow leaf curl virus*
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolet

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 ToCV ve TICV'nin coğrafi dağılımı 5

Şekil 2.2 Domates kloroz virüs genom organizasyonunun şematik gösterimi 11

Şekil 3.1 Çalışmada izlenen yollar 16

Şekil 3.2 Antalya ili haritası 17

Şekil 3.3 RNA izolasyonu sırasında izlenen aşamalar 19

Şekil 4.1 Agaroz jelde (%1) izole edilen total RNA örneklerinin görünümü 30

Şekil 4.2 Primerlerin çalışması 31

Şekil 4.3 PCR sonucunda elde edilen ToCV'ye ait agaroz jel görüntüsü 32

Şekil 4.4 Dizilenmiş bölgedeki açık okuma çerçeveleri 33

Şekil 4.5 Türkiye'deki ToCV aminoasit kılıf protein ve closter süper familya kılıf protein pozisyon hizalanması 35

Şekil 4.6 Türkiye'deki ToCV aminoasit kılıf protein ve closter süper familya kılıf protein aminoasit dizilerin hizalanması 35

Şekil 4.7 I-TASSER analizi ile tahmin edilen kılıf protein 3D yapısı 36

Şekil 4.8 Türkiye'deki izolatlari kılıf proteini aminoasit dizilerinin hizalanması 37

Şekil 4.9 Türkiye'deki izolatların filogenetik ağacı 38

Şekil 4.10 Dünyadaki ToCV izolatların ve Crinivirus cinsilerin fiogenetik ağacı 39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada Kullanılan Bitkisel Materyalve illere göre kodları 17

Cizelge 3.2 Primer tasarlamak için NCBI veri tabanından seçilen tam uzunlukta ToCV RNA 2 izolatları 21

Çizelge 3.3 Genlerin çoğaltılmasında kullanılan PCR primerleri..... 21

Çizelge 3.4 PCR'da kullanılan kimyasallar ve miktarları..... 22

Çizelge 3.5 Örneklere uygulanan thermocycler programı 23

Çizelge 3.6 Filogenetik analiz yapmak için yaralanan izolatlar 28

Çizelge 4.1 Kullanılan bitkisel materyale ait RNA miktar ve saflıkları 29

Çizelge 4.2 Tasarlanan primerlere ait bilgiler..... 31

Çizelge 4.3 Dizilenmiş bölgeleri ve karşılık gelen boyutları..... 33

Çizelge 4.4 Türkiye izolatlari ve karşılık gelen accession numaraları..... 34

1. GİRİŞ

Anavatanı Güney ve Orta Amerika olan domates (*Solanum lycopersicum,* Syn. *Lycopersicum esculentum*) patlıcangiller (*Solanaceae*) familyasına ait meyvesi yenebilen otsu bir bitki türüdür. Domates, insan sağlığı ve beslenmesi açısından önemli olan vitaminler, karbonhidratlar, yağ ve protein gibi birçok organik maddeyi bol miktarda içermektedir. İç piyasada taze olarak tüketilmesinin yanısıra gıda endüstrisinde ham madde olarak kullanılmakta, dış pazara ise taze olarak veya işlenerek ihraç edilmektedir (Anonim 1999).

Antalya ili sera üretimi başta olmak üzere yaş meyve sebze üretimi ve ihracatı ile hem ülke ekonomisine hem de bölge ekonomisine ihracat, istihdam, gelir, üretim değeri ve vergi gibi konular başta olmak üzere önemli katkılar sağlanmaktadır. Türkiye yaş meyve sebze üretimi 43 milyon ton ve ihracat değeri 800 milyon dolar'dır. Üretimin % 8,4'ü, ihracatın ise % 18,4'ü Antalya ilinden karşılanmaktadır. Üretimin ihracata oranı Türkiye genelinde % 3,8 iken, Antalya ilinde bu oran daha yüksek olup % 5,1'dir. Antalya ili sera üretim alanlarının % 59'unda domates yetiştirilmektedir. Nitekim, Türkiye yaş sebze ihracatında en fazla payı % 14 ile domates almaktadır. Antalya ilinde gerçekleştirilen toplam yaş meyve sebze ihracat değerinin % 27'si sadece domatesten sağlanmaktadır. İhracatın büyük oranda kış döneminde gerçekleştirildiği düşünüldüğünde Antalya ili sera domatesi ile % 59'luk bir paya sahip olmaktadır (Çanakçı ve Akıncı 2007, Emekli vd. 2008).

Türkiye'de kış dönemi ihracatının önemli bir dayanak noktası da yaş sebze ve meyve üretimidir. 1995 yılından günümüze örtü altı yetiştiriciliği giderek artmaktadır. Bu açıdan incelendiğinde Antalya % 76'lık bir oranla Türkiye genelinde ilk sırada yer almakta olup, 2. ürün kapsamında bu alanlar değerlendirildiğinde, oran % 125'i bulmaktadır. Türkiye genelinde 507.000 dekarlık sera alan varlığının % 50'si (250.000 dekarlık) cam seraların % 83,5'i ve plastik seraların da % 41'i Antalya iliminde bulunmaktadır (Çanakçı ve Akıncı 2007, Emekli vd. 2008).

Dikimden hasat dönemine kadar bütün aşamalarda karşılaşılan sayısız problemler nedeniyle domates ekim alanlarıyla elde edilen ürün miktarı arasında paralellik görülmemektedir. Sebze tarımında üretimi sınırlayan ve ürünün pazar değerinde kayıplara neden olan birçok canlı ve cansız etmen vardır. Domatesin üretimi ve kalitesi çok çeşitli hastalıklar nedeniyle düşmektedir. Bakteriyel, fungal ve virüs hastalıkları önemli ölçüde ürün kalitesi ve veriminde etkili olmaktadırlar. Domates üretimini bütün dünyada olduğu gibi kısıtlayan en önemli faktörlerden biri değişik virüslerin sebep olduğu virüs hastalıklarıdır (Hanssen vd. 2010).

Domateslerde yaygın olarak görülen önemli hastalıklara sebep olan virüs cins ve ilgili türler arasında *Tospovirus* cinsinde Domates lekeli solgunluk virüsü (*Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Begomovirus* cinsinde Domates sarı yaprak kıvırcıklık virüsü (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV), *Cucumovirus* cinsinde Hıyar mozaik virüsü (*Cucumber mosaic virus*, CMV), *Tobamovirus* cinsinde Tütün mozaik virüsü (*Tobacco mosaic virus*, TMV), Domates mozaik virüsü (*Tomato mosaic virus*, ToMV) ve *Crinivirus* cinsinde Domates kloroz virüsü (*Tomato chlorosis virus*, ToCV) ve Domates bulaşıcı kloroz virüsü (*Tomato infectious chlorosis virus*, TICV) sayılabilir (Moriones ve Luis-Arteaga 1999).

Bunlar içerisinde, ToCV domateslere zarar veren ve ekonomik anlamda büyük kayıplara neden olan en önemli virüslerden biridir. ToCV ilk kez domateslerde 1989 yılında Florida'da (ABD) belirlenmiş ve sarı yaprak hastalığı olarak adlandırılmıştır (Wisler vd 1998a). Domates ToCV'nin ana doğal konukçusudur. Bu virüsün diğer konukçuları *Solanum nigrum, Datura stramonium, Physalis peruviana*, tomatillo (*Physalis ixocarpa*), *Physalis angulata*, bazı tatlı biber varyeteleri (*Capsicum annuum*) ve patatestir (*Solanum tuberosum*) (Lozano vd. 2004, Trenado vd. 2007, Freitas vd. 2012).

ToCV hem tarlada, hem de örtü altında enfeksiyonlara yol açar, ancak örtü altında virüs uygun çevre koşullarından dolayı daha hızlı yayılmaktadır. Çünkü örtü altı koşulları vektör beyazsineklerin gelişimi ve çoğalması için uygun ortam sunarlar (Anonymous

2013). ToCV *Closteroviridae* familyasından *Crinivirus* cinsine ait yaklaşık 850 nm uzunluğunda uzun, kıvrımlı partiküllü, ss (+) iki parçalı RNA genomlu (RNA 1 ve RNA 2) bir virüstür (Wisler vd. 1996).

Domateslerde ToCV enfeksiyonundan kaynaklanan hastalık belirtileri alt yapraklarda damarlararası sararma ile başlar, damarlar yeşildir. Bu belirtiler mineral madde eksikliklerine, fitotoksiteye veya yaşlılık belirtilerine çok benzer. Sararmış yapraklar kalınlaşmış ve kırılgan bir yapıdadır. Sararma genellikle alt yaşlı yapraklardadır ve genç yapraklarda nadiren görülür. Enfekteli bitkiler erken yaşlanırlar ve zayıftırlar. Böyle bitkilerde meyveler geç olgunlaşırlar ve verim düşüktür (Anonymous 2013).

ToCV'nin varlığı Türkiye'de ilk kez Muğla'nın Fethiye ilçesine ait serada belirlenmiştir (Çevik ve Erkış 2007). Sonra 2011 yılında yapılan bir surveyde ToCV'nin Antalya seralarında oldukça yaygın olduğu belirlenmiştir (yayınlanmamış). Son olarak ToCV 2013 yılında Adana ve Mersin illerinde varlığı tespit edilmiştir (Pehlivan 2013) belirlenmiştir. Görüldüğü üzere ToCV ile ilgili Türkiye'de oldukça az çalışma yapılmış olması ve bu virüsün hızla yayılması bize bu konuda çalışma fikrini vermiştir. Bu çalışmada, ToCV tam kılıf protein sekansı belirlenmiş ve *Crinivirus* cinsinde bu virüsün taksonomik konumu tartışılmıştır. Bu önemli ve yayılmakta olan domates patojeninin iyi anlaşılması ve onun biyolojik özelliklerini ve izolatları arasındaki ilişkileri diğer *Crinivirus*'lerle ilişkilendirmek amacıyla, Türkiye'de 5 ToCV izolatının tam kılıf protein geni sekanslanmış, filogenetik analizi yapılmış ve NCBI genom veritabanı kayıt edilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Domates Virüsleri Hakkında Genel Bilgiler

Dünya çapında, 33 cinse ait yaklaşık 146 virüsün domatesleri enfekte ettiği rapor edilmiştir. Bunlardan 27'si *Potyvirus* cinsine ait; 17 *Begomovirus*, 15 *Nepovirus*, 9 *Potexvirus*, 8 *Tobamovirus*, 6 *Luteovirus* ve 6'sı da *Tymovirus*'lerdendir. Kalan 67 virüs *Alfamovirus*, *Carlavirus*, *Carmovirus*, *Closterovirus*, *Comovirus*, *Crinivirus*, *Cucumovirus*, *Cytorhabdovirus*, *Dianthovirus*, *Fabavirus*, *Furovirus*, *Ilarvirus*, *Ipomovirus*, *Luteovirus*, *Necrovirus*, *Nucleorhabdovirus*, *Ourmiavirus*, *Phytoreovirus*, *Sequivirus*, *Tobravirus*, *Tombusvirus*, *Tospovirus*, *Tymovirus*, *Umbravirus* ve *Varicosavirus* cinslerin arasında dağılmaktadır (Hull 2013).

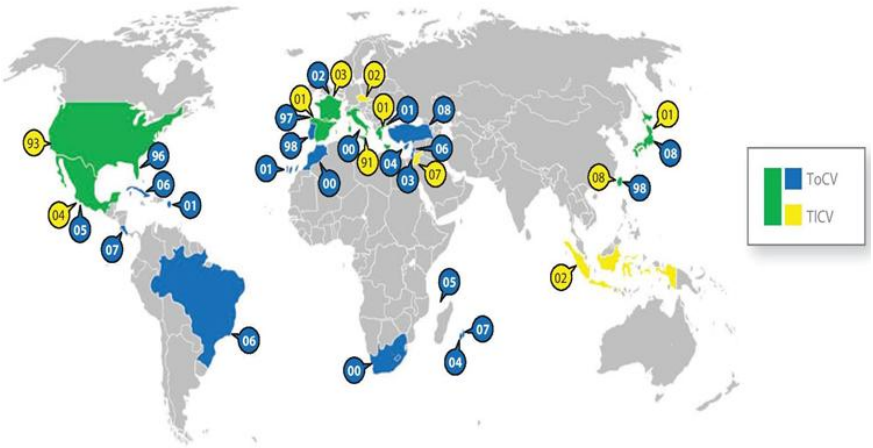
Dünya çapında domates yetiştirilen alanlarda çeşitli virüslerin varlığı bildirilmiştir. Domates virüs hastalıklarına oldukça duyarlı olması nedeniyle çok sayıda virüs hastalığına konukçuluk etmektedir. Domates yetiştirilen alanlarda Tütün mozaik virüsü (*Tobacco mosaic virus*, TMV), Domates mozaik virüsü (*Tomato mosaic virus*, ToMV), Hıyar mozaik virüsü (*Cucumber mosaic virus*, CMV), Domates lekeli solgunluk virüsü (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV), Domates sarı yaprak kıvırcıklık virüsü (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV), Tütün yanıklık virüsü (*Tobacco etch virüs*, TEV), Patates Y virüsü (*Potato virus* Y, PVY), Domates kloroz virüsü (*Tomato chlorosis virus*, ToCV), Domates bulaşıcı kloroz virüsü (*Tomato infectious chlorosis virus*, TICV), Yonca mozaik virüsü (*Alfafa mosaic virus*, AMV) gibi virüslerin zarar verdiği Türkiye'de ve dünyada birçok araştırıcı tarafından rapor edilmiştir (Güldür vd. 1995, Yurtmen vd.1998, Nie ve Singh 2002, Çevik ve Erkış 2007).

Son yıllarda gerek hijyene önem verilmesi ve gerekse dayanıklı çeşitlerin ticari olarak bulunması itibariyle mekanik olarak bulaşan (ToMV, PVX vs.) virüsler eskisi kadar görülmemekte ve dolayısıyla ekonomik kayıplar vermemektedir. Ancak domateste vektörlerle taşınan virüsler hala önemlerini korumakta, özellikle de havai vektörlerle (afit, beyazsinek, trips) taşınan virüsler çok daha önemli olmaktadır. Bu bakımdan da

beyazsineklerle taşınan virüsler (TYLCV ile ToCV) Türkiye'de özellikle sera domates üretimini en çok tehdit eden viral etmen olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.2 ToCV'nin Coğrafi DağılımıToCV dünyada ilk kez Florida'da 1989 yılında görülmüştür (Wisler vd. 1998a). ToCV sonra sırasıyla İspanya (1999), Portekiz (2000), İtalya (2001), Yunanistan (2002), Tayvan (2004) İsrail, Meksika (2006) ve Japonya (2009)'da belirlenmiştir.

ToCV Avrupa birliği ülkeleri dışında Fas (Hanafi 2002), Porto Riko (Wintermantel vd. 2001), Amerika (Wisler vd. 1998b) ve Tayvan'da (Tsai vd. 2004) rapor edilmiştir. Ayrıca, Meksika'da (Alvarez vd. 2006), Küba'da (Martinez-Zubiaur vd. 2008), Brezilya'da (Barbosa vd. 2008) da rapor edilmiştir. Türkiye'de ilk kez 2007 yılında Bayram Çevik ve Gözde Erkış (2007) tarafından Muğla'nın Fethiye ilçesinde hastalığın varlığı rapor edilmiştir. Etmen daha sonra 2011 yılında Antalya'da (Prof. Dr. İ. Özer Elibüyük ile kişisel görüşme, yayınlanmamış) ve sonra 2013 yılında Adana ve Mersin illerinde belirlenmiştir (Pehlivan 2013). Bu çalışmada Adana ve Mersin illerinde üretimi yapılan domateslerde ToCV'nin yaygınlık durumu konulmuş, ToCV'nin farklı izolatlarının kılıf protein geni üzerinden 360 bp'lik bir bölgeye göre karakterizasyonu yapılmıştır (Pehlivan 2013).



Şekil 2.1 ToCV ve TICV'nin coğrafi dağılımı (Navas-Castillo vd. 2011)

Her ülke veya bölge için ilk raporlar yıl yuvarlak içerisine alınmıştır. Ülkeler ve ilk raporlar için referansların tam listesi EK 1'de gösterilmiştir.

2.3 ToCV'nin Konukçuları

ToCV domatesten başka biber (*Capsicum annuum*) (Lozano vd. 2004, Barbosa vd. 2010, Fortes vd. 2012) ve patates (*Solanum tuberosum*) (Fortes ve Navas-Castillo 2012, Freitas vd. 2012) gibi ekonomik bakımdan önemli bitkileri enfekte edebilmektedir. *C. annum* İspanya'da doğal konukçu olarak rapor edilmese de, Tayvan'da doğal konukçu olarak kabul edilmiştir (Lozano vd. 2004, Tsai vd. 2004).

ToCV 13 familyanın 37 bitki türünü içine alan geniş test bitkisi dizisine sahiptir. Bunlar *Aizoaceae, Amaranthaceae, Apocynaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae, Plumbaginaceae, Solanaceae* familyasına dahil değişik bitkilerdir (Louro vd. 2000, 2007, Font vd. 2004, Tsai vd. 2004, Morris vd. 2006, Wintermantel ve Wisler 2006, Trenado vd. 2007, Solórzano-Morales vd. 2011, Fonseca vd. 2013).

ToCV'nin TICV ve diğer *Crinivirus*'lerin aksine marulu enfekte etmediği rapor edilmiştir (Wisler vd. 1998b). Test bitkisi olan *Nicotiana clevelandii, N. benthamiana ve Physalis wrightii'*ye bitki başına 30 beyazsinek kullanılarak deneysel olarak taşınmıştır. *P. wrightii* virüs inokulasyonu en kısa sürede simptom gösteren test bitkisi olmuştur (Wintermantel 2004).

2.4 ToCV'nin Domatesteki Belirtileri

Virüs, domates bitkilerinin özellikle alt yapraklarında damar aralarında sararmayla başlar. Zaman zaman alt yaprakların gevrek kırılgan bir yapı almasına son olarak da kırılmalara neden olur. Hastalığın seyri alt yapraklardan üst yapraklara doğrudur (Wisler vd. 1998a, 1998b). Meyvelerde belirti gözlenmese de bitki meyveden önceki dönemde virüsten etkilendiği için normal boyutuna ulaşamaz ve hasat gecikir. Arazinin geneline bakıldığında ise; meyve boyutunda küçülme, meyve sayısında azalma ile birlikte raf ömründe kısalma şeklindeki problemlerle karşılaşılmaktadır. Vektör böcek uçuşundan yaklaşık bir hafta sonra, arazide bu tip simptomlar gözlenmektedir (Wisler

vd. 1998a, 1998b, Wintermantel vd. 2008). Bazı yıllar karışık enfeksiyon oluşturması nedeniyle ciddi şekilde kayıplara neden olabilmektedir (Wintermantel vd. 2008).

ToCV'nin ve TICV'nin oldukça benzer simptomlar oluşturmasından dolayı simptomolojik açıdan birbirlerinden çok kolay ayırt edilemeyeceği bildirilmektedir (Wisler vd. 1998a). Bu iki virüs serolojik olarak benzer olmayıp, nükleik asitleri de hibridize olmamaktadır (Duffus vd. 1996).

Seralarda domateste görülen simptom ve zarar çeşitten çeşide farklılık göstermektedir (Hanafi 2002). Her ne kadar virüs meyvede belirgin bir simptom ve zarar oluşturmasa da İspanya'da Malaga ve Almeria bölgelerinde meyvelerde verim kaybı ve olgunlaşma süresinde gecikme şeklinde kayıplar rapor edilmiştir (Lozano vd. 2004).

ToCV enfekteli bitkilerde nispeten uzun bir latent dönemine sahiptir. İlk bulaşmadan genellikle 3-4 hafta sonra hastalık simptomları görülmeye başlamaktadır (Tzanetakis vd. 2013).

2.5 ToCV'nin Taşınması

ToCV beyazsineklerle semi-persistent olarak taşınan virüstür. Şimdiye kadar tespit edilen beyazsineklerle taşınan bitki virüslerinde yalnızca ToCV dört beyazsinek türüyle taşınarak, diğer Crinivirus üyelerden ayrılmaktadır (Wisler vd. 1998b). *Bemisia tabaci, Bemisia argentifolii, Trialeurodes vaporariorum* ve *Trialeurodes abutilonea* türleri bu virüsün dünya geneline yayılmasına neden olmuştur (Wintermantel 2004).

T. abutilonea ve B. tabaci biotype B (Middle East–Asia Minor 1, MEAM1) ToCV'nin en etkili vektörleri olmasına ragmen, *B. tabaci* biotype A (*B. tabaci* New World) ve *T. vaporariorum*'un da daha az etkin vektörler olduğu bildirilmiştir (Wintermantel 2004).

Wintermantel ve Wisler (2006) virüsün beyazsineklerde taşınma sürelerinin farklılık gösterdiğini; ToCV'nin *T. abutilonea*'da 5 gün, *B. tabaci*'nin B ırkında 2 gün, *T. vaporariorum* ve *B. tabaci*'nin A ırkında 1 gün kalabildiğini saptamışlardır. *B. tabaci* ve *T. vaporariorum* türleri EPPO A2 listesinde yer almaktadır (Morris vd. 2006). *T. vaporariorum* EPPO bölgesi ülkelerinde seralarda, yazları da açık alanda oldukça yaygındır (Anonymous 1998). *B. tabaci*'nin EPPO ülkelerinde seralarda Kuzey Avrupa'da ise yaz aylarında açık alanda varlığı rapor edilmiştir. *T. abutilonea* ise ABD ve Küba'da bulunmaktadır (Anonymous 1998).

Virüsün *B. tabaci* ve *T. vaporariorum* gibi vektörlerin hareketiyle yayılması öngörülenden oldukça yavaş bir şekilde gerçekleşmektedir. Virüs taşıyan beyazsinekler uzun mesafelere virüsü taşıyabilseler de, esas taşınma konukçu bitki hareketiyle olmaktadır. Diğer *Crinivirus*'ler gibi ToCV de mekanik olarak taşınmamaktadır (Dovas vd. 2002). ToCV hemen hemen tüm *Closteroviridae* familyasına dahil virüsler gibi tohumla da taşınmamaktadır (Brunt vd. 1996).

Beyazsinekler bir saat gibi kısa beslenme süreleri ile ToCV'i kazanabilmektedir, ancak böceklerin besleme süresi uzadıkça, virüsü kazanma etkinlikleri de artmaktadır. ToCV yalnızca 1-9 gün boyunca virüslü beyazsinekler tarafından taşınmaktadır (McAvoy 2009).

