T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Solanuım nigrum L. ve *Chenopodium album* L.'dan *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV)' ın RNA İZOLASYON OPTİMİZASYONU ve BU YABANCI OTLARIN KONUKÇULUK POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Hazırlayan
Tuğba ERDOĞAN

Danışman
Prof. Dr. Doğan IŞIK

2. Danışman
Dr. Cemile TEMUR ÇINAR

Yüksek Lisans Tezi

Ocak 2025
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Solanuım nigrum L. ve *Chenopodium album* L.'dan *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV)' ın RNA İZOLASYON OPTİMİZASYONU ve BU YABANCI OTLARIN KONUKÇULUK POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Hazırlayan
Tuğba ERDOĞAN

Danışman
Prof. Dr. Doğan IŞIK

2. Danışman
Dr. Cemile TEMUR ÇINAR

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FYL-2023-12673 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Ocak 2025
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Tuğba ERDOĞAN

"*Solanum nigrum* L. ve *Chenopodium album* L.'dan *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV)' ın RNA İzolasyon Optimizasyonu Ve Bu Yabancı Otların Konukçuluk Potansiyellerinin Belirlenmesi **"** adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi' ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan	**Danışman**
Tuğba ERDOĞAN	Prof. Dr. Doğan IŞIK
İmza	İmza

Bitki Koruma ABD Başkanı

Prof. Dr. H. Handan ALTINOK

İmza

TEŞEKKÜR

Danışmanlığımı üstlenerek yönlendirmeleriyle akademik gelişmeme yön veren, süreç boyunca bana rehberlik ederek bu çalışmayı bitirmemi sağlayan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Doğan IŞIK'a en derin teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışmasının hiçbir aşamasında beni yalnız bırakmayan, bilgi ve tecrübeleriyle bana ışık tutan, tüm desteğini sunarak sadece akademik değil insani anlamda da gelişmeme katkı sağlayan ve bana her zaman inanan sevgili hocam Dr. Cemile TEMUR ÇINAR'a sonsuz minnettarlığımı belirtmek istiyorum, onunla bu çalışmayı yürütmek benim için bir şanstı.

Saygıdeğer Jüri Üyeleri Doç. Dr. Sümer Horuz ve Doç. Dr. Serkan Yeşil hocalarıma zamanlarını ayırarak çalışmamı değerlendirdirdikleri ve kıymetli görüşleri, yapıcı eleştirileri ile çalışmama katkı sundukları için en içten teşekkürlerimi sunarım. Tezime dair sunduğunuz geri bildirimler, akademik gelişimime ışık tutmuş ve çalışmamı daha ileri bir noktaya taşımam için bana önemli bir rehber olmuştur.

Hayatımın tüm anında olduğu gibi bu süreçte de sevgisiyle bana her zaman güç veren, bu yolda adım atmam için beni cesaretlendiren sevgili eşim Öğr. Gör. Emre ERDOĞAN'a tüm desteği için, her fırsatta yanımda olarak fedakârlık yapan bu süreçte yalnız olmadığımı hissettirerek hayatımı kolaylaştıran sevgili ailem annem Dilek ÖZDEK ve babam Uğur ÖZDEK'e bana hep inandıkları ve her zaman arkamda durdukları için, son olarak da çalışma sürecim boyunca sabırla beni bekledikleri, gülüşleriyle yorgunluklarımı unutturdukları ve bana ilham kaynağı oldukları için oğullarım Erdal Çağan ve Atahan'a teşekkür etmek istiyorum.

Hayatımın bu önemli döneminde bana katkı sunan ve yolculuğuma anlam katan herkese minnettarım.

Tuğba ERDOĞAN

OCAK 2025, KAYSERİ

Solanum nigrum L. ve _Chenopodium album_ L.'dan _Tomato brown rugose fruit virus_ (ToBRFV)' ın RNA İZOLASYON OPTİMİZASYONU ve BU YABANCI OTLARIN KONUKÇULUK POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Tuğba ERDOĞAN

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2024
Danışman: Prof. Dr. Doğan IŞIK

ÖZET

Tomato brown rugose fruit virus (Domates kahverngi buruşuk meyve virüsü-ToBRFV), domates üreticileri için yeni ortaya çıkan bir hastalık ve viral bir salgın olarak kabul edilmektedir. Bu araştırmanın amacı ToBRFV'nin *Solanum nigrum* L. ve *Chenopodium album* L. yabancı otlarından etmenin izolasyon optimizasyonu ve bu yabancı otların test bitkisi olarak kulanım potansiyellerinin belirlenmesidir. Bu ana konukçu olmayan bitkilerde ToBRFV'nin tespiti ve incelenmesi, düşük viral yük, bitki inhibitörleri ve doku özelliklerindeki değişkenlikler gibi zorluklar nedeniyle optimize edilmiş RNA izolasyon protokollerini gerektirmektedir. Bu amaçla ToBRFV, toplam 10 adet *C. album* ve 4 adet *S. nigrum* bitkisine 10-11 gerçek yapraklı döneme geldiğinde mekanik olarak inoküle edilmiştir. Simptom gösteren örneklerden alınan yapraklar, SDS-LiCl yöntemi (fenol kullanılarak ve kullanılmadan), CTAB-LiCl yöntemi ve RNA izolasyon kiti kullanılarak işlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan RNA izolasyon teknikleri arasında, modifiye edilmiş SDS-LiCl yöntemi ile kaliteli RNA izole edilebilmiş ve bu yöntem en uygun teknik olarak belirlenmiştir. İki bitki de indikatör bitki olma potansiyelleri açısından değerlendirildiğinde, *Solanum nigrum* L. bitkisinin *Chenopodium album* L. bitkisine göre uzun ömürlü olması ve farklı iklim koşullarına dayanıklı olması, sadece lokal simptomlar göstermemesi, aynı zamanda virüsü sistemik olarak taşıyabilme potansiyeline sahip olması bakımından üstün olduğu bulunmuştur. Bu çalışma, *Solanum nigrum* L. ve *Chenopodium album* L. bitkilerinden RNA izolasyonunun verimliliğini artırmaya yönelik yenilikçi yaklaşımları incelemekte, standart izolasyon yöntemleriyle karşılaştırmalı bir analiz sunmaktadır ve RNA verimi ile saflığını artırmak için yeni çözümler önermektedir.

Anahtar Kelimeler: Tomato brown rugose fruit virüs, RNA izolasyon, *Solanum nigrum* L., *Chenopodium album* L., Yabancı ot

RNA Isolation Optimization of *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) from *Solanum nigrum* L. and *Chenopodium album* L. and Determination of the Host Potential of These Weeds

Tuğba ERDOĞAN

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences
Master Thesis, Month Year
Supervisor: Prof. Dr. Doğan IŞIK

ABSTRACT

Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) is considered an emerging disease and a viral epidemic affecting tomato. The aim of this research is to optimize the isolation of ToBRFV from the weeds *Solanum nigrum* L. and *Chenopodium album* L. and to determine its potential for use as a test plant. For this purpose, ToBRFV was mechanically inoculated when a total of 10 *Chenopodium album* L. and 4 *Solanum nigrum* L. plants reached the stage of 4-5 true leaves. The detection and study of ToBRFV in these non-primary hosts requires optimized RNA isolation protocols due to challenges such as low viral load, plant inhibitors, and variations in tissue properties. This paper explores innovative approaches to improve the efficiency of RNA isolation from *Solanum nigrum* L. and *Chenopodium album* L., offering a comparative analysis with standard isolation methods and proposing novel solutions to increase RNA yield and purity. By addressing the unique biochemical challenges posed by these plants, our work provides an essential foundation for accurate ToBRFV diagnosis and further virological research. The leaves taken from the samples showing symptoms were applied using SDS-LiCl method with and without phenol, CTAB-LiCI methods and the RNA isolation kit was used. Among the RNA isolation techniques used in this study, the most suitable one was found as modifing SDS-LiCl from which good quality RNA was able to be isolated. When the two plants were evaluated in terms of their potential as indicator plants, *Solanum nigrum* L. plant was found to be superior to *Chenopodium album* L. plant in terms of longevity and resistant to different climatic conditions, not only showing local symptoms but also having the potential to carry the virus systemically.

Keywords: Tomato brown rugose fruit virus, RNA isolation, *Solanum nigrum* L., *Chenopodium album* L., weeds

İÇİNDEKİLER

Solanum nigrum L. ve *Chenopodium album* L.'dan *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV)' ın RNA İZOLASYON OPTİMİZASYONU ve BU YABANCI OTLARIN KONUKÇULUK POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ii
KABUL VE ONAY iii
TEŞEKKÜR v
ÖZET vi
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER viii
KISALTMALAR ve SİMGELER xi
TABLOLAR LİSTESİ xii
ŞEKİLLER LİSTESİ xiii
GİRİŞ 1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Domates kahverengi buruşuk meyve virüsü (*Tomato brown rugose fruit virus*-ToBRFV) 4
1.2. Domates kahverengi buruşuk meyve virüsü (*Tomato brown rugose fruit virus*-ToBRFV)'nün yabancı ot konukçuları 7
1.3. Domates kahverengi buruşuk meyve virüsü (*Tomato brown rugose fruit virus*-ToBRFV)'nün domates ve yabancı otlarda tanılanmasıyla ilgili çalışmalarda kullanılmak üzere uygulanmış total RNA izolasyon yöntemleri 8
1.4. Yabancı otların bitki virüsleri ve epidemiyolojisindeki rolü 9
1.4.1. *Solanum nigrum* L. 9
1.4.2. *Chenopodium album* L. 10

2. BÖLÜM
MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal 12
2.1.1. Bitkisel Materyal 12
2.2. Yöntem 12
2.2.1. Virüsün Biyolojik Yöntemlerle Taşınması 12
2.2.2. RNA izolasyonunda Kullanılacak Bitkisel Materyalin Seçimi 13
2.2.3. RNA Ekstraksiyonu 14
2.2.3.1. SDS-LiCl Yöntemi ile RNA izolasyonu 14
2.2.3.2. Değiştirilmiş SDS-LiCl Yöntemi ile RNA izolasyonu 15
2.2.3.3. CTAB-LiCI Yöntemi ile RNA İzolasyonu 16
2.2.3.4. GeneJET Plant RNA Purification Mini Kiti ile RNA izolasyonu 17
2.2.4. cDNA Sentezi ve RT-PCR (Ters Transkriptaz- Polimeraz Zincir Reaksiyonu) 18
2.2.5. RT-PCR analizleri 18
2.2.6. RNA kalitesi ve miktarı değerlendirmesi 18
2.2.7. İndikatör bitki olarak kullanılan *Solanum nigrum* bitkisinin inokulum kaynağı olarak kullanımının uygunluğu testi 19

3. BÖLÜM
BULGULAR

3.1. ToBRF izolatının filogenetik analizleri 18
3.2. Domates kahverengi buruşuk meyve virüsü (*Tomato brown rugose fruit virus*) inoküle edilmiş *Solanum nigrum* L. ve *Chenopodium album* L. bitkilerinde simptomolojik gözlemler 21
3.2.1. *Solanum nigrum* L. 22
3.2.2. *Chenopodium album* L. 22
3.3. İndikatör bitki olarak kullanılan *Solanum nigrum* bitkisinin inokulum kaynağı olarak kullanımının uygunluğu 23
3.4. RNA Verimi ve Kalitesi 24

3.5. Farklı izolasyon yöntemleri kullanılarak izole edilen RNA'ların bütünlüğünün ToBRFV'ye özgü primerler kullanılarak RT-PCR analizleri ile değerlendirilimesi..... 27

4. BÖLÜM
TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1.Tartışma 27
4.2.Sonuç ve Öneriler..... 31
KAYNAKÇA..... 33
ÖZGEÇMİŞ 37

KISALTMALAR ve SİMGELER

Cdna	: Komplementer Tamamlayıcı DNA
EPPO	: Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Örgütü
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
RT-PCR	: Ters Transkriptaz- Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TMV	: Tütün mozaik virüsü
ToBRFV	: Domates Kahverengi Buruşuk Meyve Virüsü
ToMV	: Domates mozaik virüsü

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Domates kahverengi buruşuk meyve virüsünün görüldüğü ülkeler 5

Tablo 2. GeneJET Bitki RNA Saflaştırma Mini Kiti kullanılarak *C. album* ve *S. nigrum* yaprağından izole edilen toplam RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı. 25

Tablo 3. Modifiye SDS-LiCl yöntemi kullanılarak *C. album* ve *S. nigrum* yaprağından izole edilen toplam RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı. 26

Tablo 4. SDS-LiCl yöntemi kullanılarak *C. album* ve *S. nigrum* yaprağından izole edilen toplam RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı. 26

Tablo 5. CTAB-LiCI yöntemi kullanılarak *C. album* ve *S. nigrum* yaprağından izole edilen toplam RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı. 27

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. *Tomato brown rugose fruit virus*'ın küresel yayılımını gösteren dağılım haritası 2

Şekil 2. Domates kahverengi buruşuk meyve virüsünün domates ve biber bitkilerinde yaygın görülen simptomları (A: Domates bitkisinin yapraklarında koyu yeşil kabarma ve yaprak ayasında daralma; B: Biber bitkisinin yapraklarında kabarma ve damar bantlaşması; C, D, E: Domates ve biber meyvelerinde halkasal lekeler ve domates meyvesinde renk değişikliği) 6

Şekil 3. Kullanılan Bitkisel materyal (A: *Solanum nigrum* L.; B: *Chenopodium album L.*) 12

Şekil 4. Bitkisel materyale ToBRFV' nin mekanik inokulasyonu (A: *Chenopodi album* L. bitkisine mekanik inokülasyon işlemi; B*: Solanum nigrum* L. bitkisine mekanik inokülasyon işlemi) 13

Şekil 4. ToBRFV-F/R primerleri kullanılarak gerçekleştirilen RT-PCR analizi (1:Markır, 2-11: *C. album,* 12-14: *S. nigrum* , 15-16: Domates (+), 17: Domates (-)).. 13

