

Detection and Partial Molecular Characterization of *Tomato chlorosis virus* Isolates from Tomato Production Greenhouses in Antalya Province Using hsp70h Gene

Hasret ÖZTÜNÇ¹ Bayram ÇEVİK^{1*}

¹Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 32260 Isparta

*Corresponding author e-mail: bayramcevik@sdu.edu.tr

Accepted by December 6, 2016

ABSTRACT

Tomato chlorosis virus (ToCV) has been spreading in tomato production area of the world, particularly in the Mediterranean countries in recent years. The presence of the virus in Turkey was detected in Fethiye in 2008, but the presence of the virus in most important tomato production region, Antalya Province, is not yet known. In this study, a survey was conducted in Antalya Merkez and Kumluca districts and 50 samples were collected from 12 different tomato production greenhouses. After total nucleic acid isolation, all samples were tested for the presence of the ToCV by amplification of the heat shock protein 70 homologue gene (hsp70h) with gene-specific primers using nested RT-PCR method. The nested PCR test revealed that 25 of 50 tomato samples (50%) were infected with ToCV. These results showed the presence of ToCV in Antalya province for the first time and demonstrated that the virus is widely distributed in the region. The hsp70h genes of two isolates from Antalya Merkez and Kumluca districts were sequenced and used for comparison and phylogenetic analysis with each other and hsp70h genes of ToCV isolates from different tomato production area of the world retrieved from GenBank databases. As results of these analyses up to 5% genetic difference was determined among ToCV isolates from different regions and ToCV isolates were phylogenetically divided into two main groups. It was also determined that the phylogenetic groups formed may be associated with geographical origin of ToCV isolates.

Keywords: Tomato, hsp70h, nested RT-PCR, sequence analysis, phylogenetic analysis

Antalya İli Domates Üretim Seralarında *Tomato chlorosis virus*'ün hsp70 Geni Kullanılarak Tanınması ve Kısmi Moleküler Karakterizasyonu

ÖZET

Tomato chlorosis virus (ToCV) son yıllarda başta Akdeniz ülkeleri olmak üzere dünya domates üretim alanlarında yayılan bir virüstür. Ülkemizde virüsün varlığı 2008 yılında Fethiye'de tespit edilmiş ancak ülkemizin en önemli domates üretim bölgesi olan Antalya ilinde ToCV varlığı ve yaygınlığı henüz saptanmamıştır. Bu çalışmada Antalya Merkez ve Kumluca ilçelerinde sörvey çalışmaları yapılarak 12 farklı üretim serasından 50 farklı domates örneği toplanmıştır. Toplanan tüm örnekler total nükleik asit izolasyonu yapıldıktan sonra ısı şoku protein 70 homolog (heat shock protein homologue, hsp70h) genine spesifik primerler kullanılarak nested-RT-PCR yöntemiyle ToCV varlığı açısından test edilmiştir. Yapılan testlemeler sonucunda 50 domates örneğinden 25 tanesinin (%50) ToCV ile enfekteli olduğu bulunmuştur. Bu sonuçla ToCV'nin Antalya ilinde varlığı ilk kez rapor edilmiş ve virüsün bölgede yaygın olarak bulunduğu ortaya konmuştur. Antalya Merkez ve Kumluca'dan ikişer izolatan hsp70h geninin dizilemesi yapılarak birbirleriyle ve dünyanın farklı domates üretim bölgelerinden elde edilen izolatların hsp70h genleriyle kıyaslaması ve filogenetik analizler yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda ToCV izolatları arasında %5'e varan oranlarda genetik farklılık olduğu ve filogenetik olarak ToCV izolatların iki ana gruba ayrıldığı belirlenmiştir. Ayrıca oluşan filogenetik grupların ToCV izolatların coğrafik orijinleriyle ilişkili olabileceği tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Domates, hsp70h, nested-RT-PCR, dizi analizi, filogenetik analiz

GİRİŞ

Domates (*Solanum lycopersicum*), dünyada ve ülkemizde yaygın olarak üretimi yapılan ve gerek sofralık gerekse işlenmiş olarak oldukça fazla tüketilen, ekonomik açıdan önemli sebzelerin başında gelmektedir. Dünyada yıllık yaklaşık 165 milyon ton domates üretimi yapılmaktadır. Ülkemiz domates ekim alanları bakımından 300 000 ha ve domates üretimi bakımından da yaklaşık 12 milyon ton ile Çin, Hindistan ve ABD'den sonra 4. sırada yer almaktadır (FAO, 2013). Domates üretimi ülkemizde tarımsal üretimin yapıldığı bölgelerin tamamında yapılabilmekle beraber ülkemizin toplam domates üretiminin büyük bir kısmı Antalya ilinde yapılmaktadır (TUİK, 2009). Domateste zarara neden olan hastalıklar arasında virüs hastalıklarının yeri oldukça önemli olup, farklı taksonomik gruba dahil 50'den fazla virüsün domateste hastalığa yol açtığı bilinmektedir (Smith, 2012; Hansen et al., 2010). Bu virüslerden Domates sarı yaprak kıvrıkcılık virüsü (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV), Domates lekeli solgunluk virüsü (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) dünyada ve ülkemizde domates üretim alanlarında yaygın olarak görülen virüsleri oluşturmaktadır. 1990'lı yıllardan bu yana TYLCV ve TSWV dünya genelinde domateste en çok zarara yol açan virüsler olmuşlardır (Zitter et al., 1997; Erkan et al., 2001; Arlı ve Şevik, 2006). Buna karşın 2000'li yılların başlarında Domates kloroz virüsü (*Tomato chlorosis virus*, ToCV) önemli bir virüs hastalığı olarak görülmeye başlanmıştır (Hanssen et al., 2010)