2.7 ToCV'nin Teşhisi

ToCV'nin teşhisinde ilk adım simptomların tanımlanmasıdır. Fakat domateslerde TICV, ToCV belirtilerine çok benzemekte ve gözle ayrılamamaktadır (Hochmuth ve Simone 1996, Wisler vd. 1996). Sonuç olarak, ToCV çeşitli laboratuvar yöntemleriyle saptanabilmektedir.

Işık mikroskobu altında ToCV ile enfekteli *N. clevelandii*'nin sitoplazmasında azure A boyası ile kırmızı-mor ilgi cisimcikleri görülmüştür. Bu ilgi cisimcikleri TICV ile

enfekteli bitkiler içinde geçerlidir ve genelde floem hücrelerinde görülmektedir (Wisler vd. 1998b).

Crinivirus tanısı için dsRNA analizi (Morris ve Dodds 1979) yaprak sararmasının doğasını belirlemek amacıyla kullanılmıştır, fakat bu yöntem günümüzde rutin virüs teşhisinde kullanılmamaktadır (Anonymous 2013).

Real time RT-PCR ve geleneksel RT-PCR virüs tanımlama için önerilmektedir. Buna ek olarak, amplikonların dizi analizi virüsün tanımlanması için kullanılabilir. TICV ve/veya ToCV için araştırma amaçlı antiserumlar bulunsa da, günümüzde ToCV için ticari bir antiserum bulunmamaktadır (Jacquemond vd. 2009).

Digoksigenin-işaretli tamamlayıcı RNA kullanımı in vitro transkripsiyon reaksiyonu ile sentezlenmiş ve dsDNA prob'tan Dot blot analizi için güvenilir ve duyarlı olduğu özellikle örneklerin toplu tarama için kanıtlanmıştır, ancak yaygın olarak kullanılmamaktadır (Hadidi ve Yang 1990, Vaira vd. 2002, Anfoka ve Abhary 2007, Velasco vd. 2008). Louro vd. (2000) ve Vaira vd. (2002) bu virüsleri laboratuvar koşullarında dot-blot hibridizasyon yöntemi ve RT-PCR çalışmaları ile ayıt etmenin mümkün olduğunu belirtmişlerdir.

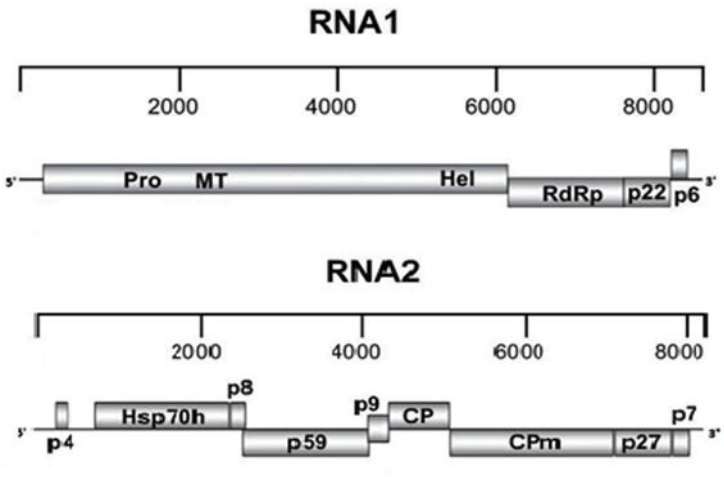
Geleneksel RT-PCR domates C*rinivirus* teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. ToCV spesifik primerler ısı şok proteini homolog geni veya kılıf protein geni için geliştirilmiştir (Tiberini vd. 2010). Virüsün saptanması daha çok moleküler çalışmalar (RT-PCR) ile mümkün olabilmektedir. Çok kısa sürede ve güvenilir bir şekilde saptanabilirliği ile ilgili olarak Hirota ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada birçok izolatı tanıyabilen ve çoğaltabilen (ToCV-CF: GTG TCA GGC CAT TGT AAA CCA AG ve (ToCV-CR: CAC AAA GCG TTT CTT TTC ATA AGC AGG) primer çiftini kullanarak doğal olarak beyazsinekle bulaşık bitkilerde ToCV'ye ait genin 360-bp'lik fragmentini çoğaltmışlardır. ToCV'ye spesifik primerler kullanarak elde ettikleri 493 bp'lik DNA ürünlerinden elde ettikleri dizilimleri Gen bankası verileriyle karşılaştırdıklarında etmenin ToCV ile % 99 oranında benzerlik gösterdiğini ortaya

koymuşlardır. Bu çalışmalar sonrasında bir Digoxigenin-DNA probu üretmişler ve dot-blot hibridizasyon yönteminde kullanmışlardır. Hem PCR ve hem de dot-blot hibridizasyon yönteminin araziden toplanan örneklerde virüsün saptanmasında hızlı ve güvenilir yöntem olduklarını bildirmişlerdir (Louro vd. 2000).

2.8 ToCV Genomunun Tanımlanması

ToCV, yaklaşık 800-850 nm uzunluğundan oluşan, iki parçalı genomlu (+) RNA (Wintermantel vd. 2005) genoma sahiptir (Lui 2000). RNA 1 virüs replikasyonu (Karasev 2000, Wintermantel vd. 2005) ile bağlantılı proteinleri kodlayan büyük dört açık okuma çerçevesini (ORF) kodlar. RNA 1 Proteaz, metiltransferez ve helikaz protease, (methyltransferase, and helicase, PRO-MT-HeL) domain, RNA'ya bağlı RNA polimeraz (RNA dependent RNA polymerase, RdRp), varsayımsal (putative) bir protein ve transmembran domain ile varsayımsal bir protein kodlamaktadır. Bu dört ORF ek olarak RNA1 bir 5'-çevrilmemiş bölümü (UTR) ve 3'-UTR içermektedir (Wintermantel vd. 2005) (Şekil 2.2). RNA 1'de kodlanmış p22 proteini etkili bir gen susturma baskılayıcısıdır. Bundan başka RNA 2'de kodlanmış kılıf protein (CP) ile küçük kılıf protein (CPm) genleri de gen susturması baskılama özelliğine sahiptir (Canizares vd. 2008).

RNA 2 kapsitlenme, hücreden hücreye hareket ve beyazsineklerle taşınma da dahil olmak üzere çok sayıda işlevler yüklenen proteinleri kodlayan dokuz ORF kadar kodlamaktadır (Zinovkin vd. 1999, Alzhanova vd. 2000, 2001) (Şekil 2.2). Her iki RNA molekülü uzun ve bükümlü viryonlar içinde ayrı olarak kapsitlenmiştir. RNA 2 bir ısı şok protein 70 homologu (Hsp70h), 59 kDa'luk protein, büyük (CP) ve küçük kılıf proteini (CPm) ile dokuz ORF içermesiyle tipik bir *Closteroviridae* bireyidir. Dokuz ORF potansiyel p4 (ORF1), Hsp70h (ORF2), p8 (ORF3), p59 (ORF4), p9 (ORF5), CP (ORF6), CPm (ORF7), p27 (ORF8), ve p7 (ORF9)'den ibarettir (Peremyslov vd. 1999, Louro vd. 2000, Lozano vd. 2006) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Domates kloroz virüs'ün genom organizasyonunun şematik gösterimi

Dikdörtgenler açık okuma çerçevelerini (ORF) temsil etmektedir. CP, kılıf protein; CPm, küçük kılıf protein; HSP70h, Isı şok proteini 70 homologu; Hel, Helikaz; MT, Metil transferaz; Pro, Proteinaz; RdRp, RNA'ya bağlı RNA polimeraz.

ToCV ve diğer *Crinivirüs*'ler arasındaki benzerlikler belirlenmiştir. ToCV genetik olarak *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV) (Wintermantel vd. 2005, Navas-Castillo vd. 2000), *Sweet patato chlorotic stunt virus* (SPCSV) ve *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) ile benzerlik göstermektedir (Lozano vd. 2006).

ToCV'nin tam genom analizi günümüze kadar yalnızca ABD (Wintermantel vd. 2005), İspanya (Lozano vd. 2006), Yunanistan (Kataya vd. 2008), Brezilya (Albuquerque vd. 2013) Çin **(**Zhao vd. 2014) ve Guney Kore (Lee vd. 2014) izolatları için yapılmıştır. Yapılan filogenetik çalışmalar Yunanistan izolatının ABD ve İspanya izolatları, Çin izolatının Florida izolatı, Brezilya izolatının da Yunanistan izolatı ile oldukça benzer olduğunu ortaya koymuştur (Jacquemond vd. 2009).

2.9 ToCV'nin Kontrolü

ToCV'nin kontrolünün beyazsinek mücadelesiyle gerçekleştirilebileceği rapor edilmiştir. Özellikle vektör böceklerde insektisit dayanıklılığı göz önünde bulundurulunca, mücadele şekillerinde alternatif yollar aranmaktadır (Anonymous

2000). Biyolojik ajan olarak *Encarsia formosa* (parazitik eşek arısı) *T. vaporariorum*'a karşı kullanılmaktadır. Ancak bu ajan *B. tabaci*'de aynı oranda etkili değildir. Bu nedenle *B. tabaci* eradikasyonunda *T. vaporariorum* için kullanılandan daha fazla biyolojik ajan kullanmak gerekmektedir. *Delphastus pusillus B. tabaci*'ye karşı oldukça etkilidir (Anonymous 2000). Bunların yanında ekim alanlarının etrafında bulunan vektör böceklerin taşınmasını sağlayabilecek ve virüsün doğal konukçusu olabilecek bitkiler yok edilmelidir. Ayrıca fidelikler gerek üretim aşamasında, gerekse nakil aşamasında enfeksiyondan uzak tutulmalıdır. Çünkü henüz ToCV'ye dayanıklı ticari çeşitler geliştirilmemiştir (Navas-Castillo vd. 2000).

Dayanıklı çeşit konusunda yeteri kadar bilgi bulunmamaktadır. Ancak dayanıklı çeşit geliştirmek için çeşitli çalışmalar yapılmaya çalışılsa da, dayanıklı çeşit sayısı çok sınırlıdır ve bunun için bazı yabani çeşitler önerilmektedir (García-Cano vd. 2010).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Örnek alma

Çalışma materyalini daha önce bir TÜBİTAK (111O025) projesi çerçevesinde Antalya'da örtü altı (cam ve plastik sera) domates yetiştiriciliğinin en yoğun olarak yapıldığı Kumluca, Kaş, Serik, Merkez ve Demre ilçelerindeki (5 izolat) seralardan ToCV ile enfekteli olduğu RT-PCR ile saptanmış domates yaprakları oluşturmuştur. Enfekteli bu yapraklar toplandıktan sonra numaralandırılıp etiketlenerek, buz kutusu içerisinde laboratuvara getirilmiş ve -80 ºC'deki derin dondurucularda muhafaza edilmiştir.

Laboratuvar çalışmaları Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarları'nda yapılmıştır. Seçilen bu beş örnek ile yeni primerler düzenlenerek doğrudan moleküler çalışmalar yapılmış ve DNA sekans sonuçları ile ToCV virüsüne ait protein kılıfının tam geninin analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.1.2 Total RNA izolasyonu

RNA izolasyon çalışmaları, PureLink® RNA Mini Kit (ambion® Thermofisher Scientific) kullanılarak yürütülmüştür. PureLink® RNA Mini Kit'inde Lysis Buffer (liziz tamponu), Wash Buffer I (yıkama tamponu I), Wash Buffer II (yıkama tamponu II), RNase-Free Water (RNase-içermeyen su), Spin Cartridges (koleksiyon tüp ile), koleksiyon tüpler ve kurtarma tüpleri yer almaktadır.

Total RNA izolasyonu işleminde kit içinde mevcut olan tüpler dışında havan ve havan eli, eppendorf tüpleri, ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları, Eppendorf centrifuge

(5427 R, US) kullanılmıştır. Tüm malzemeler (RNA izolasyon ve RT-PCR için kullanılacak) öncede diethylpyrocarbonate (DEPC) ile muamele edilmiştir. DEPC ile muamele edilmiş saf malzemeleri deterjan etkisinin kırılması amacıyla 121 ^{o}C'de 20 dakika otoklav edilmiş, sonrasında 80 ^{o}C'da fırında kurutulmuştur. Bu malzemeler kullanılıncaya kadar özel bir dolapta muhafaza edilmiş ve yalnızca RNase ve DNase'den ari polvinil eldivenler ile dokunulmuştur.

Total RNA izolasyonu çalışmaları sonucunda elde edilen farklı izolatlara ait RNA'ların miktarları ve saflıkları, BioSpec-Nano Spectrophotometer (Shimadzu Scientific for Life Science) yardım ile OD260/280 ve OD 260/230 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Elde edilen RNA'lar % 1'lik agaroz jelde 45 dk saat 80 W yürütülerek UV ışık altında görünür hale getirilerek gözlemlenmiştir.

3.1.3 RT-PCR çalışmaları

Total RNA ekstraksiyonu çalışmaları sonunda, ToCV ile infekteli bitkilerden elde edilen total RNA ekstraktları, RT-PCR çalışmalarında materyal olarak kullanılmıştır.

RT-PCR çalışmaları, 200 µl'lik PCR eppendorf tüpleri, saf su (dH_2O), pipet, steril pipet uçları, izolatlara ait RNA'ların çoğaltılması amacıyla komplementer (tamamlayıcı) DNA'e (cDNA) dönüştürülmesi için kullanılan Moloney murine leukaemia virus Reverse Transcriptase enzimi (M-MLV, stok 200 u/µl Thermo scientific, EP0441), cDNA'in çoğaltılması amacıyla gerekli yüksek sıcaklığa dayanıklı (termostabil) DNA polimeraz enzimi (*Taq* polimeraz, stok 5 u/µl Thermo scientific, EP0402), RNAse inhibitörü (stok 40 u/µl Thermo scientific, EO0381), $MgCl_2$ (stok 25 mM), *Taq* DNA Polymerase PCR Buffer (10X Thermo scientific, 18067-017) ve Deoksinükleotid trifosfat dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP dNTP Mix (10 mM each Thermo scientific, R0192) kullanılarak yapılmıştır.

Primerler ise bu araştırmada tasarlandığı ToCV kılıf protein geni için virüs spesifik oligonükleotid primerleri kullanarak RNA'nın hedef bölgesi çoğaltılmıştır. Virüs

genomu üzerinde hedef bölgelerin çoğaltılması işleminde gerekli sıcaklıklar, VERITI (Applied Biosystem) marka PCR aleti kullanılarak sağlanmıştır.

3.1.4 Agaroz jel elektroforez çalışmaları

Agaroz jel elektroforez çalışmalarında çalışma konusu virüslere ait toplam RNA ile RT-PCR çalışmaları sonucunda elde edilen PCR ürünleri materyal olarak kullanılmıştır. Agaroz jel elektroforez işleminde, agaroz (Biobasic Inc. Agarose A, D0012), Nükleik asit boyama amacıyla kullanılan Red safe (Intron Bio. 2114), TAE tampon çözeltiler, Elektroforez cihazı (Cleaver Scientific, MP-300) ve güç kaynağı kullanarak işlem gerçekleşmiştir.

RT- PCR ürünlerinin molekül ağırlıklarının kontrolü için kullanılan 1 kb DNA marker (0,5 ug/ml GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241) Thermo Scientific firmasından temin edilmiştir. Elektroforez işleminden sonra ise ChemiDoc XRS+ system UV ışık kaynağı (UVP Ultraviolet Transilluminator) ve Image Lab yazılımı kullanılarak sonuçlar kontrol edilmiştir.

3.1.5 DNA saflaştırılması

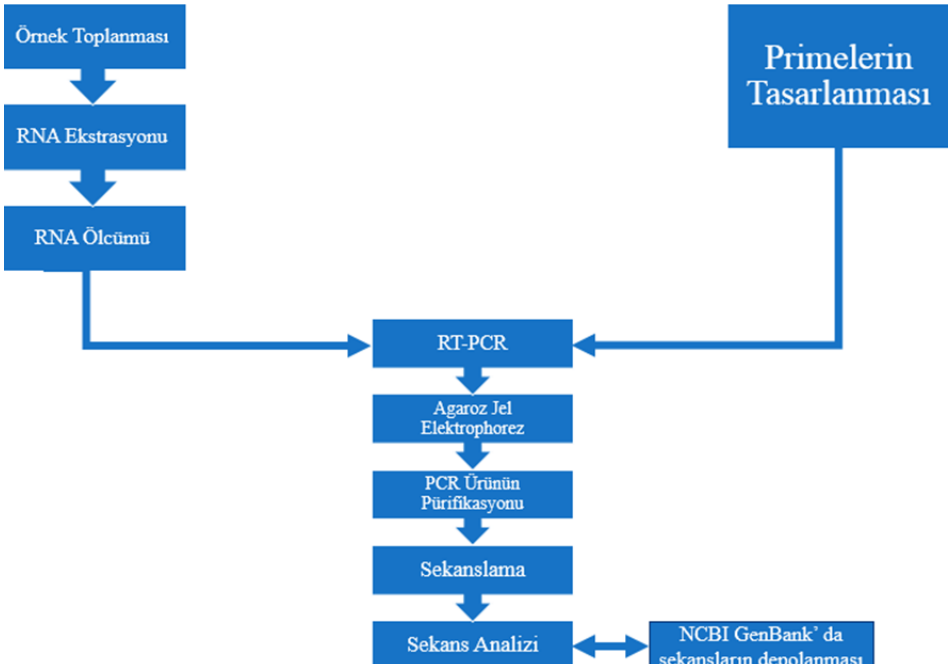
DNA saflaştırılması çalışmalarında ToCV'ye ait toplam RNA ile RT-PCR çalışmaları sonucunda elde edilen PCR ürünleri materyal olarak kullanılmıştır.

Elde edilen PCR ürünün varlığının agaroz jelde teyit edilmesinden sonra, PCR ürünü GeneJET gel extraction kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak, firmanın talimatlarına uygun olarak saflaştırılmıştır. GeneJET Jel Ekstraksiyon Kiti TAE veya TBE buffer olan standart veya düşük erime noktası agaroz jelden hızlı ve etkili DNA fragmanlarının saflaştırması için kullanılmaktadır. Kit özel silika esaslı membran teknolojisi uygun bir spin kolon şeklinde kullanmaktadır. Kitin içinde Binding Buffer

(bağlanma tamponu), Wash Buffer (yıkama tamponu), Elution Buffer (elüsyon tamponu) ve GeneJET Purification kolonlar ve tüpler yer almaktadır.

3.2 Yöntem

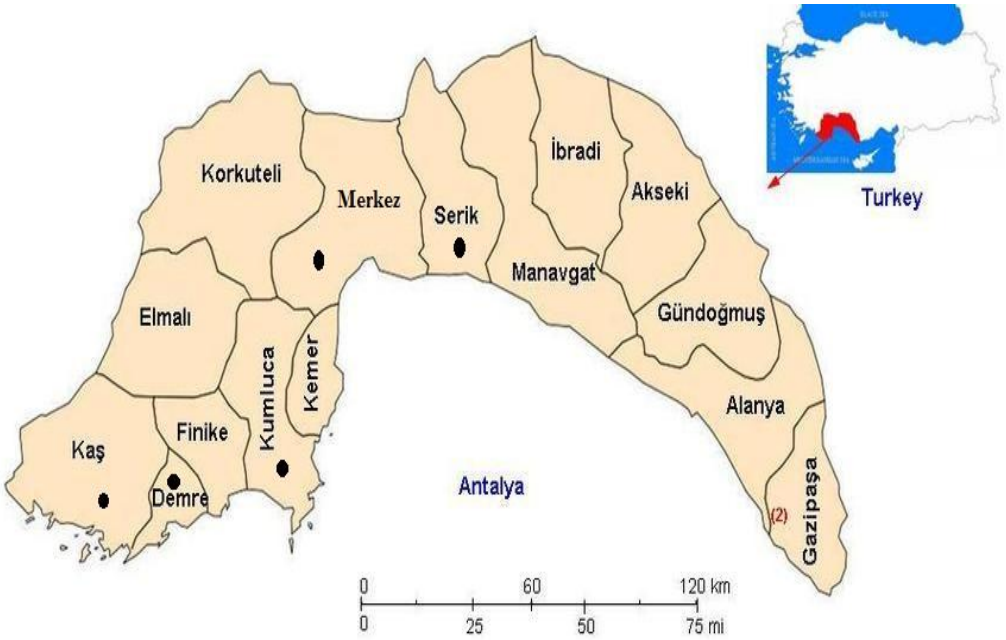
Bu çalışmada izlenen yollar şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1 Çalışmada izlenen yollar

3.2.1 Örnek alma

Bu çalışmada; TÜBİTAK (111O025 No'lu Antalya İlinde Seralarda Yetiştirilen Domateslerde Görülen Önemli Bazı Domates Virüslerinin Tespiti Üzerinde Araştırmalar) projesi kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen ToCV ile enfekteli olduğu bilinen domates yaprak örnekleri kullanılmıştır. Örnekler Antalya'da sera domates yetiştiriciliğinin en yoğun olarak yapıldığı Kumluca, Kaş, Serik, Merkez ve Demre ilçelerindeki (5 izolat) seralardan alınmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Antalya ili haritası (http://magnificentturkey.weebly.com/ 2015)

Harita üzerinde siyah noktalar Antalya'da örnekleme yerlerini göstermektedir.