Şekil 5. ToBRFV izolatlarının filogenetik analizi, 1000 bootstrap değeri ile neighbor-joining yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mevcut deneyde incelenen örnekler mavi kare ile gösterilmiştir. Diğer diziler ise NCBI veritabanından indirilmiştir. 21

Şekil 6. Domates kahverengi buruşuk meyve virüsünün *Solanum nigrum* L.bitkisinde görülen simptomları (A: Virüs inoküle edilmemiş *S. nigrum* bitkisi; B, D: koyu yeşil kabarma; C: mozaik benzeri belirtiler) 22

Şekil 7. Domates kahverengi buruşuk meyve virüsünün *Chenopodium album* L. bitkisinde görülen simptomları (A: Virüs inoküle edilmemiş *C. album* bitkisi; B: klorotik lekeler; C, E: klorotik halkalı lekeler; D: koyu yeşil beneklenme) 23

Şekil 8. *Nicotiana tabacum* cv. Samsun bitkisinde gözlenen ToBRFV belirtileri (A: *S. nigrum* inokulum kaynağı olarak kullanılmıştır; B: *Nicotiana tabacum* cv. Samsun) ... 24

Şekil 9. ToBRFV-F/R primerleri kullanılarak gerçekleştirilen RT-PCR analizi (M: Markır, T1, T2: *C. album* , T3, T4: *S. nigrum* , P: pozitif kontrol +, N: negatif kontrol-) (A: SDS-LiCI yöntemi; B: CTAB-LiCI; C: Modifiye SDS-LiCI yöntemi; D: GeneJET Bitki RNA Saflaştırma Mini Kiti) 28

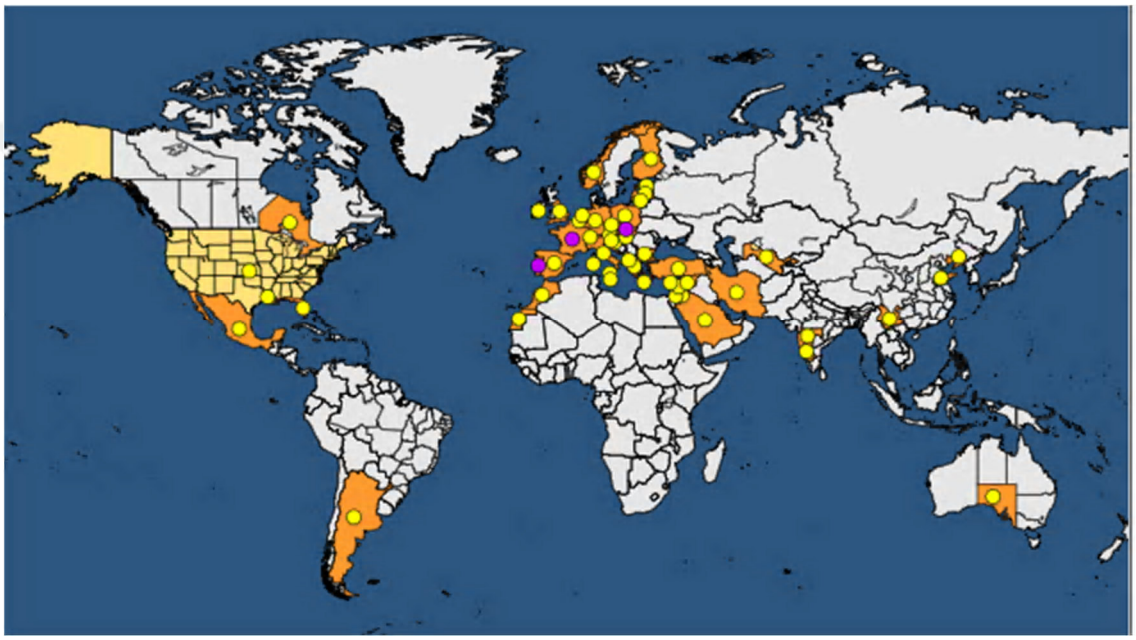
GİRİŞ

Domates (*Solanum lycopersicum* L.), likopen, çeşitli vitamin ve mineralleri bünyesi içerisinde barındıran, tropik bölgelerde çok yıllık üretimi yapılırken, diğer bazı bölgelerde ise tek yıllık bir kültür bitkisidir. Dünyada en çok üretilen, tüketilen ve ticari anlamda bir gelir kaynağı oluşuyla, insan beslenmesinin vazgeçilemez bir kaynağı olması ve gıda sanayisinde dondurulmuş, konserve, salça, ketçap ve turşu gibi çok çeşitli kullanım alanlarına sahip olması sebebiyle de önemli tarım ürünlerinin başında gelmektedir (Bayrak ve Kaya, 2009).

Domates bitkisi birçok hastalığın etkisi altındadır. Açık alanlarda yetiştiriciliği yapılan domateslerde fungal, bakteriyel ve virüs hastalıklarının önemi büyüktür. Fungal ve bakteriyel hastalıklarla kimyasal mücadele mümkün olabilirken virüs hastalıklarının henüz kimyasal mücadelesi bulunmamaktadır. Bu nedenle virüs hastalıkları bitkisel üretimde önemli bir sınırlayıcı faktördür (Hanssen et al., 2010). Domateste virüs hastalıklarının belirlenmesi ve virüs hastalıkları ile mücadele yöntemlerinin araştırılması büyük önem kazanmaktadır.

Virüsler, domates üretimini engelleyen birkaç önemli patojen arasındadır ve önemli virüsler arasında, bunlarla sınırlı olmamak ile, *Begomovirus, Tospovirus, Cucumovirus, Potyvirus* ve *Tobamovirus* cinsine dahil virüs hastalık etmenleri yer almaktadır. Bu virüslerin neden olduğu enfeksiyon mahsul verimini azaltır, meyve kalitesini ve pazarlanabilirliğini bozarak önemli ekonomik kayıplara neden olur (Hanssen ve Lapidot, 2012; Jones ve Naidu, 2019; Moury ve Verdin, 2012). Tarihsel olarak *Tobamovirus* cinsi özellikle önemlidir çünkü Tütün mozaik virüsü (TMV), Domates mozaik virüsü (ToMV) gibi yaygın görülen virüsleri içermektedir (ICTV, 2021).

Mevcut viral patojenlerin yanı sıra son yıllarda ortaya çıkan viral hastalıklar da domates üretimi için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Son zamanlarda, domates bitkilerinde *Tobamovirus* cinsinde yeni bir virüs olan Domates kahverengi buruşuk meyve virüsü (*Tomato brown rugose fruit virus*-ToBRFV) tespit edilmiştir (Luria et al., 2017; Salem et al., 2016). Virüs, şimdilerde birçok ülkede domates üretim alanlarında yıkıcı hastalık salgınlarına yol açarak verimde ciddi düşüşlere yol açmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. Tomato brown rugose fruit virus'ın küresel yayılımını gösteren dağılım haritası (EPPO, 2024).

Günümüzde çeşitli faktörlere bağlı olarak bitki virüsü hastalıkları dünya çapında hızla artış ve yayılım göstermektedir. Yabancı otlar bitki virüs hastalıkları açısından değerlendirildiğinde virüslerin ve vektörlerinin doğal ya da alternatif konukçusu olabilir ki bu da yabancı otların, virüs epidemiyolojisinin doğal bir unsuru olduğunu göstermektedir (Papayiannis et al., 2011; Erdoğan vd., 2022). Virüs taşıyıcı vektör böcekler ve konukçunun olmadığı dönemlerde tercih edilen yabancı otlar dünya genelinde virüs epidemilerinin artmasına sebep olmuştur (Jones ve Naidu, 2019; Jones, 2021). Kültür bitkilerinin ekolojisinde yabancı otlar önemli bir yere sahiptir ve ürünler hasat edildiğinde, yabancı otlar genellikle bitki virüsleri ve böcek vektör türleri için ana konukçu haline geldiği için tarımsal üretimde verimi ve kaliteyi olumsuz etkilemektedir. Dünya genelinde yapılan araştırmalarda pek çok yabancı ot türünün ToBRFV ile

enfekte olduğu ve bunların çoğunluğunun hiçbir simptom göstermediği belirtilmiştir (Erdoğan vd., 2022; Salem et al., 2022).

Bitki virüs RNA'sının bitki dokularından izole etmek için geliştirilmiş birçok yöntem mevcuttur. Ancak yakın bir geçmişte ortaya çıkan ToBRFV'nin yabancı otlardan izolasyonu için farklı yöntemlerin geliştirilmesi ile ilgili bir çalışmayla henüz karşılaşılmamıştır. Ticari izolasyon kitlerinin maliyetli olması göz önünde bulundurulduğunda ToBRFV'nin teşhisi için manuel etkili bir RNA izolasyon yönteminin geliştirilmesi gereklilik haline gelmiştir.

Bu çalışma, mevcut RNA ekstraksiyon protokollerini değerlendirip optimize ederek *S. nigrum* ve *C. album* bitkilerinden izole edilen viral RNA verimini ve kalitesini artırmayı, böylece ToBRFV'nin daha iyi tespit ve karakterizasyonunu sağlamayı amaçlamaktadır. Ayrıca, bu çalışmanın diğer bir amacı ise yeni yabancı ot-virüs etkileşimlerini keşfetmektir.

Sera ve labaratuvar koşullarında yürütülen bu çalışmada *Solanum nigrum* L. ve *Chenopodium album* L. yabancı otlarında ToBRFV'nin simptomlarının ortaya çıkışı, bu bitkiler üzerinde nasıl belirtiler gösterdiği, *S. nigrum* ve *C. album* bitkilerinin virüse konukçuluk etme durumu, bu bitkilerin indikatör bitki olarak kullanıldığı takdirde invivo çalışmalarda inokulum kaynağı olarak kullanım potansiyelinin belirlenmesi ile birlikte yabancı otlardan virüsün tespiti için uygulanabilecek uygun RNA izolasyon tekniğinin tespitinin araştırılması amaçlanmıştır.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Domates kahverengi buruşuk meyve virüsü (*Tomato brown rugose fruit virus*-ToBRFV)

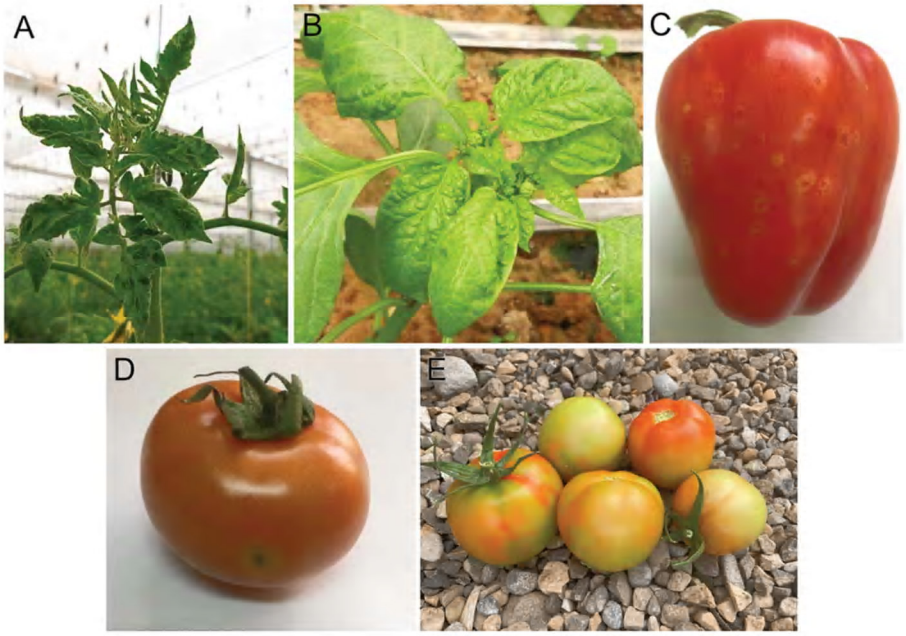
ToBRFV ilk olarak 2016 yılında Salem ve ark. tarafından Nisan 2015'te Ürdün'de yetiştirilen ve tipik viral simptomlar gösteren sera domates bitkilerinden izole edilmiştir (Salem at al., 2016). ToBRFV'nin Ürdün ve İsrail'de keşfedilmesinin ardından, ToBRFV'nin görüldüğü ülkelerin çok hızlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Bugüne kadar ToBRFV'nin görüldüğü ülke sayı Asya, Avrupa, Kuzey Amerika ve Afrika dahil olmak üzere dört kıtada 35 ülkeye ulaşmıştır (Tablo 1) (EPPO, 2020, 2022). Tablo 1'de gösterildiği gibi, bu ülkeler çoğunlukla Orta Doğu ve Avrupa'da bulunmaktadır. Tohum üretimi ve dağıtım zincirinin küresel doğası ve ToBRFV'nin tohum aktarılabilirliği göz önüne alındığında, yayılma boyutunun kaydedilenden daha şiddetli olduğu düşünülmektedir (EPPO, 2020, 2022). ToBRFV'nin Türkiye'de varlığı Fidan ve ark. tarafından 2019 yılında domates bitkisinde tespit edilmiştir (Fidan vd., 2019).

Tablo 1. Domates kahverengi buruşuk meyve virüsünün görüldüğü ülkeler (EPPO, 2020, 2022).

