

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Volkan BOZDOĞAN

**ANTALYA İLİNDE DOMATES, BİBER VE MARUL YETİŞTİRİLEN
ALANLARDA DOMATES LEKELİ SOLGUNLUK VİRÜSÜ (TOMATO SPOTTED
WILT VIRUS, TSWV) NÜN SAPTANMASI**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA, 2009

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANTALYA İLİNDE DOMATES, BİBER VE MARUL YETİŞTİRİLEN
ALANLARDA DOMATES LEKELİ SOLGUNLUK VİRÜSÜ (TOMATO
SPOTTED WILT VIRUS, TSWV)' NÜN SAPTANMASI**

Volkan BOZDOĞAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**Bu Tez 06/02/2009 Tarihinde Aşağıdaki Juri Üyeleri Tarafından Oybirliği ile
Kabul Edilmiştir.**

İmza.....	İmza.....	İmza.....
Yrd.Doç.Dr.Muharrem A.KAMBEROĞLU	Prof.Dr.Saadettin BALOĞLU	Prof.Dr.Kazım ABAK
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof.Dr.Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu Çalışma Ç.Ü.Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: ZF2007YL62

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANTALYA İLİNDE DOMATES, BİBER VE MARUL YETİŞTİRİLEN ALANLARDA DOMATES LEKELİ SOLGUNLUK VİRÜSÜ (TOMATO SPOTTED WILT VIRUS, TSWV)' NÜN SAPTANMASI

Volkan BOZDOĞAN

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Muharrem Arap KAMBEROĞLU
Yıl: 2009, Sayfa:65

Jüri: Yrd.Doç. Dr. Muharrem Arap KAMBEROĞLU
Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU
Prof. Dr. Kazım ABAK

Bu çalışma, Antalya ili Merkez (Aksu, Kurşunlu, Çamköy, Altınova), Serik (Merkez, Çakallık) ve Kumluca (Merkez, Mavikent, Beykonak) ilçelerinde yetiştirilen domates, biber ve marul alanlarında Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (Tomato Spotted Wilt Virus, TSWV)'nün saptanması ve yaygınlığının ortaya koyulması amacıyla 2007 ile 2009 yılları arasında yürütülmüştür.

Arazide şüpheli domates, biber ve marul bitkilerden alınan örnekler, öncelikle ELISA yöntemi ile testlenmiş ve hastalık oranı toplanan örneklerde % 88.25 olarak hesaplanmıştır.

ELISA testi sonucunda TSWV ile bulaşık olduğu belirlenen örneklerden üç tanesi, A1 (marul), S1 (domates) ve K1 (biber) izolatları şeklinde kodlanarak mekanik inokulasyon ve RT- PCR çalışmalarında kullanılmıştır. A1 izolatı, indikatör bitkiler üzerinde 7-10 gün sonra simptom oluştururken, S1 ve K1 izolatları 20-24 gün sonra simptom çıkışına sebep olmuştur. Çalışmada, A1 izolatının daha yüksek patojeniteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

RT- PCR işlemi sonunda, L1TSWVR- L2TSWVF primer çifti ile 276 bp ve BR035- PDH006 primer çifti ile 514 bp' lik bandlar %1.5' lik agaroz jel elektroforezde gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: TSWV, ELISA, Survey, Mekanik İnokulasyon, RT- PCR

ABSTRACT

MSc THESIS

DETECTION OF TOMATO SPOTTED WILT VIRUS (TSWV) IN TOMATO, PEPPER AND LETTUCE IN ANTALYA PROVINCES, TURKEY

Volkan Bozdoğan

**UNIVERSITY OF CUKUROVA
INSTITUTE OF BASIC AND APPLIED SCIENCE
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION**

Supervisor: Asst. Prof. Muharrem Arap KAMBEROGLU
Year: 2009, Pages: 65

Jury: Asst. Prof. Muharrem Arap KAMBEROGLU
Prof. Dr. Saadettin BALOGLU
Prof. Dr. Kazım ABAK

This study was conducted in order to detect TSWV and determine its incidence in tomato, pepper and lettuce growing greenhouses in Antalya center (Aksu, Kurşunlu, Çamköy, Altınova), Serik (Center, Çakallık) and Kumluca (Center, Mavikent, Beykonak) provinces between 2007 and 2009 by serological and molecular methods.

The collected samples were firstly tested with ELISA and infection ratio was determined as 88.25%.

Three TSWV positive sample were coded as A1, S1 and K1 and used for mechanical inoculation and RT- PCR. The symptom expression was observed on A1 isolate inoculated indicator plants in 7-10 days after the sap inoculation whereas it was observed in 20-24 days with S1 and K1 isolates. It also seemed that A1 isolate was symptomatologically more aggressive than other isolates.

TSWV was amplified by RT-PCR with virus specific primers L1TSWVR and L2TSWVF and BR035 and PDH006 from total RNA confirmed the presence of TSWV in symptomatic plants. The expected amplicon sizes of 276 and 514 bp were observed after electrophoresis of PCR products in 1% agarose gel respectively.

Key Words: TSWV, ELISA, Survey, Mechanical Inoculation, RT- PCR

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren danışman hocam sayın Yard. Doç. Dr. Muharrem Arap KAMBEROĞLU'na ve katkılarından dolayı sayın Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU'na teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında büyük bir özveri ile bana yardımcı ve destek olan Zir. Yük. Müh. A. Filiz ÇALIŞKAN ve Zir. Yük. Müh. Bilge KÜÇÜK (ALAN)'e, laboratuvar çalışmalarımındaki yardımlarından dolayı Zir. Yük. Müh. Ela KÖSE'ye teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans çalışmalarım sırasında da maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen ve beni destekleyen ailemin tüm fertlerine teşekkür ederim.

Bunlara ek olarak projenin yürütülmesinde çalışmalarına maddi olanak sağlayan Ç. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
3. MATERYAL VE METOD	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Survey Alanı ve Çalışma Materyali Hakkında Bilgiler	23
3.1.2. Mekanik inokulasyon Çalışmalarında Kullanılan Materyal	24
3.1.3. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Materyal	25
3.1.4. Total RNA Ekstraksiyonu Çalışmalarında Kullanılan Materyal	25
3.1.5. RT-PCR Çalışmalarında Kullanılan Materyal	25
3.1.6. Agarose Gel Elektforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal	26
3.2. Metod	27
3.2.1. Bitki Örneklerinin Toplanması ve Muhafazası	27
3.2.2. İndikatör Bitkilerin Yetiştirilmesi	27
3.2.3. Mekanik İnokulasyon Yöntemi	28
3.2.4. Serolojik Çalışmalar	29
3.2.4.1. DAS-ELISA Testi	29
3.2.5. Total RNA Ekstraksiyonu	30
3.2.6. RT-PCR Çalışmaları	32
3.2.6.1. Amplifikasyon Sırasında Kullanılan Primerlerin Optimum Konsantrasyonlarının Ayarlanması	34

3.2.7. Agarose Gel Elektroforez Çalışmaları	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	36
4.1. Survey Çalışmaları.....	36
4.2. ELISA Testleri.....	40
4.3. Mekanik İnokulasyon Çalışmaları.....	47
4.4. Total RNA Ekstraksiyon Çalışmaları	50
4.5. RT-PCR Çalışmaları	50
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	52
KAYNAKLAR.....	55
ÖZ GEÇMİŞ	62
EKLER.....	63

SİMGELER ve KISALTMALAR

cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik asit
dATP	Deoksiadenozintrifosfat
ddH ₂ O	Double distile su
dGTP	Deoksiguanozintrifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Deoksitimidintrifosfat
ELISA	Enzim-Linked Immuno Sorbent Assay
gr	Gram
lt	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MW	Moleküler ağırlık
µl	Mikrolitre
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PVX	Potato Virus X
RNA	Ribonükleik asit
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
RT	Reverse Transcriptase
RT- PCR	Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction
ss	Tek iplikçikli
TAE	Elektroforez buffer
Taq	Termo stabil polimeraz enzimi
Tm	Termal melting
W/V	Ağırlık/Hacim

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. Survey yapılan ilçeler, sera alanları, testlenen bitki türü ve sayısı....	23
Çizelge 3.2. Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan test bitkileri.....	24
Çizelge 3.3. Çalışmada Kullanılan Primer Çiftleri Sentezlenen Bölgenin Moleküler Büyüklüğü.....	26
Çizelge 4.1(a). Antalya ili Merkez’ de survey ve örnekleme alanları, seranın alanı, toplam bitki sayısı, kontrol edilen bitki sayısı, şüpheli bitki sayısı, testlenen ve infekteli bulunan bitki sayıları ile test edilen bitkilerde hastalık oranları.....	41
Çizelge 4.1.(b) Antalya ili Merkez’ de survey yapılan domates, biber ve marul Alanlarından elde edilen toplam veriler.....	42
Çizelge 4.2.(a) Antalya ili Serik ilçesinde survey ve örnekleme alanları, seranın alanı, toplam bitki sayısı, kontrol edilen bitki sayısı, şüpheli bitki sayısı, testlenen ve infekteli bulunan bitki sayıları ile test edilen bitkilerde hastalık oranları.....	43
Çizelge 4.2.(b) Antalya ili Serik ilçesinde survey yapılan domates ve biber alanlarından elde edilen toplam veriler.....	44
Çizelge 4.3.(a) Antalya ili Kumluca ilçesinde survey ve örnekleme alanları, Seranın alanı, toplam bitki sayısı, kontrol edilen bitki sayısı, şüpheli bitki sayısı, testlenen ve infekteli bulunan bitki sayıları ile test edilen bitkilerde hastalık oranları.....	45
Çizelge 4.3.(b) Antalya ili Kumluca ilçesinde survey yapılan domates ve biber alanlarından elde edilen toplam veriler.....	46
Çizelge 4.4. Farklı TSWV izolatları ile Yapılan Mekanik İnokulasyon Çalışmalarında Test Bitkileri Üzerinde Gözlenen Simptomlar.....	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 4.1. Domates bitkisi yapraklarında klorotik ve nekrotik lekeler	37
Şekil 4.2. Domates meyvesinde halkalı lekeler ve deformasyon	37
Şekil 4.3. Biber bitkisi yapraklarında sararma ve aşağı doğru kıvrılma	38
Şekil 4.4. Biber bitkisi meyvelerinde halkalı lekeler.....	38
Şekil 4.5. Biber yapraklarında sararma ve halkalı lekeler	39
Şekil 4.6. Marul yaprakları üzerinde nekrotik alanlar ve deformasyon	39
Şekil 4.7. TSWV infekteli marulda gelişme geriliği ve sararma (soldaki sağlıklı; sağdaki infekteli).....	40
Şekil 4.8. <i>N. rustica</i> ‘da deformasyon ve halkalı lekeler	49
Şekil 4.9. <i>N. tabacum</i> “Samsun” da klorotik ve nekrotik lekeler.....	49
Şekil 4.10. <i>N. tabacum</i> “Xanthii” de kloroz ve deformasyon.....	49
Şekil 4.11. <i>Nicotiana glutinosa</i> ’ da kloroz ve geriye ölüm	49
Şekil 4.12. <i>N. tabacum</i> “Xanthii nc” de halkalı lekeler	49
Şekil 4.13. Biber bitkisinde halkalı lekeler.....	49
Şekil 4.14. TSWV izolatlarının agaroz jeldeki total RNA bandları.....	50
Şekil 4.15. 1 ve 2 nolu primer çiftleri ile yapılan RT-PCR sonuçları 1. A1; 2.S1; 3. K1; 4. Marker; 5. A1; 6. S1; 7. K1 izolatı.....	51

1. GİRİŞ

İnsanoğlunun temel besin unsurlarından birini oluşturan ve geniş bir tür ve çeşit yelpazesine sahip olan sebzeler, dünyanın hemen hemen bütün ülkelerinde yoğun olarak üretilmektedir. Ağırlıklı tüketim miktarı göz önünde bulundurulduğunda ülkemizde meyvesi yenilen sebzeler içerisinde domates ve biber, yaprağı yenen sebzeler içerisinde ise, marul ilk sıralarda yer almaktadır.

2004 yılı verilerine göre, Türkiye’ de toplam 805 237 ha alan sebze üretimi için kullanılmış ve 23 215 577 ton ürün elde edilmiştir. Bunun 9 440 000 tonunu domates, 1 700 000 tonunu biber (710 000 ton sivri, 615 000 ton salçalık ve 375 000 ton dolmalık) ve 377 000 tonunu marul (200 000 ton göbekli, 162 000 ton kıvırcık ve 15 000 ton aysberg) üretimi oluşturmuştur. Antalya ilinde ise, 40 121 ha’ lık alanda sebze üretimi yapılmış ve toplam 3 059 136 ton ürün yetiştirilmiştir. Bu üretimin 1 693 197 tonunu domates, 181 307 tonunu biber, (36 679 ton dolmalık biber ve 144 028 ton sivri biber, 600 ton salçalık) ve 18 287 tonunu marul (7 801 ton kıvırcık marul, 6 470 ton göbekli marul ve 4 016 ton Aysberg) oluşturmuştur. Türkiye toplam domates, biber ve marul üretimlerinin sırasıyla %18, %11 ve %5’ i, Antalya ilinden elde edilmektedir (Anonymous, 2004).

Açık tarla ve örtü altı yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı alanlarda, fide döneminden hasata kadar geçen gelişme döneminde çok sayıda bakteriyel, fungal ve viral kökenli hastalık etmeni, domates, biber ve marul bitkilerinde çok ciddi kayıplara neden olmaktadır. Bu hastalık etmenleri, bitkilerin yapraklarında, gövde veya meyveleri üzerinde halkalı lekeler, klorotik ve nekrotik alanlar, mozayik, sararma, damar bantlaşması, küçülme, deformasyon, yağ lekesi görünümlü alanlar, öz boşalması, çürüklük ve genel olarak bitki boyunda kısalma, gibi belirtilere neden olmaktadır.

Bu patojenler arasında viral etmenler, bitkiden bitkiye vektör böceklerle taşınabilmeleri, çok kısa bir sürede geniş alanlara yayılabilmeleri, mekanik olarak bulaşabilmeleri ve özellikle direkt bir kimyasal mücadele yönteminin bulunmaması nedenleri ile ayrı bir öneme sahiptir. Virüsün saptanması, tanınması, özelliklerinin

ortaya konularak taşınma yollarının belirlenmesi, bu viral etmenlere karşı yapılacak mücedele yöntemlerinin ve uygulamaların esasını oluşturmaktadır.