Tez çalışması için 5 örnek seçilerek ilçelere ve bitkilere göre kodlanmış ve moleküler çalışmalarda izolat olarak kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan bitkisel materyal ve illere göre kodları

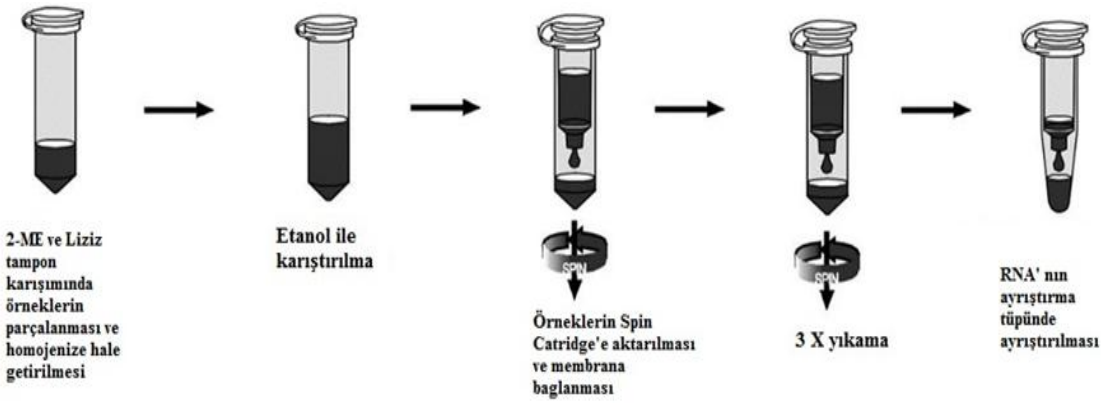
Alındığı yer	Kodu
Serik	1
Merkez	2
Demre	3
Kaş	4
Kumluca	5

3.2.2 RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonları, PureLink® RNA Mini Kit kullanarak firmanın önerileri izeleyerek aşağıdaki şekilde yürütülmüştür:

- -80 °C'de depolanmış 0,2 g ToCV ile enfekteli yaprak dokusu alınmıştır.
- Enfekteli yapraklar -20 °C'ye kadar gelinceye kadar bekletilmiştir.
- Soğuk odada steril havanlarda havan ve havan eli yardımı ile 0,2 g yaprak örneklerine sıvı azot eklenip ezilmiştir.
- Liziz tamponu parçalanmış örneklerin üzerine ilave edilmiştir. Her 2 ml tampon için, 20 µl 2-merkaptoetanol eklenmiştir.
- Örnek ve tampon karışımı daha sonra oda sıcaklığında 2 ml'lik bir Eppendorf tüpüne aktarılmış ve karışımı homojen hale getirmek için 5 dakika vorteks yardımı ile karıştırılmıştır.
- Bundan sonra karışım 12000 x g'de 5 dakika oda sıcaklığıda santrifüj edilmiştir.
- Sıvı faz (supernatant) RNase içermeyen tüplere (RNAse free tube) aktarılmış ve soğuk % 98'lük etil alkol (EtOH) ilave edilip 5 dakika karışımın çökelmesi için vorteks ile karıştırılmıştır.
- Sonrasında 700 µl süpernatant alınıp koleksiyon tüpü olan bir spin cartridge'ye aktarılmıştır.
- Daha sonra oda sıcaklığında 15 saniye 12000 x g'de santrifüj edilmiştir. Süzüntü atılmış ve Spin cartridge aynı koleksiyon tüp içine aktarılmıştır.
- Tüm örnekler bitene kadar iki yukarıdaki asama 4 kere tekrarlanmıştır.
- Sonrasında 700 µl yıkama Tamponu I Spin cartridge'e eklenmiştir.
- Oda sıcaklığında 15 saniye 12000 x g'de santrifüj edildikten sonra süzüntü ve koleksiyon tüpü atılmıştır. Spin cartridge yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirilmiştir.
- 500 µl hazırlanmış olan etanol-yıkama tamponu II (ethanol+wash buffer II) karışım Spin cartridge'e ilave edilip oda sıcaklığında 15 saniye 12000 x g'de santrifüj edilmiştir. Süzüntü atılmış ve Spin cartridge aynı koleksiyon tüp içine yerleştirilmiştir.
- Yukarıdaki aşama bir kez tekrarlanmıştır.

- Membrana bağlanmış RNA'yı kurtarmak için spin cartridge oda sıcaklığında 1 dakika 12000 x g'de santrifüj edilmiştir. Sonra koleksiyon tüpü atılmış ve Spin cartridge kurtarma tüpüne yerleştirilmiştir.
- 100 µl RNase içermeyen su (RNAse-free water) spin cartridge ortasına ilave edilip 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Membrandan RNA'nın ayrıştırması için spin cartidge tüpü ile oda sıcaklığında 12000 x g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- İzolasyonundan sonra kullanılacak olan saflaştırılmış RNA birkaç saat buz üzerinde tutulmuştur.
- Daha sonra kullanacak saflaştırılmış RNA -80 °C'de saklanmıştır.



Şekil 3.3 RNA izolasyonu sırasında izlenen aşamalar

3.2.2.3 Nanodrop'ta RNA ölçülmesi

RT-PCR'da kullanmadan önce RNA'nın saflığını ve konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla RNA ekstreleri Nanodrop'ta ölçülmüştür. Çünkü PCR'ın düzgün çalışması için iyi saflaştırılmış ve yüksek RNA konsantrasyonu gerekli olmaktadır.

BioSpec-Nano Spectrofotometrede izole edilen RNA'ların OD 260/230 nm ve OD 260/280 nm değerleri ölçülmüştür. Ekstraksyon kitten gelen RNAse free water (bu RNA ekstratlarını seyreltmek için kullanılmıştır) kör (blank) olarak cihazda

okutulmuştur. Sonrasında her örnek için 1 µl RNA örneği cihazda okunmuştur. Her okumadan sonra çapraz kontaminasyonu engellemek için cihaz otomatik olarak temizlenmiştir. NanoDrop'a bağlı olan bilgisayara RNA saflığı ve konsantrasyonları kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar kaydedilmiş ve PCR sırasında bu sonuçlar göz önünde bulundurulmuştur.

3.2.3 Primer tasarlaması

NCBI Gen Bankası veri tabanından 5 tam RNA 2 ToCV izolatı seçilmiştir. Dizileri Molecular Evolutionary Genetics Analysis, MEGA 6.0 yazılımı (Tamura vd. 2013) kullanılarak sıralanmıştır. Kullanılan izolatlar çizelge 3.2'de gösterilmiştir. Spesifik primerler tam virüs kılıf protein genini çoğaltmak amacıyla tasarlanmıştır. Primerler hem PCR çoğaltma, hem de DNA dizilemesi için kullanılmıştır. Primerler aşağıdaki kriterlere göre düzenlenmiştir.

Primerlerin GC içeriği % 50 ve % 60 arasında olmalıdır. Erime sıcaklığı (melting temperature, TM) yazılım tarafından oluşturulmuştur. İdeal TM yaklaşık 60 ve 65 ^{o}C arasında yer almaktadır. Her bir PCR reaksiyonu için forward ve reverse primerler aşağı yukarı aynı TM'ye sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. Primerlerin uzunluğu 18-22 bp olarak ayarlanmış ve bağlanma sıcaklığını kolay hesaplamak için forward ve reverse primerlerin arasındaki erime sıcaklığı 2 ^{o}C'den daha az olacak şekilde düzenlenmiştir. Primerler National Centre for Biotechnology Information'dan primer tasarımı aracını kullanarak herhangi bir ikincil yapının (secondary structure) oluşumunu önlemek için dikkatli seçilmiştir. Primerler primer-primer etkileşimleri (self-complementarity) en aza indirmek için dikkatli bir şekilde analiz edilmiştir. İki çift primerler RT-PCR'da farklı boyutlar olan amplikonlar oluşturmak ve agaroz jel elektroforez ile kolayca ayırt edilebilmek için seçilmiştir. Virüsün kılıf protein geni uzun olduğu için (774 bp) iki primer çifti tasarlanmıştır. Her primer seti kılıf proteininin bir kısmını çoğaltacak ve elde edilecek sekansları birleştirecek şekilde tasarlanmıştır. Seçilen primerler CP1-F ve CP1-R primer set 1 ve CP2-F ve CP2-R primer set 2 olarak etiketlenmiştir. Primerler yine Primer Express yazılımı v 3.0.1 ile test edilmiştir.

Çizelge 3.2 Primer tasarlamak için NCBI veri tabanından seçilen tam uzunlukta ToCV RNA 2 izolatları

Accession number	İzolat	Kaynaklar
DQ136146	İspanya	Lozano vd. (2006)
KP137101	Güney Kore	Lee vd. (2014)
NC_007341	ABD	Wintermantel vd. (2005)
JQ952601	Brezilya	Albuquerque vd. (2013)
KC709510	Çin	Zhu vd. (2013)

3.2.4 Primerlerin sentezi

Bu çalışmada tasarlanan primerler IONTEK (İstanbul) firmasına sentezlettirilmiştir. Primerler firmanın bildirdiği pmol değeri dikkate alınarak 25 µM çalışma konsantrasyonu olacak şekilde steril saf su ile sulandırılmıştır.

3.2.5 RT- PCR çalışmaları

Bu çalışmada One-step RT-PCR (tek aşamalı RT-PCR) yöntemi yapılmıştır. RT-PCR çalışmaları 200 µl'lik PCR eppendorf tüplerinde yapılmıştır. RT-PCR işlemi toplam RNA ekstrasiyonu çalışmaları sonunda elde edilen virüs RNA'sı üzerindeki belirli bölgelere karşı dizayn edilen spesifik primerler kullanılarak ve uygun koşullar altında çoğaltılma amacıyla yapılmıştır.

Çizelge 3.3 Genlerin çoğaltılmasında kullanılan primerler

Primer adı	Sekans (5'->3')	Ürünün uzunluğu
CP1-F	CGGGTGACGGAAAGTAGGTC	796
CP1-R	AGCGTTTGGAACATCGGACA	
CP2-F	ATCGGTGAAACCCCGATGAC	574
CP2-R	CCGGAACCCAAAGTCACAGT	

Çizelge 3.4 RT-PCR'da kullanılan kimyasallar ve miktarları

Bileşenler	Final conc.	1 X
H_2O	-	14.3 µl
Buffer	1X	2.5 µl
dNTP	0.15 µM	1.5 µl
$MgCl_2$	3 mM	3 µl
Forward Primer	1 µM	1 µl
Reverse Primer	1 µM	1 µl
Taq polimerase	1 u/µl	0.2 µl
Reverse transcriptase	20 u/µl	0.1 µl
RNase inhibitor	4 u/µl	0.4 µl
RNA	≤ 50 ng	1 µl
Toplam		**25 µl**

3.2.6 PCR döngü programı

RT-PCR bileşenleri karıştırıldıktan sonra tüpler çizelge 3.5'de görülen sıcaklıklar doğrultusunda ayarlanmış PCR aletine yerleştirilerek PCR aşaması tamamlanmıştır. RT-PCR yöntemi ile tanılanması amacıyla bir kaç kez sıcaklıklar denerek ayarlanmıştır. En uygun koşullar seçilmiş ve son çalışmada uygulanmıştır. Genellikle bağlanma sıcaklığı primerlerin TM'sinin altındadır. Bu çalışmada birkaç deneme yaptıktan sonra non-spesifik band çıkmasının engellemesi için en uygun bağlanma sıcaklığı 60 ^{o}C olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.5 Örneklere uygulanan thermocycler programı

Basamak	Sıcaklıklar	Zaman	
Reverse transkription	42 °C	60 dk	
Ön-Denatürasyon	94 °C	2 dk	
Denatürasyon	94 °C	30 s	40 döngü
Bağlanma	60 °C	1 dk	
Uzama	72 °C	1 dk	
Final uzama	72 °C	10 dk	
Cooling	4 °C	∞	

RT-PCR çalışmalarının sonunda çoğaltılan DNA (RT-PR ürünü) agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak gözlenmiştir.

3.2.7 Jel Elektoforez

- PCR ürünlerinin büyüklüğüne bağlı olarak 100 ml TAE içerisine 1 g agaroz konularak % 1'lik agaroz hazırlanmıştır.
- Agaroz-TAE karışımı, eriyinceye kadar bir mikrodalga fırın içerisinde ısıtılmıştır.
- Karışım bir süre soğumaya bırakıldıktan sonra ve 1 µl Red safe ilave ederek karıştırmıştır.
- Jel tepsisi içine tarakların varlığında sıvı agaroz eklenmiştir. Jel katılaştıktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkartılmıştır.
- Daha sonra jelin üzerini 1-2 mm kadar kaplayıncaya kadar tank içerisine TAE tamponu ilave edilmiştir.
- 1 X olacak şekilde 3 µl örnek, 7 µl dH_2O, 2 µl Loading Dye karıştırılmış ve jeldeki kuyulara 12 µl dikkatli bir şekilde yüklenmiştir. İki primer setinin ortasındaki kuyuya 3 µl 100 bp DNA Ladder ilave edilmiştir.
- Yükleme tamponundaki mavi renk jelin sonuna gelene kadar jel tankına 100 V elektrik akımı verilmiş ve 45 dakika çalıştırmıştır.

- Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra UV transilluminatör sistemi ile görünür hale getirilmiş ve bilgisayardaki yazılım görüntüler kaydedilmiştir.

3.2.8 Jelden PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Purifikasyon işlemi başlamadan önce yıkama tamponuna % 96'lik etanol ilave ederek karıştırılmıştır. Tüm saflaştırma işlemleri oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada izlenen basamaklar sırayla;

- DNA'nın zarar görmemesi için işlemler düşük UV ışık altında gerçekleştirilmiştir. Bantın olduğu yerdeki DNA bölgesi temiz bir bisturi kullanılarak kesilmiştir. Önce tartılmış bir 1,5 ml Eppendorflara aktarılıp yeniden tartılmıştır. Jel diliminin ağırlığı kaydedilmiştir.
- Tartılmış DNA ürününe bağlanma tamponu 1:1 olarak (hacim: ağırlık, % 1 agarose için 100 mg jel: 100 µl buffer) ilave ederek çözülene kadar 50-60 °C'de 10 dakika jel inkübe edilmiştir. Karışımın rengi sarıdır.
- Arada eritme işlemini kolaylaştırmak ve jelin tamamen çözülmesi amacıyla el ile tüpler birkaç kez tersine çevrilmiştir. Kolona yüklenmeden önce tüpler vortex ile karıştırılmıştır.
- Renk sarı ise DNA doğru pH'dadır (pH 5,2). Eğer renk portakal sarısı veya mora dönmüşse 3 M 10 µl sodyum asetat ilave edilerek doğru PH'ya ulaşılmıştır.
- 800 µl çözünmüş jel purifikasyon kolonuna yüklenmiş ve 1 dakika 12000 x g'de santrifüj edilmiştir. Çökelti (koleksiyon tüpündeki) atılmış ve tekrar kolon tüpe yerleştirilmiştir.
- 100 µl bağlanma tamponu kolona eklenip 1 dakika santrifüj edilmiştir. Çökelti (koleksiyon tüpündeki) atılmış ve yeniden kolon koleksiyon tüpe yerleştirilmiştir.
- 700 µl etanol ve yıkama tamponu karışımı kolona eklenmiş ve 1 dakika 12000 x g'de santrifüj edilmiştir. Çökelti atılmış ve yeniden kolon koleksiyon tüpüne yerleştirilmiştir.

- Kalan yıkama tamponunu tamamiyle gidermek için saflaştırma kolonu 1 dakika 12000 x g'de bir kez daha santrifuj edilmiştir.
- Saflaştırma kolonu temiz 1,5 ml'lik Eppendorf'a yerleştirilmiş, saflaştırma kolon membranının merkezine 50 µl elüsyon tamponu eklenmiş ve 1 dak santrifüj edilmiştir.
- Kolon çöpe atılmış ve çökelti (saflaştırılmış DNA) -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.9 Saflaştırılmış PCR ürünlerinin dizilenmesi

Saflaştırılmış PCR ürünleri firmaya (REFGEN Biyoteknoloji, ANKARA) jel görüntüleri elde edildikten sonra en az 100 ng /ml olacak şekilde gönderilmiştir. Çift yönlü okuma yapılacağı için her bir primer çiftinden 5 pmol konsantrasyonda 10'ar µl hazırlanarak gönderilmiştir.

3.3 Veritabanları, Yazılımlar ve Bilişimsel Dizinin Analizi

3.3.1 Hizalama ve Dizinin Düzenlemesi

Kromatogram dosyasını kontrol etmek için diziler Chromas Lite v 2.1 (2012) kullanılarak düzeltilmiştir. Çakışan diziler daha sonra çoklu sıralama sonuçlarından konsensus dizileri oluşturmak için MEGA 6.0 (Tamura vd. 2013) kullanılarak birleştirilmiştir. Düzenlenen sekanslar Gen Bankasında online BLASTn programı (Altschul vd. 1997) kullanılarak analiz edilmiştir.

3.3.2 ORF Analizi

Tam sekans ürünü, ORF'leri belirlemek için NCBI ORF finder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/ 2015) kullanılarak analiz edilmiştir. Varsayılan ayarlar minimum 20 aminoasitlik bir büyüklükle bütün ORF'leri göstermiştir. ToCV ORF'sini tanımlamak için belirlenmiş ORF bilinen/tanımlanmış bir ToCV'nin ORF'si (accession number NC_007341) ile kıyaslanmıştır.

3.3.3 Protein Familya Sınıflandırması

Kılıf protein familyası NCBI CD- Search (searched: CDD v3.03–42251 PSSMs) (Marchler-Bauer ve Bryant 2004), PSI-BLAST (Altschul vd. 1997) ve Pfam (Bateman vd. 2002) adlı 3 programın kombinasyonuyla çalışılmıştır. CD-Search bir protein sorgusu kullanılarak önceden hazırlanmış pozisyona özgü puanlama matrislerinin (position specific scoring matrices, PSSMs) bir setini taramak için RPS-BLAST'ı (Reverse-PSI-BLAST; PSI-BLAST'ın bir varyantı) kullanan Conserved Domain Database'i (CDD) araştırmak için bir NCBI arayüzüdür. PSI-BLAST (position-specific-iterated BLAST) scoring matriksini inşa etmek amacıyla sekansı sorgulamak için başlangıçtaki eşleşmeleri kullanır ve uzak homologları belirlemek için tekrarlı bir araştırma yöntemi ile matrikse, ek eşleşmeleri ekler. Pfam HMM (Hidden Markov Modeli)-temelli araştırma yardımıyla protein familyasını tayin eder. Kılıf proteinin ikincil yapısı ile proteinin fonksiyonu otomatik bir protein tahmin sunucusu olan I-TASSER (Roy vd. 2010, Yang vd. 2015) kullanılarak tahmin edilmiştir.

3.3.4 Sekans Hizalanması

DNA dizilerinin hizalanmasında yaygın olarak ClustalW kullanılmaktadır. Bu araştırmada da filogenetik analiz için MEGA 6.0 programı (Tamura vd. 2013) ile örneklerin nükleotid dizisi çift ve çok yönlü olarak hizalanmıştır. Hizalanan nükleotidler eşleşen kısımları görülecek şekilde nükleotidlere ait renk kodları ile belirlenmiştir.

Hizalama Mview programı (Brown vd. 1998) kullanılarak görüntülenmiştir. Dizinin benzerliği ve özdeşliği Sekans Kimlikleri ve Benzerlikleri sunucusu (SIAS http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html 2015) kullanılarak belirlenmiştir.

3.3.5 Filogenetik Analiz

ToCV izolatlarının dizileri NCBI veri tabanından alınmış ve Türkiye'deki izolatlar ile karşılaştırılmıştır. Diğer *Crinivirus* cins üyeleri ile de karşılaştırılma yapılmıştır. Dizi verileri ClustalW (Larkin vd. 2007) kullanılarak hizalanmıştır. Filogenetik ağaç Neighbour Joining algoritma varsayılan ayarlarında MEGA 6.0 (Tamura vd. 2013) kullanılarak oluşturulmuştur. Ağacın bootstrap analizi 1000 çoğaltması ile filogenetik ağaçların doğruluğu değerlendirilmiştir. Diziler hizalanması ve filogenetik analiz yapmak için GenBank veri tabanında kayıtlı dizilerden yararlanılmıştır (Çizelge 3.7). Elde edilen sekanslar NCBI, GenBank veri tabanına kayıt edilmiştir.

Çizelge 3.6 Filogenetik analizde yararlanan ToCV izolatları

Acession number	**ToCV İzolatı**	**Kaynaklar**
KC311375	Çin	Zhao vd. 2013
KP137101	Güney Kore	Lee vd. 2014
EU284744	Yunanistan	Kataya vd. 2008
NC_007341	ABD	Wintermantel vd. 2005
EU625350	Fransa	Jacquemond vd. 2009
DQ234673	Israil	Segev vd. 2004
AB513443	Japonya	Hirota vd. 2010
JQ952601	Brezilya	Albuquerque vd. 2013
DQ136146	İspanya	Lozano vd. 2006
FM2063821	Mauritius	Lett vd. 2008
Accession number	**Virüs**	**Kaynaklar**
AJ243000	CYSDV	Livieratos vd. 1999
AY422070	AYV	Liu ve Duffus 2003
NC_010561	BnYDV	Martin vd. 2008
AY330919	BPYV	Tzanetakis vd. 2003
GQ376201	DVCV	Tzanetakis vd. 2011
NC_012910	LCV	Salem vd. 2009
U15441	LIYV	Klaassen vd. 1994
AJ557129	PYVV	Livieratos vd. 2004
NC_005896	SPAV	Tzanetakis vd. 2004
KC888963	SPCSV	Qin vd. 2014
NC_013259	TICV	Wintermantel vd. 2009
NC_006963	BYVaV	Tzanetakis vd. 2006
M76485	CTV	Sekiya vd. 1991

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Örnek Alma

TÜBİTAK (111O025 No'lu Antalya İlinde Seralarda Yetiştirilen Domateslerde Görülen Önemli Bazı Domates Virüslerinin Tespiti Üzerinde Araştırmalar konulu) projesi kapsamında yapılan bir çalışmadan elde edilen -80 ^{o}C'de muhafaza edilen ToCV ile enfekte olduğu belirlenmiş olan yaprak örnekleri kullanılmıştır.

4.2 RNA İzolasyon Çalışmaları

4.2.1 Nanodrop'ta RNA ölçülmesi

Çizelge 4.1'de örneklerin ekstrakte edilen toplam RNA konsantrasyonu ve buna karşılık gelen optik yoğunluk değerleri (OD değerleri) görülmektedir. Konsantrasyon açısından, Kumluca örneği en yüksek (873,49 ng/ul) konsantrasyona sahip olurken, Serik örneği ise en düşük konsantrasyon değerinde (157,57 ng/ul) bulunmuştur. Sonuç olarak; 5 örnekte başarılı bir PCR yapmak için gerekli minimum konsantrasyona sahip bulunmuştur.