Kıta	**Ülke**	**Yıl**	**Referans**
Avrupa	Almanya	2018	Menzel et al. (2019)
	İtalya	2018	Panno et al. (2019)
	Türkiye	2019	Fidan et al. (2019)
	İngiltere	2019	Skelton et al. (2019)
	Yunanistan	2019	Beris et al. (2020)
	Hollanda	2019	Van de Vossenberg et al. (2020)
	İspanya	2019	Alfaro-Fernandez et al. (2021)
	Fransa	2020	Skelton et al. (2022)
	Norveç	2021	Hamborg ve Blystad (2021)
	Arnavutluk	2022	Orfanidou et al. (2022)
	İsviçre	2022	Mahillon et al. (2022)
Kuzey Amerika	Amerika	2018	Ling et al. (2019)
	Meksika	2018	Cambron-Crisantos et al. (2018)
	Kanada	2019	Sarkes et al. (2020)
Asya	İsrail	2014	Luria et al. (2017)
	Ürdün	2015	Salem et al. (2016)
	Filistin	2018	Alkowni et al. (2019)
	Çin	2019	Yan et al. (2019)
	Suriye	2020	Hasan et al. (2022)
	Lübnan	2020	Abou Kubaa et al. (2022)
	İran	2021	Ghorbani et al. (2021)
	Suudi Arabistan	2021	Sabra et al. (2021)
Afrika	Mısır	2019	Amer ve Mahmoud (2020)

Tobamovirus cinsi içerisinde yer alan virüs *Tobamovirus fructirugosum* olarak da isimlendirilmektedir. ToBRFV, Ocak 2019'da EPPO Uyarı Listesi'ne ve 2020'de karantina zararlısı olarak düzenlenmesi önerilen EPPO A2 Listesi'ne eklenmiştir (EPPO). ToBRFV, domates bitkilerinde, enfeksiyon anındaki bitki yaşı, sıcaklık, fotoperiyot ve yetiştirme sistemi gibi çevresel koşullara bağlı olarak farklı türde simptomlara neden olmaktadır (Salem et al., 2022). Domates yapraklarında en sık görülen belirtiler koyu yeşil kabarma ve yaprak ayasında daralmadır. Domates yapraklarında ve saplarında ara sıra nekrotik lezyonlara ve uzunlamasına kök nekrozuna

sebep olduğu da rapor edilmiştir (Luria et al., 2017). ToBRFV, bitkilerde %15-55 oranında verim azalmasına neden olabilmektedir (Avni et al., 2021).



Şekil 2. Domates kahverengi buruşuk meyve virüsünün domates ve biber bitkilerinde yaygın görülen simptomları (A: Domates bitkisinin yapraklarında koyu yeşil kabarma ve yaprak ayasında daralma; B: Biber bitkisinin yapraklarında kabarma ve damar bantlaşması; C, D, E: Domates ve biber meyvelerinde halkasal lekeler ve domates meyvesinde renk değişikliği) (Bananej et al., 2024)

Tobamovirus cinsinin diğer üyeleri gibi ToBRFV de kısa mesafelerde mekanik temasla, uzun mesafelerde ise kontamine tohum ve meyvelerle yayılmaktadır. Farklı tarımsal uygulamalar sırasında virüs, işçi elleri, kıyafetleri, ayakkabıları ve aletleri gibi temas yoluyla ve enfekte olmuş ve enfekte olmamış bitkiler arasında doğrudan bitkiden bitkiye temas yoluyla mekanik olarak bulaşabildiği belirlenmiştir. Deneysel sera koşullarında, enfeksiyonun bir seradaki hemen hemen tüm bitkilere (0,05 ha) hızla yayılması için yalnızca iki ToBRFV ile enfekte domates bitkisinin yeterli olduğu gösterilmiştir; burada %1,45, %80 ve %100'e kadar domates bitkileri sırasıyla 1 ay, 4 ay ve 8 ay sonra enfekte olduğu belirtilmiştir (Panno et al., 2020). ToBRFV, tohum kaynaklı bir virüs olarak kabul edilir ve kontamine tohumlar, uzun mesafeli bulaşmanın başlıca kaynağı olarak kabul edilmektedir, (Dombrovsky et al., 2017). Caruso ve ark. (2024) tarafından yapılan çalışmada, ilk kez *Tuta absoluta*'nın ToBRFV'nin yayılmasında potansiyel epidemiyolojik rolü olduğu belirlenmiştir.

ToBRFV tespiti için spesifik RNA, seroloji, elektron mikroskobu, HTS ve biyoanaliz bazlı yöntemler dahil olmak üzere çok sayıda araç ve yöntem geliştirilmiştir. Spesifik RNA bazlı tespit için en popüler olan analiz yöntemi ters transkripsiyondur (RT), ardından çok sayıda primer çifti, prob ve protokolün yayınlandığı kantitatif PCR (qPCR) yöntemi gelmektedir (Caruso et al., 2022).

1.2. Domates kahverengi buruşuk meyve virüsü (*Tomato brown rugose fruit virus*-ToBRFV)'nün yabancı ot konukçuları

Domates (*Solanum lycopersicum*) ve biber (*Capsicum annuum*), ToBRFV'nin doğal konukçıları olduğu bilinen başlıca iki mahsul türüdür (Luria et al., 2017). Laboratuvar koşullarında, dört botanik familyaya (*Amaranthaceae, Apocynaceae, Asteraceae* ve *Solanaceae*) ait geniş bir tür yelpazesi için deneysel enfeksiyonlar rapor edilmiştir. Mekanik inokülasyon yoluyla konukçu olma potansiyeli belirlenen türler; *Catharanthus roseus, Chenopodium album, Chenopodium amaranticolor, Chenopodium murale, Chenopodium quinoa, Datura metel, Datura stramonium, Emilia sonchifolia, Glebionis coronaria, Gomphrena globosa, Nicotiana benthamiana, Nicotiana clevelandii, Nicotiana debneyi, Nicotiana glutinosa, Nicotiana megalosiphon, Nicotiana dahildir occidentalis subsp. hesperis, Nicotiana rustika, Nicotiana sylvestris, Nicotiana tabacum, Petunia hybrida, Physalis angulata, Physalis pubescens* ve *Solanum nigrum'* dur (Luria et al., 2017; Chanda et al., 2021; Fidan vd., 2021).

Ürdün'de ToBRFV'nin olası alternatif konakçılarını belirlemek için yapılan bir çalışmada *Amaranthus retroflexus, Beta vulgaris subsp. maritima* ve *Chenopodium murale (Amaranthaceae); Conyza canadensis* ve *Taraxacum officinale (Asteraceae); Malva parviflora (Malvaceae); Oxalis corniculata (Oxalidaceae); Portulaca oleracea (Portulaceae); Veronica syriaca (Scrophulariaceae); Solanum elaeagnifolium* ve *S. nigrum (Solanaceae);* ve *Corchorus olitorius (Tiliaceae)* dahil olmak üzere sekiz familyaya ait on iki yabancı ot türünün ToBRFV için doğal konakçı olduğu tespit edilmiştir (Salem et al., 2022).

Bananej ve ark. (2024) tarafından İranda yapılan bir çalışmada ToBRFV-Yazd, domateste hafif ila şiddetli mozaik simptomlara, enfekte biberde deformasyon ve bodurluğa, biber meyvesinde nekrotik lezyonlara, *Datura metel* bitkisinde sistemik

simptomlara, *Gompherena globosa*'da nekrotik lokal lezyonlara ve *Chenopodium amaranticolor'*da klorotik lokal lezyonlara neden olduğu belirlenmiştir.

Yabancı otları enfekte eden, ToBRFV'nin potansiyel olarak domatesi de enfekte edebildiğini ve dolayısıyla ToBRFV salgınlarıyla alakalı olabileceğini göstermek için daha fazla doğrulayıcı in vivo analizlerin üretilmesi hala gerekli görülmektedir (Caruso et al., 2024).

1.3. Domates kahverengi buruşuk meyve virüsü (*Tomato brown rugose fruit virus*-ToBRFV)'nün domates ve yabancı otlarda tanılanmasıyla ilgili çalışmalarda kullanılmak üzere uygulanmış total RNA izolasyon yöntemleri

Nükleik asidi bitki türlerinden izole etmek için geliştirilmiş birçok protokol vardır. Nükleik asidi bitki dokularından izole etmek için, genellikle orijinal protokollerin değiştirilmiş versiyonları olan birçok başka protokol geliştirilmiştir. Bitki türleri çeşitli olduğundan, nükleik asidi geniş bir tür yelpazesinden izole etmek için evrensel bir protokol tanımlanmamıştır. Araştırmacılar genellikle zaman alıcı ve pahalı olan yüksek kaliteli RNA elde etmek için çeşitli protokolleri test ederler veya ticari reaktifler ve kitler satın almaktadırlar (Masoomi-Aladizgeh et al., 2023).

Fidan vd., (2021) tarafında yürütülen Türkiye'nin Batı Akdeniz Bölgesi'ndeki Antalya'da domates ve biber bitkileri yetiştirilen ticari seralardan viral enfeksiyon belirtileri gösteren domates ve biber bitkilerinden toplanan 100'den fazla örnekten total RNA izolasyonu GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) kiti ile yapılmıştır.

Jewehan et al., (2022) tarafından yapılan bir çalışmada ToBRFV ile inokuleleli *S. habrochaites* and *S. peruvianum* bitkilerinden total RNA ekstraksiyonu RNA Extraction Kit (Promega, USA) kiti kullanılarak yapılmıştır.

Salem et al., (2022) tarafından *Amaranthus retroflexus, Beta vulgaris subsp. maritima* ve *Chenopodium murale (Amaranthaceae); Conyza canadensis* ve *Taraxacum officinale (Asteraceae); Malva parviflora (Malvaceae); Oxalis corniculata (Oxalidaceae); Portulaca oleracea (Portulaceae); Veronica syriaca (Scrophulariaceae); Solanum elaeagnifolium* ve *S. nigrum (Solanaceae);* ve *Corchorus*

olitorius (Tiliaceae) yabancı otalırından ToBRFV'nin tespiti için total RNA, üreticinin talimatlarına uygun olarak bir SV-Total RNA Ekstraksiyon kiti (Promega, Madison, WI, ABD) kullanılarak yapılmıştır.

Caruso et al., (2024) ToBRFV ile inokuleleli domates bitkilerinden total RNA NucleoSpin® RNA Plant Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co., Dueren, Germany) kullanılarak ekstre edilmiştir.

Bananej et al., (2024) tarafından yapılan bir çalışmada *Datura metel*, *Gompherena globosa* ve *Chenopodium amaranticolor'*da bitkilerinden ToBRFV'nin tespiti için total RNA, TRIzol (Sigma-Aldrich) kullanılarak ekstre edilmiştir ve ToBRFV tespiti için geleneksel ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) için kullanılmıştır.

1.4. Yabancı otların bitki virüsleri ve epidemiyolojisindeki rolü

Yabancı otlar mahsul ekosistemlerinin önemli unsurlarıdır (Chen et al., 2013). Bitki virüs hastalıkları açısından değerlendirildiğinde yabancı otlar virüslerin ve vektörlerinin doğal ya da alternatif konukçusu olabilir ve bu da yabancı otların, virüs epidemiyolojisinin doğal bir parçası olduğunu göstermektedir (Papayiannis et al., 2011). Bitki-patojen-vektör sistemleri üzerinde birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, virüsler, vektörler ve yabancı otlar arasındaki etkileşimlere ilişkin araştırmalar henüz yeterli sayıda değildir.

Yabancı otların sayıca çok azı kültür bitkilerinin virüsle enfekte olduğunda gösterdiği simptomları gösterirler. Sararma ve hafif yaprak kıvrılması, damarlar arası kloroz gibi virüsün sebep olduğu simptomlar az sayıda yabancı ot bitkisinde de gözlenmiştir. Deneysel ortamda virüsle enfekte olabilen yabancı otlar indikatör bitki olarak kullanılabileceği için bitki virüslerinin kültüre alınmasında faydalı olabilmektedir (Temur Çınar vd., 2024).

1.4.1. Solanum nigrum L.

Solanum nigrum L., *Solanaceae* (Patlıcangiller) familyasına ait bir bitki türüdür. Genellikle kara düğme veya köpek üzümü olarak bilinir. Tropikal ve ılıman bölgelerde yaygın olarak yetişir ve genellikle yol kenarlarında, tarlalarda, bahçelerde ve açık

alanlarda görülür. Tek yıllık ya da bazen çok yıllık bir bitki olabilir. *S. nigrum*, genellikle yabancı ot olarak bilinir ve dünya genelinde farklı iklim bölgelerine uyum sağlamıştır. Orta Asya, Avrupa, Afrika ve Amerika kıtalarında yaygın şekilde bulunur. Fakir topraklarda, gölgeli ya da açık alanlarda rahatlıkla yetişebilir. *S. nigrum*, bazı bitki virüslerinin yayılmasında ve ekosistem içinde taşınmasında önemli bir rol oynar. (Zhang et al., 2022)

Bitki virüslerinin yaşam döngüsünde kritik bir rol oynayan alternatif konukçulardan biri olan bu bitki üzerinde konaklayan pek çok tarımsal hastalığın etkeni olan virüsler hem hayatta kalır hem de yayılım gösterir. Özellikle domates, patates ve biber gibi ekonomik değeri yüksek kültür bitkilerinde önemli kayıplara yol açan virüslerin ara konukçusudur. *S. nigrum*, yalnızca virüsler için konukçılık yapmakla kalmaz, aynı zamanda vektör organizmaların da besin ve yaşam kaynağıdır. Kültür bitkilerinde bulunmayan veya baskılanan virüslerin hayatta kalmasını sağlar ve bu nedenle ekolojik bir aracı görevi görür. Tarla çevresinde yetişen yabancı otlar arasında yer alan *S. nigrum*, kültür bitkilerine virüs bulaşması için birincil kaynaklardan biridir (Erdoğan vd., 2022)

1.4.2. Chenopodium album L.

Chenopodium album L, *Amaranthaceae* (Ispanakgiller) familyasına ait, dünyada yaygın bir şekilde bulunan bir yabancı ottur. Halk arasında sirken ya da kazayağı olarak da bilinir. Bu bitki, tarımsal alanlarda yabancı ot olarak sıkça görülür, bazı bölgelerde geleneksel besin veya tıbbi bir bitki olarak kullanılır. *C. album*, özellikle besin maddesi bakımından zengin topraklarda iyi gelişir. Tarla kenarlarında, bahçelerde, yol kenarlarında ve ekim alanlarında sıklıkla görülür. Hem tropikal hem de ılıman iklimlere uyum sağlamıştır (Bajva et al., 2019)

Chenopodium album L., tarımsal öneme sahip birçok bitki virüsü için ara konukçı işlevi görerek ekolojik zincirin önemli bir parçasını oluşturur. Virüslerin yaşam döngüsünü desteklemesi ve vektör popülasyonlarını artırması nedeniyle tarımsal alanlarda risk faktörü olarak değerlendirilir. Virüs vektörleri için besin kaynağı olması da epidimiyoloji de önemli rol oynamasını sağlar. Ayrıca, virüs enfeksiyonu belirtilerini göstermesi nedeniyle bazı virolojik çalışmalar için model bitki olarak da kullanılmaktadır (Erdoğan et al., 2022).

