



Domateste *Tomato spotted wilt virus*'üne karşı dayanıklılığı kıran izolatının fenotipik karakterizasyonu

Phenotypic characterization of *Tomato spotted wilt virus* resistance breaking isolate in tomatoes

Hakan FİDAN^{id}, Nuray SARI^{id}

Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antalya

Sorumlu yazar (Corresponding author): H. Fidan, e-posta (e-mail): hakanfidan@akdeniz.edu.tr

Yazar(lar) e-posta (Author e-mail): nuraysari007@gmail.com

MAKALE BİLGİSİ

Alınış tarihi 24 Temmuz 2019
Düzeltilme tarihi 22 Ağustos 2019
Kabul tarihi 26 Eylül 2019

Anahtar Kelimeler:

Dayanıklılığın kırılması
Domates
Domates lekeli lolgunluk virüsü (TSWV)
Mekanik inokulasyon
RT-PCR

ÖZ

Domateste lekeli solgunluk virüsü (*Tomato spotted wilt virus*-TSWV), dünya genelinde ekonomik anlamda büyük kayıplar meydana getiren virüslerden biridir. Son zamanlara kadar domateslerde *Sw-5* geni vasıtasıyla bu hastalık ile mücadele edilmekteydi. 2016-2019 yılları arasında Antalya ili ve ilçelerinde domates yetiştiriciliği yapılan seralarda *Sw-5* geni barındıran çeşitler üzerinde TSWV'a ait belirtilerin geliştiği gözlemlenmiştir. Bu izolatların PCR çalışmaları ile bitkilerin *Sw-5* geni içerdiği ve RT-PCR (Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu) çalışmaları ile de belirtilerin TSWV'a ait olduğu doğrulandıktan sonra izolatın ismi TSWVAntRB olarak belirlenmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda TSWVAntRB izolatının farklı simptomolojik karakterlere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılıklarının belirlenebilmesi için TSWVAntRB izolatının, bitkiler üzerine mekanik inokulasyonu 5 tekrarlolu olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Mekanik inokulasyon çalışmalarında; *Sw-5* geni içeren 4 adet ticari çeşit, bir adet dayanıklılık kaynağı olarak bilinen *Solanum peruvianum* ve bir adet hassas çeşit kullanılmıştır. *Sw-5* dayanımını kırmayan (NRB) izolatında şimdiye kadar yaprakta sadece nekrotik lekelenmeler meydana gelirken, *Sw-5* dayanımını kıran (RB) izolatında yaprak üzerinde de halkalı lekelenmelerin meydana geldiği belirlenmiştir. Aynı zamanda bazı çeşitler üzerinde ilk belirtiler meyve dönemine kadar gizli kaldığı ve meyve salkımlında bazen bir veya iki meyve üzerinde belirtiler meydana getirdiği gözlemlenmiştir. Çalışmada simptom şiddetinin hava sıcaklığı ile ilişkili olduğu saptanmış ve TSWVAntRB izolatının simptomolojik özellikleri her açıdan incelenmiştir.

ARTICLE INFO

Received 24 July 2019
Received in revised form 22 August 2019
Accepted 26 September 2019

Keywords:

Resistance breaking
Tomato
Tomato spotted wilt virus (TSWV)
Mechanical inoculation
RT-PCR

ABSTRACT

Tomato spotted wilt virus (TSWV) is one of the most important viruses that cause great economic losses in worldwide. Tomatoes including *Sw-5* resistance gene control resistance but they have recently been struggling with the virus disease. It was observed that typical symptoms developed on the varieties containing *Sw-5* gene in tomato cultivation areas in Antalya province and its districts between 2016-2019 years. These isolates were identified as TSWVAntRB after PCR studies and their host tomato plants were contained the *Sw-5* gene in RT-PCR analyses confirming that their symptoms belong to TSWVAntRB isolates. Further, observations revealed that TSWVAntRB isolate had different symptomological characteristics which explaining the differences. Mechanical inoculations with TSWVAntRB isolate on plants were performed with 5 repeats where 4 commercial varieties containing *Sw-5* gene, a *Solanum peruvianum* plant known as resistance source and one susceptible variety were used. Their results revealed that only necrotic spotting occurred in the leaves within the *Sw-5* non-resistance breaking (NRB) isolate while typical cyclic spotting presented within the *Sw-5* resistance breaking (RB) isolates. Additionally, first symptoms remained hidden until the fruit period and sometimes symptoms obtained on one or two fruits in a bunch. It was found that the severity of the symptoms increased within parallel to air temperature. We have been evaluating TSWVAntRB isolates' symptomological features in every aspect.

1. Giriş

Domates; insanlığın vazgeçilemez temel gıdalarından biri olması nedeniyle hem dünyada hem de ülkemizde en çok tüketilen ve üretilen sebzelerden biridir. Günümüzde gıda sanayisinde; dondurulmuş, kurutulmuş, keçap-salça, reçel ya da taze olarak kullanılmasının yanısıra son zamanlarda kozmetik sektöründe ilgisini çekmeyi başaramıştır (Türkomp 2016). Özellikle yüksek potasyum oranı, içerdiği C vitamini gibi vitaminler ve minareler ile sağlıklı ve dengeli beslenme açısından da önemli bir sebze olduğu görülmektedir (Türkomp 2016). Ülkemizde de yetiştirilme alanları göz önünde tutulduğunda hektar başına verdiği yüksek verimi sayesinde üreticiler arasında en fazla tercih edilen kültür bitkileri içerisinde yer almaktadır. Dünya genelinde domates üretimi incelendiğinde toplam 177 milyon ton olduğu ve (FAO 2018) Türkiye'nin 4. sırada yer alarak %7.2'lik paya sahip olduğu görülmektedir (Güvenç 2019). Bu nitelikleri göz önünde tutulduğunda domates ülkemizin tarımı için önemli bir yerde durduğu görülmektedir.

Domates, yetiştirildiği dönem boyunca da birçok biyotik ve abiyotik faktörlerden etkilenmektedir. Üretim alanlarının en büyük tehdidini virüs hastalıkları ve onlara taşıyıcılık yapan vektör böcekler oluşturmaktadır. Karşılaşılan vektörlerden beyazsinek (*Bemisia tabaci*), thripsler (*Frankliniella occidentalis*) ve afidler (*Myzus persicae*); *Tomato yellow leaf curl* (TYLCV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) ve *Tobacco mosaic virus* (TMV) gibi önemli sebze virüslerine vektörlük yaparak kültür bitkileri üzerinde ciddi hasarlar meydana getirmektedir. Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV), en önemli bitki virüslerinden birisi olup domates de dahil olmak üzere birçok kültür bitkisinde ciddi verim kayıplarına neden olabilmektedir (Scholthof ve ark. 2011).