Domates, biber ve marul üzerinde zararlı çok sayıda virüs bulunmaktadır. Hıyar mozayik virüsü (CMV), yonca mozayik virüsü (AMV), domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV), tütün mozayik virüsü (TMV), domates mozayik virüsü (ToMV), patates Y virüsü (PVY), tütün etch virüsü (TEV), şekerpancarı tepe kıvrıcıklık virüsü (BCTV), pepper mild mottle virüsü (PMMV), marul iri damar virüsü (LBVV) ve marul mozayik virüsü (LMV)' nin varlığı dünyada ve ülkemizde sebzeciliğin yoğun yapıldığı alanlardan rapor edilmiştir (Jones ve ark, 1993; Arlı Sökmen ve ark, 2005).

Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV), domates, biber ve marul bitkilerine zarar veren en önemli virüslerden bir tanesidir. TSWV, aralarında patlıcan, karpuz, bezelye, bakla, yerfıstığı ve patates gibi kültür bitkileri yanında, birçok süs bitkisi ve yabancı otların da dahil olduğu 50' den fazla bitki familyasından 650 farklı bitki türünün bulunduğu çok geniş bir konukçu dizisine sahiptir (Goldback ve Peters, 1994).

TSWV, Bunyaviridae familyasına dahil olup, bitkilerde en yıkıcı zararlara sebep olan ilk on virüs içerisinde yer alan Tospovirüs cinsine aittir (German ve ark, 1992; Gnayem, 1995). TSWV, serolojik özelliklerine ve nükleotid dizisine göre, TSWV (type species), İmpatiens necrotik spot virüs (INSV), Tomato chlorotic spot virüs (TCSV), Groundnut ringspot virüs (GRSV), İris yellow spot (İYSV) ve Watermelon silver mottle virüs (WMSMV) olarak altı türe ayrılmıştır (Mumford ve ark, 1996).

TSWV patikülleri izometrik yapıdadır. Genişliği 85 nm diameter olan vironlar, % 5 nükleik asit, % 70 protein, % 20 lipid ve % 5 karbonhidrat içermektedir. Genom yapıları tek iplikli lineer RNA' dan meydana gelmiş olup, en büyük genom parçası 8.897 kb (L-RNA)' dir. Diğer parçaları 5.4 kb (M-RNA) ve 2.916 kb (S-RNA)'dır. Temel bileşiminde % 16.2 G, % 31.6 A, % 19.3 C, % 32.9 U bazları bulunmaktadır.

TSWV, Tysanoptera takımından *Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*, *T. setosus*, *T. parvi*, *Frankliniella occidentalis*, *F. shultzei*, *F. fusca* ve *Scirtothrips*

dorsalis thrips ile persistent olarak taşınmaktadır (Cho ve ark (1987; Eckel ve ark, 1996; German ve ark, 1992). *F. occidentalis* (Western Flower Thrips, WFT), TSWV' nin en önemli vektörü olarak bildirilmiştir (Ullman ve ark, 1992). Thripsler, virüsü larva döneminde 15 dakika beslenerek bünyesine alabilmekte ve yaklaşık 4- 18 gün sonra sağlıklı bitkiye taşımaktadır.

TSWV thripslerle taşınmanın yanı sıra mekanik inokulasyon yöntemi ile de taşınabilmektedir. TSWV ile mekanik inokulasyondan 2- 4 hafta sonra bitkilerde virüsün tipik simptomları gözlenmeye başlanabilmektedir (Korbin, 2005).

TSWV, infeksiyon zamanı ve çevre koşullarına bağlı olarak değişmekle beraber, genel olarak, bulaşık bitkilerde gelişme geriliği, cüceleşme, solgunluk, yapraklarda ve meyveler üzerinde halkalı lekeler, nekrotik ve klorotik lezyonlar, deformasyon ve genç sürgünlerde geriye doğru ölüm şeklinde simptomlara neden olmaktadır (Güldür ve ark, 1995; Turhan ve Korkmaz, 2006; Holguin-Pena ve ark, 2007).

TSWV infeksiyonu, bitkilerde kalite ve kantiteyi olumsuz yönde etkilemekte olup, erken, orta ve geç sezonlardaki infeksiyonlar arasında verim düşüşü farklılık göstermektedir Erken dönemlerde bulaşma gerçekleştiğinde bitki başına daha az meyve alındığı bildirilmektedir (Gitaitis ve ark, 1998; Wangai ve ark, 2001; Farooq ve ark, 2007a). Yudin ve Mitchell (1990), yaptıkları çalışmada marullarda erken dönemde kullanılan mücadele yöntemlerinin TSWV infeksiyonunu olumsuz etkilediği ve hastalık potansiyelini düşürdüğü sonucunu gözlemlemiştir.

TSWV, *Cucumis sativus*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana clevelandii*, *N. tabacum* *N. glutinosa*, *N. rustica* ve *Petunia hybrida* gibi indikatör bitkiler üzerinde mekanik inokulasyon yöntemi ile taşınabilmektedir. Önceki çalışmalarda TSWV' nin taşınması amacıyla tercih edilen bu yöntemle ilaveten, daha sonra TSWV' ye spesifik antiserumların üretilmesi ile ELISA tekniği ve en son olarak da PCR ve hibridizasyon teknikleri yoğun bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Mumford ve ark, 1994).

Yapılan bu tez çalışmasında, thripsler aracılığıyla daha uzak alanlara kolayca yayılabilen ve özellikle son yıllarda büyük ekonomik kayıplara yol açarak önemi gün geçtikçe artan Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV)' nin, Antalya ilinde

yetiştirilen domates, biber ve marul bitikleri üzerinde ELISA testi kullanılarak saptanması ve yaygınlığının belirlenmesi, biyolojik ve moleküler yöntemler (RT-PCR) kullanılarak özelliklerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Ayrıca, bu çalışmanın, yürütüldüğü Antalya ilinde bu konuda yapılacak olan çalışmalara bir basamak oluşturması ve literatür açığının kapatılması da hedeflenmiştir.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Domates lekeli solgunluk virüsü (Tomato spotted wilt virüs, TSWV) ilk olarak 1915 yılında Avusturalya’ da domates bitkisi üzerinde Brittlebank tarafından rapor edilmiştir. 1930 yılında da viral orjinli olduğu bulunmuştur (Samuel ve ark, 1930). Son yıllarda çok sık görülmeye başlayan ve büyük ekonomik kayıplara neden olan bu virüsün Kuzey ve Güney Amerika (ABD, Brezilya), Avrupa ve Asya kıtalarında yayıldığı bildirilmiştir (Adkins ve ark, 2005).

TSWV’ nin birçok ülkede farklı bitkiler üzerinde bulunduğu bildirilmiştir. Goldbach ve Peters, (1994), TSWV’ nin çok geniş konukçu dizisine sahip bir virüs olduğunu ve 50’ den fazla botanik familyadan 650 farklı bitki türünde hastalık yaptığını rapor etmişlerdir.

TSWV’ nin Thysanoptera takımından thrips vektörleri ile taşınmasının, geniş bir alana yayılması üzerine etkili olduğu, bu virüs hastalığının önemini daha da arttırıcı ve bu nedenlerden dolayı birçok ülkede kültür bitkileri, süs bitkileri ve yabancı otların yetiştirilmesinin TSWV tarafından kısıtlandığı bildirilmiştir.

TSWV, İran’ da ilk olarak 1999- 2000 yılında TSWV’ ye spesifik polyclonal antibody (As- 0526 ve As- 0580, DSM2, Braunschweig, Germany) kullanılarak Double Antibody Sandwich Enzyme–Linked Immunosorbent Assay (DAS- ELISA) yöntemi ile ortaya çıkarılmıştır. Sonuçta İran’ ın beş ilinde, soya bitkisinde TSWV’ nin ortaya çıkma oranı % 5.4 olarak bulunmuştur. Ayrıca TSWV, İran’ da patates ve domates bitkisinde de rapor edilmiştir (Golnaraghi, 2001; Pourrahim ve ark., 2001).

TSWV’ nin en önemli vektörü bölgelere göre değişmekle birlikte, Western Flower Thrips (*Frankniella occidentalis*) olarak bildirilmiştir (Ullman ve ark., 1992). Bu vektör ilk kez 1991 yılında İsrail’ de çok geniş bir konukçu dizisinde gözlenmiş ve TSWV 1992 yılında bir fidanlıkta *Chrysanthemum* bitkisinde ortaya çıkarılmıştır (Gnayem, 1995).

TSWV, 1998 yılında Georgia’ da yerfıstığı, domates, biber ve tütünün üretimini sınırlayan en önemli hastalık olarak kaydedilmiştir. TSWV, Western Flower Thrips (*Frankniella occidentalis* Hinds) ve Tabacco thrips (*Frankniella fusca*

Pergve) ile taşınmaktadır. Bu virüsten dolayı Georgia’ da meydana gelen zarar miktarı 100 milyon dolar olarak bildirilmiştir (Jain ve ark, 1998).

Güney Amerika’ da ise, ilk olarak 1999 yılında *Melampodium divaricatum* bitkisinde ortaya çıkarılmıştır. İnfekteli bitkilerden *Melampodium divaricatum* fidelerine ve *Nicotiana bentamiana* bitkisine mekanik inokulasyon yapılması sonucunda *Melampodium* bitkisinde 48– 56 gün sonra tipik mozaik belirtiler gözlenmiş, *Nicotiana* bitkisinde ise şiddetli klorozlar, mozaik ve solgunluk belirtilerinden 14 gün sonra ölüm meydana gelmiştir. Bu çalışma sonucunda *Melampodium* bitkisinde, TSWV’ nin varlığı ELISA (Agdia, Elkhart, IN) ile desteklenmiştir (Holcomp ve ark, 2000).

Arjantin’ de, Lisionthus bitkisinin (*Eustoma grveiflora* Raf. Shin) yapraklarında az miktarda benek ve açık kahverengi lekeler ve gelişme geriliği belirtileri görülmesi sonucunda, mekanik inokulasyon ve ELISA testi uygulamaları ile TSWV’ nin Lisionthus bitkisinde varlığı ilk olarak rapor edilmiştir (Wolcan ve ark, 1996)

TSWV, Güney Afrika’ da ilk olarak 2000 yılında popüler bir bitki olan *Agapanthus* (*Agapanthus praecox subsp. orientalis*) bitkisi üzerinde rapor edilmiştir. Bitkinin yapraklarında konsantrik halka ile düzensiz klorotik lekeler ve çizgiler, çizgi desenleri gözlenmiştir. Bu belirtilmeli yapraklardan alınan örneklere ELISA testi uygulaması ve belirtilmeli bitkilerden TSWV’ nin nükleo kapsid protein genine spesifik primerler ile PCR yapılması sonucunda TSWV’nin enfeksiyonu doğrulanmıştır. Görülen band 800 bp büyüklüğündedir (Jain ve ark, 1998). Böylece, bu virüs, *Amaryllidaceae* familyasından bir türde ilk olarak rapor edilmiştir.

Bu çalışmalardan farklı olarak Georgia’ da ilk olarak TSWV’ nin karpuz bitkisinde doğal enfeksiyonu rapor edilmiştir. Tütün tarlasında kendiliğinden yetişen karpuz bitkisi yapraklarında necrotic lekeli halka ve damar nekrozları gözlenmiş ve ELISA (Agdia, Elkhart, IN) ile test edilmiştir. TSWV’ nin nükleokapsid genine spesifik primerlerden RT- PCR yapılmış ve TSWV’ nin karpuz bitkisinde varlığının teşhis edildiği bildirilmiştir (Pappu ve ark, 1998).

Kuzey Florida’ da, TSWV 2000 yılında Habanero (*Capsicum chinense*) ve Tabasco (*Capsicum frutescens*) biberlerinde çeşitli belirtiler görülmesi sonucunda

Double Antibody Sandwich Enzyme- Linked Immuno Sorbent Assay (DAS-ELISA), (Agdia, Elkhart, IN) yöntemi ile TSWV' nin varlığı tespit edilmiştir. ELISA testi ile Habanero biberinde oran 1,57- 1,59 Tabasco biberinde ise bu oran 0,97- 0,80 olarak kaydedilmiştir. Bu testte kontrol oranı ise 0,001 değerinde bulunmuştur. Ayrıca İmmuno Capture Reverse Transcription – polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) uygulamasında PCR ürünü genişliği 800 bp olarak bulunmuştur. Bu uygulamada kullanılan primerler 5' ATGTCTAAGGTTAAGCTC 3' ve 5' TTAAGCAAGTTCTGTGAG 3' dir. Bu çalışma sonucunda Florida' da TSWV ilk olarak rapor edilmiştir (Momol, 2000).

Dünyada TSWV' nin en az 8 thrips türü ile taşınmakta olduğu bildirilmiştir (Cho ve ark, 1987). Kuzey Carolina' da bu virüsün birinci vektörü, tütün thrips (Frankliniella fusca (Hinds)) olarak bildirilirken, F. occidentalis' te lokal olarak önem taşıyan bir thrips olarak kaydedilmiştir (Eckel ve ark, 1996).

Kuzey Carolina' da yapılan bir çalışmada, iki ürünsüz sezon altı tarlada geneli 28 (çok yıllık, iki yıllık ve tek yıllık) tür bitki kullanılmış, bu bitkilerden Sonchus asper, Stelleria media, Taraxacum officinale bitkileri, henüz ergin olmamış TSWV vektöründen en fazla etkilenen populasyon olarak bildirilmiştir. (Groves ve ark, 2002). Bu çalışmada Tütün thrips (F. fusca) en çok görülen TSWV vektörü olarak kaydedilmiştir. Bu yabani bitkilerden çok yıllıklar (Plantago rugelii, Taraxacum officinale) sadece lokal olarak görülürken bir çok tek yıllık yabani bitki (Cerastium vulgatum, Sonchus asper ve Stelleria media) daha geniş alana yayıldığı belirtilmiştir. 1997– 2000' de rastgele yapılan oniki surveyden onbirinde (% 91.7) 18 bitki familyasından 72 (çok yıllık, iki yıllık ve tek yıllık) bitkiden 35' inde (% 49) DAS– ELISA ile infeksiyon ortaya çıkarıldığı rapor edilmiştir. İnfeksiyon oranı en yüksek olan bitkiler Taraxacum officinale (% 5.8), Sonchus asper (% 5.1), Cerastium vulgatum (% 4.2) olarak kaydedilmiştir. Ayrıca TSWV ile infekteli 9 yeni konukçu bitki ortaya çıkarıldığı bildirilmiştir (Cardamine hirsuta, Eupatorium capillifolium, Geranium carolinianum, Gnaphalium purpureum, Linaria canadense, Molluga veritillata, Pyrrhapappus carolinianus, Raphanus raphanistrum ve Triodanis perfoliata).