Domates yapraklarında sararma belirtileri ilk olarak 1989 yılında Florida'da görülmüş ancak bu belirtilerin Domates kloroz virüsü (ToCV) tarafından neden olduğu yaklaşık 10 yıl sonra 1998 yılında saptanmıştır (Wisler et al., 1998). Bu tarihten sonra ve özellikle 2000'li yıllarda ToCV dünya domates üretim alanlarında yayılmaya başlamış ve İspanya (Lozano ve ark. 2006), Portekiz (Louro ve ark. 2000), Porto Riko (Wintermantel et al., 2001), İsrail (Segev ve ark. 2004), Yunanistan (Dovas et al., 2002; Kataya et al., 2008). Tayvan (Tsai et al., 2004), Kıbrıs (Papayiannis et al., 2005), Fransa (Jacquemonde ve ark. 2009), Mayotte Adası (Massé et al., 2008), Mauritius ve Reunion adaları (Lett et al., 2009; Delatte et al., 2005) ve Japonya'da (Hirota et al., 2010) tespit edilmiş olup her geçen gün yeni ülke ve bölgelerde virüsün varlığı rapor edilmektedir. Virüsün ülkemizde varlığı ilk olarak 2007 yılında Muğla'nın Fethiye ilçesinde domates üretim seralarında belirlenerek 2008 yılında tanısı konularak ilk kaydı yapılmıştır (Çevik ve Erkiş, 2008).

Domates kloroz virüsü Closteroviridae familyası, Crinivirus cinsine ait pozitif duyarlı tek iplikli RNA virüsü olup iki parçalı bir genomu sahiptir (Martelli et al., 2002). ToCV bitkiden bitkiye *Trialeurodes vaporariorum*, *T. abutilonea* ve *Bemisia tabaci* biyotip A ve B beyazsinek türleriyle yarı-persistent olarak taşınmaktadır (Wisler ve Duffus, 2001). ToCV'ye spesifik antikorlar yaygın olarak bulunmadığından ve ticari bir ELISA kiti olmadığından dolayı virüs serolojik olarak tespit edilememekte ve virüsün teşhisi sadece moleküler yöntemlerle yapılmaktadır (Jacquemonde et al., 2009). Bu nedenle ToCV tanısında virüsün farklı genom bölgelerinin çoğaltılmasını sağlayan ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. RT-PCR çalışmalarında bazı durumlarda ToCV ısı şoku protein homolog (heat shock protein homolog, hsp70h) geni (Navas-Castillo et al., 2000; Delatte et al., 2005; Wintermantel ve Wisler, 2006; Lett et al., 2009; Hirota et al., 2010) çoğaltılmasına rağmen virüsün tanısında genellikle kılıf protein (CP) geni (Segev et al., 2004; Hirota et al., 2010) kullanılmakta olup genin bir kısmının veya tamamının çoğaltımı yapılmaktadır. RT-PCR yöntemi bazı durumlarda tek aşamalı bazı durumlarda iki aşamalı yapılmaktadır. Özellikle virüsün düşük yoğunlukta olduğu örneklerden tanımlama yapabilmek amacıyla önce virüsün hsp70h geninin büyük bir kısmına spesifik primerlerle RT-PCR yapıldıktan sonra RT-PCR ile çoğaltılan bölgenin içinde kalan bir kısma spesifik yuvalı (nested) primerler kullanılarak ikinci bir PCR yani nested PCR yapıp yöntemin hassaslığı artırılabilir (Dovas et al., 2002).

Ülkemizde ToCV'nin varlığı ilk olarak 2008 yılında Fethiye'de Hsp70h genine spesifik nested-RT-PCR yöntemiyle belirlenmiştir (Çevik ve Erkiş, 2008). ToCV Fethiye izolatlarının Hsp70h geninin yaklaşık 450 bp kısmı nested RT-PCR yöntemiyle çoğaltılarak DNA dizilimi belirlenmiş ve ToCV Florida izolatıyla %99 benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Çevik ve Erkiş, 2008). Bu çalışmada ülkemizin en önemli domates üretim bölgesi olan

Antalya'da nested RT-PCR yöntemiyle ToCV teşhisi yapılarak virüsün bölgede varlığı yaygınlığı araştırılmıştır. Ayrıca bölgeden elde edilen izolatların hsp70h gen dizileri kullanılarak izolatların genetik çeşitliliği yanında birbirleriyle ve dünyanın farklı bölgelerinden ToCV izolatlarıyla filogenetik ilişkileri araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Sürvey Çalışmaları ve Bitki Materyalinin Toplanması

Çalışma kapsamında Antalya ilinde domates yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı yerlerde öncelikle alan çalışmaları yapılarak kloroz ve sararma belirtileri gösteren domates seralarının bulunduğu tespit edilmiştir. Daha sonra Antalya ili Merkez ilçesinde daha önce gözlem yapılan özel sektör firmalarına ve kamu kurumlarına ait seralardan kloroz belirtisi ve yaprak damar arası sararma gösteren domates bitkilerinden beşer tane olmak üzere toplam 25 farklı yaprak örneği alınmıştır. Aynı şekilde Antalya ilinin yoğun domates yetiştiriciliği yapılan Kumluca ilçesinde kloroz belirtisi gözlemlenen 7 farklı domates üretim serasından toplam 25 şüpheli yaprak örneği alınmıştır. Örnekler polietilen torbalarda laboratuara getirilerek bir hafta içerisinde test edilmek üzere kullanıncaya kadar -20°C derin dondurucuda saklanmıştır.