Çizelge 4.1 Kullanılan bitkisel materyale ait RNA miktar ve saflıkları

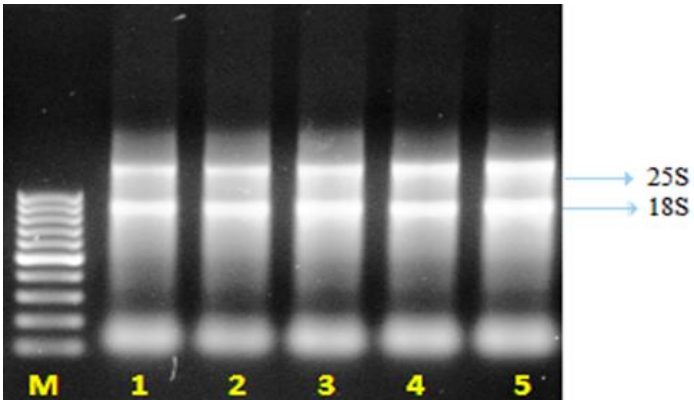
Örnek kodu	Aldığı yeri	Konsantrasyon (ng/µl)	OD 260/280	OD 260/230
1	Serik	157,57	2.14	1.89
2	Merkez	164,49	2.15	1.96
3	Demre	178,18	2.15	2.05
4	Kaş	264,21	2.15	2.01
5	Kumluca	873,49	2.17	2.07

RNA'lar kalite bakımından değerlendirildiğinde kaliteli RNA'ların saflığının (A260/A280) yaklaşık 2,0 civarında bulunması beklenmektedir. Tez kapsamında izolasyonları gerçekleştirilen RNA'ların saflık (A260/A280) oranları 2,14 - 2,17 arasında değişmiştir (Çizelge 4.1).

Saflık bakımından Serik örneği minimum değeri elde etmiş, Kumluca ise en yüksek değeri almıştır. Ancak 260/230 OD değerleri kabul edilebilir değerleri aralığında (2,2-2,0, Bustin ve Nolan, 2004) olmuştur. Kumluca en yüksek değeri 2,07 olarak alırken Merkez' in en düşük değeri 1,89 olmuştur.

4.2.2 RNA jel elektroforezi

RNA kalitesini daha da kesinleştirmek için izole edilmiş RNA'lar agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur. Yapılan agaroz jel çalışması sonucunda 2 farklı RNA bant profili tespit edilmiştir. Onlar beklenen 25S ve 18S rRNA bantlarıdır (Şekil 4.2). Bu araştırma sırasında RNA boyutu işaretleyici (marker) olmadığı için bantların tam boyutu belirlenememiştir. Ancak, iki rRNA bantının çarpıcı görüntüsü kaliteli veya parçalanmamış RNA'nın varlığını göstermiştir. Bu sonuçlara göre RNA kiti kullanılarak izole edilmiş RNA, RT-PCR ve PCR ürünlerinin sonraki sekanslanması için saf ve iyi olduğu görülmüştür.



Şekil 4.1 Agaroz jelde (%1) izole edilen total RNA örneklerinin görünümü

M: 100 bp marker; Örnekler: 1-5; 18s ve 25s rRNA bantları.

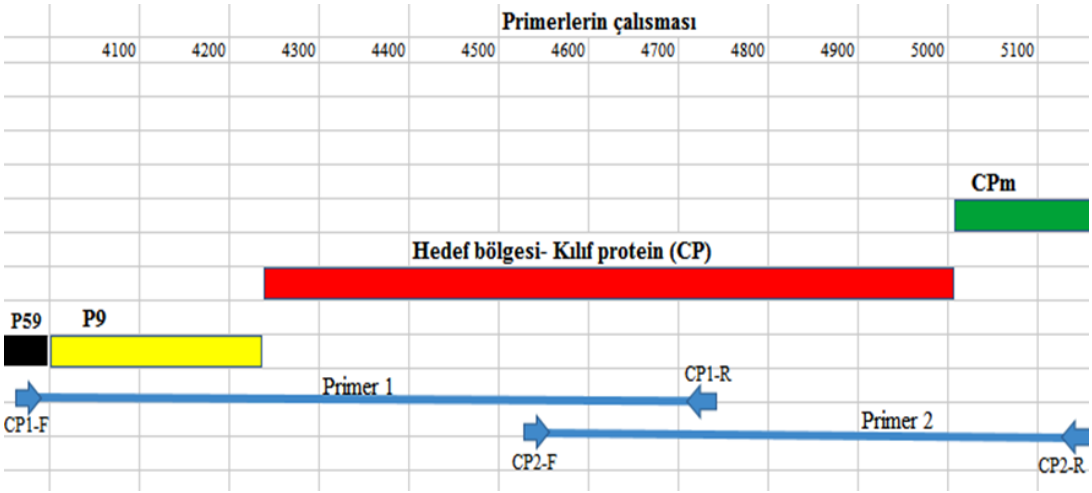
4.3 Primerlerin Tasarlanması

Primerler NCBI primer tasarım aracı kullanılarak tasarlanmış ve seçilmiştir. İki çift primer seti seçilmiştir. Primer 1 seti RNA 2'deki P59 bölgesinden başlayıp kılıf protein bölgesinde sona ermektedir. Primer 2 seti ise kılıf protein bölgesinden başlayıp kılıp protein minör (CPm) bölgesinde sona ermektedir. İki primer arasında 205 nükleotid örtüşmesi bulunmaktadır. Primerlerle ilgili detaylı bilgiler çizelge 4.2'de ve primerlerin şematik görünüşü ise şekil 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Tasarlanan primerlere ait bilgiler

	Primer 1	Uzunluk	Başlangıç	Bitiş	ES	%GC
Forward	CGGGTGACGGAAAGTAGGT	20	4041	4060	60.1	60
Reverse	AGCGTTTGGAACATCGGACA	20	4836	4817	60.2	50
	Ürünün uzunluğu	796				
	Primer 2	Uzunluk	Başlangıç	Bitiş	ES	%GC
Forward	ATCGGTGAAACCCCGATGAC	20	4630	4649	60.1	55
Reverse	CCGGAACCCAAAGTCACAG	20	5203	5184	60.1	55
	Ürünün uzunluğu	574				

ES: Erime sıcaklığı

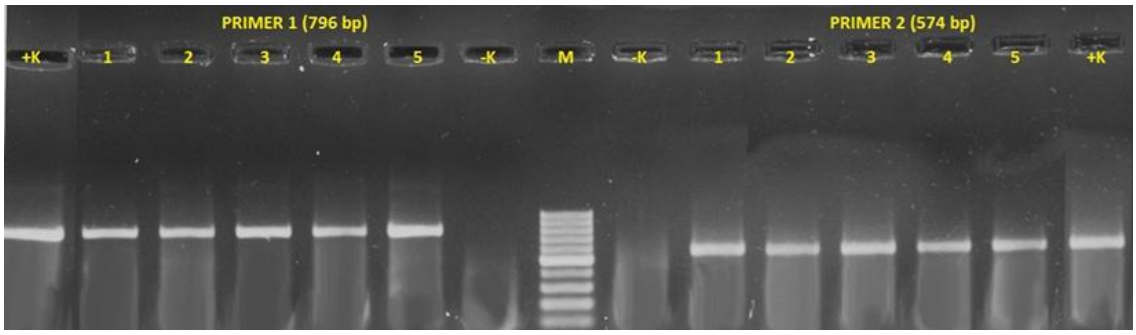


Şekil 4.2 Primerlerin çalışması

4.4 PCR Jel Görüntüleri

Günümüzde viroloji alanında yapılan çalışmalarda en yoğun şekilde kullanılan moleküler yöntemlerden biri olan RT-PCR yöntemi ToCV'nin saptanması amacıyla optimize edilmiş ve başarı ile kullanılmıştır.

DNA sekans analizleri için belirlenen 5 izolat ve aday genleri çoğaltacak primerler ile PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. RT-PCR sonucunda elde edilen PCR ürününün varlığı TAE tampon çözeltisinde hazırlanan % 1'lik agaroz jel elektroforez ile testlenmiştir. Yapılan koşum işlemi sonunda jel üzerinde hastalıklı bitkilerden elde edilen total RNA'lar gözlenmiştir. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi ile jelde beklenen 796 bp (primer 1 seti için) ve 574 bp (primer 2 seti için) DNA bandı gözlenmiştir. Negatif kontrolünde yapılan RT-PCR işleminde herhangi bir bant gözlenmemiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 PCR sonucunda elde edilen ToCV'ye ait agaroz jel görüntüsü.

M: 100 bp marker, 1 : Serik izolatı, 2 : Merkez izolatı, 3 : Demre izolatı, 4 : Kaş izolatı, 5 : Kumluca izolatı +K : pozitif kontrol, -K : negatif kontrol.

4.5 Sekansların Doğrulanması ve Birleştirilmesi

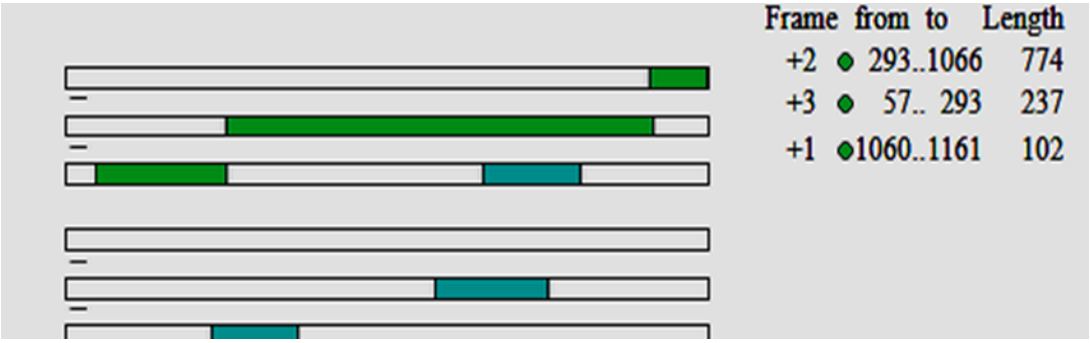
PCR ürünü temizleme ve dizileme yapıldıktan sonra elde edilen DNA dizileri önce Chromas Lite yazılım kullanarak chromatogram görüntülerine bakılmış ve DNA baser yazılımı ile yanlış çıkan diziler Primer F ve R ile çoğaltılan PCR sekans ürünlerinin nükleotid dizilimlerine ait her iki kromotogram görüntüleri olası sinyal hatalarına karşı

göz ile kontrol edilmiştir. Sekansların doğrulanmasından sonra primer 1 seti sonuçları (796 bp) ile primer 2 seti sonuclarını (574 bp) birleştirilmek icin MEGA 6.0 programı kullanılarak dizinin tam uzunluğu (1163 bp) belirlenmiştir.

4.6 Dizilimin Analizi

4.6.1 Dizilerin açıklaması

NCBI ORF Finder programı sekans içindeki ORF'leri belirlemek için kullanılmıştır ve elde edilen sonuçlar sekanslar içindeki genlerin başlangıç ve bitiş pozisyonlarını belirlemek için BLAST'ın kullanıldığı diğer ToCV ile kıyaslanmıştır. Serik izolatı şablon dizisi olarak kullanılmıştır. Elde edilen ORF'ler şekil 4.4'de genlerin başlangıç ve bitiş pozisyonları gösterilmiştir.



Şekil 4.4 Dizilenmiş bölgedeki açık okuma çerçeveleri

Çizelge 4.3 Dizilenmiş bölgeler ve karşılık gelen boyutları

Aralığı	Gen Büyüklüğü	Gen	Yorum
1 - 56	56	**P59**	Kısmı
57 -293	237	**P9**	Tam
293 - 1066	774	**CP**	Tam
1060 - 1163	103	**CPm**	Kısmı
1 – 1163	1163	**ToCV RNA 2virüs**	Kısmı

Sekanslarımız ToCV RNA 2 ile P59, P9, CP ve CPm pozisyonlarında sekans homolojisi göstermiştir. Bu potansiyel olarak 387 aminoasit için kodlanan 1163 nükleotidlik 4 gen'den ibaret sekanslanmış bölgeyi göstermektedir.

Tez kapsamında 5 domates kloroz virüs tüm DNA dizileri EK 2'de sunulmuştur. Bu araştırmada elde edilen tam izolat dizileri (1163 bp) GenBank'a (19.08.2015) gönderilmiştir.

Çizelge 4.4 Türkiye izolatları ve karşılık gelen accession numaraları

İzolat	Accession number
Serik	KT455046
Merkez	KT455047
Kumluca	KT455048
Demre	KT455049
Kaş	KT455050

4.6.2 Dizilerin kırpılması

Elde edilmiş 5 ToCV sekansı MEGA 6.0 kullanılarak hizalanmış ve kılıf proteinine (774 bp) kırpılmıştır. 257 aminoasit sekansı çevrilmiştir. Hem DNA ve hem de amino asit sekansları sonraki analizler için kullanılmıştır.

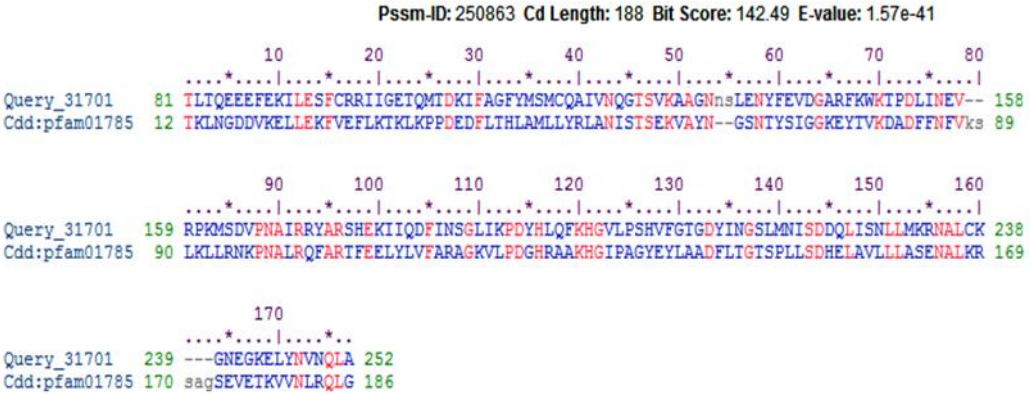
4.6.3 Kılıf protein familyasının tahmini

ToCV kılıf proteininin protein familyası üç program kombinasyonu kullanılarak tahmin edilmiştir. Protein sekansının kullanıldığı NCBI CD-Search ToCV'nin Closter_coat protein süperailesine (Pfam entry: pfam01785, accession no. cl03354) ait olduğunu ortaya koymuştur. Sekans hizalanması dikkatli bir şekilde araştırıldığında E-değeri 1.57e-41 ve bit değeri 142.49 olarak belirlenmiştir. Closter kılıf protein super ailesi

arasında ToCV en çok SPCSV'ye benzer olarak bulunmuştur. *Crinivirus* cinsinin bir kılıf proteini (GenBank: CDG34557; *Tomato chlorosis virus* Greece: Ileia) ile PSI-BLAST sekans isabeti (hit) (PSI-BLAST eşiği: 0.005 maksimum tekrarlar: 7; E-değeri: 1e-105; bit değeri: 318; hizalamada sekans kapsamı: % 100) gözlenmiştir. Sonra, Pfam-A üzerinde sekans bazlı sorgu NCBI CD-Search'ınkine benzer bir sonuç vermiştir. Bu HMM-bazlı araştırma 1.1e-38'lik bir E-değeri ile 132 bit değeri ile bir hizalama sağlamıştır.



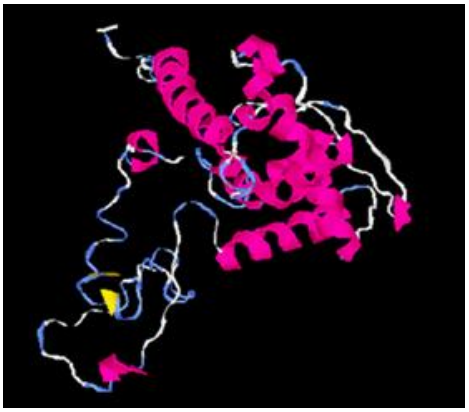
Şekil 4.5 Türkiye'deki ToCV aminoasit kılıf protein ve closter süper aile kılıf protein pozisyon hizalanması



Şekil 4.6 Türkiye'deki ToCV aminoasit kılıf protein ve closter süper familya kılıf protein aminoasit dizilerin hizalanması

4.6.4 İkincil yapının tahmin edilmesi

Tahmin edilen ToCV kılıf proteininin üçüncül yapısının 3D modeli şekil 4.7'de gösterilmiştir. Güven değeri -2,75 olmuştur.

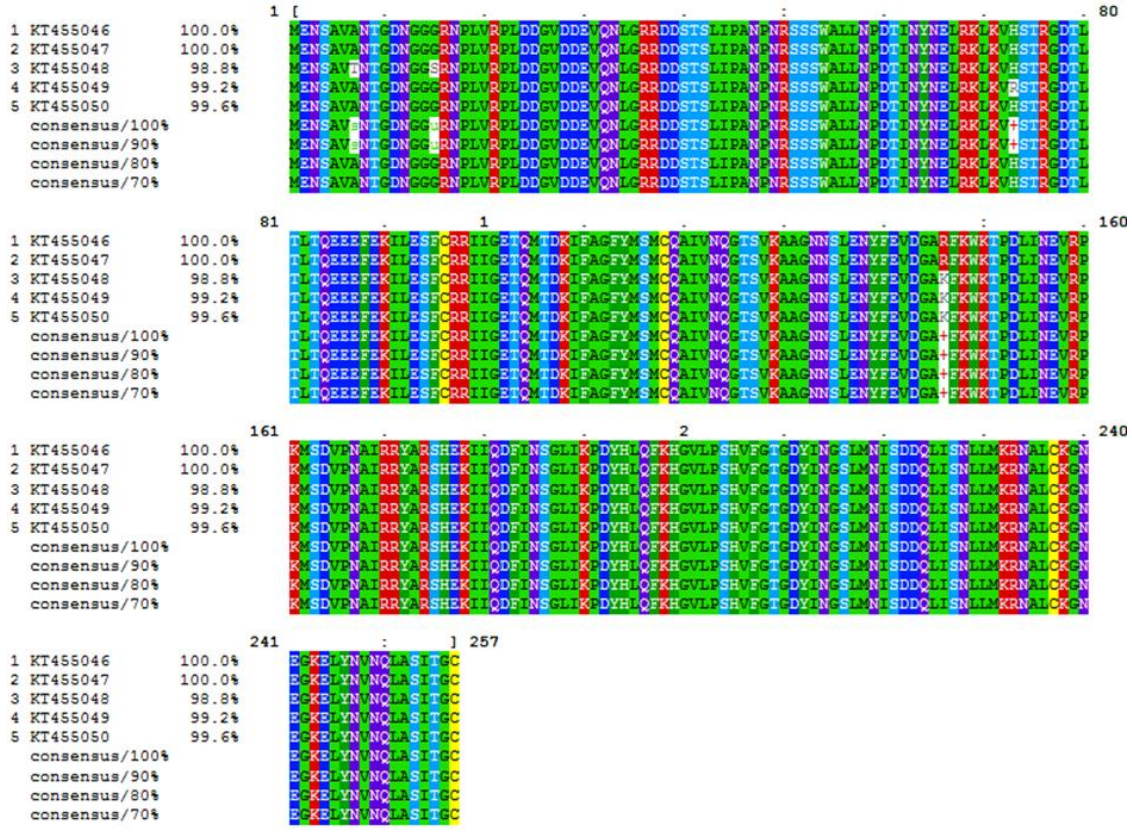


Şekil 4.7 I-TASSER analizi ile tahmin edilen kılıf protein 3D yapısı
α-heliks pembe, β-sheets sarı ve sarmal bölgeler de mavi renk ile gösterilmiştir.

ToCV'nin yapısal analogları tümü Closter kılıf super ailesine (pfam01785) ait I-TASSER analizi ile tanımlanmıştır. I-TASSER analizi β-D-glukoz, nükleik asitler, çinko (II) katyonu ve α-D-glukoz gibi ligandların bağlanabildiği ligand bağlanma noktasını da belirlemiştir.

4.6.5 Türkiye'deki izolatlar arası sekansların hizalanması

ToCV Türkiye'deki kılıf protein aminoasit dizisi kullanılarak ClustalW ile çoklu dizi hizalama yapılmış ve dizilerin hizalanması MView kullanarak görüntülenmiştir. Türkiye'deki izolatların arasında 4 değişken pozisyon ve 253 korunmuş pozisyon ortaya çıkmıştır (Şekil 4.8). Değişken pozisyonlar ise 7, 15, 73 ve 146 pozisyondadır. Değişken pozisyonlar renklendirilmemiş noktalar olarak görülmektedir. Serik izolatı ile Merkez izolati kılıf proteininin aminoasit dizileri arasında fark görülmemiştir; % 100 benzer olarak bulunmuştur (benzerlik sonuçları Ek 3'e gösterilmiştir). 7, 15 ve 146 pozisyonunda 3 değişken yer ile Kumluca izolatı Türk izolatları arasında en yüksek değişkenlik göstermiştir. İzolatlar arasında pozisyonların kalanı % 98.8 ile % 100 bir benzerlikle korunmuş olarak belirlenmiştir (EK 3).



Şekil 4.8 Türkiye'deki izolatlari kılıf proteini aminoasit dizilerinin hizalanması

Referans sekans KT455046 (Serik)'dir. Benzerlikler renklendirilmiştir. Renksiz alanlar değişken siteleri göstermektedir.

4.6.6 Türkiye'deki izolatlar arası filogenetik ağaç

Bu araştırma elde edilen 5 izolatın kılıf protein geninin çevrilen amino asit dizisi kullanarak MEGA 6.0 bilgisayar programı ile Neighbour-joining metoduna göre filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 4.9). Analiz 6 aminoasit sekanslarını içermiştir (SPSCV; KC888963 out-group olarak kullanılmıştır). Boşluklar ve eksik verileri içeren tüm pozisyonlar ortadan kaldırılmıştır.