Güney Amerika’ da 1990 yılında yapılan çalışmada diğer konukçulara ilaveten, yerfıstığının da (*Arachis hypogea* L.), TSWV ile şiddetli olarak infektelendiği bildirilmiştir. İnfekteli bitkilerde TSWV’ nin yaprak simptomları olarak klorotik benekler, klorotik çizgiler, mozaik, halkalı lekeler, konsantrik halkalar, nekrotik benekler ve sararma ile birlikte, erken dönemde büyüme geriliği ve sonuçta ciddi büyüme kayıpları meydana getirmekte olduğu rapor edilmiştir (Hagan ve ark, 1990). TSWV, thripslerle persistent olarak taşınmaktadır (German ve ark., 1992). Georgia’ da TSWV epidemisi ile en önemli vektör birlikteliği WFT (*F. occidentalis*) ve tütün thrips (*F. fusca*)’ i olarak bildirilmiştir (Todd ve ark, 1995; Mandal ve ark, 2001)

TSWV üç RNA segmenti içermektedir. Küçük RNA (SRNA), orta RNA (MRNA) ve büyük RNA (LRNA)’ dır. SRNA ve MRNA’ nın genom organizasyonu ambisense iken, LRNA’ nın genom organizasyonu negatif kutupludur. TSWV’ nin ve diğer tospovirüslerin biyolojik ve moleküler görünüşleri gözden geçirildiği bildirilmiştir (Goldbackh ve Peters, 1994; Mumford ve ark, 1996). TSWV ve diğer tospovirüslerin tütünde RT- PCR yöntemi ile ortaya çıkarıldığı rapor edilmiştir. Nükleokapsid protein (NP) gen veya LRNA’ dan spesifik primerler üretilmiş veya dejenere olmuş primerler kullanıldığı belirtilmiştir. Viral genomun genişletilmiş kısımları ile bir serogrubun tospo virüs türünün ortaya çıkarılması veya farklı serogruplar için bu başlangıçlar artık mümkün olduğu bildirilmiştir (Mumford ve ark, 1996).

Bu raporların çoğu TSWV ile infekteli tütün gibi bitki dokularından TSWV’ yi saflaştırmak ve RT- PCR’ ın kullanılabilirliği ve yararını kanıtlamak için faydalıdır. Tütün gibi konukçu bitki dokularından TSWV genomunun amplifikasyonu mümkün iken, yerfıstığı dokusundan aynı işlemin yapılması kolay olmamaktadır. Yerfıstığında TSWV’ nin saflaştırılması ve amplifikasyonu için RT- PCR’ ın uygulanması ve sonraki moleküler çalışmalarda organik çözücüler kullanılarak birkaç adım içeren ekstraksiyon prosedürlerinin uygulanması ile zorluklar engellenmiştir. Bu adımlara, yerfıstığı dokusunda bulunan ve güçlü inhibitör etkisi gösteren polyfenol bileşiklerin üstesinden gelmek için ihtiyaç duyulmuştur. Yapılan çalışmada, IC- RT- PCR ile optimize edilmiş ve teknik

sınırlamaların üstesinden gelinerek yerfıstığında TSWV' nin tanısında kullanılmıştır. Ayrıca bu yöntemin diğer virüslerin saptanmasında kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Jain ve ark, 1998).

TSWV, RT- PCR, ELİSA (Cho ve ark, 1989) ve TBİA ile (Hsu ve ark, 1991) ortaya çıkarılabilmektedir. Yetiştiriciler için geliştirilmiş ELİSA kiti hazır bulunmaktadır. Bu methodların hepsi güvenilirken, en önemlilerinden biri olan RT-PCR benzeri metodlar, dormant doku vb. veya odunsu ile zor olabilen doku hazırlama özel imkan ve donanım gerektirmektedir. TBİA' nın geliştirilmesindeki amaç dormant dokular ve odunsu dokularla çalışılarak erken teşhis ve indekslemenin kullanımı ile daha kolay vektör mücadelesi yapabilmektir. TBİA' nın birçok avantajı bulunmaktadır. DAS- ELİSA' da ihtiyacımız olandan daha az antibody ve örnek preperasyonuna ihtiyaç duyulur ve bu format üründe kullanım için potansiyele sahiptir. Sütrüktürel olmayan (NSs) protein enkodlu TSWV' nin SRNA' sı infekteli bitkide ve thripsin hücrelerinde bol bulunduğu ve infekteli hücreler içinde bol paracrystalline içeren formu olduğu rapor edilmiştir (Kormelink ve ark, 1991). Bu araştırma sonucunda; yeşil yapraklı bitkilerde yumru ve soğanda TSWV' nin NSs' nu ortaya çıkarmak için TBİA' nın geliştirildiği, DAS- ELİSA ile güvenilirliği karşılaştırıldığı ve işaretlemeyen sonra TBİA ile ortaya çıkarılacak NSs protein uzunluğu belirlendiği bildirilmiştir.

TSWV' nin neden olduğu lekeli solgunluk hastalığının, 1986 yılında Georgia da ilk flue-cured tütün (*Nicotiana tabacum*) üzerinde teşhis edildiği bildirilmiştir. 1988' de tütün üretimi yapılan 48 şehirden 28' inde ürünlerin TSWV ile infekteli olduğu gözlenmiş, fakat hastalık etmeninin ortaya çıkma oranı % 1' den düşük olarak bildirilmiştir. 1989' da ise, Georgia' da tütün üretimi yapılan bütün alanlarda lekeli solgunluk gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu alanlarda yapılan incelemeler sonucunda simptom gösteren bitkilerde hastalığın ortaya çıkma oranı % 5- 7' den az olmasına rağmen bazı tütün bitkilerinde etmenin ortaya çıkma oranı % 20' den fazla bulunmuştur ve üründe kayıplar gözlenmiştir. Mart ayında tütün fideleri başka tarlalara taşındıktan sonra gözlenen ilk simptom bitki boyunda kısılma olmuştur ve haziran ayında simptomlu bitki sayısının arttığı bildirilmiştir (Culbreath ve ark, 1991).

Hawaii’ de TSWV periodik olarak marulda şiddetli kayıplara neden olduğu rapor edilmiştir (Cho ve ark, 1989). Bazı yıllar özellikle yaz aylarında maruldaki bu kayıplar % 50- 90 olarak bildirilmiştir. Yudin ve Mitchell (1990), yaptıkları çalışmada TSWV tarafından infekteli marullarda erken dönemde mücadele yöntemlerinin uygulanmasıyla hastalık potansiyelinin daha çabuk önüne geçilebileceğini savunmuşlardır. Hastalığın önceden haber verilmesi ve üreticilerin uygulayabileceği ekonomik modeller erken mücadele kararları içerisinde yer alıp şarta bağlı olasılık ve ürün bilgilerine dayandırılan lineer geri çekilme planı, birikerek fazlalaşan thrips çokluğu ve hastalığın erken ortaya çıkma olasılığının bir fonksiyonu olarak hastalığın ortaya çıkış oranı araştırılmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda üretim alanında thrips fazlalığının fark edilerek mücadeleye başlanmasındansa daha erken dönemde teşhisin hastalığı kontrol altına almada daha etkili olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmanın amacı TSWV’ nin ortaya çıkmasının çeşitli seviyelerinde bir ekonomik plan içerisinde ve tahmini olarak hastalığın ortaya çıkma olasılığının göz önünde bulundurulmasıyla bir yetiştiricinin ekonomik kazancını sağlamak olduğu bildirilmiştir.

Mekanik inokulasyonda kullanılan TSWV için yarfıstığı genotiplerinin (Georgia Green, Georgia Runner, C- 99R ve bir de C11- 2- 39) farklı tepkileri araştırılmıştır (Mandal ve ark, 2002). Bu araştırmada hastalığın tepkisi iki sıcaklık; düşük olarak (25- 30 °C) ve yüksek olarak (30- 37 C°) seviyesinde değerlendirilmiştir. Sonuçta temel taşınma oranı, simptomoloji, TSWV’ nin dağılımı ve TSWV’ nin nükleokapsid (N) protein geninin seviyeleri G. Runner ve G. Green’ de duyarlı bulunurken, (C- 99R ve C11- 2- 39) genotipleri dirençli bulunduğu ve bu dört genotipin test edilmesi sonucu TSWV’ ye en dirençli C11- 2- 39 genotipi bulunduğu rapor edilmiştir. Ayrıca yüksek sıcaklık etkisi daha iyi bir direnç tepkisi olarak sistemik infeksiyonda azalma ile ortaya çıkmıştır ve lokal simptom da viral hareket sınırlanırken TSWV’ nin antijen seviyesi azalmıştır. Bu bilgi mekanik inokulasyonda kullanılan TSWV için yarfıstığı genotiplerinin farklı tepkilerinin ilk raporu olarak kaydedilmiştir.

TSWV, Lousiana (ABD)’ da ilk olarak 1972’ de rapor edilmiştir (Black, 1973; Greenough ve ark, 1990). Solanacea familyasından özellikle domates biber ve

tütünde çok ciddi kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Bond ve ark, 1983), (Greenogh ve ark, 1985). Bitkide klorotik, nekrotik ring spot, gövde nekrozisi yapraklarda bozukluk ve mozaik, meyvede azalma şiddetli bitki kayıplarına neden olmaktadır. Yapılan surveylerde TSWV' nin domatestede ortaya çıkma oranı ticari ürünlerde % 60 iken, ev bahçelerinde bu oran % 100 olarak kaydedilmiştir (Greenogh ve ark, 1990). Louisiana' da TSWV' nin en önemli vektörleri *T. Tabaci* (Lind) ve *F. fusca* (Hinds) olarak bildirilirken *F. occidentalis* (Pergande)' de pamukta teşhis edildiği bildirilmiştir.

Lousiana' da yapılan bir çalışmada (1983) domates, biber ve tütünde plastik film malç kullanımı ile tripslerin göç etmesi ve TSWV' nin ortaya çıkma oranı araştırılmıştır. Çalışmada; alüminyum yüzeyli plastik malç, siyah plastik malç ve malç kullanılmadan üçe ayrılan bir tarlaya rastgele konulduğu belirtilmiştir. Thrips göçünü ölçmek için ise sarı yapışkan tuzak kullanıldığı bildirilmiştir. Sonuçta alüminyum yüzeyli plastik malçlı alan, malçsız alana göre domatestede % 64 ile TSWV' nin ortaya çıkma oranı ve % 68 ile tuzaktaki tripslerin sayısı azaldığı, biberde ise TSWV' nin ortaya çıkma oranı ve tuzaktaki tripslerin sayısı % 60- 78 azaldığı bildirilmiştir. İkinci bir uygulamada ise domates, biber ve tütünde % 60 ile TSWV' nin ortaya çıkma oranı, % 33 ile thrips sayısında azalma gözlemlendiği rapor edilmiştir (Greenogh ve ark, 1985).

Batı çiçek thripsi (*Frankliniella occidentalis*) ile taşınan TSWV, kuzey Florida ve Güney Georgia' da domateslerin ana hastalıklarından birisi olduğu, vektör Thrips kontrolünde kullanılan insektisit kullanımı bu hastalığın önlenmesinde etkili olmadığı, ayrıca insektisitler üreticiler için toksik ve pahalı olup entegre mücadelede kullanılmadığı belirtilmiştir. TSWV' nin önlenmesinde UV' yi yansıtan malç örtüler, actigard gibi malzemelerin kombine ve ayrı kullanılmasının ne kadar etkili olduğu rapor edilmiştir. Actigard ve standart malç örtülerin hastalığın azalmasında etkili olduğu, ancak metal malçlarla actigard uygulamasının etkili olmadığını gözlediklerini bildirmişlerdir. Spinosad, methamidophos kadar etkili bulunup özellikle hastalığın orta ve geç sezonlarında hastalığın yayılmasını azalttığı, metal malçların, actigard ve insektisitlerin beraber kullanılması TSWV'nin % 76 kadar yayılmasını azalttığı belirtilmiştir (Momol ve ark, 2002).

TSWV, dünya çapındaki pek çok üründe büyük ölçüde ekonomik zarar oluşturmaktadır. Güney Afrika’ da, Kwa Zulu-Natal’ da tipik bir tospovirus, doğal olarak infekte olmuş biberden (*Capsicum sp.*) izole edilmiştir. Virusün TSWV olduğu ELİSA, elektron mikroskobu ve protein analizi yapılarak belirlenmiştir. TSWV’ nin Güney Afrika’ daki genetik çeşitliliği araştırılmıştır. Bu çalışmada Güney Afrika’nın farklı bölgesinden gelen toplam altı TSWV izolatu kullanıldığı bildirilmiştir. Güney Afrika’ da, TSWV ile infekte olmuş *Nicotiana rustica*’ dan izole edilmiş toplam bitki RNA’ sı, TSWV’ nin nucleocapsid genine özel primerler kullanılarak RT- PCR uygulandığı belirtilmiştir. Üretilen 760 bp ürünler daha sonra klonlanmış ve sequence analizi yapılmıştır. N geninin baz dizilimi karşılaştırması Güney Afrika izolatları ile yüksek oranda (% 90) benzerlik gösterdiği belirtilmiştir. Güney Afrika TSWV N geni sıralarının çoklu dizilimlerine ve dünyadaki farklı coğrafi yerlerde ortaya çıkan izolatlarına dayanan soyağacı analizi, Amerikan ve Avrupa gruplarını gösteren iki farklı küme izolatlarının dallarının ortaya çıkarıldığı, Güney Afrika izolatları Avrupa TSWV izolatları ile yüksek baz sırası benzerliği belirtilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen bu sonuçlar özellikle ekonomik olarak önemli olan virüslerin kontrol altına alınabilmesi için genetik mühendisliğinde etkili olarak kullanılabilirliği belirtilmiştir (Sivparsad ve Gubba 2008).