2. BÖLÜM

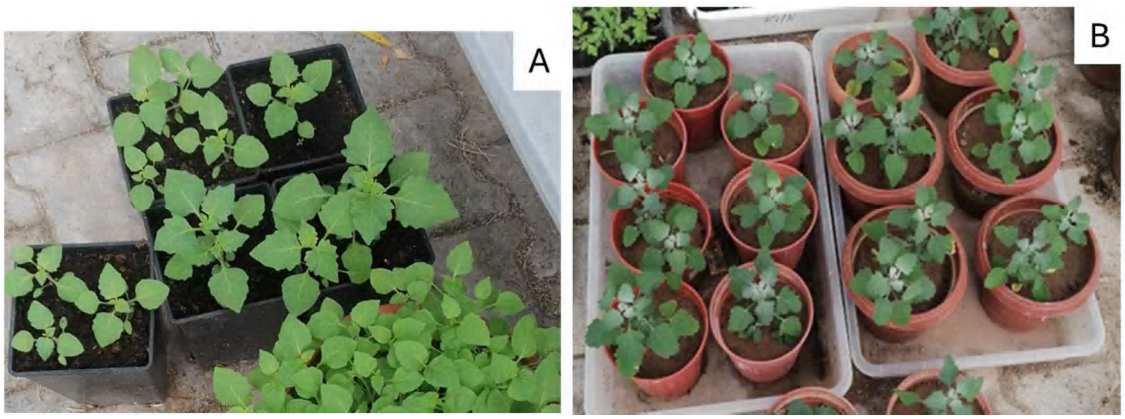
MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Bitkisel Materyal

Çalışma kapsamında bitkisel materyal olarak *Solanum nigrum* L. ve *Chenopodium album* L. yabancı otları kullanılmıştır. Araştırma amacıyla kullanılan yabancı ot tohumları Erciyes Üniversitesi kampüsünden 2023 yılı sonbahar mevsimi sonunda doğal olarak bulunan olgun bitkilerden toplanmıştır. İndikatör bitki olarak kullanılan bitkilerin yetiştirilmesinde torf, toprak ve kumdan oluşan karışım 1:1:1 oranında karıştırılarak kullanılmıştır. İndikatör bitki tohumları çimlenme sürecini tamamlayıncaya kadar ışık ve sıcaklık kontrolüne sahip iklim odasında tutulmuştur. Tohumların çimlenmesini takiben fideler 7-8 yapraklı döneme ulaştıklarında aynı karışım ile doldurulmuş yaklaşık 10 cm çapında ve 15 cm yüksekliğindeki plastik saksılara şaşırtılmıştır. Ayrı ayrı saksılara şaşırtılan otsu test bitkileri +22-24 °C sıcaklık, %60-70 orantılı nemde de Erciyes Üniversitesi Bitki Bölüm seralarında muhafaza edilmiştir (Şekil 3).

Çalışmada bitkisel materyalin dışında kurşun kalem, kilitli poşet torba (7x9 cm), toprak ve torf, 15 cm derinliğinde saksılar, asetat kalem, Biorad PCR cihazı, otoklav, pH metre, hassas terazi, biorad jel elektroforez tankı ve biorad jel görüntüleme cihazı kullanılmıştır.



Şekil 3. Kullanılan Bitkisel materyal (A: *Solanum nigrum* L.; B: *Chenopodium album* L.)

2.2. Yöntem

2.2.1. Virüsün Biyolojik Yöntemlerle Taşınması

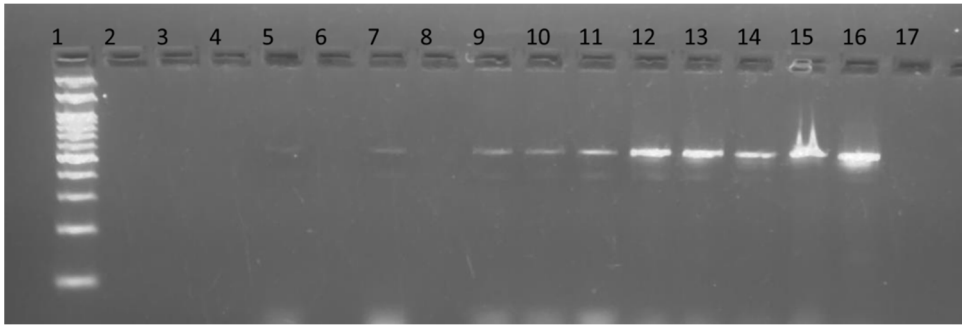
Mekanik inokulasyon çalışmaları için 7-8 yapraklı döneme ulaşan *S. nigrum* ve *C. album* test bitkileri fideleri kullanılmıştır. ToBRFV ekstrakları steril havan kullanılarak buz üstünde hazırlanmş ve 2 katlı tülbent ile süzüldükten sonra önceden karborondum tozu serpilerek hazırlanan bitkilerin yapraklarına inokule edilmiştir. ToBRFV, toplam 10 adet *C. album* ve 4 adet *S. nigrum* bitkisi 7-8 gerçek yapraklı döneme geldiğinde mekanik olarak inoküle edilmiştir (Şekil 4) Mekanik inokülasyon çalışmalarında NCBI erişim numarası PQ314730 kodlu ToBRFV izolatı kullanılmıştır. İzolat, Kayseri'de domates yetiştiriciliği yapılan alanlardan toplanan bitkilerin çeşitli virüsler açısından taranması sonucunda saf olarak elde edilmiştir.



Şekil 4. Bitkisel materyale ToBRFV' nin mekanik inokulasyonu (A: *Chenopodium album* L. bitkisine mekanik inokülasyon işlemi; B*: Solanum nigrum* L. bitkisine mekanik inokülasyon işlemi)

2.2.2. RNA izolasyonunda Kullanılacak Bitkisel Materyalin Seçimi

Bu çalışmada, RT-PCR (ters transkriptaz zincir kesme reaksiyonu) yöntemi sonucunda ToBRFV pozitif bant veren *Solanum nigrum* L. (12, 13, 14 kodlu örnekler) ve *Chenopodium album* L. (5,7,9,10,11 kodlu örnekler) bitkileri ayrı ayrı birleştirilerek kullanılmıştır.



Şekil 4. ToBRFV-F/R primerleri kullanılarak gerçekleştirilen RT-PCR analizi (1: Markır, 2-11: *C. album,* 12-14: *S. nigrum*, 15-16: ToBRFV pozitif domates, 17: ToBRFV negatif domates)

2.2.3. RNA Ekstraksiyonu

Solanum nigrum L. ve *Chenopodium album* L. bitkilerinden nükleik asit izolasyonu için deneysel konukçulardan ToBRFV RNA'sını izole etmek için en etkili yöntemi belirlemek amacıyla dört farklı izolasyon protokolü test edilmiştir. Değerlendirilen yöntemler şunlardır: SDS-LiCl Yöntemi: SDS-Fenol bazlı ekstraksiyon ve RNA'nın sodyum asetat ve LiCl ile çökeltilmesi (Vennapusa et al., 2020). CTAB-LiCl (Cetyltrimethylammonium Bromide) Yöntemi: Yüksek seviyede polisakkarit ve fenolik madde içeren bitkiler için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Vennapusa et al., 2020). Modifiye SDS-LiCl Çöktürme Yöntemi: Viral RNA izolasyonu için özel olarak optimize edilmiştir. GeneJET Plant RNA Purification Mini Kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD): RNA izolasyonu için kullanılmıştır. Bu uygulamalar içerisinde daha kaliteli viral RNA'nın yabancı otlardan izolasyonu için SDS-LiCl yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. İzolasyon işlemi SDS-LiCl yönteminden farklı olarak bu şekilde yapılmıştır: Bitki dokuları (0.12 g), sıvı azot kullanılarak havan ve tokmakta ince bir toz haline getirilmiştir. Daha sonra, öğütülmüş dokuya 600 µl RNA ekstraksiyon tamponu eklenmiş ve dokular tamamen parçalanana kadar ezme işlemi sürdürülmüştür. Doku iyi çözünmediği takdirde, ekstraksiyon tamponu hacmi 1 ml'ye kadar artırılamıştır ve fenol kullanılmamıştır. Örneklerden izole edilen RNA'lar spektrofotometre (Shimadzu spectrophotometer/ Japan) ile ölçülerek miktar ve kalite analizleri yapılmıştır ve PCR analizlerinde kullanılıncaya kadar -80 °C' de saklanmıştır.

2.2.3.1. SDS-LiCl Yöntemi ile RNA izolasyonu

RNA ekstraksiyon tamponu: 100 ml ekstraksiyon tamponu hazırlamak için, 1 M Tris-HCl (pH: 8) stoğundan 10 ml Tris (100 mM son konsantrasyon), 0,5 M stoktan 5 ml EDTA, 2Na (25 mM son konsantrasyon), 2,5 g PVP (%2,5) ve 14,61 g NaCl (2,5 M) eklenmiştir, bir karıştırma plakasında orta derecede ısıtılarak (40 ℃) karıştırılmış ve hacmi %0,1 DEPC su ile 97,5 ml'ye tamamlanarak otoklavlanmıştır. Kullanmadan hemen önce 2,5 ml β-Merkaptoetanol (%2,5) eklenmiştir (Vennapusa et al., 2020). Detaylı izolasyon basamakları şu şekildedir:

a.ToBRFV ile bulaşık bitkilerin simptom gösteren yapraklardan yaprak örneği 50-100 mg alınarak sıvı azot aracılığıyla ezilmiş toz haline gelene kadar ve 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılmıştır.

b. 600 µl RNA ekstraksiyon buffer örneğin üzerine eklenmiş vorteks cihazı ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir.

c. %2'lik SDS (%20 SDS den 60 µl bir hacim) eklenmiştir.

d. Vorteks karıştırıcı ile homojen hale getirilmiştir ve ardından +4 ºC 5 dk 15000Xg de santrifüj yapılmıştır.

e. Üst sıvı faz 1,5 ml yeni ependorf tüpe aktarılmış (600 µl) ve üzerine fenol, kloroform, izoamil alkol (25:24:1) eşit hacimde eklenmiştir (600 µl).

f. Vorteks karıştırıcı ile homojen hale getirilmiştir ve ardından +4 ºC 5 dk 15000Xg de santrifüj yapılmıştır.

g. Üst sıvı faz 1,5 ml yeni ependorf tüpe aktarılmış ve üzerine 200 µl kloroform eklenmiştir.

h. Vorteks karıştırıcı ile homojen hale getirilmiştir ve ardından +4 ºC 5 dk 15000Xg de santrifüj yapılmıştır.

i. Üstteki faz yeni tüplere aktarılmış ve 8 M LiCl 160 µl ve 60 µl 3M Sodyum asetat eklenmiştir. -20 ºC 24 saat bekletilmiştir. Ardından +4 ºC 5 dk 15000Xg de santrifüj yapılmıştır. Üst faz ortamdan uzaklaştırılmıştır.

j. Alta çöken pelet 2M LiCl ile yıkanmıştır. +4 derecede 5 dakika 15000Xg de santrifüj edilerek üst faz ortamdan uzaklaştırılmıştır.

k. Pelet üzerine önceden soğutulmuş %80'lik etanolle eklenerek yıkanmış ve+4 derecede 5 dakika 15000Xg de santrifüj edilmiştir.

l. Pelet kurutma kağıdına dikkatli bir şekilde koyularak kurutulmuştur. Elde edilen total RNA peleti üzerini 50 µl saf su eklenmiştir. Ependorf tüpler içerisinde -80 derecede saklanmıştır.

2.2.3.2. Değiştirilmiş SDS-LiCl Yöntemi ile RNA izolasyonu

a. ToBRFV ile bulaşık bitkilerin simptom gösteren yapraklardan yaprak örneği 50-100 mg alınarak 600 µl RNA ekstraksiyon buffer örneğin üzerine eklenerek ezme işlemİ yapılmıştır.Yeterli gelmediğinde buffer artırılmıştır.

b.Sonrasında 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılmıştır.

c. %2'lik SDS (%20 SDS den 60 µl bir hacim) eklenmiştir.

d. Vorteks karıştırıcı ile homojen hale getirilmiştir ve ardından +4 ºC 5 dk 15000Xg de santrifüj yapılmıştır.

e. Üst sıvı faz 1,5 ml yeni ependorf tüpe aktarılmış (600 µl) ve üzerine kloroform, izoamil alkol (24:1) eşit hacimde eklenmiştir (600 µl).

f. Vorteks karıştırıcı ile homojen hale getirilmiştir ve ardından +4 ºC 5 dk 15000Xg de santrifüj yapılmıştır.

g. Üst sıvı faz 1,5 ml yeni ependorf tüpe aktarılmış ve üzerine 200 µl kloroform eklenmiştir.

h. Vorteks karıştırıcı ile homojen hale getirilmiştir ve ardından +4 ºC 5 dk 15000Xg de santrifüj yapılmıştır.

i. Üstteki faz yeni tüplere aktarılmış ve 8 M LiCl 160 µl ve 60 µl 3M Sodyum asetat eklenmiştir. -20 ºC 24 saat bekletilmiştir. Ardından +4 ºC 5 dk 15000Xg de santrifüj yapılmıştır. Üst faz ortamdan uzaklaştırılmıştır.

j. Alta çöken pelet 2M LiCl ile yıkanmıştır. +4 derecede 5 dakika 15000Xg de santrifüj edilerek üst faz ortamdan uzaklaştırılmıştır.

k. Pelet üzerine önceden soğutulmuş %80 lik etanolle eklenerek yıkanmış ve +4 derecede 5 dakika 15000Xg de santrifüj edilmiştir.

l. Pelet kurutma kağıdına dikkatli bir şekilde koyularak kurutulmuştur. Elde edilen total RNA peleti üzerini 50 µl saf su eklenmiştir. Ependorf tüpler içerisinde -80 derecede saklanmıştır.