Şekil 4.9 Türkiye'deki izolatların filogenetik ağacı

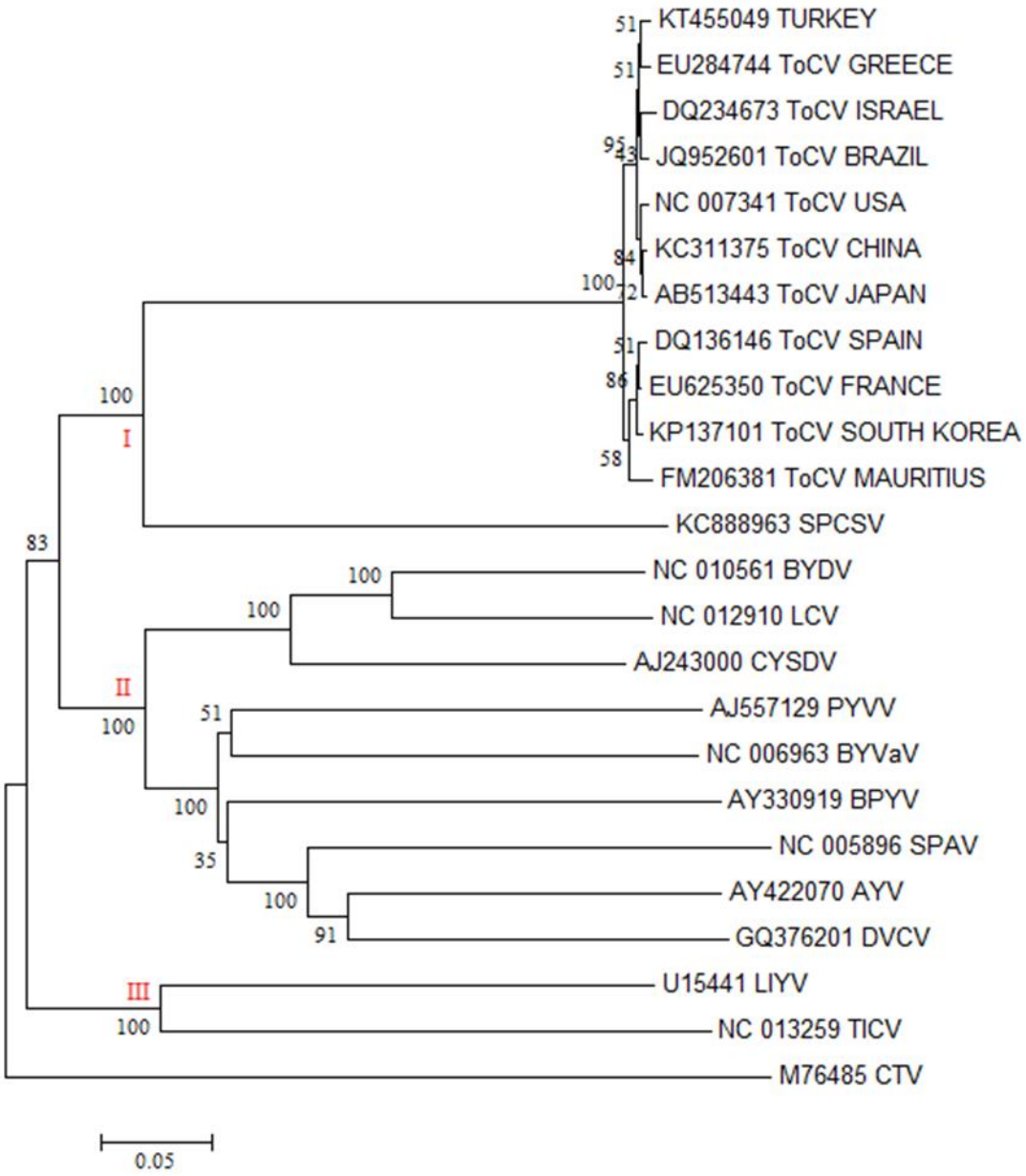
Evrimsel geçmiş Neighbor-Joining yöntemi kullanılarak ortaya çıkarılmıştır. Dal uzunluğu toplamı = 1.06450948 ile optimum ağaç gösterilmiştir. Evrimsel uzaklıklar Poisson düzeltme yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

4.6.7 Çoklu dizilerin hizalanması

Bir Türk izolatları da dahil olmak üzere dünyanın çeşitli yerlerinde izole edilmiş ToCV kılıf proteininin on bir protein dizisi MEGA 6.0 yazılımı (Tamura vd. 2013) ile ClustalW kullanarak hizalanmıştır. Hizalama Mview kullanılarak görüntülenmiştir. Hizalanmış diziler filogenetik ağacı oluşturmak için kullanılmıştır. Dizilerin ikili benzerliği ve homolojisi hesaplanmış ve sonuçları Ek 4'de gösterilmiştir. Buna göre nükleik düzeyinde Türk izolatı (KT455049) en yüksek oranda Yunanistan izolatı (EU264744) ile benzerlik göstermiştir (% 99.22), en az benzerlik ise Mauritius izolatı (FM206381) ile olmuştur (% 91.34).

4.6.8 Dünyadaki ToCV izolatların ve *crinivirus* cinsilerin fiogenetik analizi

Analiz 24 nükleotid sekansını içermiştir. Boşlukları ve kayıp verileri içeren bütün pozisyonlar yok edilmiştir. Evrimsel analiz MEGA 6'da yürütülmüştür.



Şekil 4.10 Dünyadaki ToCV izolatların ve *Crinivirus* cinsinin filogenetik ağacı

Evrimsel geçmiş Neighbor-Joining yöntemi kullanılarak ortaya çıkarılmıştır. Dal uzunluğu toplamı = 3.28375688 ile optimum ağaç gösterilmiştir. Evrimsel uzaklıklar p-distance yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Filogenetik ağaç ToCV ile diğer *Crinivirus* üyeleri arasındaki evrimsel ilişkiyi göstermek amacıyla kılıf proteininin DNA sekansı kullanılarak oluşturulmuştur.

Analizler sonucu oluşturulan dendogram ilk olarak üç ana kola ayrılmıştır ve bu üç ana kol dendogram üzerinde I, II ve III şeklinde numaralandırılmıştır (Şekil 4.10). Grup I ana kol içerisinde ToCV ve SPCSV yer almış, grup II ana kolunda BnYDV, LCV, AYV, DVCV, SPAV, CSYDV, BPYV, PYVV ve BYVaV yer almış ve grup III ana kolunda LIYV ve TICV yer almıştır. Grup II ana kolu yine iki alt grupa bölmüştür. BnYDV, LCV ve CSYDV bir alt grubunda olurken AYV, DVCV, SPAV, BPYV, PYVV ve BYVaV diğer alt grubundadır. CTV dış-grupu olarak kullanılmıştır (Şekil 4.10).

ToCV kümesi içinde beş farklı grup oluşturulmuştur. Bu gruplar Türkiye ve Yunanistan; İsrail ve Brezilya; ABD, Çin ve Japonya ile İspanya Fransa ve Güney Kore şeklinde oluşturulmuştur. Mauritius (Afrika izolatı) izolatı diğer ülkelerden gelen izolatlar ile herhangi bir küme oluşturulmamıştır (Şekil 4.10).

Genel olarak ToCV izolatlarının kılıf protein bölgesi birbirine benzemektedir. Dolaysıyla filogenetik ağaçta çok yakınlaşmışlar ve dolayısıyla çok düşük bootstrap değerlerini ortaya çıkmıştır (Şekil 4.10).

ToCV Türkiye'deki kılıf protein ve GenBanka'sında diğer ülkelerden gelen izolatların 10 kılıf protein dizisi kullanılarak ClustalW ile çoklu dizi hizalama yapılmış ve dizilerin hizalanması MView kullanarak görüntülenmiştir. Hem nükleotid hem de aminoasit seviyesinde Türkiye izolatı diğer ülkelerin izolatları ile % 97 ve % 99 arasında bir benzerlik göstermiştir (EK 4). ToCV DNA dizilerinin ikili karşılaştırmasında Türk ve Yunanistan izolatlarin arasında % 99,22 benzerlik ortaya çıkmıştır. Ancak Mauritius izolatı ile % 91,34 benzerlik belirlenmiştir. Türkiye örnekleri Fransa izolatı ve Güney Kore izolatı ile % 99.74 DNA dizisi benzerliği göstermiştir. Bu şekilde bu izolatlar Türkiye izolatları ile karşılaştırılmış ToCV izolatları arasında en yüksek nükleotid benzerliği gösteren izolatlar olarak belirlenmiştir (EK 4). ToCV izolatları arasında en düşük düşük bezerlik (% 91,21) Mauritius ve Yunanistan izolatları olmuştur. ToCV-Fransa, İspanya ve Mauritius izolatları ile karşılaştırıldığında % 99,48 ve % 92,11 nükleotid sekans benzerliği göstermiştir. Mauritius izolatının yarattığı boşluktan ayrı

olarak (kısmi sekansından dolayı) ToCV'nin çevrilmiş kılıf protein sekanslarının hizalanması 14 değişken yer ortaya çıkmasına sebep olmuştur (EK 5).

Crinivirus cinsinin ikili nükleotid karşılaştırmalı analizinde maksimum benzerlik (% 74,81) BnYDV ve LCV arasında ortaya çıkmıştır. Cins üyeleri arasında hesaplanmış küresel benzerlik (Blosum 62) 0,2 ve 0,68 arasındadır. En yüksek benzerliği BnYDV ve LCV elde etmiştir (EK 6).

Hizalama matrisleri sonuçlardan, bir referans dizi olarak ToCV Türkiye kullanılarak, ToCV'ye % 48,7 ile en benzer dizi SPCSV'dir (Ek 7). Bu, filogenetik ağaçta ToCV ile SPCSV'nin kümelenmesi (clustering) ile tutarlıdır (Şekil 4.10).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1 RNA İzolasyonu

Bitki moleküler biyoloji çalışmalarında DNA/RNA izolasyon aşaması son derece önemlidir. PCR uygulamalarında ise DNA'nın miktar ve özellikle saflığı amplifikasyon açısından daha da önem kazanmaktadır (Ergül 2000). Bitki moleküler biyoloji çalışmalarında iyi bir DNA/RNA izolasyonu başarıyı önemli ölçüde etkilemektedir (John 1992).

RNA izolasyonu için kullanılan RNA izolasyon kiti PCR ürünlerinin sonraki sekanslaması için yüksek konsantrasyona sahip ve çok saf bir RNA elde etmeye yardımcı olmuştur. En yüksek RNA konsantrasyonu Kumluca örneğinden (Örnek 5) elde edilmiştir. Her ne kadar bütün örnekler aynı muameleye tabi tutulsa da Kumluca örneğinin neden çok yüksek bir RNA konsantrasyonu verdiğini açıklamak zordur.

Hazırlanmış RNA örneklerinin kalitesinde en önemli nokta RNA'nın bütünlüğüdür (Winnepenninckx vd. 1995). Klasik olarak, bu jel elektroforez ve baskın rRNA türlerinin iyi tanımlanmış bantlarının gözlenmesiyle kontrol edilir. RNA'ların % 80-90 kadarı ribozomal RNA'lardan ibarettir (Lodish vd. 2000). Bu çalışmada izole edilmiş RNA, agaroz jel elektroforezde koşturulduğunda 25S ve 18S rRNA bantların varlığı izole edilmiş RNA'nın kalitesini daha da ortaya koymuştur. Kısmen ya da tamamen bozulmuş RNA keskin rRNA bantlarına sahip olmayacaktır (Mueller vd. 2004). Sitoplazmik 18S ve 25S rRNA'lara ilave olarak yeşil yapraklardaki total RNA kloroplastlardaki 16S ve 23S rRNA'ları da içermektedir. Bununla birlikte bu iki rRNA (16S ve 23S) bant profilinde nadiren görülürler, çünkü kloroplast rRNA'larının çoğu uzun süre depolanmış olan yaprak dokularında parçalanmaktadırlar (Lodish vd. 2000).

İzole ettiğimiz RNA'da iki keskin rRNA'nın varlığı çok iyi bir izolasyonun olduğunu göstermektedir.

5.2 Primerler

Bu çalışmada kılıf protein bölgesinin çoğaltılması ve sekanslanması için iki spesifik primer düzenlenmiştir ve bunlar 5' yönündeki sekansa bir primer walking yaklaşımı ile kombine edilmiştir ve tüm kılıf protein geninini karakterize etmek için bir PCR temelli stratejide onlar kullanılmıştır. Sekansta hiçbir boşluk kalmamasını garantilemek için primerler fragmentler arasında çakışma yaratacak şekilde düzenlenmiştir. Jel üzerinde spesifik olmayan bantların görülmemesi primerlerin ToCV tanısı için spesifik olduğunu kanıtlamıştır. Bu primerlerin ana avantajı ToCV'nin RNA2 genomuna bitişik genlerin kısmi nükleotidleri ile tüm kılıf proteinini çoğaltabilme yeteneğinde yatmaktadır. Bu şekilde bunlar karakterizasyonu kolaylaştırmak için kombine halde kolaylıkla kullanılabilir.

5.3 Kılıf Proteinin Protein Familyası Tahmini

Kılıf proteininin analizi ile ToCV'nin kılıf proteininin cl03354 süper familyasının bir üyesi olan Closter CP pfam01785'e ait olduğu saptanmıştır (Sekiya vd. 1991). Bu familya büyük bir familya olan *Closteroviridae* üyelerinin kılıf proteinlerinden ibarettir (Brunt vd. 1996). Viral kılıf proteini viral genomu kapsüller ve korur. Hem büyük CP1 ve daha küçük CP2 kılıf proteini aynı birincil transkriptten çıkar (Sekiya vd. 1991). Closteroviridae familyası *Closterovirus*, *Ampelovirus* ve *Crinivirus* cinslerinden ibarettir (Martelli vd. 2002). Filogenetik olarak ToCV iki farklı cins (*Trialeurodes* ve *Bemisia*) olan beyazsinek ile taşınan tek bitki virüsü olarak bilinmektedir (Wisler vd. 1998b, Wisler ve Duffus 2001, Wintermantel vd. 2005).

5.4 İkincil Yapı Tahmini

ToCV izolatlarının kılıf protein sekansları arasında çok yüksek bir benzerlik olup hücreden hücreye viroinların hareketi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Karasev 2000, Martelli 2002). ToCV kılıf proteininin işlevinin anlaşılması için ikincil yapı en iyi

ikincil yapı tahmini sunucusu olarak bilinen I-TASSER kullanılarak analiz edilmiştir (Zhang 2008). Bu sunucu protein dizilerinin 3D yapısını tahmin eder ve ardından yapısal uyum çıktılarına dayalı potansiyel fonksiyonları öngörür (Roy vd. 2010). ToCV kılıf proteini 3D modeli güven skoru (-2.75) düşük olarak bulunmuştur; genel olarak -1.5 ve 2 arasındaki bir skor daha doğru olarak kabul edilmektedir (Roy vd 2010). Bu düşük skor veritabanında mevcut olan yakın protein şablonlarının eksikliği nedeniyle olabilir.

Yapısal analiz I-TASSER fonksiyonel analiz tarafından da desteklenmiştir ki bu analiz kılıf proteininin muhtemelen bağlanma ve/veya taşınma aktivitesi ile ilgili olduğunu göstermiştir. ToCV için potansiyel ligand homologları, β-D-glükoz, nükleik asitler, çinko (II) katyon ve α-D-glukoz gibi küçük hidrofobik moleküllerin benzer tiplerini içerir. Kılıf proteininin tahmin edilen yapısı aynı zamanda tüm ipliğimsi RNA bitki virüslerinin kılıf proteinlerinde (Dolja vd. 1991) muhafaza edilen üç adet rezüdinin 127(Ser) 174 (Arg) ve 211 (Asp) aminoasit pozisyonlarında mevcut olduğu göstermektedir. ToCV RNA'larının çoğu kılıf protein (CP) ile kaplanmıştır, fakat yaklaşık % 5 oranında da CPm ile kaplanmıştır ki bu "çıngıraklı yılan benzeri virionlar (rattlesnake-like virions)" olarak adlandırılan bir polar konformasyonla sonuçlanmaktadır (Agranovsky vd. 1995, Tian vd. 1999, Zinovkin vd. 1999).

RNA1 bölgesindeki p22 proteini ve RNA2 minör kılıf proteini (CPm) ile birlikte *Crinivirus* kılıf proteini gen susturulmasına (silencing suppression activity) yol açmaktadır (Canizares vd. 2008).

5.5 Türk İzolatlarının Filogenetik Analizi

İzolatlarımızın kılıf protein bölgesi (sekansımızın 293-1066 nt) ToCV RNA2'sinin 4333-5106 nükleotidine denk gelecek şekilde analiz edilmiştir (Lozano vd. 2006). Sonuçlar bütün Türk izolatları arasında çok yüksek derecede genetik korunma olduğunu göstermiştir. Bütün Türk izolatları % 99-100 sekans benzerliği göstermiştir. Protein

dizilerinin karşılaştırılmasında Serik ve Merkez izolatları % 100 benzerlik göstermiş ve bu sonuç iki yer arasında yakınlığa verilmiştir (Şekil 4.11).

5.6 Dünyadaki ToCV Izolatların ve *Crinivirus* Cinsilerin Fiogenetik Analizi

Kılıf protein sekansları kullanılarak *Crinivirus*'lar ile ToCV izolatlarının benzerlikleri çok iyi anlaşılmıştır. Bu şekilde, kılıf protein sekanslarını kullanılarak ikili kıyaslamaları ve filogenileri yaratmak olasıdır (Rubio vd. 2001). *Crinivirus* cinsinin diğer üyeleriyle birlikte ToCV'nin kümeleme işlemi ToCV'nin *Crinivirus* cinsi üyeliğini doğrulamıştır. Analizler ToCV'yi *Crinivirus* cinsinin diğer tüm üyelerinden farklı bir küme oluşturacak şekilde SPSCV ile aynı lineage' e sokmuştur.

ToCV'nin en yakın akrabası ikili amino asit karşılaştırmaları ve filogenetik ağaç analizi ile teyit edildiği ve Kreuze vd (2002) tarafından desteklendiği üzere SPSCV'tir. Wintermantel vd. (2005) ToCV kılıf proteini, RdRp ve amino asit dizisi benzerliği temelinde SPCSV ile çok yakın ilişkili olduğu bildirilmiştir. ToCV'nin en yakını ikili amino asit kıyaslamaları, filogenetik ağaç analizleri ve Kreuze vd. (2002) tarafından da desteklendiği üzere SPSCV olarak belirlenmiştir. Filogenetik ağaç tarafından tahmin edildiği üzere LCV, CYSDV ve BnYDV' nin bir gruba kümelenmesi Martin vd. (2008) tarafından da benzer sonuçların alınmasıyla desteklenmiştir.

ToCV kılıf proteini kullanılarak yapılan deneysel filogenetik analiz *Crinivirus* cinsinin diğer üyeleri ile çok daha az benzerlik gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Filogenetik analiz *Crinivirus* sekans ayrımında kılıf proteinini iyi bir aday yapmaktadır (EK 7). Ancak ToCV'nin 774 nükleotidlik kılıf protein bölgesinin analizi ile tüm ToCV izolatlarının kılıf protein sekanslarının % 91-99 benzerlik göstermesiyle ve viral RNA sekanslarının da çok benzer olmasıyla çok iyi korunduğu kanıtlanmıştır.

Bu durum bu ToCV izolatları arasında nispeten daha az genetik çeşitliliğin var olduğunu göstermektedir. Bu izolatlar arasında gözlenen küçük farklıklar coğrafi konumun sonucu olabilir. Türk izolatları ile Yunan izolatları (Şekil 4.10, EK 4)

arasındaki yüksek sekans benzerliği coğrafi yakınlığın bir sonucu olarak değerlendirilebilir.

Kılıf protein geni gibi yapısal genler için bile var olan çok düşük tür içi genetik çeşitlilik pekçok *Crinivirus*'un genel bir özelliğidir (Rubio vd. 2001, Offei vd. 2004, Marco ve Aranda 2005, Tairo vd. 2005). Bu durum, bu çalışmada analiz edilen onbir izolatın kılıf protein gen dizisine dayanarak onaylanmış ve benzer çalışma Kuzey Amerika'dan dört izolat ve İsrail, İspanya ve Fransa'dan birer izolat ile Wintermantel ve Wisler (2006) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, değişkenliğin çoğu proteinin ilk 60 aminoasitinde yer almıştır (Ek 5). Bu yüzden kılıf proteininin ilk 60 aminoasitlik bölgesi farklı kökenden izolatların daha ileri filogenetik analizleri için iyi bir aday olabilir (Jacquemond vd. 2009). Nitekim, Türk izolatlarında da 7 ve 15 ile 73 ve 146 aa'lerde farklılık oluşmuştur.

ToCV izolatları arasında farklılık ve benzerlikler bildirilmiştir (Albuquerque vd. 2013). Albuquerque vd. (2013) filogenetik ağacın Mega 4 programının Neighbour Joining algoritması kullanılarak 19 ToCV izolatının nükleotid sekansının hizalanmasından ortaya çıktığını bulmuştur. Bu ağaçta Amerikan ve Avrupa izolatları ayrı ayrı kümelenmiştir. Bununla birlikte farklı ülke izolatları ile birlikte bir küme bulunmaktadır. Aynı filogenetik ağaçta Brezilya, Yunanistan ve İsrail izolatları aynen bizim de bu çalışmada ortaya koyduğumuz üzere birlikte kümelenmiştir (Albuquerque vd. 2013). Albuquerque vd (2013) kılıf protein geninin kısmi sekansını kullanarak bu benzerlik ve farklılıkları saptamışlardır. Zhao vd. (2014) dünyada ToCV izolatlarını ayırmak için aynı yaklaşımı kullanmışlardır. Sonuçta, dünyada ToCV izolatları arasında çok düşük bir genetik değişkenlik bulunduğu sonucu çıkarılabilir.

KAYNAKLAR

Abou-Jawdah, Y., El Mohtar, C., Atamian, H. and Sobh, H. 2006. First report of Tomato chlorosis virus in Lebanon. Plant Dis. 90:378

Accotto, G.P., Vaira, A.M., Vecchiati, M., Finetti-Sialer, M.M., Gallitelle, D., Finetti, S.M.M. and Gallitelli, D. 2001. First report of Tomato chlorosis virus in Italy. Plant Dis. 85:1208

Agranovsky, A.A., Lesemann, D.E, Maiss, E, Hull, R. and Atabekov, J.G. 1995. "Rattlesnake" structure of a filamentous plant RNA virus built of two capsid proteins. Proc Natl Acad Sci USA 92: 2470–2473

Agrios, G. N., 1997. Plant diseases caused by viruses. In Plant Pathology. pp: 479-556

Albuquerque, L.C., Villanueva, F., Resende, R.O., Navas-Castillo, J., Barbosa, J.C. and Inoue-Nagata, A.K. 2013. Molecular characterization reveals Brazilian Tomato chlorosis virus to be closely related to a Greek isolate. Tropical Plant Pathology, 38(4), 332-336.

Altschul, S.F.T., Madden L., Schaffer, A.A. Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, http:/blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi," Nucleic Acids Research, vol. 25, no. 17, pp. 3389–3402.