Hawaii’ de marullarda TSWV oldukça yıkıcı bir hastalık olduğu rapor edilmiştir. TSWV hastalığı ve thrips surveyi Maui’ de 1981- 1984 yılları arasında yapılmıştır. TSWV hastalığının yoğunluğu ve thrips sayısı yüksek yerlerdeki üretim yerleriyle karşılaştırıldığında alçakta (366 m) bulunan yerlerde daha fazladır olduğu belirtilmiştir. TSWV’ nin taşınmasında vektörlük yapan üç thrips tespit edilmiştir. Bunlar *Frankliniella occidentalis*, *F. scultzei*, ve *Thrips tabaci* ‘dir. *F. occidentalis* 366 m ve 643 m yüksekliklerde dominant olarak bulunduğu rapor edilmiştir. *Thrips tabaci*’ nin ise 701 m de dominant olduğu tesbit edilmiştir. Kula’ da 23 adet diğer thrips türleri tespit edilmiştir. Bulardan üç tanesi Hawaii için yeni türler olduğu belirtilmiştir. Bunlar, *Neohydatothrips gracilipes*, *Baileiothrips limbatus* ve *Scirtothrips inermis*’ dir. TSWV’ nin bir marul izolatu, *Emilia sonchifolia* bitkisine *F. occidentalis* ile taşınmıştır. TSWV’ nin yaygınlığı ile thrips sayısı arasında belirli bir bağlantı tespit edildiği bildirilmiştir. Ayrıca aylık yağış, sıcaklık, minimum sıcaklık

ve maximum sıcaklıklarında TSWV'nin yoğunluğu için önemli olduğu bildirilmiştir (Cho ve ark, 1987).

Pennsylvania' da süs bitkisi yetiştirilen ticari seralarda TSWV ile infekteli bitkiler kayıt altına alınmış daha önceden konukçusu olduğu rapor edilmemiş bitkilerde TSWV simptomlarına rastlanmıştır (Hausbeck ve ark., 1992). Bu çalışmada camgüzeli ırklarında, begonyada % 95 infekteli bitki bulunmuştur. Cineraria, sıklamen ve camgüzeli bitkilerinde oldukça fazla infekteli bitkilerin tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Mertelik ve ark (1996), 1992 ile 1995 yılları arasında yapmış oldukları bu çalışmada 160 bahçeden daha fazla alanda TSWV için survey yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda 60 bahçede 64 bitki çeşidinde 36' sı süs bitkisi, 19' u yabancı ot, 6' sı sebze, 2' si tarla bitkisi ve 1' i odunsu bitki olmak üzere TSWV' nin doğal infeksiyonunu tespit ettikleri bildirilmiştir. Bu hastalığın tespitinde TSWV, INSV ve TOSPO gruba ait ticari kitler kullanılarak DAS- ELİSA yöntemi ve indikatör bitkiler kullanılarak yapıldığı belirtilmiştir. Sıklıkla infekteli olarak tespit edilen bitkiler domates, *Chrysanthemum sp.*, *Zantedeschia sp.*, biber, *Gerbera Jamesonii*, *Impatiens sp.*, *Asparagus sprengeri* ve yabancı otlardan *Stellaria media*, *Galinsoga parviflora* ve *Symphythum officinale*' den oluştuğu bildirilmiştir. Yaz döneminde TSWV tarlalarında yetiştirilen bitkilerde ve sera etrafındaki yabancı otlarda da tespit edildiği belirtilmiştir. Bu bitkilerin infekteli olmasına bu bitkiler üzerinde *Frankliniella occidentalis* ve *Thrips tabaci*' nin kışlıyor olması rapor edilmiştir.

Kolombiya' da TSWV'nin varlığının tespit edilmesi için bir survey çalışması yürütmüşlerdir. 38 ticari araziden 2600' den fazla örnek toplamışlardır. Bu örnekleri ELİSA testi ile etmişlerdir. 38 alandan 25 tanesi TSWV ile bulaşık çıktığı rapor edilmiştir. TSWV' nin marul ve camgüzeli ırkları seralar dışında eşit dağılımda olduğu, sera içerisinde camgüzeli ırkının daha yaygın bulunduğunu rapor etmişlerdir. TSWV'nin 4 adet çok yıllık yabancı ot bitkisinde bulunduğunu tespit bildirmişlerdir. Bunlar *Trifolium spp.*, *Cirsium avense*, *Rumex acetosella* ve *Oxalis sp.*' dir. Bir adet 2 yıllık 3 adet kışlık ve 5 adet tek yıllık yabancı otta da tespit etmişlerdir. 9 adet infekteli yabancı ot türü seraların dış kısmında yetişen türler olduğunu belirtmişlerdir. Vektör olarak survey esnasında sadece *Frankliniella occidantais*' e

rastladıklarını sera içerisinde ve sera dışında yabancı otlarda da bu türün oldukça yaygın olduğunu belirtmişlerdir. TSWV' nin Kolombiya' da oldukça yaygın olduğunu rapor etmişlerdir (Bitterlich ve MacDonald, 1993)

1990 ile 1992 yılları arasında Georgia' da yapılan bu çalışma ile TSWV ile infekteli domates ve biber de hastalığın olduğu yerler taranarak bir harita oluşturduklarını bildirmişlerdir. Hastalık yoğunluğunu bazı domates yataklarında ve biber tarlalarında tespit etmişler fakat olgun domates bitkilerinde gözlemlemediklerini rapor etmişlerdir. 1990 ile 1991 yılları arasında domates yataklarında hastalık yoğunluğunun arttığını ve bunun sebebinin bitişik alanlardaki bütün bitkisi olduğunu rapor etmişlerdir. Buna ilave olarak her blokta hastalık yoğunluğu 1990 yılında birbirine yakın olarak yapılan yataklardan kaynaklandığını bildirmişlerdir. 1990 yılında ticari biber tarlalarında çapraz ve alt alta olan sıralarda hastalık yoğunluğunun arttığını belirtmişlerdir. Ürünün azalması domates bitkilerinin enfekte olduğu dönemlere bağlı olarak değiştiğini eğer erken dönemlerde bulaşma gerçekleşiyorsa bitki başına daha az meyve alındığını rapor etmişlerdir (Gitaitis ve ark, 1998).

TSWV dünyada birçok ülkede domateslerde ekonomik ürün kayıplarına neden olan viral bir etmen olduğu Wangai ve ark (2001), tarafından bildirilmiştir. Bu etmen içerisinde birçok tarım ürünü ve yabancı otlarıda içeren oldukça geniş bir konukçu dizisine sahip ve 7 adet thrips türü ile taşınabildiği rapor edilmiştir. Kenya' da yapmış oldukları bu çalışmada 1999 yılı kasım ayı ile 2000 yılı mart ayları arasında domateslerde TSWV' nin enfeksiyon meydana getirdiğini gözlemlemişlerdir. Üreticilerin ürünlerinde % 80 ürün kaybının olduğunu tespit etmişlerdir. Hastalığın tipik semptomlarının özellikle meyveler yeşilken ortaya çıktığı gözlenmiştir. Meyveler üzerinde halkaların meydana geldiği ve daha sonradan bu halkaların kahverengileşerek gözle görülür hale geldiği belirtilmiştir. Ancak yapraklarda bu tip semptomlara rastlamadıklarını sadece bazı çeşitlerde bronzlaşmalar olduğunu bildirmişlerdir. TSWV' nin testlenmesi için domates yapraklarını toplamışlar ve ticari kitler kullanarak bu yaprakları ELİSA ile testlediklerini belirtmişlerdir. Ayrıca analizi sonucunda pozitif çıkan örnekleri RT-PCR yöntemiyle moleküler olarakta test ettiklerini rapor etmişlerdir. Moleküler

çalışmada primer olarak 5'- TTA AGC AAG TTC TGT GAG -3' ve 5'-ATG TCT AAG GTT AAG CTC- 3' baz dizilimini kullandıklarını belirtmişlerdir. PCR sonucunda elde ettikleri ürünü elektroforezde görüntüleyerek 777 bp karşılığında bantlar oluştuğunu bildirmişlerdir. PCR ürünlerini ayrıca gen bankasıyla karşılaştırmışlar ve bilinen TSWV izolatları ile kendi ırkları arasında % 95 ile 99 arasında benzerlik olduğunu rapor etmişlerdir.

ABD' nin Georgiya eyaletinde Jain ve ark (1998),' nin yapmış olduğu araştırmada TSWV' nin domates biber, tütün ve yerfıstığında önemli bir hastalık etmeni olduğunu belirtmişlerdir. Özellikle yerfıstığında moleküler analiz yapılırken nükleik asit izolasyonu ve bu izolatların çoğaltılmasındaki pratik uygulamalarda bir takım engeller ile karşılaşılabilindiğini bildirmişlerdir. Bu teknik sorunu ortadan kaldırmak için IC- RT- PCR yöntemini kullandıklarını rapor etmişlerdir. Bu analizin domates, biber, tütün ve camgüzeli gibi birçok bitkide TSWV' nin tespit edilmesinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Mandal ve ark (2001), yaptıkları çalışmada, TSWV' ye dirençli yerfıstığı germplasmasının değerlendirilmesi, yerfıstığına virüsün mekanik olarak taşınmasının yüksek oranda başarılması güçlüğüle ortaya çıkarıldığı belirtilmiştir. Bu çalışmada ilerlemelerin kaydedildiği ve bir yüksek etkili mekanik taşıma protokolü geliştirildiği bildirilmiştir. Sonuçta taşınmaya etkili birkaç faktör ortaya çıkarılmıştır. İki antioksidantın (sodium sulfite ve mercaptoethanol) kullanımı ve iki aşındırıcı madde (celite ve carboradum) kullanımı yanı sıra bir pamuklu süngerle ovma veya bir iğne ile delmek taşınmanın oranını yüksek oranda etkilediğinin saptandığı rapor edilmiştir. Bu denemelerin sonucu olarakta, sadece yaprağı delme ile 1/10, sadece yaprağı ovalama ile 7/10, delme ve ovalama birlikteyse, 10/10 başarı gözlenmiştir (Johnson & Johnson, Skillman, NJ). Su kullanımı ile % 11.6, buffer (0.1 M phosphate buffer pH; 7.0) kullanımı ile % 28.3, buffer ile sodium (% 0.2' lik) kullanımında % 75, buffer ile sodium (% 0.2' lik), mercaptoethanol (% 0.01' lik) kullanımında ise % 100 başarı gözleendiği bildirilmiştir. Ayrıca sadece karborandum kullanımı ile % 14.1, sadece celite kullanımı ile % 85.8, karborandum ve celite birlikte kullanımında ise % 96.6 başarı sağlandığı rapor edilmiştir.

Mavrik ve ark (2001), yapmış olduğu çalışmada seralarda yetiştirilen biberlerde 2000 yılı temmuz ayında nekrotik halkalı lekeler olduğunu tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Simptomları sadece alt yapraklarda gözlenmesine rağmen genç yapraklar ve meyvelerde gözlemediklerini bildirmişlerdir. Simptom gösteren yapraklardan örnekler alınmış ve elektron mikroskobu altında gözlenmiş ve TSWV' ye özel partiküller belirlediklerini belirtmişlerdir. TSWV bazı biber ve domateslerde ayrıca seralarda yetiştirilen krizantem, siklamen, spatiphyllum bitkilerinde DAS- ELİSA yöntemi ile tespit etmişlerdir. Şiddetli sistemik simptomları bazı krizantem bitkilerinde rastladıklarını rapor etmişlerdir. Bu şekildeki bitkilerin satışa sunulamadıklarını belirtmişlerdir. Simptom göstermeyen ancak infekteli olan bazı bitkilerde tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bazı bölgelerde zambak yapraklarında lokal lekeler rastladıklarını bildirmişlerdir. Bu hastalık etmenini DAS- ELISA metodu ve IC- RT- PCR yöntemleri kullanarak tespit ettiklerini ve RT- PCR analizi için tospovirüslere özel primerler kullanarak analizi yürüttüklerini rapor etmişlerdir. RT- PCR ürünlerini gen bankası aracılığıyla karşılaştırarak tanımlama yaptıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, bu çalışmanın Slovenya' da TSWV için ilk yapılmış olan çalışma olduğunu rapor etmişlerdir.

Williams ve ark (2001), Arjantin' de domatesleri infekte eden Tospovirüslerin coğrafi dağılımını tespit etmek için bu çalışmayı yaptıklarını bildirmişlerdir. Çalışmada Tospovirüsleri tespit için DAS- ELİSA yöntemini kullandıklarını ve alınan örneklerin % 8.8' inde TSWV ile bulaşıklık tespit ettiklerini rapor etmişlerdir.

Whitfield ve ark (2003) yaptıkları çalışmada, Tissue Blot İmmünoassay yöntemi (TBİA)' nin *Ranunculus asiaticus* yumrularında TSWV saptanması amacıyla kullanımının güvenilirliğini DAS- ELİSA yöntemi ile karşılaştırmak suretiyle yapmışlar ve test için en güvenilir kısmın merkez gövde dokusu olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, örnekleme metodu; yumru enfeksiyonu ve ölçüsü arasındaki ilişkiyi, TSWV' nin yumrulara dağılımını, yumru enfeksiyonu ve yumru filizlenmesi arasındaki ilişkiyi ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar, küçük yumruların % 44' ünün infekteli iken, büyük yumruların % 19' unun infekteli olduğunu ve TSWV enfeksiyonu sonucu, yumruların filizlenmesinde azalma olduğunu rapor

etmişlerdir. TBİA yöntemi TSWV ile infekteli bitkileri teşhiste ve yumrulu bitki indexinde kullanılabilir bir yöntem olarak bildirilmiştir.

TSWV, Kuzey Carolina’ da, 1988 yılında domates ve tütünde teşhis edilmiştir. Önceleri infeksiyon seviyesi daha az iken, 6- 8 yıl sonra ürünler arasında hızla yayılmaya başlamış ve birçok fluencured tütünde % 30- 50 kayıp görüldüğü rapor edilmiştir. Her ne kadar geniş bir alana yayılsa da infeksiyon oranı şehrin geniş bölümünde % 10- 15 (2000 Duplin, Onslow, Pende şehirlerinde) iken, bazı domates, biber ve tütün bitkilerinde % 25- 50 oranında infeksiyon tekrarı gözlemlendiği bildirilmiştir (Groves ve ark, 2002).