2.2.3.3. CTAB-LiCI Yöntemi ile RNA İzolasyonu

a. ToBRFV ile bulaşık bitkilerin simptom gösteren yaprak örneklerinden 50-100 mg alınarak sıvı azot ile havan içerisinde ezilmiştir.

b. 200 mg ezilmiş örnekten alınıp 1.5 ml santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 500 µl CTAP ekstraksiyon bufferı eklenmiştir. 30 dk 60 °C'de bekletilmiş ve her 5 dk aralıklarla ters düz edilmiştir. Su banyosu işlemi sonrasında örnekler oda sıcaklığında 5-10 dk bekletilerek sıcaklığının düşmesi sağlanmıştır.

c. Örneklerin üzerine 24:1 oranında 700 µl kloroform-isoamil alkol eklenmiştir. 20-25 kez ters düz edilip buz üzerinde 30 dk bekletilmiştir.

d. 13.000 rpm'de 15 dk süre ile santrifüj edilerek yaprak kalıntılarının dibe çökmesi sağlanmıştır.

e. Santrifüjden örnekler sarsılmadan alınmış ve oluşan üç katmandan üstteki sıvı kısım alt katmanlarla karıştırılmadan yaklaşık 700-750 µl alınıp 1.5 ml yeni bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır.

f. 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edilip yeni bir tüpe pipet kullanmadan aktarılmıştır.

g. Üzerine 700-750 µl izoproponol eklenmiş ve -20 °C'de bir gece bekletilmiştir.

h. Örnekler 1 gece boyunca –20°C'de bekletildikten sonra tüpler 10.000 rpm'de 10 dk süre ile santrifüj edilerek RNA peletinin dibe çökmesi sağlanmıştır. Daha sonra üst kısımda kalan isopropanol dökülmüştür.

i. RNA peleti üzerine %70'lik alkolden 1 ml eklenip 2 dk 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Alkol, peletler düşürülmeden dökülmüştür.

j. Yıkanan RNA kurutularak saf suda çözdürülmüş ve izole edilen RNA kalitesini kontrol etmek için nanodropta ölçüm yapılmıştır.

2.2.3.4. GeneJET Plant RNA Purification Mini Kiti ile RNA izolasyonu

a. ToBRFV ile bulaşık bitkilerin simptom gösteren yapraklardan yaprak örneği 50-100 mg alınarak sıvı azot aracılığıyla ezilmiş toz haline gelene kadar ve 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılmıştır.

b. Üzerine 500 µl Lysis solüsyon eklenerek vorteks karıştırıcı ile homojen hale getirilmiştir.

c. 3 dk 56 °C de bekletildikten sonra 5 dk 15000Xg de santrifüj yapılmıştır.

d. Üst sıvı faz 1,5 ml yeni ependorf tüpe aktarılmış (450 µl) ve üzerine 250 µl %96'lık ethanol eklenerek pipetle karıştırılmıştır.

e. Örneğin tamamı kit içerisinde bulunan filtre tüpüne aktarılarak 1 dk 11000Xg de santrifüj yapılmıştır.

f. Filtrenin alt kısmında toplanan sıvı kısım dökülerek filtre tekrar tüpe takılmıştır. Üzerine 700 µl WB1(Wash Buffer1) eklenerek 1 dk 11000Xg de santrifüj yapılmıştır.

g. Alt kısımda kalan sıvı dökülerek filtre yeni bir tüpe aktarılmıştır.

h. Üzerine 500 µl WB2 (Wash Buffer2) eklenerek 1 dk 11000Xg de santrifüj yapılmıştır.

i. Alttaki sıvı dökülerek filtre aynı tüpe tekrar takılmıştır.

j. Bu iki adım (h-i) tekrarlandıktan sonra 14000Xg de santrifüj yapılmıştır.

k. Filtre üzerine 50 µl RNase içermeyen su eklenerek 1 dk 11000Xg de santrifüj yapılmıştır.

l. Alt kısımda kalan sıvı tekrar filtreye aktarılarak 1 dk 11000Xg de santrifüj yapılmıştır. Elde edilen total RNA -80 derecede saklanmıştır.

2.2.4. cDNA Sentezi ve RT-PCR (Ters Transkriptaz- Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Total RNA' lar kalıp olarak kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. cDNA sentezi için NucleoGene (NUCLEOGENE-Türkiye) firmasından temin edilen RNA to cDNA Mix (cDNA Synthesis Kit) (5X) kiti kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı kit protokolünde belirtildiği üzere; 4 µl cDNA Mix, 4 µl RNAse free su ve 10 µl RNA olacak şekilde hazırlanmış ve 25 °C'de 5 dk., 50 °C'de 30 dk., 85 °C'de 5 dk. inkübe edildikten sonra buz üzerinde tutulmuştur. Sentezlenen cDNA'lar -20°C'de saklanmıştır. cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak PCR yapılmıştır.

2.2.5. RT-PCR analizleri

RT-PCR analizleri sırasında ToBRFV için genel olarak kullanılan ToBRFV-F (5′- AAT GTC CAT GTT TGT TAC GCC-3′) ve ToBRFV-R (5′- CGA ATG TGA TTT AAA ACT GTG AAT-3′) (Alkowni et al., 2019) primerleri ile çalışılmıştır. Primerlerin çoğalttığı bölgenin amplikon uzunluğu 560 bp'dir. RT-PCR reaksiyonu için ThermoScientific DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılmıştır. Reaksiyonda kullanılacak olan 25 µl karışımın içeriği; 7 µl cDNA ve 6 µl DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X), 9.6 µl Water (nuclease-free) 0.7 µl, 25 µM primer ToBRFV-F, 0.7 µl, 25 µM primer ToBRFV-R olacak şekilde hazırlanmış ve Thermal Cycler cihazında çoğaltım gerçekleştirilmiştir. RT-PCR analizi için kullanılan amplifikasyon programında öncelikli olarak 95 °C de 5 dk, 35 döngü olacak şekilde "95 °C de 45 sn denatürasyon, 53 °C de 45 sn primer bağlanma, 72 °C de 1 dk uzama" ve 72 °C de 7 dk son uzama işlemi gerçekleştirilmiştir (Alkowni et al., 2019; Fidan et al., 2019). RT-PCR ürünleri %2'lik agaros jel eletroforezde koşturulmuştur. Koşma işlemi tamamlandıktan sonra jel, ethidium bromide ile boyanarak UV görüntüleme sisteminde incelenmiştir.

2.2.6. RNA kalitesi ve miktarı değerlendirmesi

RNA kalitesi spektrofotometri (A260/A280 ve A260/A230 oranları) ve agaroz jel elektroforezi kullanılarak değerlendirilmiştir. RNA verimi bir NanoDrop spektrofotometresi (Shimadzu spektrofotometresi/Japonya) kullanılarak kantifize

edilmiştir ve ToBRFV RNA'nın varlığı ve bütünlüğü ToBRFV'ye özgü primerler kullanılarak RT-PCR ile doğrulanmıştır.

2.2.7. İndikatör bitki olarak kullanılan *Solanum nigrum* bitkisinin inokulum kaynağı olarak kullanımının uygunluğu testi

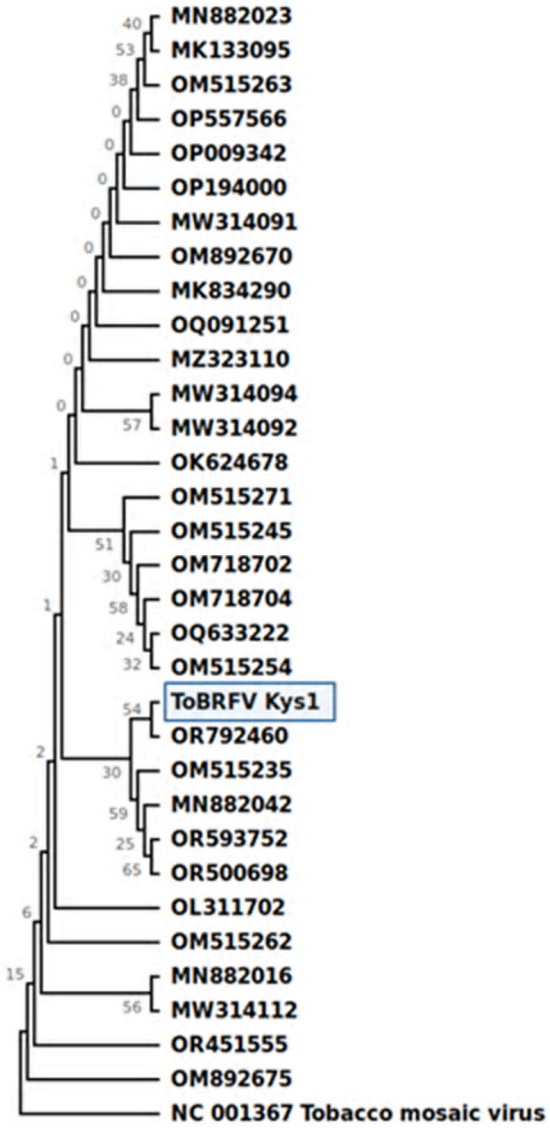
Mekanik inokulasyon çalışmaları için 7-8 yapraklı döneme ulaşan *Nicotiana tabacum* cv. Samsun test bitkileri fideleri kullanılmıştır. ToBRFV ekstrakları bulaşık *Solanum nigrum* L. yapraklarının steril havan kullanılarak buz üstünde ezilmesiyle hazırlanmış ve 2 katlı tülbent ile süzüldükten sonra önceden karborondum tozu serpilerek hazırlanan bitkilerin yapraklarına inokule edilmiştir.

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. ToBRF izolatının filogenetik analizleri

ToBRFV izolatından elde edilen PCR amplikonlarının dizileri analiz edildiğinde, PQ282223.1 (Türkiye'nin Eskişehir ili), OR792460.1 (Çin) ve OM515235.1 (Hollanda) izolatlarıyla %99 özdeşlik tespit edilmiştir. ToBRFV izolatının NCBI erişim numarası PQ314730 olarak sunulmuştur. PQ314730 erişim numaralı ToBRFV izolatımız ve kayıtlı izolatların dizilerinin filogenetik ağaçları, Mega X programında uygulanan neighbor-joining (NJ) yöntemi ile çıkarılmış ve bu çalışmada elde edilen izolatın GenBank erişim numaraları OR792460.1 (Çin'den domatesten elde edilen izolat) ve OM515235.1(Hollanda'dan domatesten elde edilen izolat) izolatları ile aynı küme içerisinde bulunmuştur.



Şekil 5. ToBRFV izolatlarının filogenetik analizi, 1000 bootstrap değeri ile neighbor-joining yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mevcut deneyde incelenen örnekler mavi kare ile gösterilmiştir. Diğer diziler ise NCBI veritabanından indirilmiştir.

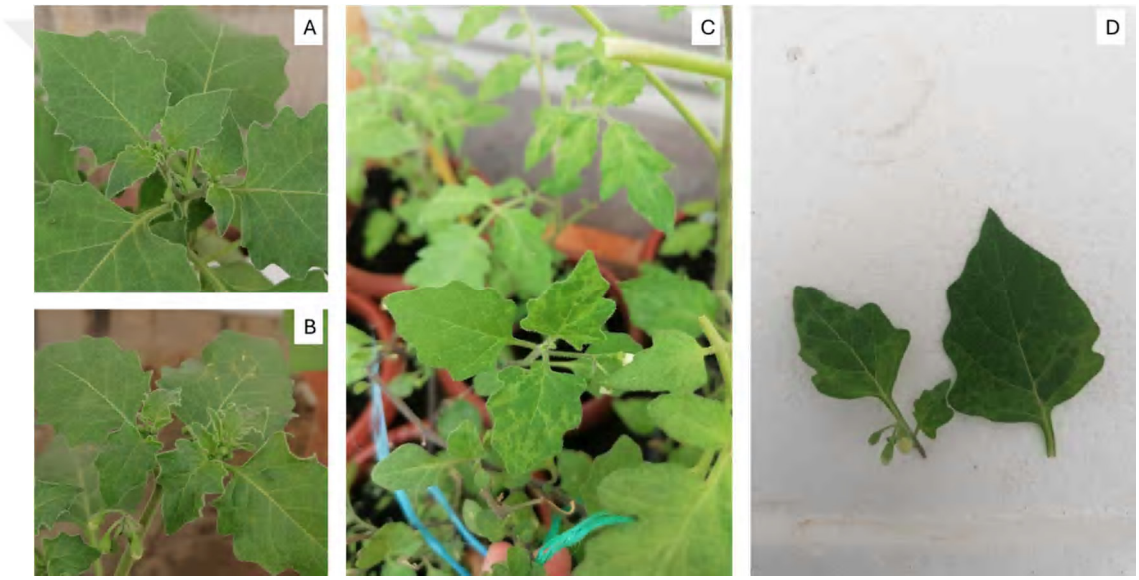
3.2. Domates kahverengi buruşuk meyve virüsü (*Tomato brown rugose fruit virus*) inoküle edilmiş *Solanum nigrum* L. ve *Chenopodium album* L. bitkilerinde simptomolojik gözlemler

Domates kahverengi buruşuk meyve virüsü (*Tomato brown rugose fruit virus*, ToBRFV), domates üretiminde ciddi ekonomik kayıplara yol açan önemli bir bitki patojenidir. ToBRFV'nin neden olduğu hastalıklar, özellikle domateslerde verim ve kalite kaybına neden olurken, diğer konukçu bitkilerde de çeşitli simptomlara göstermektedir. Bu çalışmada, ToBRFV'nin inoküle edildiği *Solanum nigrum* L.ve

Chenopodium album L. bitkilerinde görülen simptomolojik değişiklikler incelenmiştir. Bu bitkiler, doğal ekosistemlerde yaygın olarak bulunan ve çeşitli virüslerin konukçusu olabilen bitkilerdir.