TSWV, *Bunyaviridae* familyasının *Orthospovirus*ler olarak adlandırılan sınıfı içerisinde yer almaktadır (Adams ve ark. 2017). TSWV'nun genomu üç negatif çift yönlü okuma yapan tek iplikli RNA'lardan oluşmaktadır. Bu genom parçacıkları Large (L, 8.9 kb), Medium (M, 4.8 kb) ve Small segment (S, 2.9 kb)'den meydana gelmektedir (Kormelink 1994). Large segmenti antisens yapıya sahiptir ve RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) enzimini, Medium segmenti ambisens yapıdadır ve hareket proteini NSm ile yapısal protein olan thripslerle taşıma bölgesi Gn/Gc proteinlerini, Small segmenti ambisens karakterlidir ve nükleokapsid proteini N ve susturucu baskılayıcı bölge olan NSs alanını kodlamaktadır (Kormelink 1994).

TSWV; mekanik olarak taşınmasının yanı sıra, arazi koşullarında da thrips vektörleri (en önemli vektörü *F. occidentalis*) vasıtasıyla taşınarak bu hastalığın epidemisine katkıda bulunmaktadır (Rotenberg ve ark. 2015). TSWV, yapraklarda ve meyvelerde bodur ve klorotik veya nekrotik lekelerle neden olmaktadır ve ABD'de yıllık 1 milyar doları aşabilecek verim kayıplarına neden olabileceği belirtilmiştir (Pappu ve ark. 2009).

TSWV'den kaynaklı zararların önlenmesinde en etkili yöntemlerden biri dayanıklı çeşitlerin kullanılmasıdır. Domates bitkilerinde *Solanum peruvianum*'dan gelen *Sw-5* geni dayanıklılık ıslahında TSWV'a dayanıklı bitki yetiştirilmesi amacı için kullanılmıştır (Spasova ve ark. 2001). *Sw-5* geni bitkilerde hipersensitif reaksiyonlara (HR) neden olmakta ve virüsü ölü dokular içerisinde sınırlandırarak sistemik enfeksiyonları önlemektedir (Leastro ve ark. 2015). Günümüzde

ise *Sw-5* geninin dayanımını kıran TSWV izolatının dünyanın farklı bölgelerinde rapor edilmesiyle birlikte bu gen işlevini yitirmiştir (Aramburu ve Marti 2003; Lopez ve ark. 2011; Margaria ve ark. 2004; Lian ve ark. 2013; Peiro ve ark. 2014; Debreczeni ve ark. 2014). Ülkemizde ise özellikle de TSWV ait dayanıklılığı kıran izolatın hem domates hem biber bitkileri üzerinde rapor edilmesiyle birlikte (Deligoz ve ark. 2014; Fidan 2016) üretim alanlarda sorun yaratarak verim kayıplarını meydana getirmektedir. Üretim parametrelerini sınırlandıran bu hastalığın *Sw-5* dayanımını kıran ırkı üzerinde tüm genom çalışmaları yapılarak virüsün NSm-hücreden hücreye hareket bölgesindeki nokta mutasyonu (C118Y) vasıtasıyla dayanıklılık durumunun ortadan kalktığı belirlenmiştir (Fidan ve Sarı 2019). Ayrıca virüs vektörü thripslerin mevcut ilaçlara karşı direnç geliştirmesi (Dağlı ve Tunç 2008) yeni izolatın yayılmasında ve kalıcılığında etkili olmaktadır. Bu çalışma vasıtasıyla da yeni izolatın domates üzerinde dayanıklı ve hassas çeşitler üzerinde meydana getirdiği semptomlar farklı bakış açıları altında incelenerek yorumlarda bulunulmuştur.

2. Materyal ve Metot

Çalışmada kullanılan TSWV izolatı; 2016-2017 yılları arasında Antalya'nın Elmalı ilçesinde yaz döneminde domates üretim alanlarından temin edilmiştir. Sürveyler sırasında bu izolatların, üretici firmalar tarafından *Sw-5* geni ihtiva ettiği belirtilen çeşitlerde semptom geliştirdiği gözlenmiştir. Sürvey çalışmaları ile elde edilen bu izolat dayanıklı ve hassas bitkiler üzerine mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılmıştır. İzolatlar, çalışma boyunca Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim dalı Viroloji laboratuvarlarında muhafaza edilmiştir.

Mekanik inokulasyon çalışmalarında bulaştırılmak üzere seçilen bitki materyalleri firmalar tarafından dayanıklı ve hassas olarak beyan edilen bitkilerden oluşmaktadır. Çalışma boyunca yetiştirilen bitkiler Akdeniz Üniversitesi Fitopatoloji seralarında muhafaza edilmiştir.

Mekanik inokulasyon sonucunda semptom meydana getiren çeşitler üzerinde *Sw-5* geninin varlığını tespit edebilmek için DNA ekstraksiyonu Thermo Scientific-GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific Fisher, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon çalışması sonucunda elde edilen DNA'ların konsantrasyonları belirlenmiştir. Her bir örnek için PCR Bileşeni; DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) 11 µl, Forward primer 1.0 µM, Reverse primer 1.0 µM, Template DNA 10 pg - 1 µg, Su 11 µl olarak belirlenmiştir. Bu bitkilerin *Sw-5* dayanımları Dianese ve ark. (2010) geliştirilen Co-dominant primerleri kullanılarak doğrulanmıştır.

TSWV ile bulaşık bitki öz suları elde edilmesinde porselen havan ve havaneli kullanılmıştır. Mekanik inokulasyon çalışmalarında %0.1'lik 2-mercaptoethanol ve 0.02 gr DIECA kimyasalı içeren ve 1.5 (w/v) oranında hazırlanmış 0.02 M Fosfat tampon (pH: 7) çözeltisi kullanılmıştır. İlk inokulasyon, bitkilerin kotiledon yapraklarına olmak üzere toplamda 5 defa mekanik inokulasyon yapılmıştır. Mekanik inokulasyon sırasında bitkiler plastik sera içerisinde muhafaza edilmiştir.

İlk semptomların test bitkilerinde görülmesi ile birlikte örneklerin sadece TSWV ile enfekteli olduğunu doğrulayabilmek için domates bitkilerinde en sık görülen 12 adet virüs için test edilmiştir.