2004 yılının bahar ve güz ayları boyunca Lübnan’ da 1000 m yükseklikte bulunan arazilerde TSWV’ nin epidemi yaptığı bildirilmiştir. Simptomlar TSWV’ nin karakteristik belirtilerinin olduğunu belirtmişlerdir. Fideler Byblos’ un kıyı bölgelerinden elde edildiği bildirilmiştir. 2005 yılı bahar aylarında TSWV belirtisi benzeri belirtiler aynı bölgede domateste olduğu kadar biber ve marul bitkilerinde de gözlemeye başlandığı bildirilmiştir. İlk teşhisler Immunostrip testler ile yapılmış ve domates ve marul bitkilerinden alınan örneklerden pozitif sonuçlar elde edildiği rapor edilmiştir. Aynı örnekler RT- PCR ile testlenmiş ve belirtil gösteren örneklerden spesifik bantlar (619 nt) elde edilirken, sağlıklı bitkilerde herhangi bir bant gözlenmediği bildirilmiştir. Elde edilen ürünler klonlanmış ve bunların nükleotid baz dizilimi analiz edilmiştir. Yapılan karşılaştırmada birçok TSWV izolatu % 99 amino asit düzeyinde benzerlik gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışmanın Lübnan’ da TSWV’ nin ilk kez rapor edildiği çalışma olduğu bildirilmiştir. TSWV’nin yayılmasını engellemek için üreticilerin hastalık hakkında ve kontrol mekanizmaları hakkında bilgilendirilmeleri gerektiğini belirtmişlerdir (Abou-Jawdah ve ark, 2006).

Korbin (2005), yaptığı çalışmada dört gerbera bitkisini TSWV’ ye dayanıklılık geni içeren genleri transfer ederek virüse karşı olan dayanıklılığı gözlemlediğini belirtmiştir. Bu çalışmada 33 transgenik bitkiden 16 tanesi PCR ile taranmış ve serada fenotipik özellikleri gözlemlendiği bildirilmiştir. TSWV ile mekanik inokulasyondan 2- 4 hafta sonra kontrol bitkilerinde virüsün tipik belirtilerinin gözlemlendiği, oysa transgenik bitkilerde herhangi bir hastalık belirtisi görülmediği

rapor edilmiştir. Transgenik olan ve olmayan bitkilerden arasında fiziksel olarak herhangi bir farklılık gözlenmediği bildirilmiştir.

Bütün dünyada biberlerde TSWV enfeksiyonu sonucunda üretimde kayıplar olduğu bildirilmiştir. Üretim programlarından tarla koşulunda TSWV' ye karşı dayanıklı çeşitlerin bulunmasının önemli olduğu, çünkü bu virüs etmeninin vektörüyle taşındığı belirtilmiştir. Bu çalışmada TSWV' ye karşı dayanıklı *Capsicum spp.* çeşitlerini tespit etmek için değişik çevre koşullarında denemeler yapıldığı belirtilmiştir (Genda ve ark, 2007).

Farooq ve ark (2007a), yapmış oldukları çalışmada 8 farklı domates çeşidinin tarla koşullarında TSWV' ye karşı performansı üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmanın 2005- 2006 yılları arasında gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Yapmış oldukları bu çalışmada sağlıklı bir domates ile infekteli bir domatesin verimi karşılaştırıldığında belirli bir düşüş olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca TSWV ile erken orta ve geç sezonlardaki enfeksiyonlar verimi farklı bir şekilde etkilediğini belirtmişlerdir.

Holguin-Pena ve ark (2007), 2005 yılında yapmış oldukları çalışmada TSWV belirtilmalarına benzer belirtilmalar gösteren 24 adet domates bitkisini serolojik bir yöntem olan ELISA metodunu kullanarak tespit etmişlerdir. Bu test sonucunda tospovirus cinsi Bunyaviridae familyasına dahil olan TSWV etmeninin tespit edildiği bildirilmiştir. Bu analizler sonucunda TSWV için pozitif sonuçlar veren domates bitkilerinin Kaliforniya için önemli çeşitler olduğunu belirtmişlerdir. TSWV' ye spesifik belirtilmalar olan; klorozlar, tepe yapraklarında şekil bozuklukları, bodurlaşma ve halkalı lekeler gözlediklerini bildirmişlerdir. 2006 yılında TSWV' ye özel belirtilmalar gösteren 42 adet domates bitkisini DAS- ELISA ile ticari kitleri kullanarak analiz ettiklerini rapor etmişlerdir. Bu analiz sonucunda RT- PCR ile izole ettikleri nükleik asitleri çoğaltmışlar ve primer olarak da 5'- ATG TCT AAG GTT AAG CTC 3' ve 5'- TTA AGC AAG TTC TGT GAG -3' kullandıklarını bildirmişlerdir. Bu analiz sonucunda elde ettikleri 16 adet pozitif örneğin ürünlerinin yaklaşık 800 bp karşılığında bantlar oluşturduğunu rapor etmişlerdir. Mekanik olarak da domates ve *Nicotiana glauca* bitkilerine inokulasyon yaptıklarını belirtmişlerdir. Mekanik inokulasyon sonucunda domates yapraklarında klorotik halkalar ve nekrotik

lezyonlar oluşurken *N. glauca* yaprakları üzerinde iç içe geçmiş halkalı lekelerin oluştuğunu gözlemlediklerini kaydetmişlerdir. Simptom gösteren bütün domates bitkilerini hem ELISA hem de RT-PCR tekniği kullanarak test etmişler ve simptom göstermeyen bitkilerin tamamen negatif çıktığını rapor etmişlerdir.

TSWV için hızlı ve etkili bir metod olan inokulasyon tekniklerinden spreyleme tabacası ve CO₂ tozu serpen atomizer kullanılarak, infekteli bitki parçaları fosfat tamponu içinde ezilmiş ve 320 Carborandum tozu serpilmiş yapraklar üzerine spreyleme yapıldığı bildirilmiştir. Uygulamada 1,1 basınçla spreyleme yapıldığı, mekanik inokulasyonda tütün (*Nicotiana tabacum*), yerfıstığı (*Arachis hypogaea*), domates (*Lycopersicon esculentum*) bitkileri konukçu olarak başarıyla kullanıldığı, % 75 ile 100 arasında sistemik enfeksiyon gerçekleştiği bildirilmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda TSWV ile enfekte edilen normal mekanik inokulasyona oranla % 50 oranla daha hızlı olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak bu inokulasyon yöntemi ile daha çok sayıda bitki ile daha hızlı çalışma imkanı bulunduğu, özellikle virüslere dayanıklı çeşitlerin tesbitinde bu yöntem rahatlıkla kullanılabileceği bildirilmiştir (Mandal ve ark, 2008).

Mun ve ark (2008), Kore’de 2006 ağustos ayında mozaik ve nekrotik belirtiler gösteren seralarda biberlerde öldürücü bir hastalık tespit etmişlerdir. Bu viral hastalığın tespit edilmesi için simptom gösteren ve göstermeyen 11 meyveden örnek alınmış ve ezilerek total RNA izolasyonunu yapmışlardır. CMV, PepMoV, TSWV ve PMMoV virusleri için spesifik primerler dizayn edilerek kullandıklarını belirtmişlerdir. Analiz sonucunda elde edilen ürünler % 98 ve 100 oranında TSWV ile CMV’ nin kılıf proteini ile uyum sağladığını rapor etmişlerdir. Bunun da biberlerde bu belirtilere neden olan viral etmenlerin CMV ve TSWV olduğunun tespit edildiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmayı Kore’de biberlerde TSWV ve CMV için yapılmış olan ilk çalışma olarak rapor etmişlerdir.

TSWV, ülkemizde ilk olarak tütünde; Çanakkale’yi takiben Balıkesir, Manisa Uşak ve Samsun’da, daha sonra ise, domateste; İzmir, Manisa’da (Azeri, 1981; 1994) ve Çukurova’da (Güldür ve ark, 1995) teşhis edilmiştir. Önce sadece domates bitkisinde olduğu düşünülmüş, fakat 1997- 1998 yılları süresince İçel’ in

Kazanlı bölgesinde biber bitkisinde de ortaya çıkarılmıştır ve bu bölgede TSWV' nin *Frankliniella occidentalis* ve *Thrips tabaci* vektörleri ile taşındığı bildirilmiştir.

Turhan ve Korkmaz, 2006 yılında Çanakkale ilinde domates üretim sezonu içinde açık alanlarda yetiştirilen domates tarlalarında Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV)' nün varlığının belirlemesi amacıyla yaptıkları çalışmada, domates ekili alanlarda bir survey çalışması yapmışlar ve, TSWV' ye benzer simptom gösteren bitkilerden örnekler alarak ELISA ile testi ile testlemişlerdir. İki yıl süresince toplam 99.2 ha alanda gözlem yapılmış ve TSWV simptomlarını gösteren toplam 200 bitkiden örnek almışlardır. Ayrıca, ELISA testinde pozitif çıkan örnekler, her iki yöntemi birbiriyle kıyaslamak için DTBIA yöntemi ile de testlenmişlerdir. Araştırmacılar, ELISA testleri ve DTBIA yöntemi sonucunda 9 örneği TSWV ile infekteli bulduklarını, her iki yöntemin TSWV tanısında güvenle kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmada başarılı bir şekilde kullanılan DTBIA yönteminde hastalıklı örneklerin 10X büyütme bir binoküler altında nitroselüloz membran üzerinde tipik pembemsi- kırmızı renk oluşumlarını gözlediklerini rapor etmişlerdir.

Arlı Sökmen ve ark (2005), Samsun ilinde biber üretim yerlerinde birçok virüs hastalığı olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı araştırmacılar, 1998 ve 1999 yılları arasında bu virüsleri tespit için toplam 313 örnek almış ve ELISA ile testlemişlerdir. Bu örneklerde AMV, CMV, PVY, ToMV, TMV ve TSWV olmak üzere 6 adet virüs tespit edilmiş, ayrıca TSWV' nin birçok yabancı ot üzerinde de varlığı ortaya konulmuştur. Bu çalışma ile biber tarlalarında bulunan bu yabancı otların aynı zamanda biberler için TSWV enfeksiyon riski meydana getirdiğini bildirmişlerdir.

Arlı-Sökmen ve Şevik (2006), domatesleri infekte eden virüslerin tespit edilmesi ve yoğunluğunun ortaya konulması amacıyla, 2002 ve 2003 Mayıs ayları arasında Samsun' da yaptıkları survey çalışmasında, 31 adet tarladan 186 domates örneği almışlar ve ELISA yöntemi ile testlemişlerdir. Testlenen örneklerde, ToMV, TSWV, PVX ve CMV enfeksiyonlarını bildirmişlerdir. ToMV, TSWV, PVX ve CMV' nin sırasıyla, % 52.1, 12.9, 10.7 ve 6.9 sıklığında tespit ettiklerini rapor etmişlerdir. 30 tane örnekte karışık enfeksiyon tespit ettiklerini belirtmişlerdir (% 16.1). En yaygın ve dominant olan ToMV ve TSWV (% 6.4), PVX (% 4.9), ve CMV (% 3.2) karışık enfeksiyon meydana getirdiği rapor edilmiştir.

Küçük (2006), 2005- 2006 yılları arasında yürüttüğü çalışmada, Adana ve Mersin illerinde yetiştirilen domates ve biberlerde zararlı Domates Lekeli Solgunluk Virüsü' nün saflaştırılması, biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanısının yapılması amacıyla, araziden toplanan ve virüslü olduğundan şüphelenilen bitkileri, öncelikle ELISA yöntemi ile testlemiş ve toplanan örneklerde hastalık oranını % 45 olarak hesaplamıştır. Araştırmacı, E8, D2, M5 kodlu izolatlar ile aşılı indikatör bitkilerde 5-15 gün içerisinde symptom gözlenirken, T1 izolatının 30-60 gün gibi bir sürede symptom çıkışına neden olduğunu, yapılan SDS-PAGE yönteminde TSWV' ye ait bir protein band gözlemlendiğini ve molekül ağırlığının 27 kDa olarak saptandığını bildirmiştir. TSWV' nin saflaştırılması amacıyla kullanılan PEG çöktürme ve kolon kromatografisi yöntemlerinin başarılı olmadığı ortaya konulmuştur. Saflaştırılan TSWV vironlarının SDS-PAGE yönteminde dört, agarose jel elektroforez' de ise, tek band verdiği belirtilmiştir. TSWV ile infekteli test bitkilerinden total RNA ekstraksiyonu yapılarak, RT- PCR yönteminde kullanılmış ve PCR ürünleri agarose jel elektroforez ile testlenip beklenen band büyüklükleri gözlenmiştir.

Şevik ve Arlı-Sökmen (2007), TSWV' nin domates üretim alanındaki zamana ve mesafeye bağlı olarak thrips türleri ile yayılışının, virüs taşınmasında etkili olan vektör türleri ve bunların hastalığın bulaşma ve yayılmasındaki rollerinin saptanması amacıyla 2004 yılında yaptıkları çalışmada, 2100 m²' lik bir alana 4080 domates bitkisi dikmişler ve TSWV ile bulaşık bitkileri haftalık olarak izlenmesi sonucu, vektör popülasyonu ile ilişkisini araştırmışlardır. Bu amaçla, TSWV- domates izolatu ile inokule edilmiş 15 adet domates bitkisi, inokulum kaynağı olarak deneme alanının merkezine bırakılmış ve daha sonra bu infekteli bitkiler 15 gün ara ile yenileriyle değiştirilerek virüs konsantrasyonunun sürekli olarak yüksek seviyede tutulması sağlanmıştır. Deneme alanındaki toplam bitki sayısının % 6' sını oluşturacak şekilde on hafta boyunca 240 bitkiden örnek alınmış ve DAS- ELISA yöntemiyle testlenmiştir. Aynı zamanda haftalık olarak araziye yerleştirdikleri tuzaklardaki thrips türlerinin popülasyonundaki değişiklikler de takip edilmiştir. Yaptıkları çalışmada deneme alanında *Frankliniella intonsa*, *Trybom* ve *Thrips tabaci* Lindeman türü thripsleri tespit etmişler ve thrips popülasyonu ile infekteli

bitki sayısı arasındaki ilişkiyi istatistiki olarak $P < 0.01$ düzeyinde önemli bulmuşlardır. Araştırmacılar, inokulum kaynağının araziye bırakılmasından üç hafta sonra, inokulum kaynağına 24.5 m ve 25 m uzaklıktaki iki bitkinin infekteli olduğu, yeni infekteli hale gelen bitki sayısının sekizinci haftaya kadar artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, bu çalışmada domatesten izole edilen TSWV- Samsun izolatının domates ve tütünden tekrar domatese *T. tabaci* bireyleri ile taşınabilirliği biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemlerle belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Survey Alanı ve Çalışma Materyali Hakkında Bilgiler

Survey çıkışları, Antalya ilinin Merkez (Altınova, Kurşunlu, Çamköy ve Aksu), Serik (Merkez ve Çakallık) ve Kumluca (Merkez, Mavikent ve Beykonak) ilçelerinde domates, biber ve marul yetiştiriciliği yapılan sera alanlarına yapılmış ve TSWV’ nin farklı yöntemler kullanılarak saptanması ve bulaşıklık oranının ortaya konulması için gerekli şüpheli bitki örneklerinin toplanması amacıyla yürütülmüştür.