Alvarez-Ruiz, P., Jimenez, C.G., Leyva-López, N.E. and Méndez-Lozano, J. 2006. First report of Tomato chlorosis virus infecting tomato crops in Sinaloa, New Disease Reports (2006) 14, 40.

Alzhanova, V.V., Hagiwara, Y., Peremyslov, V.V. and Dolja, V.V. 2000. Genetic analysis of the cell-to-cell movement of beet yellows closterovirus. Virology 268:192-200.

Alzhanova, V.V., Napuli, A.J., Creamer, R. and Dolja, V.V. 2001. Cell-to-cell movement and assembly of a plant closterovirus: roles for the capsid proteins and HSP70 homolog. EMBO J. 20:6997-7007.

Anfoka, G.H. and Abhary, M.K. 2007. Occurrence of Tomato infectious chlorosis virus (TICV) in Jordan. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 37, 186–190.

Anonymous 2015. Antalya maps http://magnificentturkey.weebly.com/antalya_2.html. Erişim tarihi: 15/03/2015

Anonim 1999. Tarımsal Yapılar ve Üretim DİE, T.C. Başbakanlık İstatistik Matbaası, Ankara.

Anonymous 1998. Distribution Maps of Quarantine Pests for Europe. CAB International, EPPO/CABI Wallingford (GB).

Anonymous 2000. Current recommendations for eradication and containment. PHSI Handbook of instructions. MAFF, London (GB).

Anonymous 2013. PM 7/118 (1) Tomato chlorosis virus and Tomato infectious chlorosis virus, EPPO Bulletin Volume 43, Number 10.1111.43.issue-3, 462-470

Barbosa, J.C., Teixeira, A.P.M., Moreira, A.G., Camargo, L.E.A., Bergamin, F.A., Bergamin Filho A., Kitajima, E.W. and Rezende, J.A.M. 2008. First report of Tomato chlorosis virus infecting tomato crops in Brazil. Plant Dis. 92:1709

Barbosa, J.C., Teixeira, L.D.D. and Rezende, J.A.M. 2010. First report on the susceptibility of sweet pepper crops to Tomato chlorosis virus in Brazil. Plant Dis. 94, 374 (-374).

Bateman, A., Bateman A., Finn, R.D., Clements J., Coggill, P., Eberhard R.Y., Eddy S.R., Heger A., Hetherington, K., Holm L., Mistry J., Sonnhammer E.L.L., Tate J. and Punta M. 2002. "The pfam protein families database," Nucleic Acids Research, vol. 30, no. 1, pp. 276–280.

Brown, N.P., Leroy, C. and Sander, C. 1998. MView: a web-compatible database search or multiple alignment viewer. Bioinformatics (Oxford, England) 14 (4):380-1

Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. 1996. `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996.' URL http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/

Çağlar, B.K. and Yilmaz, M.A. 2002. Detection of Squash Mosaic Comovirus (SqMV) of Cucurbits by Biological, Serological and Advanced Techniques Methods in Çukurova Region in Turkey. The Journal of Turkish Phytopathology. Vol: 31, No.2, 79-87.

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. and Madden T.L. 2008 "BLAST+: architecture and applications." BMC Bioinformatics 10:421.

Çanakcı, M. ve Akıncı, İ. 2007. Antalya ili sera sebze yetiştiriciliğinde modern ve geleneksel sera işletmelerinin kıyaslanması. Tarımsal Mekanizasyon 24. Ulusal Kongresi, Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Makinaları Bölümü, S.54‑61, 05-06 Eylül 2007, Kahramanmaraş.

Canizares, M.C, Navas-Castillo, J. and Moriones, E. 2008. Multiple suppreossors of RNA silencing encoded by both genomic RNAs of the crinivirus, Tomato chlorosis virus Virology 379:168-174

Castro, R.M., Hernandez, E., Mora, F., Ramirez, P. and Hammond. R.W. 2009. First report of Tomato chlorosis virus in tomato in Costa Rica. Plant Dis. 93:970

Çevik, B. and Erkış, G. 2007. First report of Tomato Chlorosis Virus in Turkey. New Disease Reports (2007) 16, 18.

Chromas Lite version 2.1 2012. Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia.

Dalmon, A., Dalmon, A., Bouyer, S., Cailly, M., Girard, M., Lecoq, H., Desbiez, C. and Jacquemond, M. 2005. First report of Tomato chlorosis virus and Tomato infectious chlorosis virus in tomato crops in France. Plant Dis. 89:1243

Delatte H., Naze F., Cottineau J.S., Lefeuvre P., Hostachy B., Reynauda B. and Lett, J.M. 2006. Occurrence of Tomato chlorosis virus on tomato in Réunion Island. Plant Pathol. 55:289

Dellavalle G., Caciagli P., Bosco, D., Lisa, V., d'Aquilio, M., Milne, R.G. and Mascaga, V. 1995. A whitefly-transmitted closterolike virus isolated from diseased tomato. Proc. Conf. Virus Dis. Veg., 8th, Praga, pp. 35-38

Dolja, V.V., Boyko, V.P., Agranovsky, A.A. and Koonin, E.V. 1991. Phylogeny of capsid proteins of rod-shaped and filamentous RNA plant viruses: two families with distinct patterns of sequence and probably structure conservation. Virology 184, 79–86.

Dovas, C.I., Katis, N.I. and Avgelis, A.D. 2002. Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. Plant Dis. 86:1345-49

Duffus, J.E., Liu, H.Y. and Wisler, G.C. 1994. A new closterovirus of tomato in southern California transmitted by the greenhouse whitefly (Trialeurodes vaporariorum). Phytopathology 84:1072-73

Emekli, N.Y., Büyüktaş, D. ve Büyüktaş, K. 2008. Antalya yöresinde seracılığın mevcut durumu ve yapısal sorunları. Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi, 25(1):26-39.

Ergül, A. 2000. Asmalarda (Vitis vinifera L. cvs.) genomic DNA Parmak İzi Analizi ile Moleküler Karakterizasyon. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Fonseca, M.E.N., Boiteux, L.S., Abreu, H., Nogueira, I. and Pereira-Carvalho, R.C. 2013. Physalis angulata: a new natural host of Tomato chlorosis virus in Brazil. Plant Dis. 97, 692 (-692).

Font, M.I., Juárez, M., Martínez, O. and Jordá, C. 2004. Current status and newly discovered natural hosts of Tomato infectious chlorosis virus and Tomato chlorosis virus in Spain. Plant Dis. 88: 82.

Font, M.I., Martínez-Culebras, P., Jorda, M.C., Louro, D., Vaira, A.M. and Accotto, G.P. 2002. First report of Tomato infectious chlorosis virus in Spain. Plant Dis. 86:696

Font, M.I., Vaira, A.M., Accotto, G.P., Lacasa, A., Serra, J., Gomila, J., Juárez, M., Espino, A.I. and Jordá, M. C. 2003. Amarilleos en los cultivos de tomate asociados a Tomato chlorosis virus (ToCV) y Tomato infectious chlorosis virus (TICV) en España.

Fortes, I.M. and Navas-Castillo, J. 2012. Potato, an experimental and natural host of the crinivirus Tomato chlorosis virus. Eur. J. Plant Pathol. 134, 81–86.

Fortes, I.M., Moriones, E. and Navas-Castillo, J. 2012. Tomato chlorosis virus in pepper: prevalence in commercial crops in south-eastern Spain and symptomatology under experimental conditions. Plant Pathol. 61, 994–1001.

Freitas, D.M.S., Nardin, I., Shimoyama, N., Souza-Dias, J.A.C. and Rezende, J.A.M. 2012. First report of Tomato chlorosis virus in potato in Brazil. Plant Dis. 96, 593 (-593).

García-Cano, E., Navas-Castillo, J., Moriones, E. and Fernández-Muñoz, R. 2010. Resistance to Tomato chlorosis virus in wild tomato species that impair virus accumulation and disease symptom expression. Phytopathology 100:582-592.

Güldür, M.E., Marchouks, M.G.M., Yurtmen, E. ve Yilmaz, M.A. 1995. Mersin ve Çevresinde Yetiştirilen Domateslerde Zararlı Yeni Bir Virüs Tomato Spotted Wilt Virus. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 26-29 Eylül 1995, Adana. Bildiriler, 303-306.

Hadidi, A. and Yang, X. 1990. Detection of pome fruit viroids by enzymatic cDNA amplification. Journal of Virological Methods 30, 261–270.

Hanafi, A. 2002. Inasive species: a real challenge to IPM in the Mediterrranean region?European Studies Network Newsletter no.13,p. 4. John Innes Centre, Norwich (GB).

Hanssen, I.M., Lapidot, M. and Thomma, B.P.H.J. 2010. Emerging Viral Diseases of Tomato Crops. Molecular Plant-Microbe Interactions 2010 23:5, 539-548

Hartono, S., Natsuaki, T., Sayama, H., Atarashi, H. and Okuda, S. 2003. Yellowing disease of tomatoes caused by Tomato infectious chlorosis virus newly recognized in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 69:61-64

Hirota, T., Natsuaki, T., Murai, T., Nishigawa, H., Niibori, K., Goto, K., Hartono, S., Suastika, G. and Okuda, S. 2010. Yellowing disease of tomato caused by Tomato chlorosis virus newly recognized in Japan J. Gen. Plant Pathol. 76, 168-171

Hochmuth, R.C. and Simone, G.W. 1996. A new whitefly-vectored closterovirus of tomato in Florida. Tom Inst Proc . 71–74.

Hull, R. 2013. Plant Virology, 5th Edition Academic Press ISBN: 978-0-12-361160-4

Jacquemond, M., Verdin, E., Dalmon, A., Guilbaud, L. and Gognalons, P. 2009. Serological and molecular detection of Tomato chlorosis virus and Tomato infectious chlorosis virus in tomato Plant Pathol. 58 (2), 210-220

John, M.E. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. Nucleic Acids Res. 20: 2381.

Jones, D.R. 2001. Pest Risk Analysis of Tomato chlorosis virus. York: CSL. 4 pp.

Jones, D.R. 2005. Pest Risk Analysis for Tomato infectious chlorosis virus. York: CSL. 6 pp.

Karasev, A.V. 2000. Genetic diversity and evolution of Closteroviruses. Annu. Rev. Phytopathol. 38:293-324.

Kataya, A.R.A., Stavridou, E., Farhan, K. and Livieratos, I.C. 2008. Nucleotide sequence analysis and detection of a Greek isolate of Tomato chlorosis virus Plant Pathol. 57 (5), 819-824

Klaassen, V.A., Boeshore, M., Dolja, V.V. and Falk, B.W. 1994. Partial characterization of the lettuce infectious yellows virus genomic RNAs, identification of the coat protein gene and comparison of its amino acid sequence with those of other filamentous RNA plant viruses J. Gen. Virol. 75 (Pt 7), 1525-1533

Kreuze, J.F., Savenkov, E.I. and Valkonen, J.P.T. 2002. Complete genome sequence and analyses of the subgenomic RNAs of Sweet potato chlorotic stunt virus reveal several new features for the genus Crinivirus. J Virol 76: 9260–9270

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D.,

Gibson T.J. and Higgins D.G. 2007. ClustalW and ClustalX version 2. Bioinformatics 23(21): 2947-2948.

Lee, Y.J., Kwak, H.R., Kim, M.K., Seo, J.K., Kim, J.S., Lee, S.C. and Choi, H.S. 2014. Molecular characterization of Tomato chlorosis virus infecting Korean tomato based on analyses of complete genome sequences. Direct submission to NCBI, Unpublished

Lett, J., Hoareau, M., Reynaud, B., Saison, A., Hostachy, B., Lobin, K. and Benimadhu, S. 2008. First report of Tomato chlorosis virus (Crinivirus) on tomato in Mauritius Island NCBI database: FM206382, Unpublished

Lievens, B. and Thomma, B.P.H.J. 2005. Recent developments in pathogen detection arrays: Implications for fungal plant pathogens and use in practice. Phytopathology, Vol. 95, No. 12, pp. 1374-1380, ISSN 0031-949X.

Liu, H.Y. and Duffus, J.E. 2003. Characterization of Abutilon yellows virus-a crinivirus transmitted by the banded-wing whitefly (Trialeurodes abutilonea) Unpublished. NCBI direct submission.

Liu, H.Y., Wisler, G.C. and Duffus, J.E. 2000. Particle lengths of whitefly-transmitted criniviruses. Plant Dis. 84:803-805.

Livieratos, I.C., Avgelis, A.D. and Coutts, R.H. 1999. Molecular characterization of the cucurbit yellow stunting disorder virus coat protein gene Phytopathology 89 (11), 1050-1055

Livieratos, I.C., Eliasco, E., Muller, G., Olsthoorn, R.C., Salazar, L.F., Pleij, C.W. and Coutts, R.H. 2004. Analysis of the RNA of potato yellow vein virus: evidence for a genome and conserved 3'-terminal structures among members of the genus Crinivirus. J Gen Virol 85: 2065–2075

Lobin, K., Druffel, K.L., Pappu, H.R. and Benimadhu, S.P. 2010. First report of Tomato yellow leaf curl virus in tomato in Mauritius. Plant Dis. 94:1261

Lodish H, Berk A., Zipursky, S.L., Matsudaira P., Baltimore D. and Darnell J. 2000. Molecular Cell Biology. 4th edition. New York: W.H. Freeman; 2000. Section 11.6, Processing of rRNA and tRNA.

Louro, D., Acotto, G.P. and Vaira, A.M. 2000. Occurrence and diagnosis of Tomato chlorosis virus in Portugal. European Journal of Plant Pathology 106.589-592.

Louro, D., Trenado, H.P., Fortes, I.M. and Navas-Castillo, J. 2007. Spread of Tomato yellow leaf curl virus and Tomato chlorosis virus to a new area in Portugal following the northern expansion of the vector Bemisia tabaci. J. Plant Pathol. 89, 301 (-301).

Lozano, G., Moriones E. and Navas-Castillo J. 2004. First report of sweet pepper (*Capsicum annuum*) as a natural host plant for Tomato chlorosis virus. Plant Dis. 88 224

Lozano, G., Moriones, E. and Navas-Castillo, J. 2006. Complete nucleotide sequence of the RNA2 of the crinivirus tomato chlorosis virus JOURNAL Arch. Virol. 151 (3), 581-587.

Marchler-Bauer, A. and S.H. Bryant. 2004. "CD-Search: protein domain annotations on the fly," Nucleic Acids Research, vol. 32, pp. W327–W331.

Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M.K., Gonzales, N.R., Lu S., Chitsaz, F., Geer, L.Y., Geer, R.C., He, J., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lanczycki, C.J., Lu, F., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita R.A., Zhang, D., Zheng C. and Bryant, S.H. 2015. "CDD: NCBI's conserved domain database." Nucleic Acids Res. 43:D222-6.

Marco, C.F. and Aranda, M.A. 2005. Genetic diversity of a natural population of Cucurbit yellow stunting disorder virus. Journal of General Virology 86, 815–22.

Martelli, G.P., Agranovsky, A.A, Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R.H., Dolja, V.V., Falk, B.W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A.V., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H.J., Wisler, G.C. and Yoshikawa, N. 2002 The family Closteroviridae revised. Arch Virol 147: 2039–2044

Martin, G., Velasco, L., Segundo, E., Cuadrado, I.M. and Janssen, D. 2008. The complete nucleotide sequence and genome organization of bean yellow disorder virus, a new member of the genus. *Crinivirus* Arch. Virol. 153 (5); 999-1001

Martinez-Zubiaur, Y., Fiallo-Olive, E., Carillo-Tripp, J. and Riverabustamante, R. 2008. First report of tomato chlorosis virus infecting tomato in single and mixed infections with Tomato yellow curl virus in Cuba. Plant Disease 92:836.

Massé, D.L.P., Delatte, H., Abdoul Karime, A.L., Hostachy, B., Reynaud B. and Lett J.M. 2008. Tomato chlorosis virus: first report in Mayotte Island. Plant Pathol. 57:388

McAvoy, G. 2009. Pest of the Month: Tomato Chlorosis Virus. http://www.growingproduce.com/crop-protection/disease-control/pest-of-the-month-tomato-chlorosis-virus-2/. August 1, 2015

Moriones, E. and Luis-Arteaga M. 1999. Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops Developments in Plant Pathology Volume 14, 1999, pp 16-33 Viral Diseases

Morris, J., Steel, E., Smith, P., Boonham, N., Spence, N. and Barker, I. 2006. Host range studies for Tomato chlorosis virus, and Cucumber vein yellowing virus transmitted by Bemisia tabaci (Gennadius). European Journal of Plant Pathology 114, 265–73.

Morris, X.J. and Dodds, J.A. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plants and fungal tissue. Phytopathology 69, 854-858.

Mueller, O., Lightfoot, S. and Schroeder, A. 2004. RNA integrity number (RIN)—standardization of RNA quality control. Agilent Application Note, Publication 5989-1165EN, pp. 1–8.

Navas-Castillo, J., Camero, R., Bueno, M. and Moriones, E. 2000. Severe yellowing outbreaks in tomato in Spain associated with infections of Tomato chlorosis virus. Plant Disease 84, 835–837.

Navas-Castillo, J., Fiallo-Olive, E. and Sanchez-Campos, S. 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. Annual Review of Phytopathology 49:219-248

Nie, X. and Singh, R.P. 2002. A new approach for the simultaneous differentiation of biological and Geographical strains of Potato virus Y by uniplex and multiplex RT-PCR. Journal of Virological Methods 104:41-54.

Offei, S.K., Arciniegas, N., Müller, G., Guzmán, M., Salazar, L.F. and Coutts, R.H.A. 2004. Molecular variation of potato yellow vein virus isolates. Archives of Virology 149, 821–7.

Papayiannis, L.C., Ioannou, N., Dovas, C.I. Maliogka, V.I. and Katis, N.I. 2006. First report of Tomato chlorosis virus on tomato crops in Cyprus. Plant Pathol. 55:567

Pehlivan, D. 2013. Adana ve Mersin illerinde domates kloroz virüsü (*Tomato chlorosis virus*, ToCV)' nün saptanmasi ve moleküler karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 52 pp

Peremyslov, V.V., Hagiwara, Y. and Dolja, V.V. 1999. HSP70 homolog functions in cell-to-cell movement of a plant virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:14771-14776.

Qin, Y., Wang, L., Zhang, Z., Qiao, Q., Zhang, D., Tian, Y., Wang, S., Wang, Y. and Yan, Z. 2014. Complete genomic sequence and comparative analysis of the genome segments of sweet potato chlorotic stunt virus in china PLoS ONE 9 (8), E106323

Roy, A., Kucukural, A. and Zhang, Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction Nature Protocols 5(4):725-738

Rubio, L., Abou-Jawdah, Y., Lin, H.X. and Falk, B.W. 2001. Geographically distant isolates of the crinivirus Cucurbit yellow stunting disorder virus show very low genetic diversity in the coat protein gene. Journal of General Virology 82, 929–33

Salem, N.M., Chen, A.Y., Tzanetakis, I.E., Mongkolsiriwattana, C. and Ng, J.C. 2009. Further complexity of the genus Crinivirus revealed by the complete genome sequence of Lettuce chlorosis virus (LCV) and the similar temporal accumulation of LCV genomic RNAs 1 and 2. Virology 390 (1), 45-55

Segev, L., Wintermantel, W.M., Polston, J.E. and Lapidot, M. 2004. First report of Tomato chlorosis virus in Israel. Plant Dis. 88:1160

Sekiya, M.E., Lawrence, S.D., McCaffery, M. and Cline, K. 1991. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the coat protein gene of citrus tristeza virus J. Gen. Virol. 72 (Pt 5), 1013-1020

Solórzano-Morales, A., Barboza, N., Hernández, E., Mora-Umaña, F., Ramírez, P. and Hammond, R.W. 2011. Newly discovered natural hosts of Tomato chlorosis virus in Costa Rica. Plant Dis. 95, 497 (-497).

Tairo, F., Mukasa, S.B., Jones, R.A.C., Kullaya, A., Rubaihayo, P.R. and Valkonen, J.P.T. 2005. Unravelling the genetic diversity of the three main viruses involved in Sweet Potato Virus Disease (SPVD), and its practical implications. Molecular Plant Pathology 6, 199–211.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution30: 2725-2729.

Tian, T.Y., Rubio, L., Yeh, H.H., Crawford, B. and Falk, B.W. 1999. Lettuce infectious yellows virus: in vitro acquisition analysis using partially purified virions and the whitefly Bemisia tabaci. J Gen Virol 80: 1111–1117

Tiberini, A., Tomassoli, L., Barba, M. and Hadidi, A. 2010. Oligonucleotide microarray-based detection and identification of 10 major tomato viruses Journal of Virological Methods Volume 168, Issues 1–2, September 2010, Pages 133–140

Trenado, H.P., Fortes, I.M., Louro, D. and Navas-Castillo, J. 2007. Physalis ixocarpa and P. peruviana, new natural hosts of Tomato chlorosis virus. Eur. J. Plant Pathol. 118, 193–196.

Tsai, W.S., Shih, S.L., Green, S.K., Hanson, P. and Liu, H.Y. 2004. First report of the occurrence of Tomato chlorosis virus and Tomato infectious chlorosis virus in Taiwan. Plant Dis. 88, 311 (-311).

Tzanetakis I.E., Martin R.R and Wintermantel W.M. 2013. Epidemiology of criniviruses: an emerging problem in world agriculture Front Microbiol. 2013; 4: 119.

Tzanetakis, I.E., Halgren, A.B., Keller, K.E., Hokanson, S.C., Maas, J.L., McCarthy, P.L. and Martin, R.R. 2004. Identification and detection of a virus associated with strawberry pallidosis disease Plant Dis. 88, 383-390

Tzanetakis, I.E., Susaimuthu, J., Gergerich, R.C. and Martin, R.R. 2006. Nucleotide sequence of Blackberry yellow vein associated virus, a novel member of the Closteroviridae Virus Res. 116 (1-2), 196-200

Tzanetakis, I.E., Wintermantel, W.M. and Martin, R.R. 2003. First report of Beet pseudoyellows virus in strawberry in the USA: A second crinivirus able to cause pallidosis disease Plant Dis. 87, 1398

Tzanetakis, I.E., Wintermantel, W.M., Poudel, B. and Zhou, J. 2011. Diodia vein chlorosis virus is a group-1 crinivirus Arch. Virol. 156 (11), 2033-2037

Vaira, A.M., Accotto, G.P., Vecchiati, M. and Bragaloni, M. 2002. Tomato infectious chlorosis virus causes leaf yellowing and reddening of tomato in Italy. Phytoparasitica 30, 290–294.