RT-PCR çalışmaları için bitkilerden yaprak örnekleri alınarak; Thermo Scientific-RNA izolasyon kiti (Thermo

Scientific Fisher, USA) ile RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'lar spektrofotometrede optimize edilerek (A260/280 1.8-2.0) konsantrasyonları 200 ng/μl olacak şekilde ayarlanmıştır. RNA optimizasyonu yapıldıktan sonra Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR Kit ReddyMix kullanılarak Tek Aşamalı RT-PCR (One Step RT-PCR) çalışmaları yürütülmüştür.

Her bir örnek için RT-PCR bileşenleri, Verso Enzim Mix 0.5 μl, 2X-1- Step PCR ReddMix 12.5 μl, RT Enhanser 1.25 μl, Forwrd primer 1 μl, Reverse primer 1 μl, RNA 2 μl, ddH₂O 6.25 μl olacak şekilde toplamda 25 μl olacak şekilde ayarlanmıştır. Test edilen virüsler; AMV (Saleh ve Amer 2013), CMV (Paradies ve ark. 2000), PVX (Fidan ve ark. 2011), PVY (Fidan ve ark. 2011), TEV (Lee ve ark. 2011), TMV (Kumar ve ark. 2011), ToMV (Kumar ve ark. 2011), TSWV (Adkins ve ark. 2005), TYLCV (Anfoka ve ark. 2008), ToCV (Tiberini ve ark. 2010), ToRSV (Fuchs ve ark. 2010), PepMV (Ge ve ark. 2013) olarak belirlenmiştir. Yapılan PCR ve RT-PCR analizleri sonucunda test bitkilerinin sadece TSWV ile enfekteli olduğu doğrulanmıştır.

Dianese ve ark. (2010) belirttiği markırlara göre yapılan moleküler testler sonucunda bitkilerin *Sw-5* durumları belirlenmiştir. RT-PCR çalışmaları ile simptomların sadece TSWV'a ait olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda Elmalı bölgesinden elde edilen örneklerin *Sw-5* dayanımını kıran bu izolat olduğu da doğrulanmıştır. Bu izolatın ismi TSWVAntRB olarak isimlendirilmiştir. NCBI (National Center for Biotechnology Information) sistemine kayıtları yapılmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

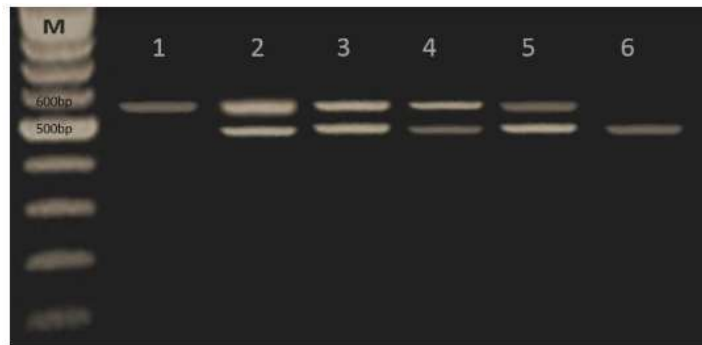
Yürütülen çalışma kapsamında, TSWV'nun *Sw-5* dayanımını kıran izolatı dayanıklı ve hassas bitkilere bulaştırılmış, bu izolatın klasik testleme yöntemi doğrulanmış ve oluşturduğu simptomlar gözlemlenerek eski ve yeni izolat arasında farklılıklar yorumlanmaya çalışılmıştır. Test bitkilerinde Dianese ve ark. (2010) geliştirdikleri SCAR markır kullanılmıştır. PCR çalışmasının sonuçları Şekil 1'de paylaşılmıştır. Yapılan analiz neticesinde hassas bitki 500 bp'de bant verirken dayanıklılık kaynağı *Solanum peruvianum*'da 574 bp ve heterozigot bitkilerde ise çift bant görülmüştür. Yapılan analizlerin sonuçları Şekil 1'de paylaşılmıştır.

Bitkilere toplamda 5 inokulasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve ilk simptomlar hassas çeşit olarak seçilen bitki materyali üzerinde gözlemlenmiştir. Hassas olarak seçilen bazı bitkilerinde ölümler meydana geldiği belirlenmiştir. Bu

ölümlerin bitkinin erken dönemlerde maruz kaldığı virüs partüküllerinin sebep olduğu düşünülmektedir. Bitkiler üzerinde ilk mekanik inokulasyonu takiben ikinci inokulasyon 2 gün sonra, diğer inokulasyonlar ise birer hafta arayla tekrar edilmiştir. Birinci inokulasyondan sonraki 15 günlük zaman dilimi içerisinde ilk simptomlar denemede hassas çeşit olarak seçilen bitki üzerinde meydana gelmiştir. Dayanıklı olarak seçilen çeşitler üzerinde ise ilk simptomların gözlemlenmesi farklı zaman dilimleri içerisinde geliştiği belirlenmiştir. *Sw-5* geni barındıran çeşitlerin bazılarında ilk simptomlar 3, bazı çeşitler üzerinde 5. mekanik inokulasyon sonrasında gözlemlenirken bazı çeşitler üzerinde ise uzunca bir dönem virüs latent periyoda kalarak bitki meyve dönemine geçtiği zaman özellikle meyveler üzerinde şiddetli simptomlarını meydana getirdiği gözlemlenmiştir. Bu farklılıkların nedenlerinin; *Sw-5* geni barındıran çeşitler üzerinde gerçekleştirilen üst üste enfeksiyonların, dayanıklılığın kırılmasında etkin rol oynayabileceği gibi mevsimsel olaylara bağlı olarak meydana gelen sıcaklık değişimlerinde etkili olmaktadır. Özellikle ilkbahardan yaz mevsimine geçişteki dönemde ilk mekanik inokulasyondan son mekanik inokulasyona kadar sıcaklık değerlerinde doğrusal bir artışın olması inokulasyonun başarısını ve simptomların ifadesini etkileyebileceği düşünülmektedir.