Bu amaçla yapılan survey çalışmalarında, şüpheli domates, biber ve marul bitkilerinden alınan bitki dokuları çalışmalarda kullanılmıştır (Çizelge 3.1.).

Çalışma, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarı, Bitki Virüsleri Araştırma Serası ve mevcut klima odalarında yürütülmüştür.

Çizelge 3.1. Survey yapılan ilçeler, sera alanları, testlenen bitki türü ve sayısı

İl	İlçe	Sera Sayısı	Alan (Da)	Bitki Türü	Testlenen Bitki Sayısı
Antalya	Merkez	22	70	Domates	98
		35	103	Biber	175
		12	27.25	Marul	58
	Serik	14	42.75	Domates	70
		16	32.5	Biber	80
	Kumluca	6	16.75	Domates	25
		18	88	Biber	90
Toplam		123	380.25		596

3.1.2. Mekanik İnokulasyon Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Mekanik inokulasyon çalışmalarında, araziden toplanan ve TSWV ile bulaşık olduğu ELISA testleri ile saptanan domates, biber, marul bitkilerinden alınan taze bitki dokuları materyal olarak kullanılmıştır.

Mekanik inokulasyon çalışmaları, Çizelge 3.2’ de verilen test bitkileri üzerine, havan ve havan eli, fosfat tampon çözeltisi, sodyum sülfid, karborandum tozu ve çeşme suyu kullanılarak yapılmıştır.

Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan indikatör bitkilerin tohumlarının ekilmesi ve fidelerin yetiştirilmesi için kum, toprak ve torf karışımı (1:1:1), plastik saksılar, plastik küvetler, plastik viyoller, mikro ve makro besin elementleri içeren gübreler ve zaman zaman herhangi bir zararlı ve hastalık etmenine karşı insektisit ve fungusitler kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan indikatör bitkilerin tohumları, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Viroloji Laboratuvarı’ndan temin edilmiştir.

Çizelge 3.2. Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan test bitkileri

Türkçe Adı	Latince Adı
Biber	<i>Capsicum annum</i>
Akkaz Ayağı	<i>Chenopodium quinoa</i>
Tütün Türleri	<i>Nicotiana glutinosa</i> L. <i>N. tabacum</i> L. ''Xanthi' <i>N. tabacum</i> L. ''Xanthi nc'' <i>N. tabacum</i> ''Samsun'' <i>N. rustica</i>

3.1.3. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Materyal

Yapılan ELISA testlerinde, TSWV ile infekteli olduğundan şüphelenilen domates, biber ve marul bitkileri ile mekanik inokulasyon yöntemi ile inokule edilen indikatör bitkilerden alınan bitki dokuları materyal olarak kullanılmıştır.

ELISA testleri, ticari olarak temin edilmiş olan ELISA kiti, tampon çözeltiler, düz tabanlı, 96 kuyu içeren Maxi Sorp mikrotiter ELISA plateleri (NUNC-Danimarka), Medispec ESR 200 marka ELISA okuyucusu (Medispec ESR 200 ELISA Reader), otomatik pipetler ve pipet uçları ve saf su kullanılarak yapılmıştır.

3.1.4. Total RNA Ekstraksiyonu Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Yapılan ELISA testleri sonucunda TSWV ile infekteli olduğu saptanan arazi örneklerinden ve mekanik inokulasyon yöntemi ile TSWV bulaştırılan otsu indikatör bitkilerden alınan yapraklardan elde edilen bitki özsuları çalışma materyalini oluşturmuştur.

Total RNA ekstraksiyonu işleminde; steril havan ve havan eli, tampon çözeltiler, ependorf tüpleri, ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları, Universal 320R marka masa tipi soğutmalı santrifüj kullanılmıştır.

Total RNA ekstraksiyonu çalışmalarında kullanılan solüsyonlar Ek 2' de yer almaktadır.

3.1.5. RT-PCR Çalışmalarında Kullanılan Materyal

RT-PCR yönteminde, total RNA ekstraksiyonu çalışmaları sonunda, TSWV ile infekteli bitkilerden elde edilen total nükleik asit ekstraktları materyal olarak kullanılmıştır.

RT-PCR işlemi, Moloney Murine Leukaemia Virus'den oluşan reverse transcriptase (MMLV-RT, 200U/μl, Fermentas, EP0441) enzimi ve reverse transcriptase reaksiyon tampon çözeltisi, Taq polymerase enzimi (Termostabil DNA polymerase enzyme, 5U/μl, Fermentas, EP0401) ve reaksiyon tampon çözeltisi,

dNTP set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 25 mM, Promega), MgCl₂, MgCl₂ buffer, RNase inhibitör (40U/μl Fermentas, EO0311), Bench Top 1 kb DNA Ladder marker (Promega), çeşitli tampon çözeltiler, saf su, pipet ve steril pipet uçları, PCR tüpleri ve Çizelge 3.3’de verilen TSWV’ ye ve Tospovirüslere spesifik primerler (10mM) kullanılarak yapılmıştır (Adkins ve ark, 2005; Eiras ve ark, 2001).

Ayrıca çalışmalarda, elde edilen sonuçları karşılaştırmak amacıyla ticari olarak temin edilen 2X PCR Master Mix (Fermentas)’ de kullanılmıştır.

Virüs genomu üzerinde hedef bölgelerin çoğaltılması işleminde gerekli sıcaklıklar, TECHNO GENIUS marka termocycle aleti kullanılarak sağlanmıştır.

Çizelge 3.3. Çalışmada Kullanılan Primer Çiftleri ve Sentezlenen Bölgenin Moleküler Büyüklüğü

Primer Çiftleri	Dizi	Band Büyüklüğü (bp)
L1TSWVR L2TSWVF	AATTGCCTTGCAACCAATTC ATCAGTCGAAATGGTCGGCA	276
BR035 PDH006	GAATATATGACACCATTG CCCAGAGCAATCAGTGCA	514

3.1.6. Agarose Gel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Agarose Gel Elektroforez çalışmalarında, total RNA ekstraksiyonu işlemi sonucunda elde edilen TSWV’ ye ait total RNA’ lar ile RT- PCR çalışmalarında elde edilen PCR ürünleri materyal olarak kullanılmıştır.

Agarose gel elektroforez işleminde, agarose, tampon çözeltiler, BIORAD marka Mini Sub. DNA Cell Elektroforez cihazı ve güç kaynağı, UVP Ultraviolet Transilluminator marka UV ışık kaynağı, polaroid film ve Polaroid Gel Cam marka fotoğraf makinesinden yararlanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Bitki Örneklerinin Toplanması ve Muhafazası

Çalışmanın yürütüldüğü bölgelerde TSWV' nin bulaşıklık oranının ortaya konulması ve toplanan örneklerde TSWV varlığının farklı yöntemlerle saptanması amacıyla yapılan survey çalışmaları, Antalya iline bağlı Merkez, Serik ve Kumluca ilçelerinde örtüaltı domates, biber ve marul üretiminin yapıldığı alanlarda gerçekleştirilmiştir.

Survey çalışmaları, 2007- 2009 yılları arasında ilkbahar ve sonbahar aylarında yapılmıştır.

TSWV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen bitkilerin belirlenmesi amacıyla öncelikle simptomatolojik gözlemler yapılmış, örnek alınan bitkilerde, TSWV' nin neden olduğu, yapraklarda deformasyon, klorotik halkalı lekeler, sararma, klorotik ve nekrotik alanlar, variegation, gövde ve yaprak sapı üzerinde yağ lekeleri ve şok simptomları aranmıştır.

TSWV tarafından meydana getirilen bu simptomların bir veya birkaçını gösteren domates, biber ve marul bitkilerinden alınan bitki dokuları naylon poşetlere konulmuş ve poşetler numaralandırılarak buz kutusu içerisinde uygun koşullarda laboratuvara getirilmiştir. Bu bitki dokuları yapılacak olan biyolojik, serolojik ve moleküler çalışmalarda kullanılıncaya kadar kısa bir süre için buzdolabında +4 °C' de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. İndikatör Bitkilerin Yetiştirilmesi

Mekanik inokulasyon çalışmalarında, Çizelge 3.2' de verilen indikatör bitkileri kullanılmış ve bu bitkilerin tohumları, Ç.Ü.Z.F. Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarı' ndan temin edilmiştir.

Test bitkilerinin tohumları, önce metil bromid ile fumige edilmiş, kum, yanmış hayvan gübresi, toprak ve torf karışımını (1:1.1:1) içeren küvetlere ekilmiş ve

daha sonra çıkan bitkiler 4- 6 yapraklı dönemde, aynı karışımın bulunduğu plastik saksılara (12 cm çapında ve 15 cm yüksekliğinde) tek tek şaşırtılmıştır.

İndikatör bitkiler, 22-24 °C sıcaklık, % 70 nem, 16/8 saat (Işık/Karanlık) ve 5000 Lüks aydınlatma koşullarına sahip kontrollü klima odalarında çimlendirilmiş, yetiştirilmiş ve muhafaza edilmiştir (Choueiri ve ark, 1993).

Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarı' na ait klima odasında yetiştirilen bitkiler, zararlı- hastalık ve semptom gelişimi için araştırma boyunca periyodik olarak her gün kontrol edilmişlerdir. Bitkilerin sağlıklı büyümeleri için gerekli makro ve mikro besin elementleri sulama suyuna ilave edilerek bitkilere verilmiş ve hastalık ve zararlılara karşı gerektiğinde pestisit uygulamaları yapılmıştır.

3.2.3. Mekanik İnokulasyon Yöntemi

TSWV'nin biyolojik tanısı, total RNA izolasyonu ile virüsün saflaştırılması çalışmalarında kullanılacak olan bitkilerin elde edilmesi amacıyla, indikatör bitkiler üzerine mekanik inokulasyon çalışmaları, arazi çıkışlarında semptomatolojik olarak TSWV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen ve ELISA testleri sonucunda TSWV ile bulaşık olduğu saptanan bitkilerden alınan dokular kullanılarak yapılmıştır. Mekanik inokulasyon yöntemi, Mandal ve ark. (2001)'e göre aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

Şüpheli bitkilerden alınan bitki dokuları, 1: 5 oranında 2-Mercaptoethanol ve % 2'lik sodyum sülfid içeren 0.01 M fosfat tamponu (pH; 7.0) içeren steril porselen havanda ezilmiş ve daha önceden karborandum tozu serpilmiş indikatör bitkilerin yapraklarına mekanik olarak inokule edilmiştir. Daha sonra indikatör bitkiler semptom gözlenmesi amacıyla kontrollü koşullarda muhafaza edilmiştir ve periyodik olarak gözlemlenmiştir.

Kullanılan indikatör bitkiler aşağıda verilen semptomlar için gözlenmiştir.

***Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa*;** Nekrotik ve lokal lezyonlar, sistemik nekrotik şekil ve yaprak deformasyonu, geriye doğru ölüm

***Nicotiana rustica*;** Mozayik, klorotik lokal lezyon, yaprak kırışıklığı

***Capsicum annum*;** Klorotik lokal lezyon, nekrotik lokal lezyon, halkalı leke, damar açılması, deformasyon, yaprak kırışıklığı, geriye doğru ölüm, mozayik

Mekanik inokulasyon yapılan indikatör bitkiler; belirlenen koşullara sahip klima odasında muhafaza edilmişler ve simptom gelişimi için periyodik olarak gözlenmişlerdir.

Çalışmalar, Ç.Ü.Z.F. Bitki Koruma Bölümü Bitki Virüs Hastalıkları Araştırma Serası'nda yürütülmüştür.

3.2.4. Serolojik Çalışmalar

Arazi çıkışlarında, simptomatolojik olarak TSWV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen domates, biber, ve marul örnekleri, TSWV'nin varlığının ortaya konulması amacıyla öncelikle Double Antibody Sandwich (DAS) ELISA testi ile testlenmiştir. Ayrıca mekanik inokulasyon çalışmaları sonunda simptom gösteren indikatör bitkiler ile virüsün saflaştırılması işleminin farklı aşamalarında alınan örnekler de ELISA testine tabi tutulmuştur.

Yapılan ELISA testlerinde kullanılan platelerin her birinde, örnek tampon çözeltisi ve sağlıklı ağaçlardan alınan veya firmalardan ticari olarak temin edilen dokular ile hazırlanan ekstrakt olmak üzere iki farklı negatif kontrol ve TSWV bulaşık olarak ticari temin edilmiş bir pozitif kontrol karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır. ELISA testlerinde kullanılan tampon çözeltiler ve bunların hazırlanması Ek 1'de verilmiştir.

ELISA testleri sonucunda, sağlıklı kontrol için 405 nm'de elde edilen absorbans değerinin en az iki katı ve daha fazla absorbans değeri veren örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir (Barba ve Riccioni, 1993; Helguera ve ark, 2002).

3.2.4.1. DAS-ELISA Testi

DAS-ELISA çalışmaları, Clark ve Adams (1977) ve Jain ve ark. (1998) tarafından bildirilen yöntemle göre yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan sulandırma oranları kitin temin edildiği firmanın belirttiği oranlar dikkate alınarak yapılan DAS- ELISA yöntemi aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

1. TSWV' ye spesifik γ -globulin, firmanın bildirdiği prosedüre göre kaplama tamponunda belli oranda sulandırılarak, ELISA pleytlerine her çukura 100 μ l konulmuştur.

2. Pleytler, 30 °C'de 4 saat inkübasyona tabi tutulduktan sonra, yıkama tamponu ile her yıkama 3' er dakika olacak şekilde 3 kere yıkanmıştır.

3. Ekstraksiyon tampon çözeltisinde 1/10 oranında hazırlanmış olan ekstraktan her kuyuya 100' er μ l konulmuş ve pleytler +4 °C' de bir gece inkübasyona tabi tutulduktan sonra yıkama tamponu ile yukarıdaki şekilde yıkanmıştır.