Nükleik Asit İzolasyonu

Antalya Merkez ve Kumluca ilçelerinde domates üretim seralarından toplanan domates örneklerinden CTAB nükleik asit izolasyon yöntemi (Li et al., 2009) kullanılarak total nükleik asit izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla domates örneklerinden yaklaşık olarak 2 gr yaprak dokusu alınarak havan içerisinde sıvı azot yardımı ile ezilmiştir. Ezilen yaprak dokusundan 100 mg alınarak 2.0 ml'lik santrifüj tüpüne konulduktan sonra örnekler 1ml CTAB tamponu (% 2 CTAB, %2 PVP-40, 10 Mm Tris HCL, Ph 8.0, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA ve 0,2 %2 Mercaptoethanol) eklenerek vorteksle iyice karıştırılmıştır. Tüpler -20 °C'de 5-15 dak bekletilerek dondurulmuş sonra da vorteks ile en yüksek hızda en az 60 sn karıştırılmıştır. Elde edilen homojenat 65 °C'de en az 15 dak. inkübasyona bırakıldıktan sonra 4 °C 10 000 rpm hızda 5 dak santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında 650 ml süpernatant 1000 ml pipet yardımıyla alınarak yeni bir 1.5 ml santrifüj tüpüne alınarak eşit hacimde chloroform:isoamyl alkol karışımı (24:1) eklenerek 4 °C 15 000 rpm hızda 10 dak santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında 50 ml süpernatant 100 ml pipet yardımıyla 350 ml izopropanol içeren yeni bir 1.5 ml santrifüj tüpüne eklenerek karışım 4 °C 15 000 rpm 10 dak santrifüj yapılmıştır. Daha sonra sıvı kısım dökülerek pelete 1 ml % 70'lik etil alkol ile yıkanarak 4 °C 15 000 rpm 5 dak santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra sıvı kısım dökülerek tüpler oda sıcaklığında 10-15 dak kurutulduktan sonra 100 µl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0 solüsyonu ile çözdürülmüştür. Elde edilen nükleik asitler kullanıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Primer Tasarımı

ToCV tanısının yapılması amacıyla virüsün hsp70h geninin korunmuş bölgelerine spesifik olarak tasarlanmış olan BC 365'-GG(G/T)TT(A/G)GA(G/T)TT(C/T)GGTACTAC-3', BC37 5'-CC(G/T)CCACCAA (A/G)TCGTA-3', BC40 5'-GGTTTGGATTTTGGTACTACATTCAGT-3' ve BC41 5'-AAACTGCCTGCAT GAAAAGTCTC-3' primerleri (Davos et al., 2002). ticari bir firmaya (Iontek) sentezletirilmiştir.

ToCV Hsp 70h Geninin RT-PCR Yöntemiyle Çoğaltılması

ToCV bir RNA virüsü olduğundan dolayı hsp70h geninin bir kısmının çoğaltılmasında önce RNA'dan DNA sentezlenmiş sonra sentezlenen DNA'nın çoğaltılmasını sağlayan "Tersine Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyon" (RT-PCR) yöntemi kullanılmıştır. Enfekteli bitki dokusundan izole edilen total RNA'dan ToCV Hsp 70 geninin çoğaltılması için TAKARA (Japonya) firmasından sağlanan iki aşamalı RT-PCR kiti (Two Step RT-PCR Kiti) kullanılmıştır. İlk aşamada total RNA'dan "Random Primer" ve "PrimeScript Reverse Transkriptaz" enzim kullanılarak tamamlayıcı DNA (complementer DNA, cDNA) sentezlenmiştir. Bu amaçla toplam reaksiyon hacmi 20

µl olacak şekilde 1X tersine transkripsiyon tampon solüsyonu, 1-3 µg total nükleik asit, 0.5 mM dNTP, 200 pmol random primer, 20 ünite PrimeScript Reverse Transkriptaz, 20 ünite RNase inhibitörü ve steril saf su ilave edilerek tersine transkripsiyon karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım 30 °C'de 10 dakika, 45 °C'de 1 saat ve 75 °C'de 15 dakika daha sonra da 4°C'de sürekli olarak kalacak şekilde programlanan PCR cihazında bekletilerek cDNA sentezi yapılmıştır. Daha sonra ToCV hsp70h geninin bir kısmı spesifik primerler ve "ExTaq" DNA polimeraz enzimi kullanılarak aşağıdaki prosedüre göre çoğaltılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için; 1X PCR tampon solüsyonu II, 2 µl cDNA, 0.5 mM dNTP, 20 pmol Primer 1, 20 pmol Primer 2, 0.25 Ünite Takara Ex Taq DNA Polimeraz ve su ilave edilerek karışım hazırlanmıştır. PCR makinesi, önce 94°C 'de 2 dakika bekletilerek, daha sonra 94°C 30 s, 45-55 °C 30 s ve 72° C 30 s süreyle 40 döngüyü tamamladıktan sonra 72°C 5 dak bekletilmiştir. Son olarak da 4°C'de sürekli kalacak şekilde programlanarak ToCV Hsp 70 geninin bir kısmının çoğaltılması yapılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri lamda 100bp DNA büyüklük markörüyle birlikte %1,5 agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında Doc-It jel (UVP, İngiltere) görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.