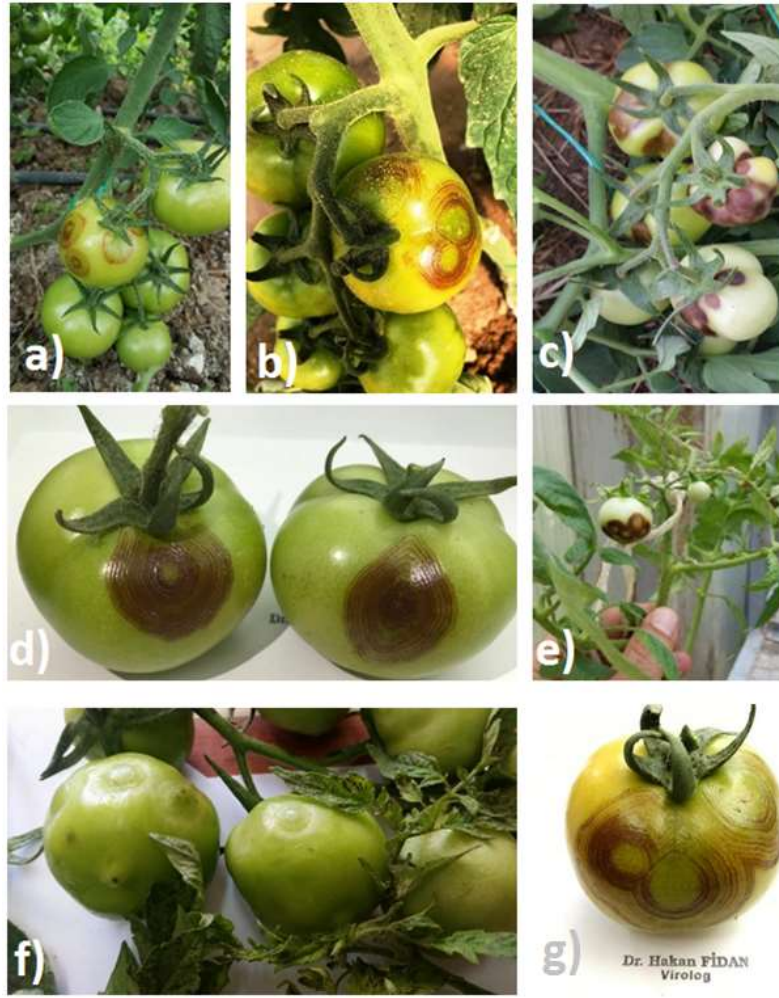
Sw-5 geni bulunduran çeşitler üzerinde dayanıklılığı kıran izolatın mekanik inokulasyonunda başarıyı etkileyen iki önemli faktörün olduğu belirlenmiştir. Bunlardan birincisi; mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan Fosfat tamponun içerisine eklenen binde 1 oranında DIECA kimyasalının domates bitkileri üzerinde inokulasyonun başarısını olumlu yönde etkilediği, bir diğerinin ise domates bitkileri üzerinden elde edilen TSWV izolatının yine domates üzerinden meydana getirilen enfeksiyonlarda başarılı sonuç verdiği yönündedir. Debreczeni ve ark. (2014) çalışmasında elde ettikleri bulgulara göre; *Tsw* genine sahip biber bitkileri üzerinde meydana gelen TSWV (biberde dayanıklılığı kıran izolatlar) enfeksiyonuna sahip izolatlar domates bitkileri üzerinde başarılı bir enfeksiyon meydana getiremediği, aynı şekilde *Sw-5* geni içeren domates bitkilerinden elde edilen izolatında biberler üzerinde başarılı bir enfeksiyon meydana getiremediği rapor edilmiştir.

Yürütülen çalışma kapsamında mekanik inokulasyon esnasında bulaştırma için seçilen izolatların başarıyı etkilemede kilit nokta olduğu belirlenmiştir. Şekil 2, Şekil 3 ve Şekil 4 TSWVAntRB izolatının mekanik inokulasyon sonrasında meydana getirdiği simptomlar gösterilmiştir.



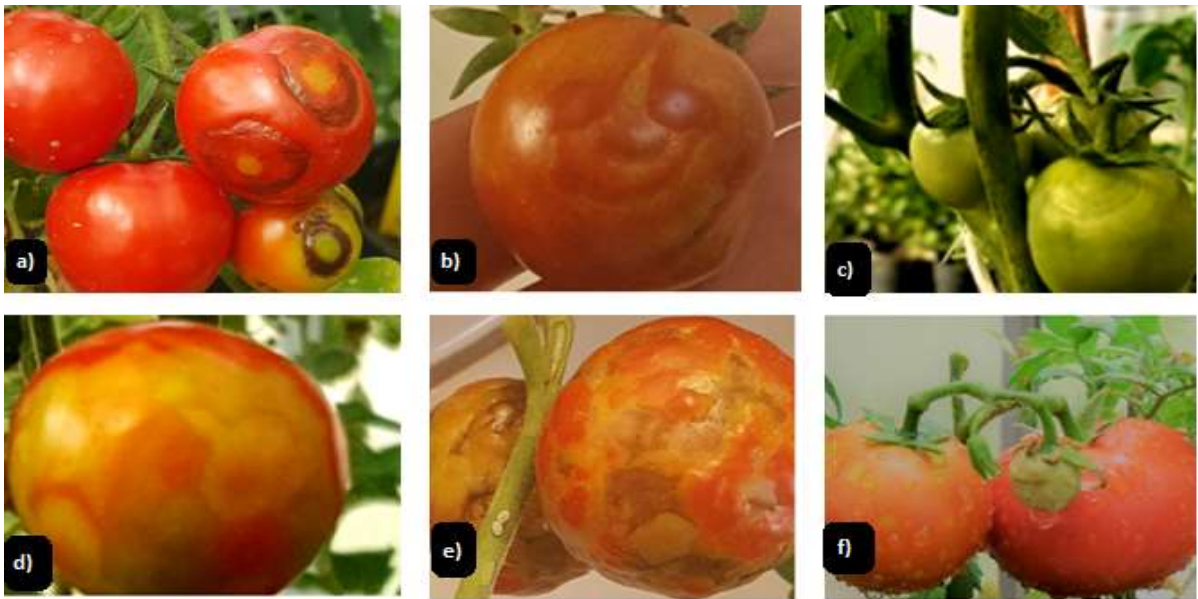
Şekil 1. Kullanılan bitki materyallerinin *Sw-5* geni dayanıklılık durumlarının belirlenmesi. M: Markır, 1 numara dayanıklılık kaynağı *Solanum peruvianum*, 2, 3, 4 ve 5 numara heterozigot dayanıklı örnek, 6 numara hassas kontrol.

Figure 1. Determination of resistance to *Sw-5* gene in used plant material in the study. M: Marker, number 1 resistance source *Solanum peruvianum*, number 2, 3, 4 and 5 number heterozygous resistant sample, number 6 susceptible control.