3.2.1. *Solanum nigrum* L.

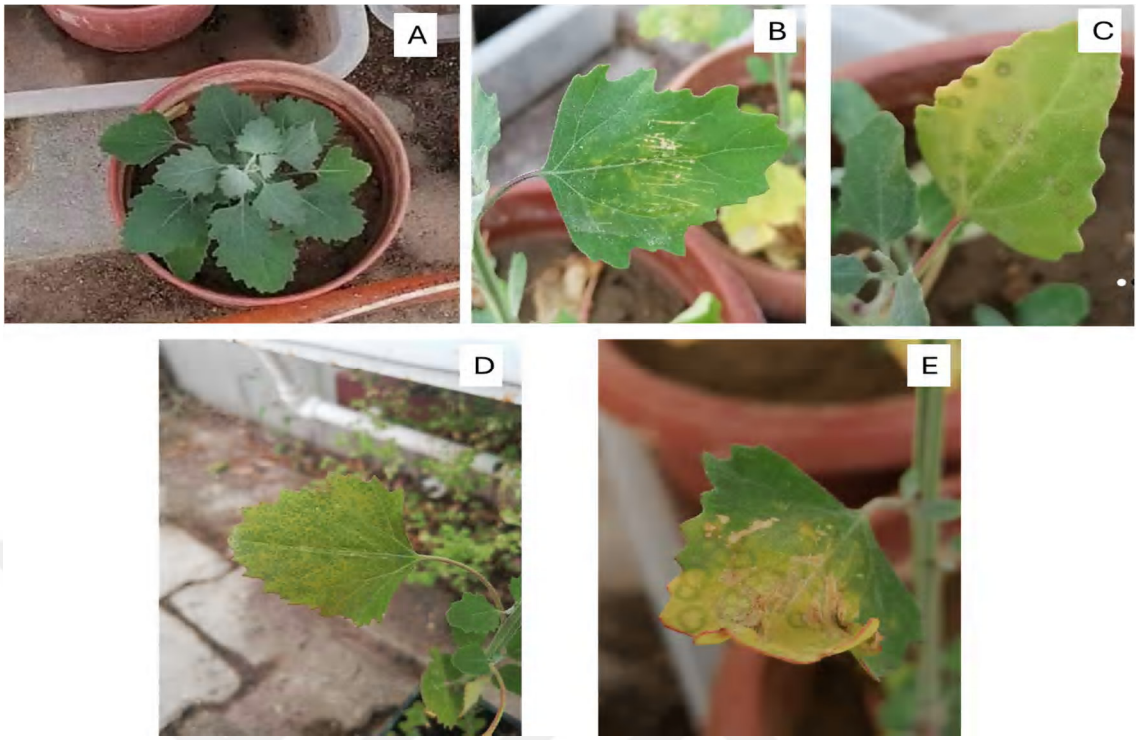
ToBRFV ile inoküle edilen *Solanum nigrum* bitkilerinde, inokülasyondan 14 gün sonra ilk simptomlar gözlemlenmiştir. Gözlemlenen simptomlar arasında *S. nigrum* yapraklarında, domates yapraklarındakine benzer koyu yeşil kabarma, mozaik benzeri belirtiler ve yaprak kenarlarında hafif kıvrılma yer almaktadır (Şekil 6).



Şekil 6. Domates kahverengi buruşuk meyve virüsünün *Solanum nigrum* L. bitkisinde görülen simptomları (A: Virüs inoküle edilmemiş *S. nigrum* bitkisi; B, D: koyu yeşil kabarma; C: mozaik benzeri belirtiler)

3.2.2. *Chenopodium album* L.

Chenopodium album L. bitkilerinde ise ToBRFV inokülasyonunun ardından yaklaşık 5-7 gün içinde inokülasyon yapılan yapraklarda simptomlar ortaya çıkmıştır. Bu bitkide gözlemlenen başlıca simptomlar arasında yapraklarda klorotik lekeler, klorotik halkalı lekeler ve koyu yeşil beneklenme yer almaktadır (Şekil 7). Sistemik enfeksiyon belirtisi göstermemiş ve simptomatik yapraklar tamamen sararıp ve kısa sürede düşmüştür.



Şekil 7. Domates kahverengi buruşuk meyve virüsünün *Chenopodium album* L. bitkisinde görülen simptomları (A: Virüs inoküle edilmemiş *C. album* bitkisi; B: klorotik lekeler; C, E: klorotik halkalı lekeler; D: koyu yeşil beneklenme)

Bu çalışmada, ToBRFV'nin *S. nigrum* ve *C. album* bitkilerinde farklı simptomlara neden olduğu gözlemlenmiştir. Her iki bitki türü de virüse karşı duyarlı olup, enfeksiyon belirtileri göstermektedir. Ancak, *S. nigrum* ve *C. album* bitkilerindeki simptomların farklılığı, bu bitkilerin ToBRFV'ye karşı farklı duyarlılıklar gösterdiğini ortaya koymaktadır.

3.3. İndikatör bitki olarak kullanılan *Solanum nigrum* bitkisinin inokulum kaynağı olarak kullanımının uygunluğu

ToBRFV inokule edilmiş *S. nigrum* bitkisinin ToBRFV ile ilgili deneysel çalışmalarda indikatör bitki olarak kullanılılabilirliğinin belirlenmesi için yaptığımız çalışmada *S. nigrum'un* 240 günden daha uzun bir süre inokulum kaynağı olarak canlılığını sürdürmesi ve farklı bir konukçu bitkiye virüsün bulaştırılmasında kaynak bitki olarak kullanıldığında *Nicotiana tabacum* cv. Samsun bitkisinde belirti oluşturmasıyla hem deneysel çalışmalar için önemli bir kaynak olabileceği hem de doğada virüsün epidemisinden sorumlu olabileceği belirlenmiştir.

Aşırı koşullara (örneğin kuraklık, yüksek sıcaklık) direncinin iyi olduğu gözlemlenen *S. nigrum* L. bitkisini inokulum kaynağı olarak kullanarak, mekanik inokulasyon yoluyla *Nicotiana tabacum* cv. Samsun indikatör bitkisine uygulanmıştır. *Nicotiana tabacum* cv. Samsun bitkisinde yoğun klorotik lekeler gözlemlenmiştir (Şekil 8). *S. nigrum*'un inokulum kaynağı olarak kullanılması, çeşitli biyolojik süreçler üzerindeki etkilerinin ve bitki patolojisi araştırmalarındaki potansiyel uygulamalarının incelenmesine olanak tanıyabilir.



Şekil 8. Nicotiana tabacum cv. Samsun bitkisinde gözlenen ToBRFV belirtileri (A: *S. nigrum* L. inokulum kaynağı olarak kullanılmıştır; B: *Nicotiana tabacum* cv. Samsun)

3.4. RNA Verimi ve Kalitesi

Farklı bitkilerden RNA elde etmek için kullanılan yöntemlerin etkinlik dereceleri bitkisel türlere göre değişiklik göstermektedir (Liu et al., 2018). Polisakkaritlerin RNA'ya benzer fiziksel ve kimyasal özellikleri, RNA'nın polifenollerle birlikte çökelme riskini artırarak genel kalitesini olumsuz etkileyebilir. Araştırmalar, *C. album* ve *S. nigrum*'un yüksek seviyelerde polisakkarit, fenol, protein ve diğer sekonder metabolitler içerdiğini ortaya koymuştur (Cutillo et al., 2004; Arora et al., 2018; Chen et al., 2022).

Geleneksel RNA çıkarma yöntemleriyle *S. nigrum* ve özellikle *C. album*' dan yüksek kaliteli RNA elde etmek zordur. SDS-LiCl (Vennapusa et al., 2020) ve CTAB-LiCl yöntemleri bu bitkilerde tatmin edici sonuçlar vermemiştir. GeneJET Plant RNA

Purification Mini Kit kullanılarak elde edilen RNA'nın kalitesi uygun bulunmuş, ancak ticari kitlerin yüksek maliyeti, bu çalışmada polisakkaritler ve polifenoller açısından zengin bitkilerden yüksek kaliteli RNA elde etmek için kolay, uygun maliyetli ve etkili bir RNA çıkarma protokolü geliştirme gerekliliğini ortaya koymuştur.

Bu çalışmada, ekstrakte edilen toplam RNA kalitesi spektrofotometri (A260/A280 ve A260/A230 oranları) ve agaroz jel elektroforezi kullanılarak değerlendirilmiştir. RNA verimi bir NanoDrop spektrofotometresi kullanılarak kantifize edilmiştir ve ToBRFV RNA'nın varlığı ve bütünlüğü ToBRFV'ye özgü primerler kullanılarak RT-PCR ile doğrulanmıştır.

Ticari kit ile T1 örneğinden izole edilen RNA, düşük nükleik asit konsantrasyonu göstermiştir. Yüksek OD260/280 oranı, protein veya kalıntı çözücülerden kaynaklanan kontaminasyonu, düşük OD260/230 oranı ise fenol, tuzlar veya organik çözücülerle kirlenmeyi işaret etmiştir. T2 örneği orta düzeyde bir RNA konsantrasyonu sunmuş ancak benzer kontaminasyonlar kaliteyi düşürmüştür. T3 ve T4 örnekleri, yüksek nükleik asit konsantrasyonu ile birçok uygulama için uygun kalite göstermiştir. Ancak OD260/280 oranlarının hafif yüksekliği, RNA'da az miktarda safsızlıkların varlığına işaret etmektedir (Tablo 2).

Tablo 2. GeneJET Bitki RNA Saflaştırma Mini Kiti kullanılarak *C. album* ve *S. nigrum* yaprağından izole edilen toplam RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı.

Örnek	Bitki örneği	OD260/280	OD260/230	Konsantrasyon (ng/ µL)
T1	*C. album* yaprak	3,20	0,24	65,56
T2	*C. album* yaprak	1,61	0,67	129,58
T3	*S. nigrum* yaprak	2,13	1,23	160,29
T4	*S. nigrum* yaprak	2,14	1,77	177,22
P	*S.lycopersicum* yaprak	2,22	1,66	141,31

Modifiye SDS-LiCl yöntemi ile T1, T2, T3 ve T4 örneklerinden izole edilen, RNA'nın düşük kontaminasyon seviyelerine sahip olduğunu belirlenmiştir. OD260/280 ve OD260/230 oranlarının uygunluğu, hassas moleküler teknikler için önemli olan kontaminantların etkin şekilde uzaklaştırıldığını göstermektedir. Bununla birlikte, *C. album*'dan RNA izolasyonu, daha yüksek sekonder metabolit seviyeleri nedeniyle *S.*

nigrum'a göre daha zordur. Optimize edilmiş protokoller, bu zorlukları aşarak standart yöntemlere göre önemli bir iyileşme sağlamıştır (Tablo 3).

Tablo 3. Modifiye SDS-LiCl yöntemi kullanılarak *C. album* ve *S. nigrum* yaprağından izole edilen toplam RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı.

Örnek	Bitki örneği	OD260/280	OD260/230	Konsantrasyon (ng/ µL)
T1	*C. album* yaprak	2,45	1,36	110,78
T2	*C. album* yaprak	2,17	2,59	108,44
T3	*S. nigrum* yaprak	2,13	1,63	149,91
T4	*S. nigrum* yaprak	2,38	1,68	167,45
P	*S. lycopersicum* yaprak	2,14	2,45	124,13

SDS-LiCl yöntemi kullanılarak izole edilen T1, T2 ve T4 örnekleri, düşük nükleik asit konsantrasyonları nedeniyle diğer uygulamalarda sınırlı kullanıma sahiptir. Çok yüksek OD260/280 oranı, muhtemelen proteinlerden veya artık çözücülerden kaynaklanan önemli bir kontaminasyona işaret ederken, düşük OD260/230 oranı fenol veya tuzlarla kontaminasyona işaret etmektedir. T3 örneği ise orta düzeyde bir RNA konsantrasyonu ve dört örnek arasında en iyi kaliteyi sunmuştur. OD260/280 oranı hafif yüksek olsa da, OD260/230 oranı kabul edilebilir aralıktadır (Tablo 4).

Tablo 4. SDS-LiCl yöntemi kullanılarak *C. album* ve *S. nigrum* yaprağından izole edilen toplam RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı.

Örnek	Bitki örneği	OD260/280	OD260/230	Konsantrasyon (ng/ µL)
T1	*C. album* yaprak	4,76	0,48	5,24
T2	*C. album* yaprak	3,82	0,53	22,57
T3	*S. nigrum* yaprak	2,34	1,47	14,12
T4	*S. nigrum* yaprak	3,62	0,64	9,52
P	*S. lycopersicum* yaprak	2,19	1,70	36,45

CTAB-LiCI yöntemi kullanılarak izole edilen T3 ve T4 örnekleri benzer nükleik asit konsantrasyonlarına ve yakın değerlerde düşük saflık oranına sahip bulunmuştur. Buna karşın T1 ve T2 örnekleri, düşük nükleik asit konsantrasyonu ve ciddi kontaminasyon sergilemiştir (Tablo 5).