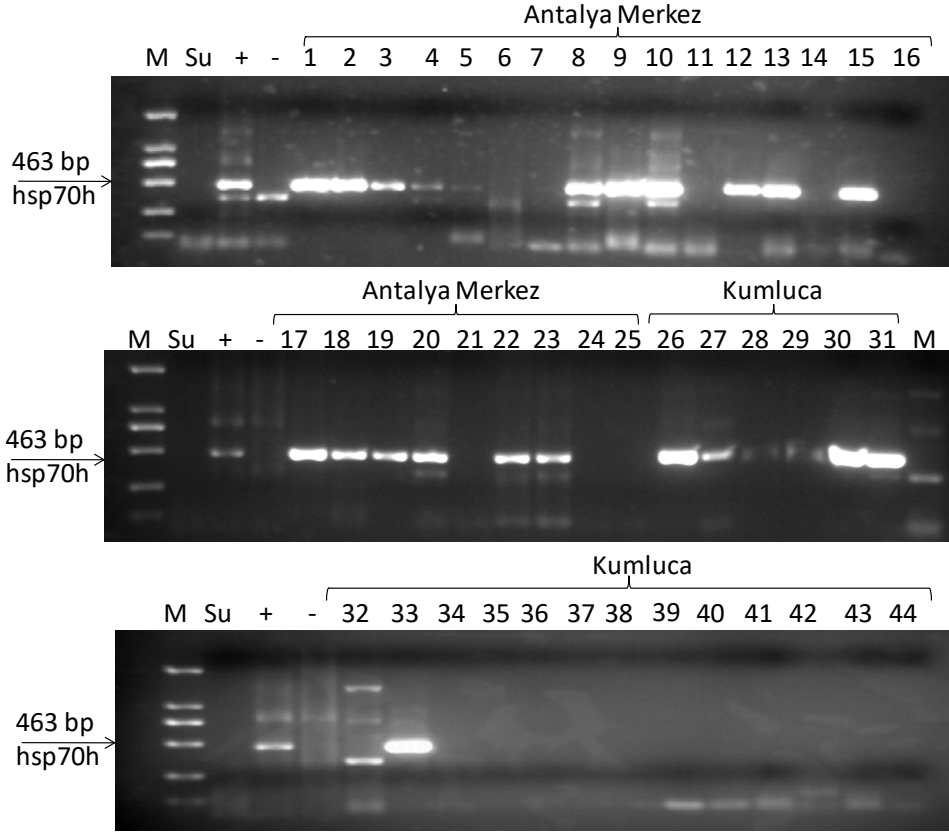
BULGULAR ve TARTIŞMA

Arazi çalışmaları

Bu çalışma kapsamında yapılan arazi çalışmaları sonucunda 1 toplam 11 farklı üretim serasında yetiştirilen 50 farklı domates bitkisinden yaprak örnekleri alınmıştır. Örnek alınan bitkiler belirgin kloroz belirtisi göstermekte olup bitkilerin bazılarının tamamında yaygın bir kloroz gözlemlenirken bazılarında ise sadece yaşlı yapraklarda kloroz gözlemlenmiştir. Yapraklarda görülen kloroz belirtileri yaprağın tamamına yayılmış olarak, sadece yaprağın uç ve kenar kısımlarında veya yaprak damar aralarında sararma olarak kendini göstermiştir. Antalya Merkez'de yaprak örneği alınan örnekler Orient, Linda, Vuslat, Reyhan, Bestona, Baly, Astona RN, Reyhan, Bestona'yı içeren 9 farklı ticari domates çeşidi ve 204/F1, 208/F1, 253/F1 ve 228/F1 içeren domates hatlarından oluşmuştur. Buna karşın Kumluca'dan alınan domates örnekleri çoğunlukla bölgede en yaygın yetiştirilen Alegro (16 adet) ticari çeşidinden oluşmakla birlikte Vuslat, Deniz, Bestone, Reyhan gibi ticari çeşitleri de içermiştir.

Nested-RT-PCR yöntemi ile ToCV'nin Tanınması

Örnek alınan domates çeşitlerinden total nükleik asit izolasyonu yapıldıktan sonra iki aşamalı RT-PCR yöntemiyle alınan örneklerde ToCV varlığı belirlenmiştir. Testlemelerde daha önce ToCV tanısında kullanılan ve düşük virüs yoğunluğunda bile ToCV tanınmasında kullanılan hassas bir yöntem olan nested-RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. RT-PCR testlemelerinde sadece saf su içeren bir örnek ve sağlıklı domates bitkisi negatif kontrol olarak daha önce Fethiye'de tespit edilen ToCV izolatıyla enfekteli örnek de pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Yapılan RT-PCR sonucunda negatif kontrol örneklerinden herhangi bir çoğaltım yapılmazken pozitif kontrol örneğinden hsp70h geninin 463 bp büyüklüğünde bir kısmı çoğaltılmıştır. Pozitif ve negatif kontrollerden elde edilen sonuçlar nested-RT-PCR yönteminin doğru bir şekilde uygulandığını ve yöntemin çalıştığını göstermiştir (Şekil 1). RT-PCR sonucunda Antalya Merkezden alınan 25 örneğin 18'inden ve Kumluca'dan alınan 25 örneğin 7'sinden ToCV hsp70h genine spesifik 463 bp büyüklüğünde bant çoğaltılmıştır. Bu sonuçlar Antalya'nın iki farklı bölgesinden alınan 50 örneğin 25'inin ToCV ile enfekteli olduğunu göstermiştir. Elde edilen bulgular Antalya genelinde kloroz belirtisi gösteren örneklerin ortalama %50'sinin ToCV ile enfekteli olduğunu ortaya koymuştur. Örnek alınan iki bölge ayrı ayrı incelendiğinde Antalya Merkez'den toplanan şüpheli örneklerin enfeksiyon oranı %64 olurken Kumluca'da ise bu oranın %28 olduğu ortaya çıkmıştır.