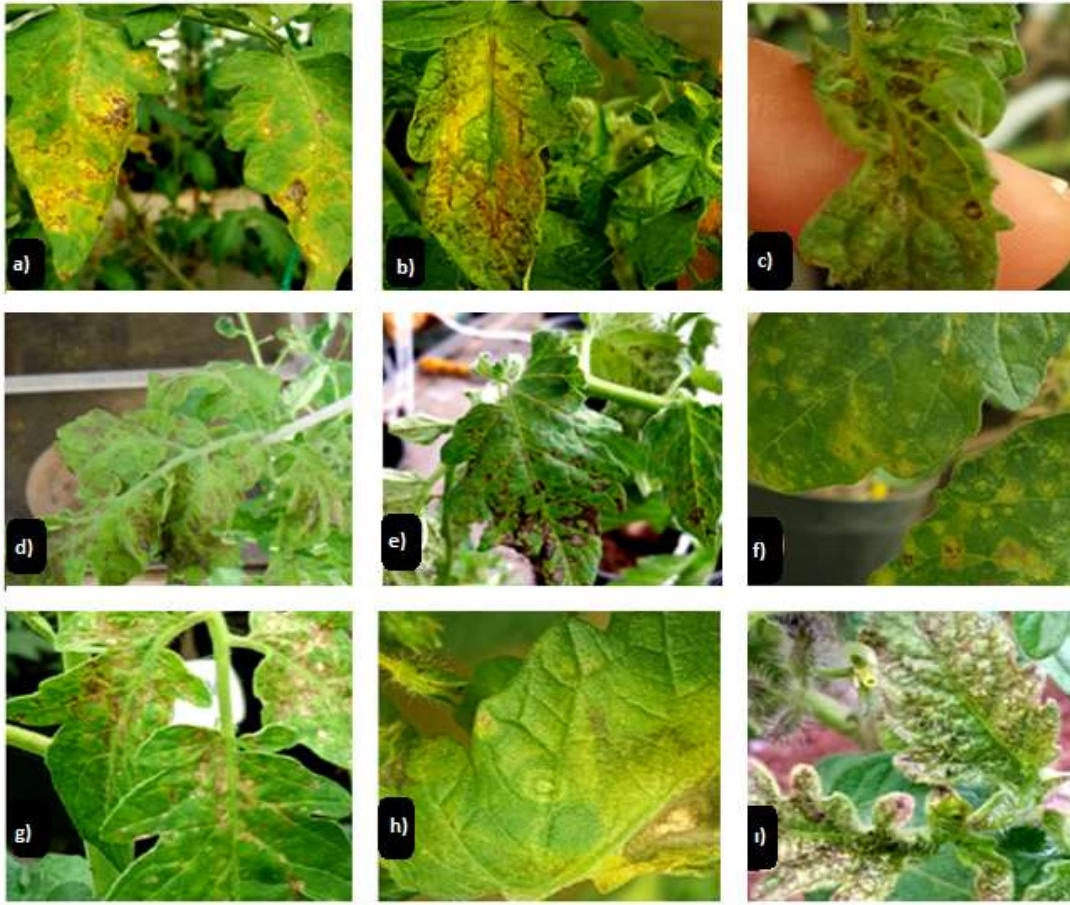
Şekil 2. TSWVAntRB izolatına ait gözlemler. a), b), c), d), e), f) ve g) TSWV'nun meyve üzerindeki belirtileri.

Figure 2. Observations of TSWVAntRB isolate on tomatoes. a), b), c), d), e), f) and g) Symptoms of TSWV on tomato fruit.



Şekil 3. TSWVAntRB izolatına ait gözlemler. a), b), c), d), e) ve f) TSWV'nun meyve üzerindeki belirtileri.

Figure 3. Observations of TSWVAntRB isolate on tomatoes. a), b), c), d), e) and f) Symptoms of TSWV on tomato fruit.



Şekil 4. TSWVAntRB izolatına ait gözlemler. a), b), c), d), e), f), g), h) ve i) TSWV'nun yaprak üzerindeki belirtileri.

Figure 4. Observations of TSWVAntRB isolate on tomatoes. a), b), c), d), e), f), g), h) and i) Symptoms of TSWV on tomato leaf.

Çalışma sonuçlarını simptomolojik açıdan değerlendirdiğimizde TSWVAntRB izolatının hem yaprak hem meyve hem de gövde üzerinde farklı belirtilere neden olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle meyve salkımları üzerinde meydana getirdiği belirtiler incelendiğinde bazı bitkilerde salkım üzerindeki TSWV belirtilerinin yoğun olarak sadece bir meyvede meydana geldiği, bazı meyvelerde ise koyu nekrotik lekelerin olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca meyve dönemine geçinceye kadar bitkide herhangi bir belirtmeye rastlanmamıştır. Hasat zamanı yaklaştığında en büyük zararlarını meydana getirmesi verim kayıplarının artışı tetiklemekte ve aynı zamanda bu izolatın simptomolojik olarak tanımlanmasını da zorlaştıran bir etmen haline gelmiştir.

TSWV'a ait belirtilerin bitkinin yetiştirildiği çevreye bağlı olarak bitkinin yaşına, beslenme programına, sıcaklık değişimlerine ve konukçudan konukçuya değişebildiği bilinmekle birlikte yapılan bu çalışma ile domates gibi aynı konukçu üzerinde de farklılaştığı belirlenmiştir. García-Cano ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada bu değişkenliğin aynı zamanda aynı virüsün farklı suşlarına bağlı olarak da meydana gelebileceğini ifade etmişlerdir. Yapılan bu çalışma ile de TSWV'nın *Sw-5* dayanımını kıran izolatının test bitkileri üzerindeki farklı simptomolojik reaksiyonları incelenerek yorumlarda bulunulmaya çalışılmıştır.

Sw-5 geni *Sw-5a*'dan *Sw-5e*'ye kadar değişen beş paralog gen çeşidine sahip olduğu (Dianese ve ark. 2010) daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir. Bu genler arasında *Sw-5b* geninin