Tablo 5. CTAB-LiCI yöntemi kullanılarak *C. album* ve *S. nigrum* yaprağından izole edilen toplam RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı.

Örnek	Bitki örneği	OD260/280	OD260/230	Konsantrasyon (ng/ µL)
T1	*C. album* yaprak	0,80	0,14	0,94
T 2	*C. album* yaprak	4,89	0,35	2,10
T 3	*S. nigrum* yaprak	1,78	0,51	20,47
T 4	*S. nigrum* yaprak	2,07	0,69	13,13
P	*S. lycopersicum* yaprak	2,71	0,75	61,18

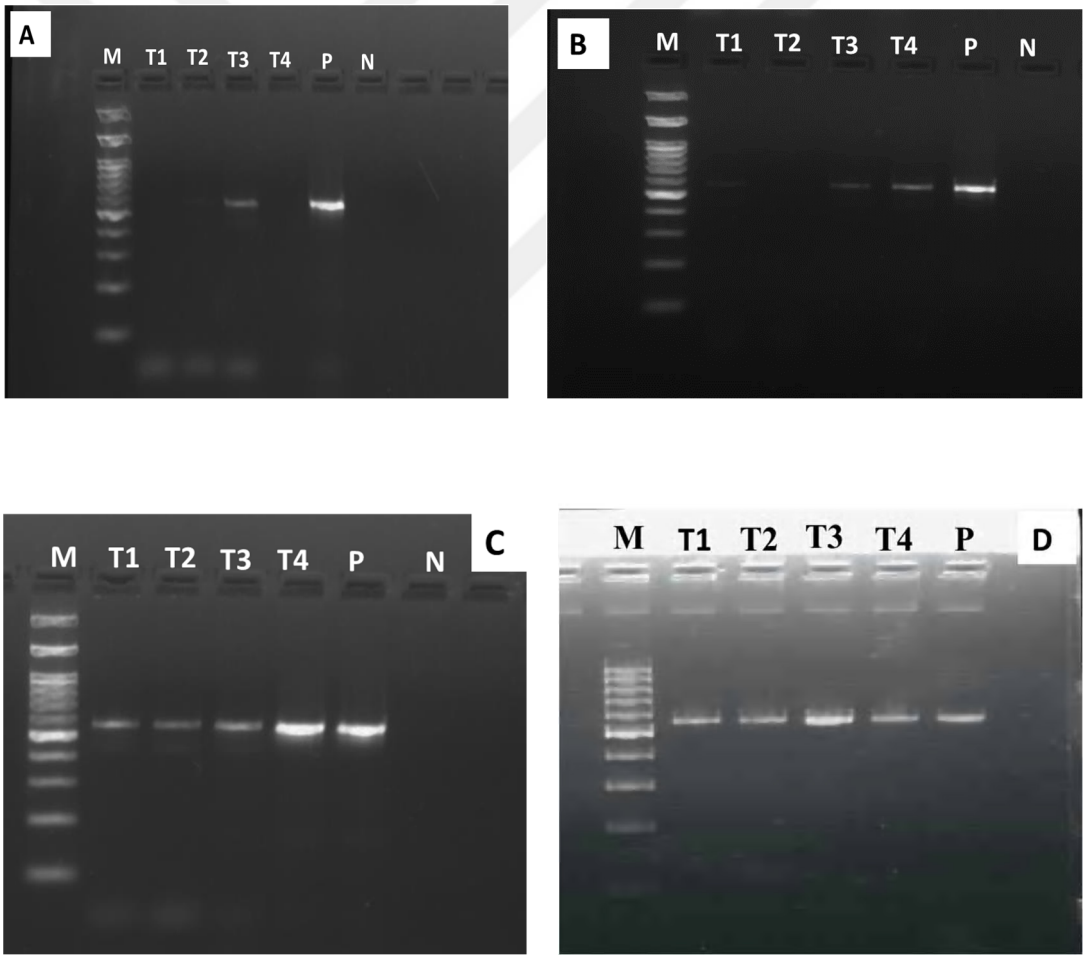
Modifiye SDS-LiCl yöntemi, RNA izolasyonunda ekonomik ve etkili bir alternatif sunmuş ve özellikle polisakkarit ve polifenol bakımından zengin bitkilerde RNA kalitesini artırmada başarılı olmuştur. T3 ve T4 örnekleri, hassas moleküler biyoloji uygulamaları için uygun niteliklere sahiptir. Bu yöntemin, maliyet-etkinliği ve verimliliği ile ticari kitlere karşı güçlü bir alternatif oluşturduğu düşünülmektedir.

3.5. Farklı izolasyon yöntemleri kullanılarak izole edilen RNA'ların bütünlüğünün ToBRFV'ye özgü primerler kullanılarak RT-PCR analizleri ile değerlendirilimesi.

Bitki virüslerinin teşhisinde RNA izolasyonu, doğru ve güvenilir tanı için kritik bir adımdır. Virüsler, bitki hücrelerine girdiklerinde kendi RNA'larını kullanarak çoğalırlar. Bu nedenle, bitki örneklerinden izole edilen RNA, virüsün genetik materyalini doğrudan tespit etmek ve analiz etmek için kullanılır. RNA izolasyonu, özellikle moleküler biyoloji tekniklerinde (PCR, RT-PCR, qPCR gibi) yüksek hassasiyet ve özgüllük sağlar. Ayrıca, RNA'nın saf ve kaliteli bir şekilde elde edilmesi, yanlış negatif sonuçların önlenmesine ve doğru teşhislerin konmasına olanak tanır. Bu süreç, virüslerin genetik dizilimlerinin belirlenmesine, varyantlarının saptanmasına ve epidemiyolojik çalışmaların yürütülmesine de katkı sağlar. Sonuç olarak, RNA izolasyonu, bitki virüslerinin hızlı ve kesin teşhisi için vazgeçilmez bir yöntemdir.

Bu çalışmada, söz konusu yöntemler kullanılarak elde edilen RNA izolasyon protokollerinin etkinliği detaylı bir şekilde incelenmiş ve yöntemlerin etkinliği ile güvenilirliği değerlendirilmiştir. Değiştirilmiş SDS-LiCI yöntemi yöntemi, yüksek saflık ve verimlilik açısından en başarılı yöntem olarak belirlenmiştir. Değiştirilmiş SDS-LiCI yöntemi kullanılarak izole edilen RNA, ToBRFV'ye özgü amplifikasyon için daha net RT-PCR bantlarıyla, aşağı akış uygulamalarında üstün performans göstermiştir (Şekil 9).

SDS-LiCl yöntemi ile RNA izolasyon adımları fenol kullanılmadan uygulandığında, hem *C. album* hem de *S. nigrum*'da daha kaliteli RNA izolasyonu elde edilmiştir. Bu RNA'ları şablon olarak kullanarak oluşturulan cDNA kütüphanelerinde gerçekleştirilen RT-PCR analizlerinin sonuçları bunu doğrulamaktadır. ToBRFV'nin RT-PCR amplifikasyonu, optimize edilmiş bir protokol kullanılarak izole edilen RNA ile daha yüksek güvenilirlik ve hassasiyet göstermiştir. Bu bulgu, yöntemin hem tanısal hem de araştırma amaçlı uygulamalar için uygun bir araç olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışmada sunulan modifiye SDS-LiCl yöntemi, polisakkaritler ve polifenoller gibi biyoaktif bileşikler bakımından zengin olan *C. album* yapraklarından yüksek verimli ve kaliteli RNA izolasyonu için güvenilir bir yöntem olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 9. ToBRFV-F/R primerleri kullanılarak gerçekleştirilen RT-PCR analizi (M: Markır, T1, T2: *C. album*, T3, T4: *S. nigrum*, P: pozitif kontrol +, N: negatif kontrol-) (A: SDS-LiCI yöntemi; B: CTAB-LiCI; C: Modifiye SDS-LiCI yöntemi; D: GeneJET Bitki RNA Saflaştırma Mini Kiti)

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1.Tartışma

Çalışmamızda, farklı RNA izolasyon protokollerinin etkinliği karşılaştırılmış ve SDS-LiCl modifiye edilmiş yöntemi, yüksek saflık ve verimlilik açısından en başarılı yöntem olarak belirlenmiştir. RT-PCR sonuçları hem *Solanum nigrum* L. hem de *Chenopodium album* L. bitkilerinin ToBRFV ile enfekte olabileceğini ve virüsün bu bitkilerde replike olabileceğini göstermiştir.

Solanum nigrum L. ve *Chenopodium album* L. de ToBRFV sİmptomlarının ilerlemesi ve yoğunluğundaki farklılıklar gözlemlenmiş, bitki türleri arasında duyarlılık ve simptom ifadesindeki varyasyonlar vurgulanmıştır. İnokulasyonu takiben, *S. nigrum* bitkileri 10-15 gün içinde sistemik enfeksiyon sergilemiş, başlangıçta genç üst yapraklarda hafif kloroz göstermiş, ardından daha belirgin mozaik desenlere ve hafif yaprak kıvrılmalarına dönüşmüştür. Buna karşılık, *C. album* daha hızlı belirti başlangıcı göstermiş, inokulasyondan 5-7 gün sonra yapraklarda klorotik lekeler ve halkalar ortaya çıkmıştır. Ancak, *C. album* bitkilerinde simptomları inoküle edilmiş alanlarla sınırlı kalmış ve sistemik enfeksiyon gözlenmemiştir. *S. nigrum* ise ToBRFV'nin sistemik enfeksiyonunu destekleyerek yoğun simptomlar göstermesine rağmen 240 günden fazla hayatta kalmıştır.

Sİmptom gelişimindeki bu farklılıklar, *S. nigrum*' un sistemik enfeksiyonu destekleme kapasitesini, *C. album*' un ise enfeksiyonu lokalize etme eğilimini ortaya koymaktadır. Bu ayrım, *S. nigrum*'un ToBRFV'nin sistemik davranışını incelemek için uzun vadeli çalışmalarda etkili bir model olabileceğini, *C. album*' un ise lokalize direnç mekanizmalarını araştırmak için daha uygun bir model sunduğunu göstermektedir.

Ayrıca, yabancı otların fitopatojenlerin alternatif konukçuları olarak hareket edebileceği ve hastalık epidemiyolojisinde önemli rol oynayabileceği vurgulanmaktadır (Temur Çınar vd., 2024).

RNA izolasyonu, ToBRFV'nin tespiti ve teşhisi için kritik bir aşamadır. Bu bağlamda, polisakkarit ve polifenolik bileşikler bakımından zengin bitkilerden yüksek kaliteli nükleik asit izole etmek genellikle zorluklar yaratmaktadır. RNA ekstraksiyon protokollerinin karşılaştırılması, Modifiye SDS-LiCl yönteminin özellikle saflık ve verim açısından üstün olduğunu göstermiştir. SDS, polisakkaritler ve proteinlerle yüksek reaktivite gösterirken RNA ile etkileşime girmemekte, böylece RNA'nın diğer biyopolimerlerden daha etkili bir şekilde ayrılmasını sağlamaktadır (Chatterjee et al., 2002; Azevedo et al., 2003; Vennapusa et al., 2020).

Modifiye SDS-LiCl yöntemi, ticari kitlerle benzer sonuçlar vermekle birlikte, özellikle *C. album* gibi örneklerde daha yüksek saflıkta RNA üretmiştir. Örneğin, bu yöntemle izole edilen RNA, OD260/280 ve OD260/230 oranlarında daha dengeli sonuçlar göstermiştir. *C. album*'dan RNA izolasyonu zorlu olmasına rağmen, bu yöntemle kabul edilebilir saflıkta RNA elde edilmiştir. Ayrıca, RNA'nın temizliğinin, izolasyon sonrası PCR deneylerinde RNA miktarından daha kritik olduğu gözlemlenmiştir. Bu, Değiştirilmiş SDS-LiCl yönteminin yalnızca ToBRFV değil, diğer bitki virüslerinin tespitinde de uygulanabilir bir protokol olduğunu göstermektedir.

Bulgular doğrultusunda, Değiştirilmiş SDS-LiCl yöntemi, özellikle ekonomik ve pratik avantajlarıyla dikkat çekmektedir. Bu yöntem, ToBRFV ile ilgili gelecekteki araştırmalara temel oluşturabilir ve tarımsal hastalık yönetimi stratejilerine önemli katkılar sağlayabilir. *S. nigrum* ve *C. album* gibi bitki türlerinin farklı tepki mekanizmalarının anlaşılması, ToBRFV'nin epidemiyolojisi ve kontrolü açısından yeni yaklaşımlara ışık tutabilir.

Dünyanın farklı bölgelerinden ek yabani ot türlerinin ToBRFV konukçusu olup olamayacağının belirlenmesi, domates mahsulü olmadığında virüsün yabancı ot türlerinin konukçularında ne kadar süre kalabildiğinin ve tohum aktarımının *S. nigrum*

dışındaki yabancı ot tohumlarından gerçekleşip gerçekleşmediğinin anlaşılması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (Salem et al., 2022).

4.2.Sonuç ve Öneriler

ToBRFV, yüksek bulaşıcılığı nedeniyle küresel domates ve biber endüstrisi için önemli bir tehdit oluşturmaktadır (Panno et al., 2019). 2015 yılından bu yana ToBRFV'nin beş kıtada 35'ten fazla ülkeden rapor edildiği bildirilmiştir. Küreselleşme, dünya çapında tohum ve bitki materyali alışverişini artırmış ve bu virüsün bu kadar kısa sürede beş kıtaya yayılmasına önemli katkı sağlamıştır. Virüs, verim ve meyve kalitesinin yanı sıra bitki canlılığını da azaltmaktadır. Dikkat çekici şekilde, Türkiye'de ToBRFV enfeksiyonu ile ilgili zararın boyutu şu anda artmaktadır. Hızlı ve kesin bir tespit ve teşhis tekniğinin oluşturulması, ToBRFV enfeksiyonunun yayılmasını durdurmak için acil kontrol önlemlerinin alınması için gereklidir.