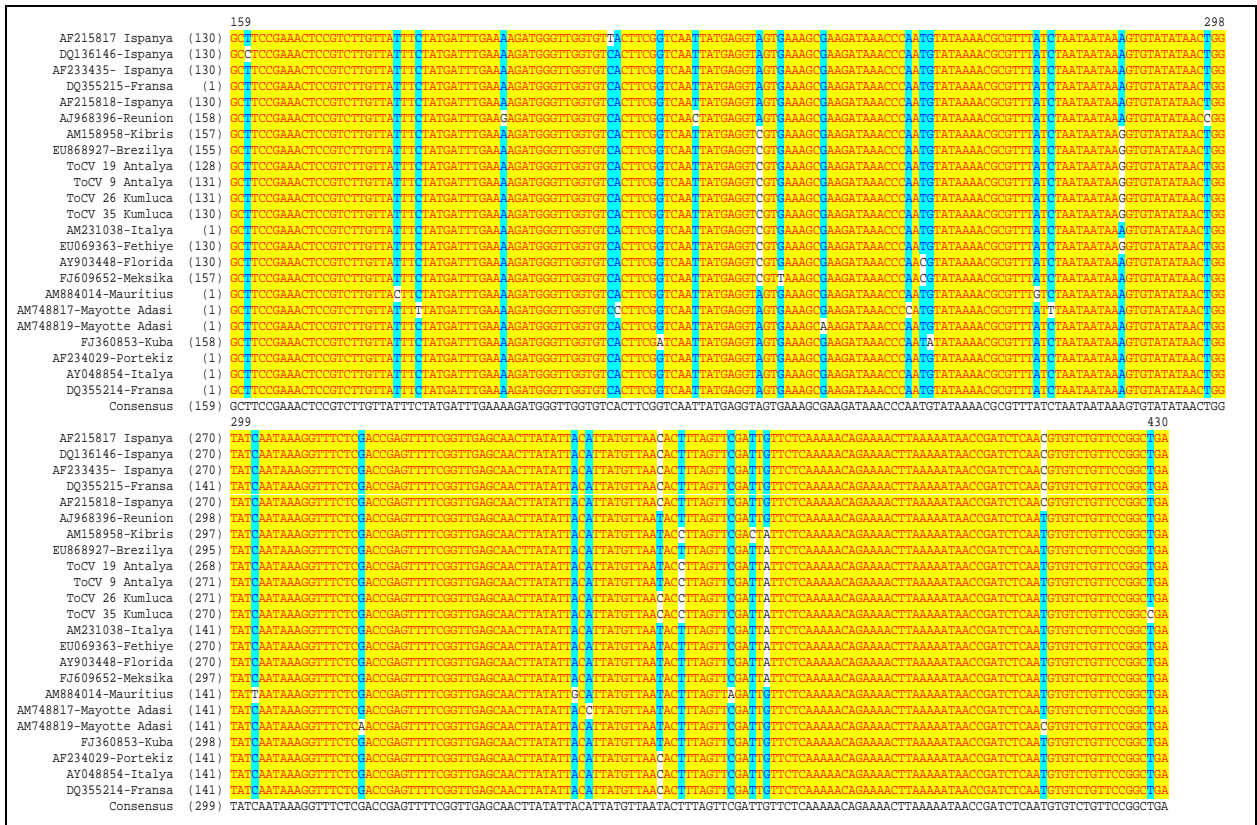


Şekil 1. Antalya domates üretim seralarından toplanan örneklerde ToCV tespiti amacıyla kullanılan nested-RT-PCR sonuçlarını gösteren jel fotoğrafları. M: 100 bp DNA büyüklük markörü + : Pozitif kontrol - :Negatif kontrol

Hsp70h Gen Dizileme ve Dizi Analizleri

Antalya Merkez ve Kumluca'dan elde edilen domates örnekleri içerisinde ToCV enfekteli nested RT-PCR yöntemiyle tespit edilen domates örneklerinin ikişer tanesi seçilerek hsp70h genine at 463 bp kısmı yeniden çoğaltılmıştır. Çoğaltılan hsp70h DNA fragmanı Qiagen PCR pürifikasyon kiti kullanılarak saflaştırılarak doğrudan dizileme yöntemiyle PCR ürünlerinin DNA dizilimi belirlenmiştir. Elde edilen DNA diziler Vector NTI programı kullanılarak temizlenmiş ve birbirleriyle ve dünyanın farklı domates üretim bölgelerinden elde edilen ToCV izolatlarının aynı gen bölgeleriyle karşılaştırılmıştır. Yapılan çoklu dizi karşılaştırmaları sonucunda Antalya ilinden elde edilen ToCV izolatlarının hsp70 h homolog genlerinin %95-99 arasında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Tüm dünya izolatları karşılaştırıldığında da benzer şekilde izolatların hsp70h gen bölgeleri arasındaki benzerliğin %95-100 arasında değiştiği görülmüştür. Antalya izolatları en çok benzerliği %99 oranıyla İtalyan (AM231038) izolatı ile gösterirken, en az benzerliği %95 oranıyla Küba (FJ360853) izolatıyla göstermiştir. ToCV izolatları arasında %5'e varan nükleotid farklılıkları olduğu ve bu farklılıkların 463 bazlık kısmı üzerinde belirli bir yerde yoğunlaşmayıp homojen bir şekilde dağıldığı görülmüştür.

DETECTION AND PARTIAL MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *TOMATO CHLOROSIS VIRUS* ISOLATES FROM TOMATO PRODUCTION GREENHOUSES IN ANTALYA PROVINCE USING HSP70H GENE



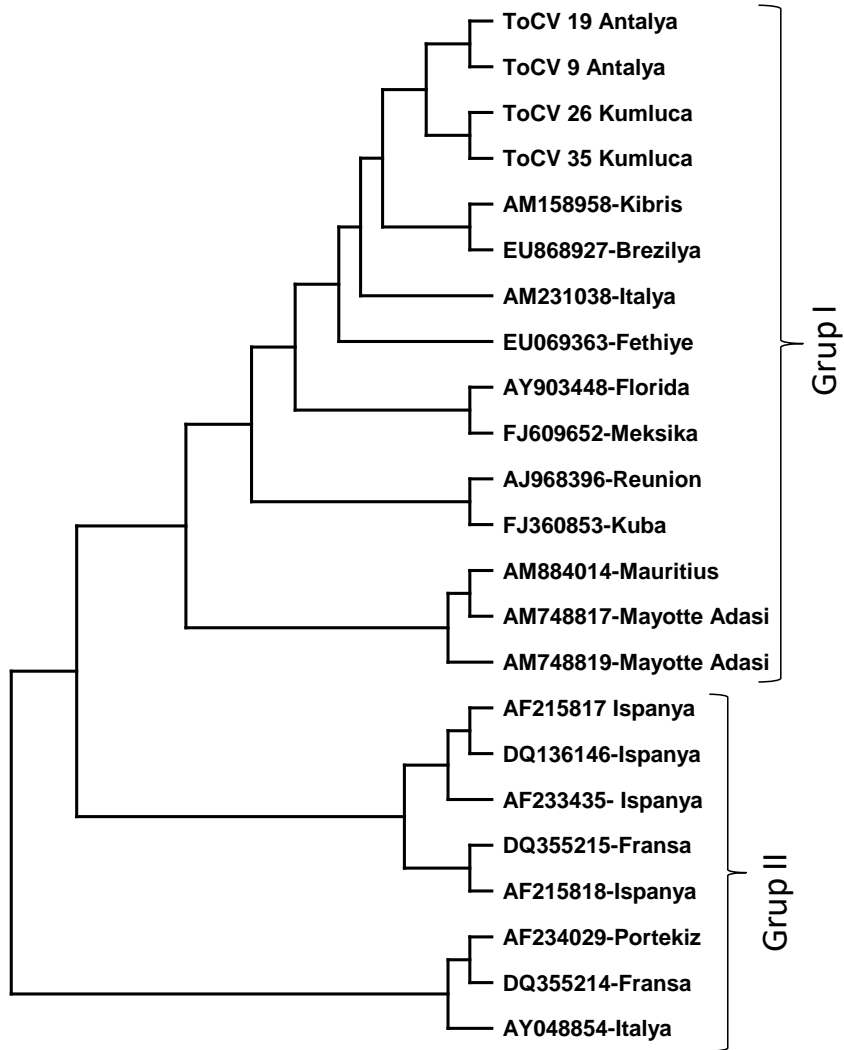
Şekil 2. Antalya ili domates üretim alanlarından elde edilen ToCV izolatlarının hsp 70h geninin dünyanın farklı domates üretim bölgelerinden elde edilen ve Gen bankası veri tabanlarında bulunan ToCV izolatlarının hsp 70h genleriyle karşılaştırılması. Sarı bölgeler aynı mavi ve beyaz bölgeler ise farklı nükleotidleri taşıyan pozisyonları göstermektedir.