*Orthospovirüs*ler için en geniş spektrumlu dayanıklılık geni olduğu belirtilmiştir (Spasova ve ark 2001; Hallwass ve ark. 2014; Leastro ve ark. 2015). Firmaların çeşitlerini oluştururken hangi materyalleri ile melezledikleri bilinmediği için bu bitkilerin farklı kaynaklardan elde ettikleri bitkiler üzerinde farklı belirtiler oluşturması beklenebilmektedir. İkinci olarak ise bu izolatın sıcaklık ile olan ilişkisidir. Bazı çalışmalarda sıcaklığın artması (30°C ve yukarı) ile *Sw-5* gibi tek dominant genlerinin aktivitesini kaybederek sistemik enfeksiyonların görülebileceğini ifade edilmiştir (Chung ve ark. 2018). Bu araştırmacıların işaret ettiği gibi sıcaklığın yükselmesi ile belirtilerin artışının birbirine paralel şekilde olması yorumlanması gereken bir diğer noktayı oluşturmaktadır. Birçok çeşit üzerinde ilk belirtilerin meyveler üzerinde görülmesinde bu denli bir etkinin olabileceği düşünülmektedir. Denemilerin ilk kurulduğu dönemlerdeki hava sıcaklığının 22-25°C arasındaki iken ilerleyen dönemlerde mevsimde etkisiyle hava sıcaklığının giderek artması ile belirtilerinin daha da şiddetlendiği *Sw-5* geni ve TSWV izolatı arasında bir etkileşim olduğunu düşünülmektedir. de Ronde ve ark. (2019) yaptıkları çalışmalarında ise; TSWV dayanımını kıran izolatların iki alt gruba ayrıldığını; AbsRB (Absolute resistance breaking- Her durumda dayanıklılığı kıran) ve TempRB (Temperature Resistance breaking- Sıcaklığa bağlı dayanıklılığı kıran) olduğunu belirtmişlerdir. Elde ettikleri TSWV'ye ait dayanıklılığı kıran izolatları farklı sıcaklıklar altında (23°C-35°C) bitkilere bulaştırarak, gözlemler gerçekleştirilmiş ve oluşturduğu belirtiler değerlendirilmeye

çalışılmıştır. NRB (None Resistance Breaking- Dayanıklılığı kırmayan) izolatin 23°C ve 30°C derecelere kadar dayanıklı bitkiler üzerinde simptom oluşturmazken, 32°C'de sistemik reaksiyonların oluşmaya başladığı, TempRB izolatinın ise 23°C-25°C arasında herhangi bir sistemik reaksiyon oluşturmazken 28°C ve üzerinde sistemik reaksiyonların meydana geldiğini ve AbsRB izolatinın ise 23°C-32°C arasındaki her sıcaklık artışında TSWV ait sistemik enfeksiyonların meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular incelendiğinde *Tsw* ve *Sw-5* gibi tek dayanıklılık genlerinin yüksek sıcaklıklarda inaktif duruma gelerek dayanıklılık durumunun ortadan kalktığı görülmüştür. Ülkemizden elde edilen TSWVAntRB izolatinın ise daha önceden yapılan çalışmalar ile (Fidan ve Sarı 2019) C118Y noktası üzerinde meydana gelen nokta mutasyonu neticesinde dayanıklılığın kırıldığı belirlenmiştir. Bölgemizde sorun haline gelen TSWV izolatinın hava sıcaklıklarına bağlı olarak da agresifliğinde meydana gelen değişimler bu izolatin hem sıcaklığa hem de mutasyona bağlı dayanıklılığı kıran izolatların birlikte bulunması neticesinde meydana gelebileceği düşünülmektedir.

Elde ettiğimiz bulgular, virüsün hareket proteini üzerindeki 118. noktasında meydana gelen mutasyonları taşıyan izolatin yılın her döneminde enfeksiyon meydana getirebilecekken, sıcaklığa bağlı olarak sistemik enfeksiyonları meydana getiren izolatin, ilkbahar- yaz dönemlerinde yetiştiricilik yapılan alanlarda sıkça karşılaşılabileceğini göstermektedir. Bu iki izolatin birlikte karışık halde bulunma ihtimali ise simptom ifadelerinin şiddetini ve yoğunluğunu etki ederek ekonomik zararları daha da yukarılara çekebilmektedir.

TSWVAntRB izolatlarının aynı denemeden elde edilen bitkiler üzerinde simptom yoğunluğu ve ifadesinin değiştiği Şekil 2, Şekil 3 ve Şekil 4'de gösterilmiştir. Şekil 2a ve Şekil 3a'da belirtilen bitkiler üzerindeki simptomlar dikkat edilirse meyve üzerinde meydana gelen simptomların daha geniş ve daha kahverengi olduğu, Şekil 2b, d ve e'de ise simptomların daha ince daha sık kahverengi halkalardan meydana geldiği belirlenmiştir. Şekil 2f'ye bakıldığında ise bir salkımda meydana gelen üç domatesten iki tanesinin gayet sağlıklı ve arzu edilen kırmızı meyvelere sahip olduğu fakat aynı salkımda yer alan iki sağlıklı meyvenin ortasında duran yeşil ve küçük meyvenin ise TSWV'a ait iç içe geçmiş kahverengi halkaların tüm bitkiyi sardığı gözlemlenmiştir. Şekil 2f'de ise yeşil meyve üzerindeki simptomlarının halkalı simptomlarının bombeli hale gelerek bitkide şekil bozukluğunu artırdığı tespit edilmiştir. Şekil 3b, d ve e'de ise kırmızı meyveler üzerinde iç içe geçen halkalanmalarının yerini dar sadece yuvarlak halkalı lekeler almıştır.

Ayrıca Şekil 4 incelendiğinde ise; TSWV'nun yapraklarda nekrotik lekeler oluşturduğu bilinmesine rağmen (Turhan ve Korkmaz 2006), TSWVAntRB izolatinın yapraklar üzerinde de halkalı lekeler meydana geldiği gözlemlenmiştir. Yaprak üzerindeki nekrotik lekeler incelendiğinde, Şekil 4e'de yaprak ucunda yoğunlaşırken, Şekil 4c ve g'de yaprak ayasında yoğunlaştığı, Şekil 4b ve d'de ise tüm yaprağa yayılan nekrotik lekelenmelerin meydana geldiği belirlenmiştir. Bu denemede elde edilen verilere göre de en önemli bulgunun Şekil 4a, h ve f'de yaprak üzerinde halkalı lekelenmelerin meydana geliyor olmasıdır. Şekil 4a'da bu lekelerin nekrotik halkalı lekeler olurken, Şekil 4h ve f'de açık renkli halkaların meydana gelmektedir. Daha önceden TSWV izolatinın gövde üzerinde herhangi bir simptom oluşturduğu belirtilmemiş olmasına rağmen test bitkileri üzerinde Şekil 5'de da belirtildiği gibi bu



Şekil 5. TSWVAntRB izolatinın gövde üzerindeki simptomları.