Velasco, L., Simon, B., Janssen, D. and Cenis, J.L. 2008. Incidences and progression of Tomato chlorosis virus disease and Tomato yellow leaf curl virus disease in tomato under different greenhouse covers in southeast Spain. Annals of Applied Biology 153, 335–344.

Verhoeven, J.T.h. J., Willemen, T.M., Roenhorst, J.W. and van der Vlugt, R.A.A. 2003. First report of Tomato infectious chlorosis virus in tomato in Indonesia. Plant Dis. 87:872

Winnepenninckx, B., Van de Peer, Y., Backeljau, T. and De Wachter, R. 1995. "CARD: a drawing tool for RNA secondary structure models", BioTechniques 18, 1060-1063,.

Wintermantel, W. M. 2004. Emergence of greenhouse whitefly (Trialeurodes vaporariorum) transmitted criniviruses as threats to vegetable and fruit production in North America. APSnet Features. doi:10.1094/APSnetFeature-2004-0604.

Wintermantel, W.M. and Wisler, G.C. 2006. Vector specificity, host range, and genetic diversity of Tomato chlorosis virus. Plant Disease 90, 814–9.

Wintermantel, W.M., Cortez, A.A., Anchieta, A.G., Gulati-Sakhuja, A. and Hladky, L. L. 2008. Co-infection by two criniviruses alters accumulation of each virus in a host-specific manner and influences efficiency of virus transmission. Phytopathology 98, 1340–1345.

Wintermantel, W.M., Hladky, L.L., Gulati-Sakhuja, A., Li, R., Liu, H.Y. and Tzanetakis, I.E. 2009. The complete nucleotide sequence and genome organization of tomato infectious chlorosis virus: a distinct crinivirus most closely related to lettuce infectious yellows virus Arch. Virol. 154 (8), 1335-1341

Wintermantel, W.M., Polston, J.E., Escudero, J. and Paoli, E.R. 2001. First report of Tomato chlorosis virus in Puerto Rico. Plant Disease 85, 228.

Wintermantel, W.M., Wisler, G.C, Anchieta, A.G., Liu, H.Y., Karasev, A.V. and Tzanetakis, I.E. 2005. The complete nucleotide sequence and genome organization of tomato chlorosis virus. Arch Virol 150: 2287-2298

Wisler, G.C, Li, R.H., Liu, H.Y., Lowry, D.S. and Duffus, J.E. 1998a. Tomato chlorosis virus: A new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato. Phytopathology 88:402-409.

Wisler, G.C., Duffus, J.E., Liu, H.Y., Li, R.H. 1998b. Ecology and epidemiology of Whitefly transmitted closteroviruses. Plant Dis 82:270–280

Wisler, G.C. and Duffus, J.E. 2001. Transmission properties of whitefly-borne criniviruses and their impact on virus epidemiology. In: Harris KF, Smith OP, Duffus JE (eds), Virusinsect–plant interactions. Academic Press, San Diego, pp 293–308

Wisler, G.C., Duffus, J.E., Liu, H.Y., Li, R.H., Simone, G.W. and Hochmuth, R.C. 1996. A new, whiteflytransmitted virus infecting tomato from Florida. Phytopathology 86:S71-S72 (Abstr.)

Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. and Zhang, Y. 2015. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. Nature Methods, 12: 7-8 (2015).

Yurtmen, M., Güldür, M.E. and Yilmaz, M.A. 1998. Tomato Spotted Wilt Virus on Pepper in İçel Province of Turkey. Ninth Conference of the I. SH.S Vegetable Virus Working Group, Recent Advance in Vegetable Virus Research, 22-27 August 1998, Torino, Italy, p 91-92.

Zhang, Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinformatics 9(40)

Zhao, L.M., Li, G., Gao, Y., Liu, Y.J., Sun, G.Z. and Zhu, X.P. 2014. Molecular Detection and Complete Genome Sequences of Tomato chlorosis virus Isolates from Infectious Outbreaks in China. Journal of Phytopathology, 162: 627–634.

Zhao, R.N., Wang, R., Wang, N., Fan, Z.F., Zhou, T., Shi, Y.C. and Chai, M. 2013. First report of Tomato chlorosis virus in China JOURNAL Plant Dis. 97 (8), 1123

Zinovkin, R.A., Jelkmann, W. and Agranovsky, A.A. 1999. The minor coat protein of Beet yellows closterovirus encapsidates the 5′ terminus of RNA in virions. J. Gen. Virol. 80:269-272.

Zuckerkandl, E. and Pauling, L. 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. Edited in Evolving Genes and Proteins by V. Bryson and H.J. Vogel, pp. 97-166. Academic Press, New York.

EK 1 ToCV ve TICV'nin Bulunduğu Ülkeler ve İlk Saptanış Tarihleri (Navas-Castillo vd. 2011)

Virüs	Ülke	Yıl*	Kaynak
Tomato chlorosis virus (ToCV)	Brezilya	2006	Barbosa vd. 2008
	Kanarya Adaları	2001	Font vd. 2003
	Kosta Rika	2007	Castro vd. 2009
	Küba	2006	Martínez-Zubiaur vd. 2008
	Kıbrıs	2004	Papayiannis vd. 2006
	Fransa	2002	Dalmon vd. 2005
	Yunanistan	2001	Dovas vd. 2002
	İsrail	2003	Segev vd. 2004
	İtalya	2000	Accotto vd. 2001
	Japonya	2008	Hirota vd. 2010
	Lübnan	2006	Abou-Jawdah vd. 2006
	Mauritius	2007	Lobin vd. 2010
	Mayotte (FR)	2005	Massé vd. 2008
	Meksika	2005	Alvarez-Ruiz vd. 2006
	Fas	2000	Hanafi 2002
	Portekiz	1998	Louro vd. 2000
	Porto Riko	2001	Wintermantel vd. 2001
	Réunion (FR)	2004	Delatte vd. 2006
	Güney Afrika	2001	Jones 2001
	İspanya	1997	Navas-Castillo vd. 2000

	Tayvan	1998	Tsai vd. 2004
	Türkiye	2008	Çevik ve Erkiş 2007
	ABD	1996	Wisler vd. 1996
Tomato infectious chlorosis virus (TICV)	Çek Cumhuriyeti	2002	Jones 2005
	Fransa	2003	Dalmon vd. 2005
	Yunanistan	2001	Dovas vd. 2002
	Endonezya	2002	Verhoeven vd. 2003
	İtalya	1991	Dellavalle vd. 1995
	Japonya	2001	Hartono vd. 2003
	Ürdün	2004	Anfoka vd. Abhary 2007
	Meksika	2004	Wintermantel 2004
	İspanya	2001	Font vd. 2002
	Tayvan	1998	Tsai vd. 2004
	ABD	1993	Duffus vd. 1994

EK 2 Beş ToCV İzolatının Kılıf Protein Sekansı (sarı renk ile gösterilmiştir)

>KT455046 SERIK

CGGGTGACGGAAAGTAGGTCCAATAAGACTGCTTGTGACGATAGGTGTTTGGAGTCATGGATCTTGAG
GAAATGATCAAAGAGTTAGGTCTGGCTAAAGTTGAGAGATTTCTCACTGTCTATAATCAAGGTAGGTTT
GTAGCTTTCGGAAATATAGAAATTCTACTCTGCCTGATTAATCAACATTTTGTGGAGTTTAATCCTCAAA
GAGCTAAACTGGACATTGAATTGTCTGAAGTGAGAGATTTCTTGAGGTGTTTTGAATCTTTTAGAAGCT
TTGGTTTAAGGAAATAATGGAGAACAGTGCCGTTGCAAACACTGGTGATAACGGTGGTGGCCGCAATC
CTCTGGTTAGACCGTTAGATGATGGCGTAGATGACGAGGTGCAGAACTTAGGCAGGAGGGACGATTCA
ACATCTCTCATTCCGGCTAATCCTAATCGATCTTCCAGTTGGGCTTTGTTGAACCCGGATACTATTAATT
ATAACGAGTTAAGGAAATTGAAGGTACGCTCCACTAGGGGTGATACTCTTACCTTGACTCAGGAAGAG
GAGTTCGAGAAGATACTCGAATCCTTTTGCAGGCGAATAATCGGTGAGACCCAGATGACGGATAAGAT
TTTCGCTGGTTTCTACATGTCTATGTGTCAGGCCATTGTAAACCAAGGGACCTCAGTTAAAGCAGCCGG
TAATAACAGTCTTGAAAACTACTTTGAGGTAGATGGTGCGAAATTTAAGTGGAAAACTCCGGATTTGAT
AAATGAGGTTAGACCCAAAATGTCCGATGTTCCAAACGCTATACGTCGGTACGCCAGAAGTCATGAAA
AGATTATTCAGGACTTTATTAACTCCGGTCTTATTAAGCCTGATTATCATTTACAATTCAAACATGGCGT
ATTACCAAGCCATGTGTTTGGTACCGGCGATTATATAAATGGTTCGTTGATGAATATCTCAGATGATCA
ACTTATCTCGAACCTGCTTATGAAAAGAAACGCTTTGTGCAAGGGTAACGAGGGCAAGGAACTGTACA
ACGTTAACCAACTTGCATCGATAACTGGTTGCTAAATTATATGGATGAAAATGAAATCTATGAGGATCA
AGAGGATCTCTCTGCTCGTGGCGGTGGGGGTTTCTATTACCAGACTGTGACTTTGGGTTCCGG

>KT455047 MERKEZ

CGGGTGACGGAAAGTAGGTCCAATAAGACTGCTTGTGACGATAGGTGTTTGGAGTCATGGATCTTGAG
GAAATGATCAAAGAGTTAGGTCTGGCTAAAGTTGAGAGATTTCTCACTGTCTATAATCAAGGTAGGTTT
GTAGCTTTCGGAAATATAGAAATTCTACTCTGCCTGATTAATCAACATTTTGTGGAGTTTAATCCTCAAA
GAGCTAAACTGGACATTGAATTGTCTGAAGTGAGAGATTTCTTGAGGTGTTTTGAATCTTTTAGAAGCT
TTGGTTTAAGGAAATAATGGAGAACAGTGCCGTTGCAAACACTGGTGATAACGGTGGTAGCCGCAATC
CTCTGGTTAGACCGTTAGATGATGGCGTAGATGACGAGGTGCAGAACTTAGGCAGGAGGGACGATTCA
ACATCTCTCATTCCGGCTAATCCTAATCGATCTTCCAGTTGGGCTTTGTTGAACCCGGATACTATTAATT
ATAACGAGTTAAGGAAATTGAAGGTACGCTCCACTAGGGGTGATACTCTTACCTTGACTCAGGAAGAG
GAGTTCGAGAAGATACTCGAATCCTTTTGCAGGCGAATAATCGGTGAGACCCAGATGACGGATAAGAT
TTTCGCTGGTTTCTACATGTCTATGTGTCAGGCCATTGTAAACCAAGGGACCTCAGTTAAAGCAGCCGG
TAATAACAGTCTTGAAAACTACTTTGAGGTAGATGGTGCGAAATTTAAGTGGAAAACTCCGGATTTGAT
AAATGAGGTTAGACCCAAAATGTCCGATGTTCCAAACGCTATACGTCGGTACGCCAGAAGTCATGAAA
AGATTATTCAGGACTTTATTAACTCCGGTCTTATTAAGCCTGATTATCATTTACAATTCAAACATGGCGT
ATTACCAAGCCATGTGTTTGGTACCGGCGATTATATAAATGGTTCGTTGATGAATATCTCAGATGATCA
ACTTATCTCGAACCTGCTTATGAAAAGAAACGCTTTGTGCAAGGGTAACGAGGGCAAGGAACTGTACA
ACGTTAACCAACTTGCATCGATAACTGGTTGCTAAATTATATGGATGAAAATGAAATCTATGAGGATCA
AGAGGATCTCTCTGCTCGTGGCGGTGGGGGTTTCTATTACCAGACTGTGACTTTGGGTTCCGG

>KT455048 KUMLUCA

CGGGTGACGGAAAGTAGGTCCAATAAGACTGCTTGTGACGATAGGTGTTTGGAGTCATGGATCTTGAG
GAAATGATCAAAGAGTTAGGTCTGGCTAAAGTTGAGAGGTTTCTCACTGTCTACAATCAAGGTAGGTTT
GTAGCTTTCGGAAATATAGAAACTCTACTCTGCCTGATTAATCAACATTTTGTGGAGTTTAATCCTCAAA
GAGCTAAACTGGACATTGAATTGTCTGAAGTGAGAGATTTCTTGAGGTGTTTTGAATCTTTTAGAAGCT
TTGGTTTAAGGAAATAATGGAGAACAGTGCTGTTGCAAACACTGGTGATAACGGTGGTAGCCGCAATC
CTCTGGTTAGACCGTTAGATGATGGCGTAGATGACGAGGTGCAGAACTTAGGCAGGAGGGACGATTCA
ACATCTCTCATTCCGGCTAATCCTAATCGATCTTCCAGTTGGGCTTTGTTGAACCCGGATACTATTAATT
ATAACGAGTTAAGGAAATTGAAGGTACGCTCCACTAGGGGTGATACTCTTACCTTGACTCAGGAAGAG
GAGTTCGAGAAGATACTCGAATCCTTTTGCAGGCGAATAATCGGTGAGACCCAGATGACGGATAAGAT
TTTCGCTGGTTTCTACATGTCCATGTGTCAGGCCATTGTAAACCAAGGGACCTCAGTTAAAGCAGCCGG
TAATAACAGTCTTGAAAACTACTTTGAGGTAGATGGTGCGAAATTTAAGTGGAAAACTCCGGATTTGAT
AAATGAGGTTAGACCCAAAATGTCCGATGTTCCAAACGCTATACGTCGGTACGCCAGAAGTCATGAAA
AGATTATTCAGGACTTTATCAACTCCGGTCTTATTAAGCCTGATTATCATTTACAATTCAAACATGGCGT
ATTACCAAGCCATGTGTTTGGTACCGGCGATTATATAAATGGTTCGTTGATGAATATCTCAGATGATCA
ACTTATCTCGAACCTGCTTATGAAAAGAAACGCTTTGTGCAAGGGTAACGAGGGCAAGGAACTGTACA
ACGTTAACCAACTTGCATCGATAACTGGTTGCTAAATTATATGGATGAAAATGAAATCTATGAGGATCA
AGAGGATCTCTCTGCTCGTGGCGGTGGGGGTTTCTATTACCAGACTGTGACTTTGGGTTCCGG

>KT455049 DEMRE

CGGGTGACGGAAAGTAGGTCCAATAAGACTGCTTGTGACGATAGGCGTTTGGAGTCATGGATCTTGAG
GAAATGATCAAAGAGTTAGGTCTGGCTAAAGTTGAGAGATTTCTCACTGTCTATAATCAAGGTAGGTTT
GTTGCTTTCGGAAATATAGAAACTCTACTCTGCCTGATTAATCAACATTTTGTGGAGTTTAATCCTCAAA
GAGCTAAACTGGACATTGAATTGTCTGAAGTGAGAGATTTCTTGAGGTGTTTTGAATCTTTTAGAAGCT
TTGGTTTAAGGAAATAATGGAGAACAGTGCTGTTGCAAACACTGGTGATAACGGTGGTGGCCGCAATC
CTCTGGTTAGACCGTTAGATGATGGCGTAGATGACGAGGTGCAGAACTTAGGCAGGAGGGACGATTCA
ACATCTCTCATTCCGGCTAATCCTAATCGATCTTCCAGTTGGGCTTTGTTGAACCCGGATACTATTAATT
ATAACGAGTTAAGGAAATTGAAGGTACACTCCACTAGGGGTGATACTCTTACCTTGACTCAGGAAGAG
GAGTTCGAGAAGATACTCGAATCCTTTTGCAGGCGAATAATCGGTGAGACCCAGATGACAGATAAGAT
TTTCGCTGGTTTCTACATGTCTATGTGTCAGGCCATTGTAAACCAAGGGACCTCAGTTAAAGCAGCCGG
TAATAACAGTCTTGAAAACTACTTTGAGGTAGATGGTGCGAAATTTAAGTGGAAAACTCCGGATTTGAT
AAATGAGGTTAGACCCAAAATGTCCGATGTTCCAAACGCTATACGTCGGTACGCCAGAAGTCATGAAA
AGATTATTCAGGACTTTATTAACTCCGGTCTTATTAAGCCTGATTATCATTTACAATTCAAACATGGCGT
ATTACCAAGCCATGTGTTTGGTACCGGCGATTATATAAATGGTTCGTTGATGAATATCTCAGATGATCA
ACTTATCTCGAACCTGCTTATGAAAAGAAACGCTTTGTGCAAGGGTAACGAGGGCAAGGAACTGTACA
ACGTTAACCAACTTGCATCGATAACTGGTTGCTAAATTATATGGATGAAAATGAAATCTATGAGGATCA
AGAGGATCTCTCTGCTCGTGGCGGTGGGGGTTTCTATTACCAGACTGTGACTTTGGGTTCCGG

>KT455050 KAŞ

CGGGTGACGGAAAGTAGGTCCAATAAGACTGCTTGTGACGATAGGTGTTTGGAGTCATGGATCTTGAG
GAAATGATCAAAGAGTTAGGTCTGGCTAAAGTTGAGAGGTTTCTCACTGTCTATAATCAAGGTAGGTTT
GTAGCTTTCGGAAATATAGAAACTCTACTCTGCCTGATTAATCAACATTTTGTGGAGTTTAATCCTCAAA
GAGCTAAACTGGACATTGAATTGTCTGAAGTGAGAGATTTCTTGAGGTGTTTTGAATCTTTTAGAAGCT
TTGGTTTAAGGAAATAATGGAGAACAGTGCTGTTGCAAACACTGGTGATAACGGTGGTGGCCGCAATC
CTCTGGTTAGACCGTTAGATGATGGCGTAGATGACGAGGTGCAGAACTTAGGCAGGAGGGACGATTCA
ACATCTCTCATTCCGGCTAATCCTAATCGATCTTCCAGTTGGGCTTTGTTGAACCCGGATACTATTAATT
ATAACGAGTTAAGGAAATTGAAGGTACACTCCACTAGGGGTGATACTCTTACCTTGACTCAGGAAGAG
GAGTTCGAGAAGATACTCGAATCCTTTTGCAGGCGAATAATCGGTGAGACCCAGATGACAGATAAGAT
TTTCGCTGGTTTCTACATGTCTATGTGTCAGGCCATTGTAAACCAAGGGACCTCAGTTAAAGCAGCCGG
TAATAACAGTCTTGAAAACTACTTTGAGGTAGATGGTGCGAAATTTAAGTGGAAAACTCCGGATTTGAT
AAATGAGGTTAGACCCAAAATGTCCGATGTTCCAAACGCTATACGTCGGTACGCCAGAAGTCATGAAA
AGATTATTCAGGACTTTATCAACTCCGGTCTTATTAAGCCTGATTATCATTTACAATTCAAACATGGCGT
ATTACCAAGCCATGTGTTTGGTACCGGCGATTATATAAATGGTTCGTTGATGAATATCTCAGATGATCA
ACTTATCTCGAACCTGCTTATGAAAAGAAACGCTTTGTGCAAGGGTAACGAGGGCAAGGAACTGTACA
ACGTTAACCAACTTGCATCGATAACTGGTTGCTAAATTATATGGATGAAAATGAAATCTATGAGGATCA
AGAGGATCTCTCTGCTCGTGGCGGTGGGGGTTTCTATTACCAGACTGTGACTTTGGGTTCCGG

EK 3 SIAS (Sequence Identity and Similarity) Sunucusu Kullanılarak Türk İzolatları Arasındaki Benzerlik Oranları

IDENTITY RESULTS					
KT455046	100%				
KT455047	99.87%	100%			
KT455048	99.22%	99.22%	100%		
KT455049	99.35%	99.35%	99.09%	100%	
KT455050	99.48%	99.48%	99.74%	99.35%	100%
	KT455046	KT455047	KT455048	KT455049	KT455050
SIMILARITY RESULTS					
KT455046	100%				
KT455047	100%	100%			
KT455048	99.22%	99.22%	100%		
KT455049	99.35%	99.35%	99.09%	100%	
KT455050	99.48%	99.48%	99.74%	99.35%	100%
	KT455046	KT455047	KT455048	KT455049	KT455050
GLOBAL SIMILARITY (BLOSUM62) RESULTS					
Reference protein					
	KT455046	KT455047	KT455048	KT455049	KT455050
KT455046	1	0.99	0.99	0.99	0.99
KT455047	0.99	1	0.99	0.99	0.99
KT455048	0.99	0.99	1	0.98	0.99
KT455049	0.99	0.99	0.99	1	0.99
KT455050	0.99	0.99	0.99	0.99	1

EK 4 SIAS (Sequence Identity and Similarity) Sunucusu Kullanılarak Türk ve Dünya İzolatları Arasındaki Benzerlik Oranları

a. IDENTITY RESULTS

KC311375	100%										
KP137101	97.67%	100%									
KT455049	98.70%	97.41%	100%								
EU284744	98.70%	97.41%	99.22%	100%							
NC_007341	99.22%	97.67%	98.96%	98.70%	100%						
EU625350	97.67%	99.74%	97.67%	97.41%	97.67%	100%					
DQ234673	98.44%	97.15%	98.96%	98.96%	98.70%	97.15%	100%				
AB513443	99.61%	97.80%	98.83%	98.83%	99.35%	97.80%	98.57%	100%			
JQ952601	98.57%	97.54%	98.83%	99.09%	98.57%	97.54%	98.83%	98.70%	100%		
DQ136146	97.15%	99.22%	97.41%	96.89%	97.15%	99.48%	96.89%	97.28%	97.28%	100%	
FM206381	91.60%	92.11%	91.34%	91.21%	91.60%	92.11%	91.34%	91.60%	91.34%	91.98%	100%
	KC311375	KP137101	KT455049	EU284744	NC_007341	EU625350	DQ234673	AB513443	JQ952601	DQ136146	FM206381

EK 4 SIAS (Sequence Identity and Similarity) Sunucusu Kullanılarak Türk ve Dünya İzolatları Arasındaki Benzerlik Oranları