4. Konjugat tamponu içerisinde sulandırılmış olan enzimle işaretli γ -globulinden (Konjugate) her kuyuya 100' er μ l konulmuş ve 30 °C' de 5 saat inkübasyondan sonra pleytler yıkama tamponu ile yıkanmıştır.

5. Son olarak pleytlerin her kuyusuna substrate tampon çözeltisinde 1mg/ml olacak şekilde hazırlanan substrattan 100' er μ l ilave edilmiş ve pleytler 30- 60 dakika oda sıcaklığında ışısız ortamda bekletildikten sonra ELISA okuyucuda okunmuştur.

Yapılan ELISA testlerinde her örnek için ikişer kuyu kullanılmış ve her pleytte pozitif, negatif ve buffer kontrol bulunmasına dikkat edilmiştir.

ELISA testleri sonunda ELISA okuyucusunda negatif kontrol için okunan absorbans değerinin 2- 3 katı absorbans değerine sahip örnekler, TSWV ile bulaşık kabul edilmiştir.

3.2.5. Total RNA Ekstraksiyonu

TSWV ile infekteli olduğu ELISA yöntemiyle saptanan arazi örneklerinden ve mekanik inokulasyon yöntemi ile TSWV aşılana indikatör bitkilerden alınan genç yapraklar kullanılarak yapılan total RNA izolasyon çalışmaları, Astruc ve ark, (1996)' nın önerdiği yöntemle göre aşağıdaki şekilde yürütülmüştür.

Total RNA ekstraksiyonu yönteminde izlenen basamaklar:

a. Örnekler ekstraksiyon tamponu (100mM Tris-HCl pH.8.0, 50mM EDTA b-pH. 7.0, 500 NaCl, 10 mM 2. mercapto-ethanol (1/1000)) ile 1:2 (w/v) oranında sulandırılarak ekstrakte edilmiş ve bitki özsuğu steril tülbentten süzölmüştür.

b. Bitki özsuğundan 1ml alınarak eppendorf tüpleri içersine yerleştirilmiş ve örnekler 3 dakika 4.000 rpm’de santrifüj edilmiştir.

c. Supernatant üzerine % 20’lik Sodium Dodecylsulfat (SDS)’den 50 µl ilave edilerek vortekste karıştırılmış ve sonra tüpler 65 °C’de 30 dakika su banyosunda inkübe edilmiştir.

d. Tüplere 250 µl potasium asetat (5M) ilave edilerek 20 dakika buz içersinde bekletilmiş ve daha sonra 15 dakika 13.000 rpm’de santrifüj yapılmıştır.

h. Elde edilen süpernatant ikiye bölünmüş ve 500 µl’ si yeni hazırlanmış eppendorf tüplerine konarak -70 °C de saklanmıştır.

Geriye kalan 500 µl süpernatant yeni hazırlanan eppendorf tüplerine konulmuş, üzerine % 100’lük ethanolde 500 µl ilave edilerek 1ml’ ye tamamlanmış ve vortekste karıştırılmıştır.

i. Daha sonra tüplere 50 µl sodium asetat (3M) ilave edilmiş ve örnekler tekrar karıştırılarak -70 °C’de bir gece bekletilmiştir.

i. Örnekler 15 dakika 14.000 rpm’ de santrifüj edilerek süpernatant kısmı ortamdan uzaklaştırılmıştır.

j. Eppendorf tüpleri filtre kağıdı üzerinde ters çevrilerek 5 dakika kurutulmuş ve pellet üzerine % 70’lik ethanolde 1ml ilave edilmiştir.

k. Örnekler RNA’ları çöktürmek amacıyla 5 dakika 13.000 rpm’ de santrifüj edilmiş ve tüp içersindeki ethanol atılarak eppendorf tüpleri kurutma kağıtları ile dikkatlice kurutulmuştur.

l. Elde edilen total RNA’lar 50 µl RNase free saf su ile sulandırılarak, 15µl ve 35 µl olmak üzere ikiye bölünmüş ve eppendorf tüpleri içersinde -70 °C’de muhafaza edilmiştir.

Daha sonra agaroz jel elektroforez çalışmasıyla total RNA’ların varlığı kontrol edilmiştir.

3.2.6. RT- PCR Çalışmaları

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) çift iplikli bir DNA molekülünde, hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Nükleik asit materyali RNA olan bir hedef çoğaltılmak isteniyorsa, önce RNA' dan Reverse Transcriptase (RT) enzimi ile cDNA' lar elde edilir ve daha sonra bu DNA' lar PCR işlemiyle çoğaltılır (RT- PCR).

Bu çalışmada, RT- PCR işlemi; total RNA çalışmaları sonunda elde edilen virüs nükleik asidi üzerindeki belirli bölgelerin spesifik primerler kullanılarak ve uygun koşullar altında çoğaltılması ve böylelikle TSWV' nin moleküler tanısı amacıyla yapılmıştır.

RT- PCR yöntemi, Jain ve ark. (1998); Pappu ve ark. (1998)' e göre yapılmıştır. İki aşamadan oluşan işlemin birinci aşamasında; RT (Reverse transcription) işlemi ile cDNA' lar elde edilmiş, ikinci aşamada ise, bu cDNA' lar kullanılarak PCR yapılmıştır.

RT aşamasında; her PCR tüpüne, 1 µl saflaştırılmış total RNA ve 1 µl reverse primer konularak 70 °C' de 5 dakika bekletilmiş, daha sonra tüpler buz üzerine alınmıştır.

Bu PCR tüplerine, 16.6 µl saf su, 5 µl RT tampon çözeltisi (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 1 µl dNTP (2 mM), 0.3 µl RNase ve 0.1 µl RT enzimi ilave edilerek, 42 °C' de 60 dakika inkübe edilmiş ve işlem sonunda cDNA' lar elde edilmiştir.

PCR aşamasında ise, ayrı bir PCR tüpüne, yukarıdaki işlemde elde edilen cDNA'dan 1 µl konulmuş, üzerine 16.8 µl saf su, 2.5 µl 10X PCR tampon çözeltisi (100 mM Tris- HCl (pH 8.8), 500 mM KCl, % 0.8 Nonidet P40), 1.5 µl MgCl₂, 1 µl dNTP (2 mM), 0.2 µl Taq DNA polymerase, 1 µl forward primer ve 1 µl reverse primer ilave edilmiştir. Daha sonra tüpler;

94 °C'de 2 dakika	1 döngü	
94 °C'de 30 saniye		35 döngü
48 veya 53 °C'de 30 saniye		
72 °C'de 2 dakika		
72 °C'de 10 dakika	1 döngü	

olacak şekilde ayarlanmış termocycler'a yerleştirilerek PCR aşaması tamamlanmıştır.

RT işlemi ve PCR aşamalarında kullanılan farklı derecelerdeki sıcaklıklar aşağıda verilen amaçlar doğrultusunda düzenlenmiş ve kontrol edilmiştir:

a. 42 °C'de 1 saat; Amplifikasyonu yapılacak olan TSWV' nin RNA' sından komplementer DNA (cDNA) elde etmek amacıyla kullanılmıştır. 42 °C MMLV reverse transcriptase enziminin çalışma sıcaklığıdır.

b. 94 °C'de 2 dk. ; Virüsün RNA' sına komplementer olarak elde edilmiş olan cDNA'yı virüse ait olan RNA'dan ayırmak amacıyla ayarlanmıştır. Çift iplikli nükleik asitteki zincirler 94 °C' de birbirinden ayrılmaktadır. PCR aşamasında bu cDNA çoğaltılacaktır.

c. 94 °C'de 30 sn.; Amplifikasyonda **b'** deki programın çalıştırılması sırasında birbirinden ayrılmayan RNA ve cDNA'ların ayrılması ve daha sonra oluşacak çift ipliklerin sürekli birbirinden ayrılması için ayarlanmıştır.

d. 48 veya 53 °C'de 30 sn.; Kullanılan primerlerdeki G, C, A ve T baz miktarları göz önünde bulundurularak $T_m = (G+C) \times 4 + (A+T) \times 2$ formülü (T_m =melting temperature=erime ısısı) ile ayarlanmıştır ve bu sıcaklıktan 5 °C aşağısı kullanılmıştır. Bu programdaki sıcaklık seviyesi; primerlerin, çoğaltılması hedeflenen nükleik asitte bulunan ve primerlere spesifik yerlere bağlanması için gerekli olan sıcaklıktır.

e. 72 °C'de 2 dk. ; DNA Taq polimeraz enziminin çalışma sıcaklığı olup **d'**deki programın çalışması ile spesifik bölgelere bağlanan primerlerin uzaması için ayarlanmıştır. Bu sıcaklıkta DNA Taq polimeraz enzimi dNTP'leri kullanarak amplifikasyonu gerçekleştirir.

c, d ve e' deki programlar 35 defa tekrarlanacak şekilde ayarlanmıştır.

f. 72 °C'de 10 dk. ; Amplifikasyon sonunda çoğaltılan nükleik asit ipliklerinde tamamlanmayan bölgelerin tamamlanması amacıyla ayarlanmıştır.

RT-PCR yönteminin her iki aşamasında; tüplerdeki karışım, toplam hacim 25 µl olacak şekilde hesaplanarak hazırlanmıştır.

2X PCR Master mix kullanılarak yapılan RT-PCR işleminde, RT kısmı yukarıda verildiği şekilde uygulanmış, PCR kısmı ise ticari firmanın önerdiği prosedür kullanılarak, yine son hacim 25 µl olacak aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

cDNA	1 µl
2X PCR Master Mix.....	12.5µl
Primer1.....	1 µl
Primer2.....	1 µl
dH ₂ O.....	9.5 µl

3.2.6.1. Amplifikasyon Sırasında Kullanılan Primerlerin Optimum Konsantrasyonlarının Ayarlanması

TSWV'nin RT- PCR yöntemi ile tanınması işleminde kullanılan primerler ticari firma tarafından farklı pmol konsantrasyonlarında purifiye edilmişlerdir. Amplifikasyon sırasında kullanılmak amacıyla, L1TSWVR- L2TSWVF çifti ile BR035- PDH006 çifti primerler ddH₂O ile sulandırılarak 10 pmol'e ayarlanmışlardır.

3.2.7. Agarose Gel Elektroforez Çalışmaları

RT-PCR işlemleri sonunda, TSWV'nin çoğaltılan nükleik asit materyalleri % 1- 1.5' luk agaroz jel elektroforez yöntemine tabi tutulmuştur.

Gallitelli ve Minafra (1994)'e göre modifiye edilerek uygulanan yöntemde;

100- 150 mg agaroz 10 ml lxTAE tampon çözeltisi (4.84 gr Tris, 2 ml 0.5 M Na₂EDTA, 1.142 ml Glucial Asetic Acid/1 lt) içerisine konularak, agaroz eriyinceye kadar mikrodalga fırında ısıtılmış ve son hacim tekrar 10 ml' ye ayarlanmıştır.

Karışım bir süre soğumaya bırakıldıktan sonra; jel, hazırlanan kısma boşaltılarak tarak takılmıştır.

Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çekilmiş ve bu kısım elektroforez tankına yerleştirilerek, jeli 1-2 mm geçecek kadar 0.5x TAE tampon çözeltisi ilave edilmiştir.

Örnekler, 5 µl örnek ve 1 µl 6x loading buffer olacak şekilde hazırlandıktan sonra jeldeki kuyulara dikkatli bir şekilde yüklenmiştir. İlk kuyuya marker (4 µl marker, 1 µl loading buffer) konulmuştur.

Loading buffer içindeki turuncu renk (Orange G) jelin sonuna gelene kadar elektroforez tankına 50 V elektrik akımı verilmiştir.

Jel, elektroforez işlemi sonunda, oda sıcaklığında 10 dk. 30 µl ethidium bromid/ 100 ml saf su (10 mg/ml saf su) çözeltisinde çalkalanarak boyanmış ve daha sonra fazla ethidium bromidi uzaklaştırmak için 5 dk. saf su içerisinde tutulmuştur.

Yıkanan jel, UV Transilluminatör üzerine konularak, UV ışıktaki ortaya çıkan bantlar gözlenmiş ve fotoğrafı çekilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Survey Çalışmaları

Çalışmanın yürütüldüğü bölgelerde TSWV' nin bulaşıklık oranının ortaya konulması ve toplanan örneklerde TSWV varlığının farklı yöntemlerle saptanması amacıyla, Antalya ili Merkez (Altınova, Kurşunlu, Çamköy ve Aksu), Serik (Merkez ve Çakallık) ve Kumluca (Merkez, Mavikent ve Beykonak) ilçelerinde örtüaltı domates biber ve marul üretimi yapılan toplam 123 sera alanında toplam 380,25 dekar alanda survey çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.1.).

Buna göre, Antalya ili Merkez' de, 22 domates, 35 biber ve 12 marul olmak üzere 69 sera alanı gezilmiş ve 98 domates bitkisi, 175 biber bitkisi ve 58 marul bitkisinden olmak üzere toplam 331 adet örnekleme yapılmıştır. Aynı ile bağlı Serik ilçesinde, örtüaltı yetiştiriciliği yapılan 14 domates ve 16 biber alanı gezilmiş ve 70 domates ve 80 biber örneği olmak üzere toplam 150 adet örnek alınmıştır. Kumluca ilçesinde ise, örtüaltı yetiştiriciliği yapılan 6 domates ve 18 biber alanı gezilmiş ve 25 domates ve 90 biber örneği olmak üzere 115 adet örnek alınmıştır.

Örneklerin alındığı seralardaki bitkilerin yapraklarında şekil bozuklukları, klorotik halkalı lekeler, mozayik, nekrotik lekeler, meyvelerde halkalı lekeler, bitkilerde genel sararma, cücelik ve şok belirtileri aranmış ve belirtilere sahip olan bireylerin testlenmek amacıyla, yaprak ve meyveleri alınarak örnekleme yapılmıştır (Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4,4.5,4.6,4.7).

Simptomatolojik gözlemlerle virüsün kesin tanısı mümkün olmadığından, bu çalışmada, Antalya ili merkezi ve bağlı ilçelerde, toplam 123 alanda yapılan örnekleme alanından alınan 193 domates, 345 biber ve 58 marul olmak üzere toplam 596 örnek ELISA testine tabi tutulmuştur.