Figure 5. Symptoms of TSWVAntRB isolate on the stem.

halkalı nekrotik lekelerin gövde de görülmeye başlamış olmasıdır.

de Ronde ve ark. (2019) TSWV izolatlarını TempRB (sıcaklığa bağlı), AbsRB (her koşulda dayanıklılığı kıran) ve NRB (dayanıklılığı kırmayan) izolat olarak inceleyip sıcaklığa bağlı davranışlarını incelerken, Aramburu ve ark. (2015) NRB (None Resistance Breaking-Dayanıklılığı kırmayan) ve RB (Resistance Breaking-Dayanıklılığı kıran) izolatlarının birlikte bulunma ihtimallerini gözönünde bulundurarak yorumlarda bulunmuşlardır. Çalışmalarında sadece NR izolatinın bitkiler üzerinde HR yanıtları oluşturduğu ve sistemik enfeksiyonlar oluşturmadığını sadece RB izolatinın bitkilerde lokal enfeksiyonlara neden olduğunu rapor etmişlerdir. Margaria ve ark. (2004) TSWV'nun dayanıklılığı kıran irkinda HR sistemik dayanıklılığı indükleyen HR yanıtlarının yine de gözlemlenebildiğini rapor etmişlerdir. Aramburu ve ark. (2015) bu durumunu açıklamasını da NRB izolatinın gelen HR yanıtlarının bitkiler tarafından hala oluşturulabilirken RB izolatinın sistemik enfeksiyonu meydana getirebilme özelliğinden dolayı olduğunu savunmuşlardır. Aramburu ve ark. (2015) ayrıca NRB izolatlarının RB izolatları ile birlikte inokulasyonu sonucunda NRB izolatlarında birlikte enfekteleyebilme özelliği kazandığını düşünmüşlerdir. Bölgemizde tespit edilen bitkiler üzerindeki simptomların değerlendirildiğinde; *Sw-5* dayanımını kıran izolattın tek başına gösterdiği bir etkimi yoksa eski ve yeni izolatin birlikte bulunmasının epidemilere sağladığı katkılardan dolayı farklı simptomlara belirlenmesi gereken konulardandır. Bunun tespit edilmesi geliştirilmek istenen mücadele yöntemlerine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

di Rienzo ve ark. (2018) *Sw-5* genini kıran izolatin mutasyon belirlenen C118Y noktasına özgü primerler dizayn ederek bu yönlü çalışmalara desteklerini sunmuşlardır.

TSWV'nun avr determinantı önceki çalışmalarda (Zhu ve ark. 2017) Medium segmenti üzerindeki NSm alanı olarak belirlenmiştir. TSWV genomuna ait NSm proteini üzerindeki C118Y noktası dayanıklılığın belirlenmesinde spesifik bir nokta olduğu birçok araştırmacı tarafından belirlenmiştir.

Asıl önemli sorun ise virüs genomunda diğer noktalar değil de C118Y ve T120N noktalarının neden önemli olduğu konusudur. Virüsün NSm alanının, *Sw-5* dayanıklılığının avirülens belirleyicisi olduğu ve dayanıklılığın kırılmasından C118Y ve T120N mutasyonlarının sorumlu olduğu belirtilmiştir (Peiro ve ark. 2014). Zhu ve ark. (2017) NSm genomu üzerinde

bazı noktaları silerek yaptıkları analiz neticesinde 115. Nokta ile 135. nokta arasının Avrupa kökenli izolatlarda Sw5 geninin üstesinden gelmede oldukça önemli olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca araştırmacılar, bu primerler vasıtasıyla dayanıklılığı kıran ve kırmayan izolatlara hızlı bir şekilde tespit edilebileceğini ayrıca bölgedeki yoğunluğun belirlenmesinde de kolaylık sağlayacağını belirtmişlerdir.

4. Sonuç

Bu çalışma ile Antalya bölgesinde domates üretimi yapılan alanlarda Sw-5 geni bulunduran çeşitler üzerinden TSWV ile enfekteli bitkiler moleküler ve klasik yöntemler ile belirlenmiştir. Ülkemizde hem biber hem de domates üzerinde belirlenen bu izolata nazarın daha agresif tavırlar sergilediği ve ürünler üzerinde çok şiddetli semptomlar meydana getirerek pazar değerini düşürdüğü görülmüştür. Çalışma verilerinin bu alan üzerinde çalışan birçok araştırmacı ve ıslah firması için aydınlatıcı bilgiler içermesine özen gösterilmiştir.