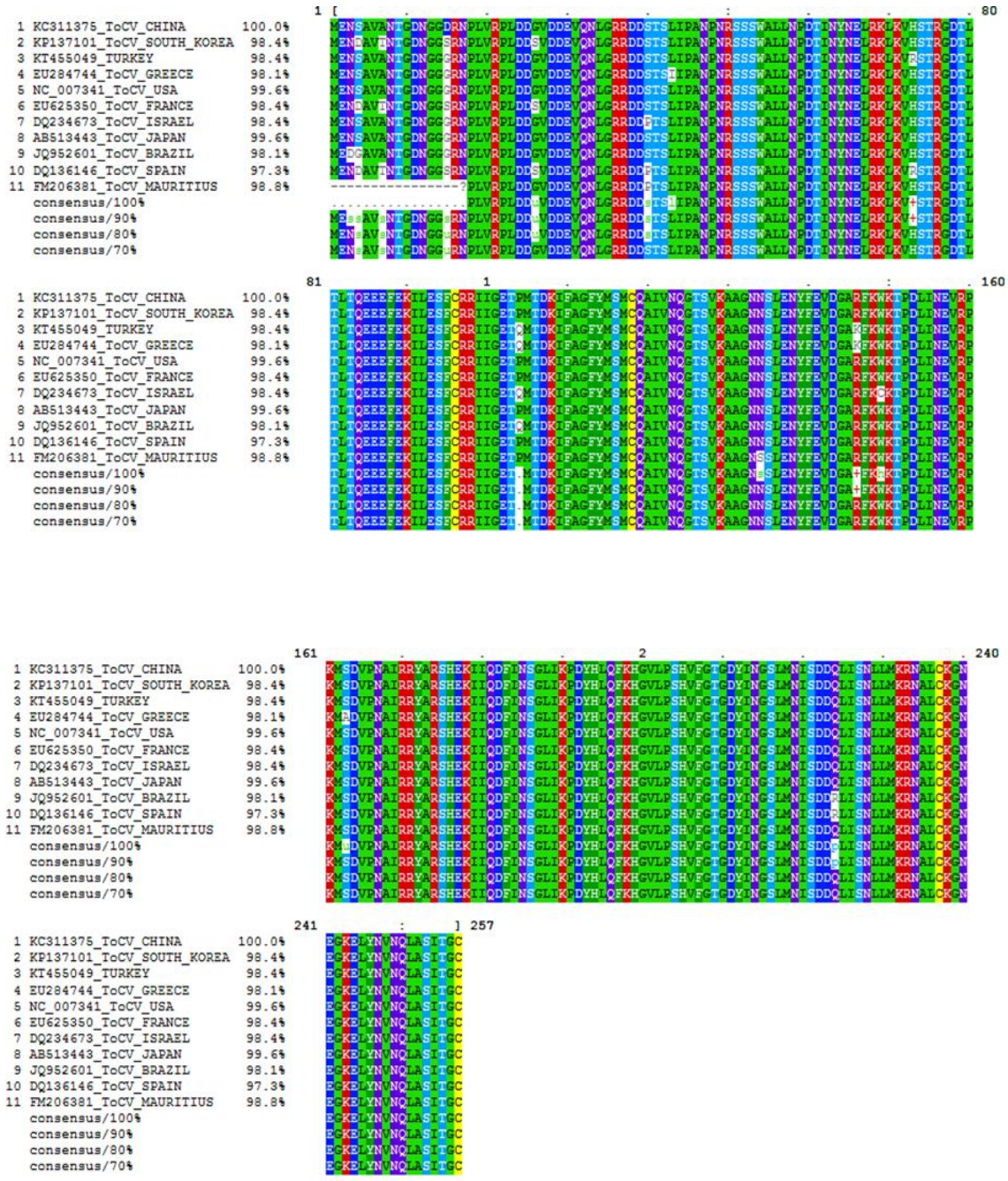
b. GLOBAL SIMILARITY (BLOSUM62) RESULTS

	KC311375	KP137101	KT455049	EU284744	NC_007341	EU625350	DQ234673	AB513443	JQ952601	DQ136146	FM206381
KC311375	1	0.97	0.98	0.98	0.99	0.97	0.98	0.99	0.98	0.96	0.97
KP137101	0.97	1	0.97	0.97	0.97	0.99	0.96	0.97	0.97	0.99	0.97
KT455049	0.98	0.97	1	0.99	0.98	0.97	0.98	0.98	0.98	0.97	0.96
EU284744	0.98	0.97	0.99	1	0.98	0.97	0.98	0.98	0.98	0.96	0.96
NC_007341	0.99	0.97	0.99	0.98	1	0.97	0.98	0.99	0.98	0.96	0.97
EU625350	0.97	0.99	0.97	0.97	0.97	1	0.96	0.97	0.97	0.99	0.97
DQ234673	0.98	0.96	0.98	0.98	0.98	0.96	1	0.98	0.98	0.96	0.96
AB513443	0.99	0.97	0.98	0.98	0.99	0.97	0.98	1	0.98	0.96	0.96
JQ952601	0.98	0.97	0.98	0.99	0.98	0.97	0.98	0.98	1	0.96	0.96
DQ136146	0.96	0.99	0.97	0.96	0.96	0.99	0.96	0.96	0.96	1	0.97
FM206381	0.97	0.97	0.96	0.96	0.97	0.97	0.96	0.96	0.96	0.97	1

99

EK 5 Dünyadaki ToCV İzolatların Kılıf Proteini Amino Acit Dizileri Kullanılarak Çoklu Dizilerin Hizalanması.

Referans dizisi olarak ToCV Çin izolatı kullanılmıstır. Benzerlik renklenmiştir



EK 6 SAIS sunucusu kullanılarak ToCV Türk İzolatı ile Dünyadaki *Crinivirus* Cinsi Virüslerin Benzerlik Oranları

a. IDENTITY RESULTS

ToCV	100%													
CYSDV	47.54%	100%												
AYV	43.24%	48.77%	100%											
BnYDV	44.22%	65.23%	48.40%	100%										
BPYV	42.13%	49.26%	54.29%	46.68%	100%									
DVCV	42.26%	49.63%	64.98%	48.15%	54.66%	100%								
LCV	44.22%	65.47%	47.17%	74.81%	48.77%	46.80%	100%							
LIYV	41.64%	40.78%	41.27%	40.66%	39.31%	40.17%	38.69%	100%						
PYVV	42.87%	49.01%	53.80%	48.52%	56.38%	50.85%	49.75%	40.54%	100%					
SPAV	40.17%	45.45%	59.82%	43.85%	53.68%	59.70%	45.70%	44.10%	54.05%	100%				
SPCSV	50.61%	47.05%	42.87%	44.10%	43.24%	42.50%	45.45%	37.10%	41.89%	38.94%	100%			
TICV	39.18%	40.78%	39.92%	40.66%	37.83%	38.32%	38.82%	50.85%	40.29%	39.68%	38.82%	100%		
BYVaV	43.24%	52.21%	53.56%	48.77%	53.43%	52.33%	49.63%	37.22%	55.52%	51.84%	44.84%	38.32%	100%	
CTV	29.97%	35.99%	32.43%	37.34%	31.69%	32.55%	36.73%	34.39%	32.80%	32.30%	29.60%	30.95%	32.30%	100%
	ToCV	CYSDV	AYV	BnYDV	BPYV	DVCV	LCV	LIYV	PYVV	SPAV	SPCSV	TICV	BYVaV	CTV

EK 6 SIAS EK 6 SIAS Sunucusu Kullanılarak ToCV Türk İzolatı ile Dünyadaki *Crinivirus* Cinsi Virüslerin Benzerlik Oranları

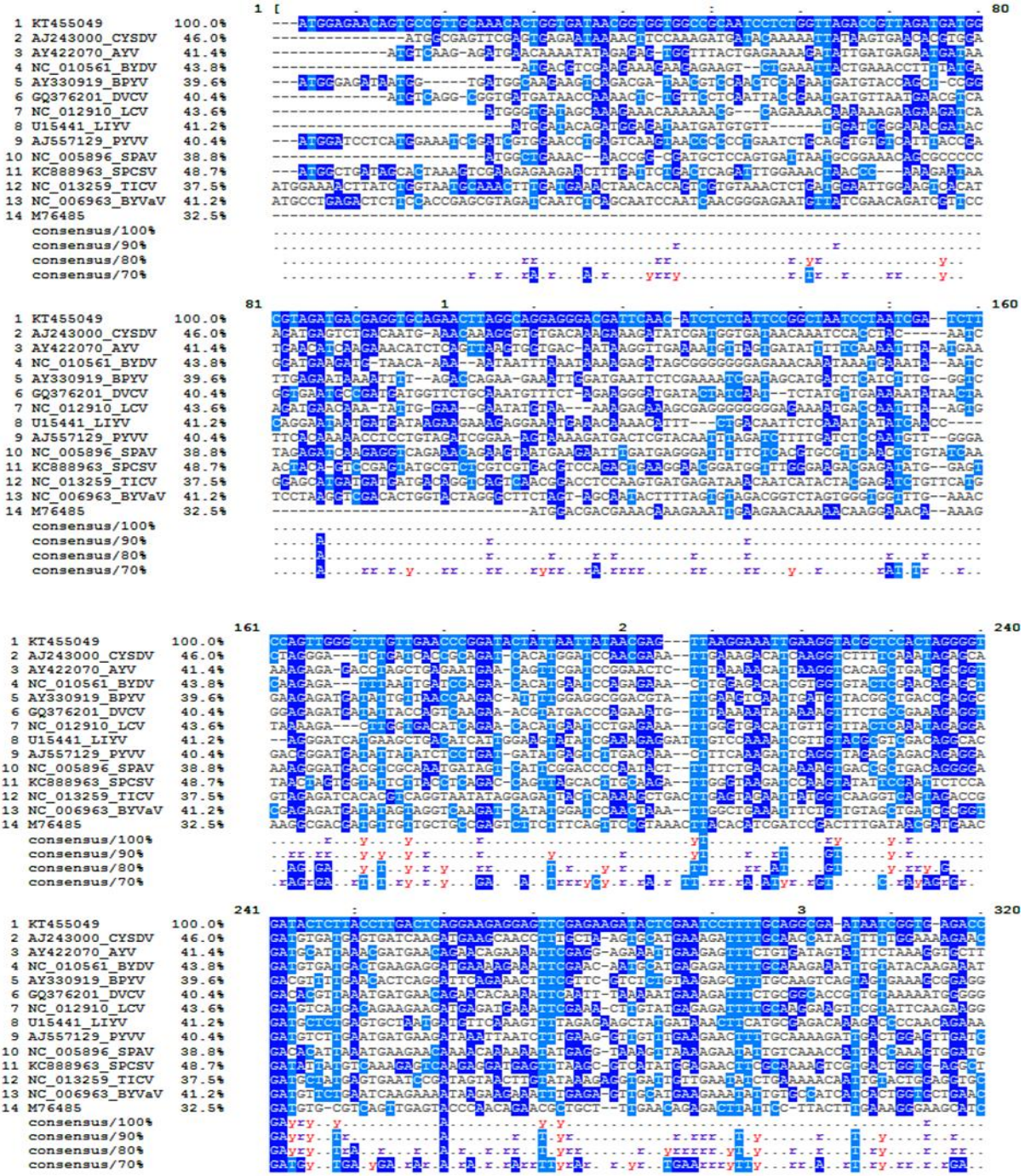
b. GLOBAL SIMILARITY (BLOSUM62) RESULTS

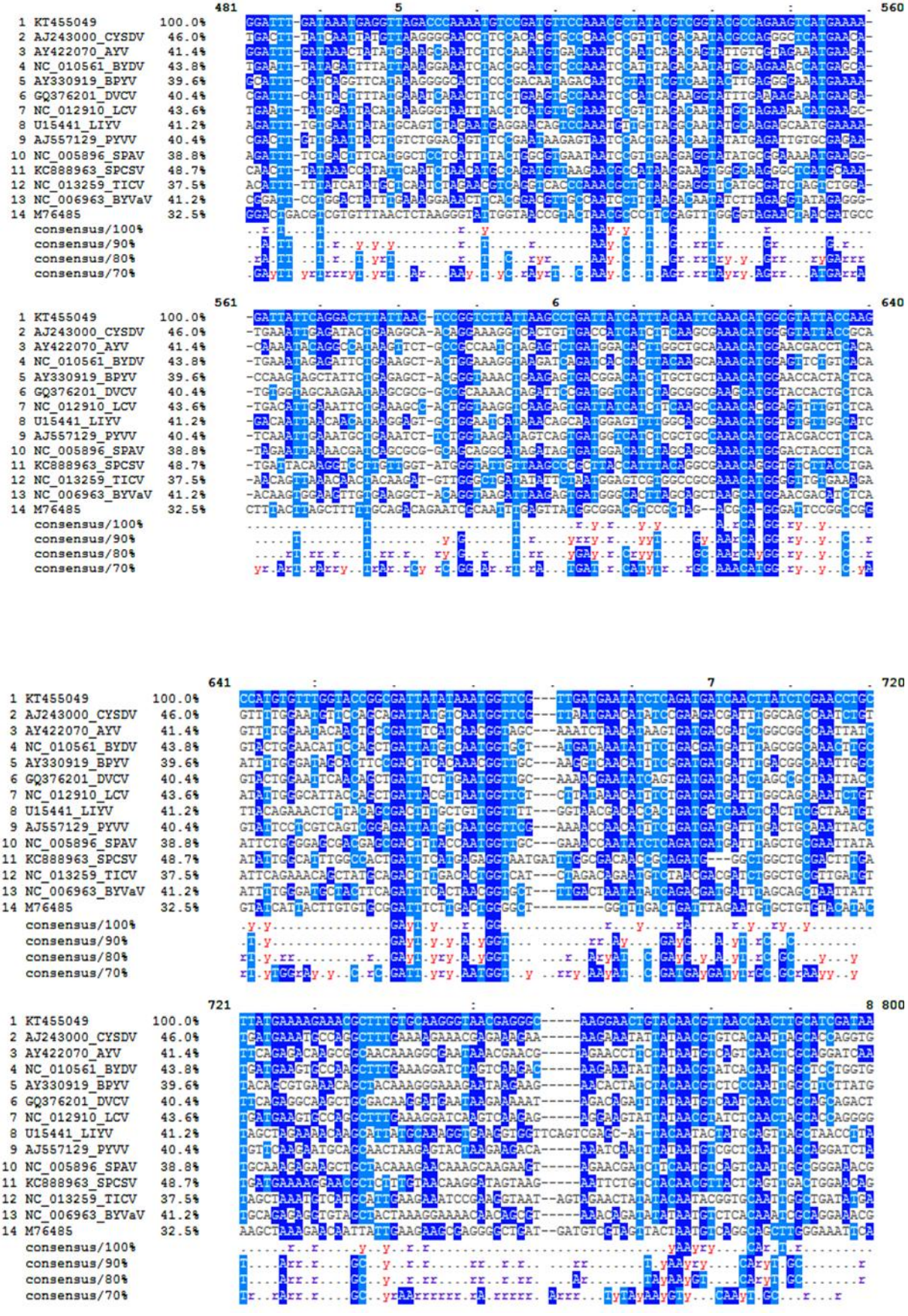
	ToCV	CYSDV	AYV	BnYDV	BPYV	DVCV	LCV	LIYV	PYVV	SPAV	SPCSV	TICV	BYVaV	CTV
ToCV	1	0.34	0.29	0.33	0.27	0.28	0.32	0.28	0.27	0.25	0.38	0.24	0.28	0.16
CYSDV	0.33	1	0.35	0.59	0.36	0.35	0.58	0.26	0.35	0.31	0.33	0.28	0.4	0.23
AYV	0.27	0.34	1	0.36	0.41	0.55	0.35	0.25	0.4	0.49	0.27	0.26	0.42	0.17
BnYDV	0.31	0.57	0.35	1	0.34	0.35	0.68	0.25	0.36	0.3	0.32	0.27	0.38	0.24
BPYV	0.26	0.37	0.42	0.36	1	0.43	0.37	0.24	0.45	0.43	0.28	0.23	0.42	0.18
DVCV	0.26	0.35	0.55	0.36	0.42	1	0.34	0.26	0.38	0.5	0.29	0.25	0.42	0.18
LCV	0.29	0.56	0.34	0.68	0.35	0.33	1	0.23	0.37	0.31	0.32	0.25	0.38	0.22
LIYV	0.26	0.25	0.25	0.25	0.23	0.25	0.23	1	0.27	0.29	0.23	0.4	0.23	0.17
PYVV	0.26	0.35	0.42	0.38	0.44	0.38	0.38	0.27	1	0.43	0.27	0.25	0.44	0.2
SPAV	0.24	0.31	0.49	0.31	0.41	0.5	0.32	0.3	0.42	1	0.24	0.27	0.4	0.16
SPCSV	0.38	0.34	0.29	0.34	0.28	0.3	0.35	0.24	0.28	0.25	1	0.25	0.32	0.17
TICV	0.24	0.29	0.27	0.3	0.23	0.26	0.27	0.43	0.26	0.28	0.25	1	0.24	0.21
CTV	0.14	0.21	0.15	0.22	0.16	0.16	0.21	0.16	0.18	0.15	0.15	0.18	0.18	1

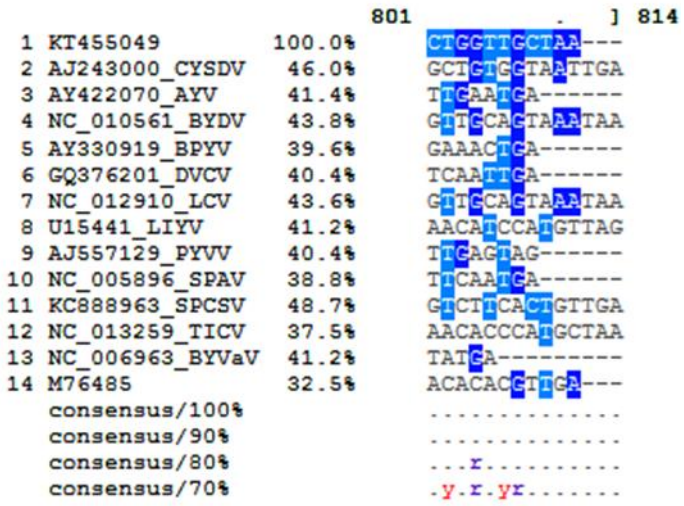
69

EK 7 Crinivirüs Cinsi Virüsleri Kılıf Proteini Amino Asit Dizileri Kullanılarak Çoklu Dizilerin Hizalanması.

Referans dizisi olarak ToCV-Turk izolat kullanılmıştır.




481 5 560
1 KT455049 100.0%
2 AJ243000_CYSDV 46.0%
3 AY422070_AYV 41.4%
4 NC_010561_BYDV 43.8%
5 AY330919_BPYV 39.6%
6 GQ376201_DVCV 40.4%
7 NC_012910_LCV 43.6%
8 U15441_LIYV 41.2%
9 AJ557129_PYVV 40.4%
10 NC_005896_SPAV 38.8%
11 KC888963_SPCSV 48.7%
12 NC_013259_TICV 37.5%
13 NC_006963_BYVaV 41.2%
14 M76485 32.5%
consensus/100%
consensus/90%
consensus/80%
consensus/70%
561 6 640
1 KT455049 100.0%
2 AJ243000_CYSDV 46.0%
3 AY422070_AYV 41.4%
4 NC_010561_BYDV 43.8%
5 AY330919_BPYV 39.6%
6 GQ376201_DVCV 40.4%
7 NC_012910_LCV 43.6%
8 U15441_LIYV 41.2%
9 AJ557129_PYVV 40.4%
10 NC_005896_SPAV 38.8%
11 KC888963_SPCSV 48.7%
12 NC_013259_TICV 37.5%
13 NC_006963_BYVaV 41.2%
14 M76485 32.5%
consensus/100%
consensus/90%
consensus/80%
consensus/70%
641 7 720
1 KT455049 100.0%
2 AJ243000_CYSDV 46.0%
3 AY422070_AYV 41.4%
4 NC_010561_BYDV 43.8%
5 AY330919_BPYV 39.6%
6 GQ376201_DVCV 40.4%
7 NC_012910_LCV 43.6%
8 U15441_LIYV 41.2%
9 AJ557129_PYVV 40.4%
10 NC_005896_SPAV 38.8%
11 KC888963_SPCSV 48.7%
12 NC_013259_TICV 37.5%
13 NC_006963_BYVaV 41.2%
14 M76485 32.5%
consensus/100%
consensus/90%
consensus/80%
consensus/70%
721 8 800
1 KT455049 100.0%
2 AJ243000_CYSDV 46.0%
3 AY422070_AYV 41.4%
4 NC_010561_BYDV 43.8%
5 AY330919_BPYV 39.6%
6 GQ376201_DVCV 40.4%
7 NC_012910_LCV 43.6%
8 U15441_LIYV 41.2%
9 AJ557129_PYVV 40.4%
10 NC_005896_SPAV 38.8%
11 KC888963_SPCSV 48.7%
12 NC_013259_TICV 37.5%
13 NC_006963_BYVaV 41.2%
14 M76485 32.5%
consensus/100%
consensus/90%
consensus/80%
consensus/70%


801] 814
1 KT455049 100.0% CTGGTTGCTAA---
2 AJ243000_CYSDV 46.0% GCTGTGGTAATTGA
3 AY422070_AYV 41.4% TTGAATGA------
4 NC_010561_BYDV 43.8% GTTGCAGTAAATAA
5 AY330919_BPYV 39.6% GAAACTGA------
6 GQ376201_DVCV 40.4% TCAATTGA------
7 NC_012910_LCV 43.6% GTTGCAGTAAATAA
8 U15441_LIYV 41.2% AACATCCATGTTAG
9 AJ557129_PYVV 40.4% TTGAGTAG------
10 NC_005896_SPAV 38.8% TTCAATGA------
11 KC888963_SPCSV 48.7% GTCTTCACTGTTGA
12 NC_013259_TICV 37.5% AACACCCATGCTAA
13 NC_006963_BYVaV 41.2% TATGA---------
14 M76485 32.5% ACACACGTTGA---
consensus/100% ....
consensus/90% ....
consensus/80% ...r..........
consensus/70% .y.r.yr.......

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	:	Salisu SULLEY
Doğum Yeri	:	Accra, GANA
Doğum Tarihi	:	05.04.1988
Medeni Hali	:	Bekar
Yabancı Dili	:	Türkçe

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise	:	St. John's Grammar Senior High School (2006)
Lisans	:	Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Faculty of Agriculture, Department of Crop and Soil Scıences (2011)
Yüksek Lisans	:	Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı Adı (Eylül 2013 – Ocak 2016)