Çizelge 1. Antalya ili domates üretim alanlarından elde edilen ToCV izolatlarının hsp70h geninin dünyanın farklı domates üretim bölgelerinden elde edilen ve Gen bankası veri tabanlarında bulunan ToCV izolatlarının hsp70h genleriyle benzerlik oranları

	DQ136146-İspanya	AF233435-İspanya	DQ355215-Fransa	AF215818-İspanya	AJ968396-Reunion	AM158958-58-Kibris	EU868927-Brezilya	ToCV 19 Antalya	ToCV 9 Antalya	ToCV 26 Kumluca	ToCV 35 Kumluca	AM231038-İtalya	EU069363-Fethiye	AY903444-8-Florida	FJ609652-Meksika	AM884014-Mauritius	AM748817-Mayotte Adası	AM748819-Mayotte Adası	FJ360853-Kuba	AF234029-Portekiz	AY048854-4-İtalya	DQ355214-4-Fransa	
AF215817 İspanya	100	100	100	100	98	98	98	96	96	95	96	98	98	98	97	97	97	99	98	99	99	99	
DQ136146-İspanya		100	100	100	98	98	98	96	96	95	96	98	98	98	97	97	97	99	98	99	99	99	
AF233435- İspanya			100	100	98	98	98	96	96	95	96	99	98	98	98	97	97	99	98	99	100	100	
DQ355215-Fransa				100	98	97	98	97	97	96	98	99	98	98	98	97	98	99	98	100	100	100	
AF215818-İspanya					98	98	98	96	96	95	96	99	98	98	97	97	98	99	98	100	100	100	
AJ968396-Reunion						97	98	96	95	94	95	98	97	98	97	96	97	97	98	98	98	98	
AM158958-Kibris							100	98	98	98	97	99	99	99	98	96	96	97	98	98	98	98	
EU868927-Brezilya								99	98	97	97	99	99	99	98	96	97	97	98	98	98	98	
ToCV 19 Antalya									99	98	98	99	98	98	97	96	96	97	96	98	98	98	
ToCV 9 Antalya										97	97	98	97	97	96	95	96	97	95	97	97	97	
ToCV 26 Kumluca											99	97	96	96	95	94	94	95	94	96	96	96	
ToCV 35 Kumluca												99	97	97	96	96	97	95	98	98	98	98	
AM231038-İtalya													100	100	99	97	98	98	98	99	99	99	
EU069363-Fethiye															99	98	97	98	98	99	99	99	
AY903448-Florida																99	97	98	98	99	99	99	
FJ609652-Meksika																	96	97	98	97	98	98	
AM884014-Mauritius																		97	97	97	98	98	
AM748817-Mayotte Adası																			98	97	98	98	
AM748819-Mayotte Adası																				98	98	98	
FJ360853-Kuba																					99	99	
AF234029-Portekiz																						100	100
AY048854-İtalya																							100

Antalya domates üretim alanlarından elde edilen ToCV izolatlarının hsp70h geninin dünyanın farklı domates üretim bölgelerinden elde edilen ve Gen bankası veri tabanlarında bulunan 20 farklı ToCV izolatlarının hsp70h genleriyle yapılan filogenetik analizler sonucunda elde edilen soyağacı Şekil 4'de verilmiştir. Analizler sonucunda

Antalya ToCV izolatlarının birbirleriyle yakın ilişkide olduğu ve aynı kümede yer aldığı belirlenmiştir. Ayrıca Antalya izolatının hsp70h genlerinin daha önce Fethiye'den elde edilen ToCV izolatıyla da yakın filogenetik ilişkiler gösterdiği belirlenmiştir. Filogenetik analizler sonucunda dünyanın farklı domates üretim bölgelerinden elde edilen ve analizi yapılan ToCV izolatlarının hsp70h genlerine göre iki ana gruba ayrıldığı belirlenmiştir. Grup I'de aralarında Türkiye'nin de bulunduğu Florida ABD, Brezilya, Meksika, Küba, İtalya gibi ülkelerden ve Kıbrıs, Reunion, Mayotte ve Mauritius gibi adalardan oluşan dokuz farklı ülkeden 14 ToCV izolatı içerdiği tespit edilmiştir. Grup II ise Güney Avrupa veya Kuzey Akdeniz olarak adlandırılan bölgeden İspanya, Portekiz, İtalya ve Fransa gibi 5 farklı ülkeden 8 ToCV izolatı içermektedir. Analizi yapılan izolatların coğrafik orijinleri ve filogenetik gruplar birlikte değerlendirildiğinde Grup I'in uluslararası izolatlardan Grup 2'nin ise Akdeniz izolatlarından oluştuğu tesbit edilmiştir. Bu sonuçlar ToCV hsp70h geninin 463 bp kısmının izolatların coğrafik orijinlerine göre gruplandığını göstermektedir.