Kaynaklar

- Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ, Kropinski AM, Kuhn MKH, Mushegian AR, Nibert M (2017) Changes to taxonomy and the international code of virus classification and nomenclature ratified by the international committee on taxonomy of viruses. Archives of Virology 162: 2505-2538.
- Adkins S, Zitter T, Momol T (2005) Tospoviruses (Family Bunyaviridae, Genus Tospovirus). Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Services Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida Fact Sheet, pp. 212.
- Anfoka G, Abhary M, Haj-Ahmad F, Hussein AF, Rezk A, Akad F, Abou-Jawdah YM, Lapidot F, Vidavski MK, Nakhla H, Sobh H, Atamian L, Cohen I, Sobol H, Mazyad DP, Maxwell-Czosnek H (2008) Survey of *Tomato yellow leaf curl disease*-associated viruses in the eastern Mediterranean basin. Journal of Plant Pathology 90(2): 311-320.
- Aramburu J, Marti M (2003) The occurrence in north-east Spain of a variant of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the Sw-5 gene. Plant Pathology 52: 407.
- Aramburu J, Galipienso L, Soler S, Rubio L, Lopez V (2015) A severe symptom phenotype in pepper cultivars carrying the Tsw resistance gene is caused by a mixed infection between resistance-breaking and non-resistance-breaking isolates of *Tomato spotted wilt virus*. Phytoparasitica 43(5): 597-605.
- Chung BN, Lee JH, Kang BC, Koh SW, Joa JH, Choi KS, Ahn JJ (2018) HR-Mediated Defense Response is Overcome at High Temperatures in *Capsicum* Species. Plant Pathology 34(1): 71-77.
- Dağlı F, Tunç İ (2008) Insecticide Resistance In *Frankliniella Occidentalis*: Corroboration Of Laboratory Assays With Field Data And Cross-Resistance in A Cypermethrin-Resistant Strain. Phytoparasitica 36: 352-359.
- de Ronde D, Lohuis D, Kormelink R (2019) Identification and characterization of a new class of temperature-dependent Tsw -based *Tomato spotted wilt virus* resistance breaking isolates. Plant Pathology 68(1): 60-71.
- Debreczeni DE, Rubio L, Aramburu J, Lopez C, Galipienso L, Soler S, Belliure B (2014) Transmission of *Tomato spotted wilt virus* isolates Able and Unable To Overcome Tomato or Pepper Resistance by its Vector *Frankliniella occidentalis*. Annals of Applied Biology 164(2): 182-189.
- Deligoz I, Sokmen MA, Sari S (2014) First report of resistance-breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* (*Tospovirus; Bunyaviridae*) on resistant sweet pepper cultivars in Turkey. New Disease Reports 30: 26.
- di Rienzo V, Bubici G, Montemurro C, Cillo F (2018) Rapid identification of tomato Sw-5 resistance-breaking isolates of *Tomato spotted wilt virus* using high resolution melting and TaqMan SNP Genotyping assays as allelic discrimination techniques. Plos One 13(4).
- Dianese EC, Fonseca MEN (2010) Development of A Locus-Specific, Co-Dominant SCAR Marker for assisted-selection of the Sw-5 (*Tospovirus* Resistance) gene. Molecular Breeding 25: 133-142.
- FAO (2018) Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://fenix.fao.org/faostat/internal/en/#home>. Accessed 05 July 2019.
- Fidan H, Adak NA, Konuksal A, Akerzurumlu E, Yılmaz MA (2011) Occurrence of *Alfalfa Mosaic Virus* (AMV) Diseases on Potato Crops in Northern Cyprus, 5th Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes, Tirana, Arnavutluk, 960: 341-346.
- Fidan H (2016) Antalya'da Örtü Altı Domates ve Biber Alanlarında Dayanıklılık Kıran *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) İzolatlarının Genetik Kıyaslanması, VI. Türkiye Bitki Koruma Kongresi Konya, Türkiye, s. 560.
- Fidan H, Sari N (2019) Molecular characterization of resistance-breaking *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) isolate medium segment in tomato. Applied Ecology and Environmental Research 17: 2203-2218.
- Fuchs M (2010) Association of Tobacco ring spot virus, Tomato ring spot virus and Xiphinema americanum with a decline of high bushblue berry in New York, 21st International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Neustadt, Germany, 427: 15-17.
- García-Cano E, Resende RO, Fernández-Muñoz R, Moriones E (2006) Synergistic Interaction Between *Tomato chlorosis virus* and *Tomato spotted wilt virus* Results in Breakdown of Resistance in Tomato. Phytopathology 96(11): 1263-1269.
- Ge B, Li Q, Liu G, Lu M, Li S, Wang H (2013) Simultaneous detection and identification of four viruses infecting pepino by Multiplex RT-PCR. Archives of Virology 158(6): 1181-1187.
- Güvenç İ (2019) Türkiye'de Domates Üretimi, Dış Ticareti ve Rekabet Gücü. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım Doğa Dergisi 22(1): 57-61.
- Hallwass M, de Oliveira AS, Dianese E, Lohuis D, Boiteux LS, Nagata AK, Resende RO, Kormelink R (2014) The *Tomato spotted wilt virus* cell-to-cell movement protein (NSM) triggers a hypersensitive response in Sw-5 containing resistant tomato lines and in *Nicotiana benthamiana* transformed with the functional Sw-5b resistance gene copy. Molecular Plant Pathology 15(9): 871-880.
- Kormelink R, Storms M, Van J, Peters LD, Goldbach R (1994) Expression and Subcellular Location of the NSM Protein of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), a Putative Viral Movement Protein. Virology 200: 56-65.
- Kumar S, Udaya-Shankar AC, Nayaka SC, Lund OS, Prakas HS (2011) Detection of *Tobacco mosaic virus* and *Tomato mosaic virus* in pepper and tomato by multiplex RT-PCR. Letter in applied Microbiology 53(3): 359-363.
- Leastro MO, Pallas V, Resende RO, Sanchez-Navarro JA (2015) The movement proteins (NSm) of distinct *Tospoviruses* peripherally associate with cellular membranes and interact with homologous and heterologous NSm and nucleocapsid proteins. Virology 478: 39-49.

- Lee JS, Cho WK, Choi H, Kim KH (2011) RT-PCR Detection of five Quarantine Plant RNA Viruses Belonging to Poty and Tospoviruses. *Plant Pathology* 27(3): 291-296.
- Lian S, Lee JS, Cho WK, Yu J, Kim MK, Choi HS, Kim KH (2013) Phylogenetic and Recombination Analysis of *Tomato spotted wilt virus*. *Plos One* 92: 210-215.
- Lopez C, Aramburu J, Galipienso L, Soler S, Nuez F, Rubio L (2011) Evolutionary analysis of tomato *Sw-5* resistance-breaking isolates of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of General Virology* 92: 210-215.
- Margaria P, Ciuffo M, Turina M (2004) Resistance breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* (*Tospovirus; Bunyaviridae*) on resistant pepper cultivars in Almería, Spain. *Plant Pathology* 53(6): 795.
- Paradies F, Finetti M, Gallitelli D, Castellano M, Di Franco A, Digiaro M, Martelli G, Yılmaz A (2000) Partial characterization of cucumber mosaic virus isolates from citrus and grapevine. *Journal of Plant Pathology* 82(2): 133-145.
- Pappu HR, Jones RAC, Jain RK (2009) Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus Research* 141: 219-236.
- Peiro A, Canizares MC, Rubio L, Lopez C, Moriones E, Aramburu J, Sanchez-Navarro J (2014) The movement protein (NSm) of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the tomato *Sw-5* gene-based resistance. *Molecular Plant Pathology* 15: 802-813.
- Rotenberg D, Jacobson AL, Schneewis DJ, Whitfield AE (2015) Thrips transmission of Tospoviruses. *Current Opinion in Virology* 15: 80-89.
- Saleh MA, Amer MA (2013) Biological and Molecular Variability of *Alfalfa mosaic virus* Affecting Alfalfa Crop in Riyadh Region. *Plant Pathology* 29(4): 410-417.
- Scholthof KB, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P (2011) Top 10 Plant Viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 12: 938-954.
- Spasova MI, Prins TW, Folkertsma RT, Klein-Lankhorst RM, Hille J, Goldbach RW (2001) The tomato gene *Sw-5* is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. *Molecular Breeding* 7: 151-161.
- Tiberini A, Tomassoli L, Barba M, Hadidi A (2010) Oligonucleotide microarray based detection and identification of 10 major tomatoviruses. *Journal of Virological Methods* 168: 133-140.
- Turhan P, Korkmaz S (2006) Çanakkale ilinde domates lekeli solgunluk virüsü'nün serolojik ve biyolojik yöntemlerle saptanması. *Tarım Bilimleri Dergisi* 12(2): 130-136.
- Türkomp (2016) Ulusal Gıda Kompozisyon Veritabanı. <http://www.turkomp.gov.tr/main>. Erişim 05 Temmuz 2019.
- Zhu M, Jiang L, Bai B, Zhao W, Chen X, Li J, Tao X (2017) The Intracellular Immune Receptor *Sw-5b* Confers Broad-Spectrum Resistance to Tospoviruses through Recognition of a Conserved 21-Amino Acid Viral Effector Epitope. *The Plant Cell* 29(9): 2214-2232.