Genel olarak bu çalışma, yabani otlar ToBRFV'nin birincil inokulumunu taşıyabileceğinden, bir sonraki büyüme döngüsü ekilmeden önce domates yetiştirme uygulamalarında kontrol önlemlerinin yeniden gözden geçirilmesi gerektiğinin altını çizmektedir. Çalışma*, S. nigrum* ve *C. album*' dan RNA verimini ve saflığını önemli ölçüde artıran ve ToBRFV'nin daha etkili bir şekilde tespit edilmesini ve karakterize edilmesini sağlayan optimize edilmiş bir RNA izolasyon protokolü sunmaktadır. Bu protokol, ToBRFV ve diğer bitki virüsleri ile ilgili gelecekteki araştırmalar için bir temel oluşturabilir ve sonuçta tarımda daha iyi hastalık yönetimine katkıda bulunabilir.

Solanum nigrum L. ve *Chenopodium album* L., ToBRFV'nin izolasyonu ve enfeksiyon mekanizmalarının anlaşılması için önemli bitkisel modellerdir.

Solanum nigrum L, uzun ömürlü yapısı, farklı iklim koşullarına dayanıklılığı, lokal semptomların yanı sıra virüsü sistemik olarak taşıyabilmesi nedeniyle *Chenopodium album* L.'a göre daha güçlü bir test bitkisi potansiyeli taşımaktadır.

Modifiye edilmiş SDS-LiCl yöntemi, düşük viral yük ve bitkisel inhibitörler gibi zorluklara rağmen kaliteli RNA izolasyonu için en uygun yöntem olarak tespit edilmiştir.

RNA kalitesi, spektrofotometrik analizle doğrulanmış ve ToBRFV'nin varlığı RT-PCR ile başarılı bir şekilde tespit edilmiştir.

Öneriler:

- *S. nigrum*, ToBRFV'nin enfeksiyon süreçlerini anlamak ve uzun vadeli viral çalışmalar için bir model bitki olarak tercih edilebilir.
- RNA izolasyonu ve teşhis çalışmaları için modifiye edilmiş SDS-LiCl yöntemi geniş çaplı uygulanabilir. Bu yöntem, düşük maliyet ve yüksek verimlilik sunarak, özellikle sahada kullanılabilecek pratik bir yaklaşım sunmaktadır.
- *C. album*, yerel semptomlar oluşturduğu için kısa vadeli çalışmalarda kullanılabilir ancak sistemik enfeksiyon oluşturma kapasitesi sınırlıdır.
- Farklı RNA izolasyon protokollerinin daha fazla bitki türünde denenmesi, diğer potansiyel konukçuların tespiti için faydalı olabilir.
- ToBRFV'nin diğer alternatif konukçu bitkilerdeki davranışını incelemek, hastalık yönetim stratejilerine katkı sağlayabilir.

Bu çalışmanın sonuçları, ToBRFV'nin daha etkili ve hassas teşhisi için yeni protokollerin geliştirilmesine temel oluşturabilir.

KAYNAKÇA

Alkowni, R., Alabdallah, O., & Fadda, Z. 2019. Molecular identification of tomato brown rugose fruit virus in tomato in Palestine. **Journal of Plant Pathology, 101**, 719-723.

Arora, S., & Itankar, P. 2018. Extraction, isolation and identification of flavonoid from Chenopodium album aerial parts. **Journal of traditional and complementary medicine, 8**(4), 476-482.

Avni, B., Gelbart, D., Sufrin-Ringwald, T., Zemach, H., Belausov, E., Kamenetsky-Goldstein, R., & Lapidot, M. 2022. ToBRFV infects the reproductive tissues of tomato plants but is not transmitted to the progenies by pollination. **Cells, 11**(18), 2864.

Azevedo, H., Lino-Neto, T., & Tavares, R. M. 2003. An improved method for high-quality RNA isolation from needles of adult maritime pine trees. **Plant molecular biology reporter, 21**, 333-338.https://doi.org/10.1007/BF02772582.

Bajwa, A. A., Zulfiqar, U., Sadia, S., Bhowmik, P., & Chauhan, B. S. 2019. A global perspective on the biology, impact and management of Chenopodium album and Chenopodium murale: two troublesome agricultural and environmental weeds**. Environmental Science and Pollution Research, 26**, 5357-5371. https://doi.org/10.1007/s11356-018-04104-y

Bana, R. S., Kumar, V., Sangwan, S., Singh, T., Kumari, A., Dhanda, S., ... & Singh, V. 2022. Seed Germination Ecology of Chenopodium album and Chenopodium murale. **Biology, 11**(11), 1599.

Bananej, K., Keshavarz, T., da Silva, J. P. H., & Zerbini, F. M. 2024. Isolation and whole-genome sequencing of tomato brown rugose fruit virus from pepper in Iran. **Journal of Plant Diseases and Protection, 131**(1), 49-55.

Caruso, A. G., Bertacca, S., Parrella, G., Rizzo, R., Davino, S., & Panno, S. 2022. Tomato brown rugose fruit virus: A pathogen that is changing the tomato production worldwide. **Annals of Applied Biology, 181**(3), 258-274.

Caruso, A.G., Tortorici, S., Davino, S., Bertacca, S., Ragona A., Verde, G.L., Biondi, A., Noris, E. Rizzo, R., & Panno, S. 2024. The invasive tomato pest Tuta absoluta can transmit the emergent tomato brown rugose fruit virüs. **Entomologia Generalis, 44** (2), 289–296.

Chatterjee, A., Moulik, S. P., Majhi, P. R., & Sanyal, S. K. 2002. Studies on surfactant–biopolymer interaction. I. Microcalorimetric investigation on the interaction of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and sodium dodecylsulfate (SDS) with gelatin (Gn), lysozyme (Lz) and deoxyribonucleic acid (DNA). **Biophysical chemistry, 98**(3), 313-327.https://doi.org/10.1016/S0301-4622(02)00107-2.

Chen, X., Dai, X., Liu, Y., Yang, Y., Yuan, L., He, X., & Gong, G. 2022. Solanum nigrum Linn.: an insight into current research on traditional uses, phytochemistry,and pharmacology. **Frontiers in Pharmacology, 13**,918071. doi: 10.3389/fphar.2022.918071.

Chen, G., Pan, H., Xie, W., Wang, S., Wu, Q., Fang, Y., Zhang, Y. 2013. Virus infection of a weed increases vector attraction to and vector fitness on the weed**. Scientific Reports, 3**(1), 2253.; doi:10.1038/srep02253.

Cutillo, F., D'Abrosca, B., DellaGreca, M., & Zarrelli, A. 2004. Chenoalbicin, a novel cinnamic acid amide alkaloid from Chenopodium album. **Chemistry & biodiversity, 1**(10), 1579-1583.

Dombrovsky, A., & Smith, E. 2017. Seed transmission of Tobamoviruses: Aspects of global disease distribution. **Advances inSeed Biology 12**, 233-260.

Erdoğan, T., Çınar, C. T., & Işık, D. 2022. Domates Sarı Yaprak Kıvırcıklık Virüsünün (Tomato Yellow Leaf Curl Virus-TYLCV) Doğal Konukçuları: Yabancı Otlar. **Turkish Journal of Weed Science, 25**(2), 145-150.

EPPO. 2023. European and Mediterranean Plant Protection Organization: Tomato Brown Rugose Fruit Virus. Global Database Distribution World. Available online: **https://gd.eppo.int/taxon/TOBRFV/distribution** (accessed on 14 April 2023).

EPPO. 2024. European and Mediterranean Plant Protection Organization Updated version of the Pest risk analysis for Tobamovirus fructirugosum (tomato brown rugose fruit virus) Available online: **https://gd.eppo.int/taxon/TOBRFV/distribution** (EPPO, 2024-09-30)

Fidan, H., Sarikaya, P., & Calis, O. 2019. First report of tomato brown rugose fruit virus on tomato in Turkey. **New Disease Reports, 39**(18), 18. doi: http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.039.018.

Fidan, H., Sarikaya, P., Yildiz, K., Topkaya, B., Erkis, G., & Calis, O. 2021. Robust molecular detection of the new Tomato brown rugose fruit virus in infected

tomato and pepper plants from Turkey. **Journal of Integrative Agriculture, 20**(8), 2170-2179.

Hanssen, I. M., Lapidot, M., & Thomma, B. P. 2010. Emerging viral diseases of tomato crops. **Molecular Plant-Microbe Interactions, 23**(5), 539–548. https://doi.org/10.1094/MPMI-23-5-0539.

Hanssen, I.M. & Lapidot, M. 2012 Major tomato viruses in the Mediterranean basin. **Advances in Virus Research, 84**, 31–66.

Jewehan, A., Kiemo, F.W., Salem, N., Tóth, Z., Salamon, P., & Szabó, Z. (2022). Isolation and molecular characterization of a tomato brown rugose fruit virus mutant breaking the tobamovirus resistance found in wil Solanum species. **Arch Virol, 167**, 1559–1563. https://doi.org/10.1007/s00705-022-05438-2

Jones, R. A., & Naidu, R. A. 2019. Global dimensions of plant virus diseases: current status and future perspectives. **Annual review of virology, 6**(1), 387-409.

Jones, R.A.C. 2021. Global plant virus disease pandemics and epidemics. **Plants, 10**, 233.

Liu, L., Han, R., Yu, N., Zhang, W., Xing, L., Xie, D., & Peng, D. 2018. A method for extracting high-quality total RNA from plant rich in polysaccharides and polyphenols using Dendrobium huoshanense. **Plos one, 13**(5),41-49.

Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I., Dombrovsky, A. (2017). A new Israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-22 resistance genes**. PloS one, 12**(1),41-55.

Masoomi-Aladizgeh, F., Jabbari, L., Khayam Nekouei, R., Aalami, A., Atwell, B. J., & Haynes, P. A. (2023). A universal protocol for high-quality DNA and RNA isolation from diverse plant species. **Plos one, 18**(12).

Panno, S., Caruso, A. G., Blanco, G., & Davino, S. 2020. First report of Tomato brown rugose fruit virus infecting sweet pepper in Italy. **New Disease Reports, 41**(20), 2044-0588. https://doi.org/10.5197/j.2044- 0588.2020.041.020.

Panno, S., Caruso, A. G., & Davino, S. 2019. First report of tomato brown rugose fruit virus on tomato crops in Italy. **Plant Disease, 103**(6), 1443-1443.

Papayiannis, L. C., Katis, N. I., Idris, A. M., & Brown, J. K. 2011. Identification of weed hosts of Tomato yellow leaf curl virus in Cyprus. **Plant Disease, 95**(2), 120-125.

Salem, N., Mansour, A., Ciuffo, M., Falk, B. W., & Turina, M. 2016. A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. **Archives of virology, 161**, 503-506.

Salem, N. M., Abumuslem, M., Turina, M., Samarah, N., Sulaiman, A., Abu-Irmaileh, B., & Ata, Y. 2022. New weed hosts for Tomato brown rugose fruit virus in wild Mediterranean vegetation. **Plants, 11**(17), 2287.

Salem, N. M., Jewehan, A., Aranda, M. A., & Fox, A. 2023. Tomato brown rugose fruit virus pandemic. **Annual review of phytopathology, 61**(1), 137-164.

Çınar, C. T., Dertli, E., Kaya, Y., & Işık, D. 2024. Determination of The Potential of Some Weeds to be Used as An Indicator Plant in Studies On Plumpox virus-T. **Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi, 27**(5), 1087-1094.

Vennapusa, A. R., Somayanda, I. M., Doherty, C. J., & Jagadish, S. K. 2020. A universal method for high-quality RNA extraction from plant tissues rich in starch, proteins and fiber. **Scientific reports, 10**(1), 16887.

Zhang, Q., Shao, J., Han, R., & Wang, J. 2022. Effects of Solanum nigrum l. density on agronomic and yield traits, physiological indexes, and the economic threshold of mechanically-harvested cotton. **Gesunde Pflanzen, 74**(4), 879-888. https://doi.org/10.1007/s10343-022-00665-8

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Tuğba ERDOĞAN

Uyruğu: Türkiye T.C.

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi, Bitki Koruma	-
Lisans	Erciyes Üniversitesi, Bitki Koruma	2015
Önlisans	Erciyes Üniversitesi, Gıda teknolojileri	2012

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2019-Halen	Bilenler un ve yem fab.	Mühendis

YAYINLAR

1. Erdoğan, T., Temur Çınar C., Işık D. (2022). Domates Sarı Yaprak Kıvırcıklık Virüsünün (Tomato Yellow Leaf Curl Virus-TYLCV) Doğal Konukçuları: Yabancı Otlar. Herboloji Dergisi 25(2) ss 145-150.

2. T. Erdoğan Et al., "Solanum nigrum ve Chenopodium album Yabancı Otlarından Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)' nün RNA'sının İzolasyonunun Optimizasyonu," SELCUK 10th Internatıonal Conference On Applıed Scıences, Konya, Turkey, pp.1, 2024.

3. C. Temur Çınar And T. Erdoğan, "Şeftali Virüs Ve Viroid Hastalıkları," In Şeftali Yetiştiriciliği, Hastalık ve Zararlıları , Kayseri: İKSAD International Publishing House, 2023, pp.183-203.

4. 2023 - Devam Ediyor : Farklı Yabancı Otlardan Domates Sarısı Yaprak Kıvırcıklık Virüsünün Tomato yellow leaf curl virusTYLCV İzolasyonunun Optimizasyonu -Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje IŞIK D. (Yürütücü), ERDOĞAN T., TEMUR ÇINAR C.

5. 2024 - Devam Ediyor : Farklı bölgelerden toplanan domates örneklerinde virüs ve fitoplazma hastalıklarının moleküler yöntemlerle belirlenmesi- Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje TEMUR ÇINAR C. (Yürütücü), ERDOĞAN T.