Şekil 3. Antalya ToCV izolatlarının hsp70h genlerinin dünyanın farklı domates üretim belgelerinden elde edilen ve hsp70h gen dizilimi gen bankası veri tabanından alınan diğer ToCV izolatlarıyla karşılaştırılması sonucunda reeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı.

DETECTION AND PARTIAL MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *TOMATO CHLOROSIS VIRUS*
ISOLATES FROM TOMATO PRODUCTION GREENHOUSES IN ANTALYA PROVINCE USING HSP70H GENE

Bu çalışma Antalya Merkez ilçe ve Kumluca ilçesinde yapılmış olup, ülkemizin en önemli domates üretim bölgesinde ToCV varlığı ilk kez tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan dizileme, dizi karşılaştırmaları ve filogenetik analizlerle Antalya Merkez ve Kumluca ilçesinden elde edilen ToCV izolatlarının hsp70h geninden yararlanılarak kısmi moleküler karakterizasyonu da yapılmıştır. Antalya izolatları hsp70h genleri arasındaki genetik farklılıkların dünyanın farklı bölgelerinden izolatların aynı gene bölgeleriyle benzerlik gösterdiği ve yüksek oranda korunduğu tespit edilmiştir. Düşük genetik çeşitliliğin izolatlar üzerinde herhangi bir seleksiyon baskısının olmadığını işaret etmiştir. Farklı domates çeşitlerinin testlenmesi sonucunda örnek alınan ticari çeşit veya hatların çoğunluğunda ToCV belirlenmiştir. Bu sonuçlar ToCV'ye karşı dayanıklı bir ticari çeşit bulunmadığını da göstermiştir. Bu da herhangi bir kültür veya yabancı domates çeşidinde ToCV dayanıklılığının henüz belirlenmemiş olmasıyla uyumlu bir veri olarak ortaya çıkmıştır. Yapılan filogenetik analizler ToCV izolatlarının hsp70h geninin kısmi dizilerine göre izolatların coğrafik orijinleriyle ilişkili olarak iki gruba ayrıldığını göstermiştir. Ancak daha kesin bir gruplandırma ve izolatların genetik ilişkilerinin belirlenmesi için daha farklı coğrafik bölgeden daha fazla izolat ile çalışma yapılmalıdır.

ToCV izolatlarının doğru ve hızlı bir şekilde teşhisi ve moleküler karakterizasyonu virüs epidemiyolojisinin anlaşılması ve virüsün yol açtığı hastalığın mücadelesi bakımından önemlidir. ToCV nin tanımlanmasına yönelik antikor bulunmadığından virüsün teşhisi için ELİSA veya diğer serolojik yöntemle kullanılamamaktadır (Jacquemon et al., 2009). Bu nedenle virüsün tanısı tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de moleküler yöntemlerle yapılmaktadır. Bu yöntemler içerisinde RT-PCR en yaygın kullanılan yöntem olmakla (Segev et al., 2004; Morris et al., 2006; Wintermantel, 2006; Trenado et al., 2007; Wintermantel, 2008; Dalmon et al., 2009; Hirota et al., 2010) birlikte virüs yorgunluğunun düşük olduğu durumlarda daha hassas bir yöntem olan nested (yuvalı) RT-PCR yöntemi de kullanılmaktadır (Wisler et al., 1998a; Louro et al., 2000; Dovas et al., 2002; Papayiannis et al., 2011). Özellikle virüs belirtilerinin veya yoğunluğunun az olduğu durum, dönemlerde, doku ve örneklerde nested RT-PCR kullanımı önerilmektedir. ToCV'nin moleküler tanısında virüs genomunun farklı kısımlarını hedefleyen bir çok RT-PCR yöntemi geliştirilerek kullanılmaktadır (Dovas ve ark. 2002). Bu tanı yöntemlerinde virüsün kılıf protein geni en çok kullanılan hedef olmamasına rağmen, sadece bu virüs familyasına özgü olan ve yüksek oranda korunmuş diziyeye sahip olan Hsp70 geni ToCV ve benzer virüslerin moleküler tanımlanmasında hedef olarak kullanılmaktadır (Louro et al., 2000; Navas-Castillo, 2000; Dovas ve ark. 2002; Papayiannis, 2005; Barbosa et al. 2008).

Diğer virüslerde olduğu gibi ToCV'nin genetik varyasyonunun belirlenmesinde ve filogenetik analizlerde tüm genom veya genom segmanları yanında spesifik genlerin tüm veya kısmi dizileri de kullanılmaktadır. Dünyanın farklı yerlerinde yapılan sınırlı sayıda çalışmada ToCV izolatlarının filogenetik analizleri ve genetik ilişkilerinin belirlenmesinde CP (Gharsallah et al., 2015) hsp70h (Albuquerque et al., 2013) genlerinin tüm veya kısmi dizilerinden yararlanılmaktadır (hsp70h genleriyle daha önce yapılan bir çalışmada ToCV izolatlarının bu çalışmada olduğu gibi coğrafik orijinlerine göre gruplandırıldığı ancak bu çalışmadan farklı olarak izolatların 3 farklı gruba ayrıldığı belirlenmemiştir. Ancak üçüncü grupta sadece Mauritius adasından elde edilen iki ToCV izolatının bulunduğu belirlenmiştir (Albuquerque et al., 2013). Bu sonuçlar genel olarak hsp70h geniyle yapılan filogenetik çalışmalarda ToCV izolatları arasında benzer bir gruplama oluştuğunu ve hsp70h geninin de izolatların genetik ilişkilerinin belirlenmesinde kullanılabileceğini göstermiştir.

LİTERATÜR LİSTESİ

- Albuquerque, L.C., Villanueva, F., Resende, R.O., Navas-Castillo, J., Barbosa, J.C., & Inoue-Nagata, A.K. 2013. Molecular characterization reveals Brazilian Tomato chlorosis virus to be closely related to a Greek isolate. *Tropical Plant Pathology*, 38(4):332-336.
- Arli-Sokmen, M., and Sevik M.A. 2006. Viruses infecting field-grown tomatoes in Samsun province, Turkey. *Archives Phytopathology and Plant Protection* 39(4):283-288.
- Çevik, B. and Erkiş, G. 2008. First Report of Tomato Chlorosis Virus in Turkey. *Plant Pathology* 57(4):767

- Delatte H., Naze F., Cottineau J.S., Lefeuvre P., Hostachy B., Reynaud B. and Lett J.M., 2006. Occurrence of Tomato chlorosis virus in Réunion Island. *Plant Pathology* 55: 289.
- Dovas, C.I., Katis, N.I. and Avgelis, A.V. 2002. Multiplex Detection of Criniviruses Associated With Epidemics of A Yellowing Disease of Tomato in Greece. *Plant Diseases*, 86(12), 1345-1349.
- Erkan, S., Gümüş, M., Türküsay, H., ve Duman, İ. 2001. Sanayi Domates Çeşitlerinin Bazı Viral ve Bakteriyel Hastalık Etmenlerine Karşı Davranışlarının Belirlenmesi. XI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, s:198-204.
- FAOSTAT, 2013. <http://www.fao.org>: 05.12.2016.
- Gharsallah, C., Halima, A. B., Fakhfakh, H., & Gorsane, F. (2015). Insights into the genetic diversity and the phylogenetic analysis of Tunisian isolates of Tomato chlorosis virus. *Phytoparasitica*, 43(1): 87-96.
- Hanssen I. M., Lapidot M. and Thomma B.P. 2010. Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular plant-microbe interactions*, 23(5):539-548.
- Hirota, T, Natsuaki, T, Murai, T, Nishigawa, H, Niibori, K Goto, K., Hartono, S. Suastika, G. and Okuda S. (2010). Yellowing disease of tomato caused by Tomato chlorosis virus newly recognized in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 76:168-171.
- Jacquemond, M. Verdin, E. Dalmon, A. Guilbaud L. and Gognalons P. 2009 Serological and molecular detection of Tomato chlorosis virus and tomato infectious chlorosis virus in tomato, *Plant Pathology* 58 (2): 210–220.
- Kataya, A.R.A., Stavridou, E., Farhan, K. and Livieratos, I.C. 2008. Nucleotide sequence analysis and detection of a Greek isolate of Tomato chlorosis virus. *Plant Pathology*: 57: 819–824.
- Lett, J.M., Hoareau, M., Reynaud, B., Saison, A., Hostachy, B., Lobin, K., and Benimadhu, S.P. 2009. First Report of Tomato chlorosis virus in tomato on Mauritius Island. *Plant Dis.* 9:111.
- Li R, Mock R, Huang Q, Abad J, Hartung J, 2008 A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *Journal of Virological Methods* 154: 48-55.
- Louro, D., Accotto, G.P., Vaira, A.M. 2000. Occurrence and diagnosis of tomato chlorosis virus in Portugal. *European Journal of Plant Pathology*, 106(6):589-592.
- Lozano, G., Moriones, E., Navas-Castillo, J. 2006. Complete nucleotide sequence of the RNA2 of the crinivirus tomato chlorosis virus. *Archives of Virology*, 151(3):581-587.
- Martelli, G.P., Agranovsky, A.A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R.H., Dolja, V.V., Falk, B.W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A.V., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H.J., Wisler, G.C., Yoshikawa, N. 2002. The family Closteroviridae revised, *Archives of Virology* 147:2039–2044.
- Masse, D., Lefeuvre, P., Delatte, H., Abdoul-Karime A.L., Hostachy, B., Reynaud, B. and Lett, J.M. 2008. Tomato chlorosis virus: First report in Mayotte Island. *Plant Pathology*, 57(2). 388.
- Navas-Castillo, J., Camero, R., Bueno, M., Moriones, E. 2000 Severe yellowing outbreaks in tomato in Spain associated with infections of Tomato chlorosis virus. *Plant Diseases*, 84:835–837.
- Papayiannis, L.C., Ioannou, N., Dovas, C.I., Maliogka, V.I., Katis, N.I. 2005. First report of Tomato chlorosis virus (ToCV) on tomato crops in Cyprus. *Plant Pathology* 55: 567.
- Segev, L., Polston, J.E., Lapidot, M. 2004. First report of Tomato chlorosis virus in Israel. *Plant Diseases* 88: 160.
- Smith, K. M. 2012. A textbook of plant virus diseases. Elsevier. 684 pp.
- Tsai, W.S., Shih, S.L., Gren, S.K., Hanson, P., Liu, H.Y. 2004. First report of the occurrence of Tomato chlorosis virus and Tomato infectious chlorosis virus in Taiwan. *Plant Diseases* 88: 311.
- Wintermantel, W. M., Polston, J. E., Escudero, J., Paoli, E.R. 2001. First report of Tomato chlorosis virus in Puerto Rico. *Plant Diseases*: 85, 228.
- Wintermantel, W.M. and Wisler, G.C. 2006. Vector specificity, host range, and genetic diversity of Tomato chlorosis virus. *Plant Diseases*. 90:814-819.

DETECTION AND PARTIAL MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *TOMATO CHLOROSIS VIRUS*
ISOLATES FROM TOMATO PRODUCTION GREENHOUSES IN ANTALYA PROVINCE USING HSP70H GENE

- Wisler, G.C., Li, R.H., Liu, H. Y., Lowry, D. S., Duffus, J.E. 1998. Tomato Chlorosis Virus., A New Whitefly-Transmitted, Phloem-Limited, Bipartite Closterovirus of Tomato The American Phytopathological Society. Vol. 88, No. 5, 402-409.
- Wisler, G.C., Duffus, J.E. 2001. Transmission properties of whitefly-borne criniviruses and their impact on virus epidemiology. In: Harris KF, Smith OP, Duffus JE (eds), Virus-insect-plant interactions. Academic Press, San Diego, pp 293-308.
- Zitter, T.A., Stall, R.E., Jones, J.P., 1997. Diseases caused by viruses. J. B. Jones, eds.) Compendium of Tomato Diseases, APS Pres, Minnesota, USA. pp. 31-42.