ELISA testleri sonucunda, TSWV ile infekteli olduğu saptanan örneklerden üç tanesi kodlanarak, mekanik inokulasyon, RT- PCR çalışmalarında kullanılmıştır. Bu çalışmada, Antalya ili merkezinden alınan TSWV marul izolatu A1, Serik ilçesinden alınan TSWV domates izolatu S1, Kumluca ilçesinden alınan TSWV biber izolatu K1 şeklinde kodlanmıştır.



şekil 4.1. Domates bitkisi yapraklarında klorotik ve nekrotik lekeler



şekil 4.2. Domates meyvesinde halkalı lekeler ve deformasyon



şekil 4.3. Biber bitkisi yapraklarında sararma ve aşağı doğru kıvrılma



şekil 4.4. Biber bitkisi meyvelerinde halkalı lekeler



şekil 4.5. Biber yapraklarında sararma ve halkalı lekeler



şekil 4.6. Marul yaprakları üzerinde nekrotik alanlar ve deformasyon



Şekil 4.7. TSWV infekteli marulda gelişme geriliği ve sararma (soldaki sağlıklı; sağdaki infekteli)

4.2. ELISA Testleri

Antalya ili Merkez, Serik ve Kumluca ilçelerinde yapılan bu çalışmada ELISA testlerinde, arazi çıkışlarında simptomatolojik olarak, TSWV ile infekteli olduğundan şüphelenilen 193 domates, 345 biber ve 58 marul bitkisinden oluşan toplam 596 bitki örneği testlenmiştir. Testlenen domates örneklerinden 156 tanesi (% 80,83), biber örneklerinden, 316 tanesi (% 91,6) ve marul örneklerinden ise 54 tanesi (% 93,1) olmak üzere toplam 526 bitki (% 88.25) TSWV ile infekteli bulunmuştur (Çizelge 4.1.(a,b), 4.2.(a,b),4.3.(a,b)).

Çizelge 4.1(a). Antalya ili Merkez’ de survey ve örnekleme alanları, seranın alanı, toplam bitki sayısı, kontrol edilen bitki sayısı, şüpheli bitki sayısı, testlenen ve infekteli bulunan bitki sayıları ile test edilen bitkilerde hastalık oranları

Bitki Türü	Bölge	Alan (da)	Bitki Sayısı	Kontrol Edilen Bitki Sayısı	Şüpheli Bitki Sayısı	Testlenen Bitki Sayısı	İnfekteli Bitki Sayısı	Testlenen Bitkilerde Hastalık Oranı (%)
Domates	Kurşunlu	11	27500	2750	31	5	0	0
Domates	Kurşunlu	6,5	16250	1625	21	5	5	100
Domates	Kurşunlu	4	10000	1000	12	5	5	100
Domates	Kurşunlu	1	2500	250	6	5	4	80
Domates	Kurşunlu	3	7500	750	303	5	4	80
Domates	Kurşunlu	2,5	6250	625	397	5	4	80
Domates	Kurşunlu	2	5000	500	197	5	4	80
Domates	Çamköy	2	5000	500	6	5	5	100
Domates	Çamköy	2	5000	500	1	1	0	100
Domates	Çamköy	5	12500	1250	118	5	5	100
Domates	Çamköy	2	5000	500	1	1	0	0
Domates	Aksu	3	7500	750	7	5	3	60
Domates	Aksu	1,5	3750	375	5	5	3	60
Domates	Aksu	1	2500	250	53	5	4	80
Domates	Aksu	3	7500	750	12	5	4	80
Domates	Aksu	6	15000	1500	9	5	3	60
Domates	Altınova	3	7500	750	11	5	5	100
Domates	Altınova	2	5000	500	15	5	5	100
Domates	Altınova	4	10000	1000	28	5	5	100
Domates	Altınova	2,5	6250	625	3	3	3	100
Domates	Altınova	2	5000	500	8	5	4	80
Domates	Altınova	3	7500	750	3	3	2	66,6
Biber	Altınova	2	3000	300	21	5	4	80
Biber	Altınova	2	3500	350	16	5	5	100
Biber	Altınova	3	4500	450	11	5	5	100
Biber	Altınova	3	4500	450	16	5	5	100
Biber	Altınova	3	4500	450	21	5	5	100
Biber	Altınova	3	6000	600	11	5	5	100
Biber	Altınova	3	6000	600	31	5	5	100
Biber	Altınova	7	14000	1400	32	5	3	60
Biber	Altınova	2	4000	400	11	5	4	80
Biber	Altınova	3	6000	600	302	5	5	100
Biber	Altınova	3	6000	600	10	5	5	100
Biber	Kurşunlu	2	3000	300	25	5	5	100
Biber	Kurşunlu	4	6000	600	41	5	5	100
Biber	Kurşunlu	2	3000	300	22	5	4	80
Biber	Kurşunlu	2,5	3750	375	5	5	4	80
Biber	Kurşunlu	1	1500	150	6	5	3	60
Biber	Kurşunlu	2	4000	400	9	5	4	80
Biber	Kurşunlu	3,5	7000	700	48	5	4	80
Biber	Kurşunlu	3	6000	600	51	5	5	100
Biber	Kurşunlu	4	8000	800	45	5	5	100
Biber	Kurşunlu	3	6000	600	102	5	5	100
Biber	Çamköy	2	3000	300	27	5	5	100
Biber	Çamköy	1,5	2250	225	11	5	4	80
Biber	Çamköy	2	3000	300	7	5	4	80

Çizelge 4.1(a)'nın devamı

Biber	Çamköy	5	10000	1000	32	5	4	80
Biber	Çamköy	3	6000	600	51	5	5	100
Biber	Çamköy	3	6000	600	47	5	4	80
Biber	Çamköy	5	10000	1000	31	5	5	100
Biber	Çamköy	1,5	3000	300	23	5	5	100
Biber	Çamköy	4	8000	800	31	5	4	80
Biber	Çamköy	3	6000	600	11	5	5	100
Biber	Çamköy	2	4000	400	15	5	4	80
Biber	Çamköy	3	6000	600	6	5	5	100
Biber	Çamköy	3	6000	600	30	5	4	80
Biber	Çamköy	4	8000	800	25	5	5	100
Marul	Kurşunlu	2	6000	600	11	5	3	60
Marul	Kurşunlu	2	3000	300	53	5	5	100
Marul	Kurşunlu	3	9000	900	32	5	5	100
Marul	Kurşunlu	1	4000	400	64	5	5	100
Marul	Kırcami	3	9000	900	7	5	5	100
Marul	Kırcami	2	10000	1000	8	5	5	100
Marul	Kırcami	3	15000	1500	9	5	4	80
Marul	Kırcami	3	12500	1250	9	5	4	80
Marul	Kırcami	2	10000	1000	11	5	5	100
Marul	Kırcami	3	15000	1500	3	3	3	100
Marul	Kırcami	3	15000	1500	5	5	5	100
Marul	Altınova	0,25	500	50	53	5	5	100

Çizelge 4.1.(b) Antalya ili Merkez' de survey yapılan domates, biber ve marul alanlarından elde edilen toplam veriler

Bitki Türü	Bölge	Alan Sayısı	Alan (da)	Testlenen Bitki Sayısı	İnfekteli Bitki Sayısı	Testlenen Bitkilerde Hastalık Oranı (%)
Domates	Kurşunlu	7	29	35	26	74.28
	Altınova	6	16.5	26	24	92.30
	Aksu	5	14.5	25	17	68.00
	Çamköy	4	11	12	10	83.33
Toplam		22	71	98	77	78.57
Biber	Kurşunlu	10	27	50	44	88.00
	Altınova	11	34	55	51	92.72
	Çamköy	14	42	70	63	90.00
Toplam		35	103	175	158	90.28
Marul	Kurşunlu	4	8	20	18	90.00
	Altınova	1	0.25	5	5	100.0
	Kırcami	7	19	33	31	93.93
Toplam		12	27.25	58	54	93.10
Genel Toplam		69	200.25	331	289	87.31

Çizelge 4.1.(b)' ye göre, Antalya Merkez' de örtüaltı yetiştiriciliği yapılan alanlardaki domates yetiştirilen alanlarda infeksiyon oranı, % 68 ile 92.30 arasında olup, toplam domates örneklerinde % 78,57 oranında tespit edilmiştir. Biberlerde bu oran % 88 ile 92.72 arasında olup toplam biber örneklerinde 90.28, marul yetiştirilen alanlarda da % 90 ile 100 arasında olup toplam marul örneklerinde % 93.10 oranında saptanmıştır. Antalya ili Merkez' de domates, biber ve marul alanlarından toplam 331 adet örnekleme yapılmış ve bunların 289 tanesi (% 87.31) infekteli bulunmuştur.

Çizelge 4.2.(a) Antalya ili Serik ilçesinde survey ve örnekleme alanları, seranın alanı, toplam bitki sayısı, kontrol edilen bitki sayısı, şüpheli bitki sayısı, testlenen ve infekteli bulunan bitki sayıları ile test edilen bitkilerde hastalık oranları

.Bitki Türü	Bölge	Alan (da)	Bitki Sayısı	Kontrol Edilen Bitki Sayısı	Şüpheli Bitki Sayısı	Testlenen Bitki Sayısı	İnfekteli Bitki Sayısı	Testlenen Bitkilerde Hastalık Oranı (%)
Domates	Çakallık	1,25	3125	312	26	5	4	80
Domates	Çakallık	1	2500	250	17	5	3	60
Domates	Çakallık	1,5	3750	375	31	5	5	100
Domates	Çakallık	2	5000	500	18	5	5	100
Domates	Serik	2	5000	500	20	5	4	80
Domates	Serik	1	2500	250	16	5	3	60
Domates	Serik	1,5	3750	375	33	5	2	40
Domates	Serik	2	5000	500	30	5	4	80
Domates	Serik	2,5	6250	625	23	5	5	100
Domates	Serik	5	12500	1250	52	5	5	100
Domates	Serik	4	10000	1000	7	5	4	80
Domates	Serik	10	25000	2500	14	5	4	80
Domates	Serik	5	12500	1250	26	5	5	100
Domates	Serik	4	10000	1000	13	5	5	100
Biber	Çakallık	1,25	2250	225	23	5	4	80
Biber	Çakallık	1	2000	200	17	5	5	100
Biber	Çakallık	3	6000	600	5	5	4	80
Biber	Çakallık	3	6000	600	31	5	4	80
Biber	Çakallık	2	4000	400	24	5	5	100
Biber	Çakallık	1,5	3000	300	20	5	5	100
Biber	Çakallık	1	2000	200	32	5	5	100
Biber	Çakallık	1,5	3000	300	47	5	5	100
Biber	Serik	4	8000	800	12	5	4	80
Biber	Serik	3	6000	600	40	5	5	100
Biber	Serik	1,75	3500	350	32	5	5	100
Biber	Serik	2,5	5000	500	64	5	5	100
Biber	Serik	1	2000	200	28	5	4	80
Biber	Serik	2	4000	400	30	5	5	100
Biber	Serik	2	4000	400	32	5	3	60
Biber	Serik	2	4000	400	20	5	4	80

Çizelge 4.2.(b) Antalya ili Serik ilçesinde survey yapılan domates ve biber alanlarından elde edilen toplam veriler

Çeşit	Bölge	Alan Sayısı	Alan (da)	Testlenen Bitki Sayısı	İnfekteli Bitki Sayısı	Testlenen Bitkilerde Hastalık Oranı (%)
Domates	Serik	10	37	50	41	82.00
	Çakallık	4	5.75	20	17	85.00
Toplam		14	42.75	70	58	82.85
Biber	Serik	8	18.25	40	35	87.5
	Çakallık	8	14.25	40	37	92.5
Toplam		16	32.50	80	72	90.00
Toplam		30	75.25	150	130	86.66

Çizelge 4.2.(b)' ye göre, Antalya ilinin Serik ilçesinde örtüaltı yetiştiriciliği yapılan alanlardaki domates yetiştirilen alanlarda enfeksiyon oranı, % 82 ile 85 arasında olup, toplam domates örneklerinde % 82.85 oranında tespit edilmiştir. Biberlerde bu oran % 87.5 ile 92.50 arasında olup toplam biber örneklerinde % 90.00 oranında saptanmıştır. Serik ilçesinde domates ve biber alanlarından toplam 150 adet örnekleme yapılmış ve 130 tanesi (% 86.66) infekteli bulunmuştur.

Çizelge 4.3.(a) Antalya ili Kumluca ilçesinde survey ve örnekleme alanları, seranın alanı, toplam bitki sayısı, kontrol edilen bitki sayısı, şüpheli bitki sayısı, testlenen ve infekteli bulunan bitki sayıları ile test edilen bitkilerde hastalık oranları

Bitki Türü	Bölge	Alan (da)	Bitki Sayısı	Kontrol Edilen Bitki Sayısı	Şüpheli Bitki Sayısı	Testlenen Bitki Sayısı	İnfekteli Bitki Sayısı	Testlenen Bitkilerde Hastalık Oranı (%)
Domates	Kumluca	5	12500	1250	6	5	4	80
Domates	Kumluca	2	5000	500	3	3	3	100
Domates	Kumluca	4	10000	1000	24	5	4	80
Domates	Kumluca	2	5000	500	36	5	3	60
Domates	Mavikent	0,75	2000	200	2	2	2	100
Domates	Beykonak	3	7500	750	5	5	5	100
Biber	Mavikent	10	20000	2000	111	5	5	100
Biber	Mavikent	4,5	9000	900	21	5	5	100
Biber	Mavikent	2	3500	350	153	5	5	100
Biber	Mavikent	5	10000	1000	53	5	5	100
Biber	Mavikent	5	10000	1000	52	5	4	80
Biber	Mavikent	5	10000	1000	50	5	4	80
Biber	Mavikent	3,5	7000	700	101	5	5	100
Biber	Mavikent	2	3500	350	153	5	5	100
Biber	Mavikent	10	20000	2000	121	5	5	100
Biber	Mavikent	4	8000	800	86	5	5	100
Biber	Mavikent	2	4000	400	24	5	5	100
Biber	Mavikent	2	3500	350	143	5	5	100
Biber	Mavikent	3	5500	550	467	5	5	100
Biber	Beykonak	2	4000	400	50	5	5	100
Biber	Beykonak	10	20000	2000	11	5	5	100
Biber	Beykonak	8	16000	1600	23	5	4	80
Biber	Beykonak	3	5500	550	97	5	4	80
Biber	Beykonak	7	14000	1400	287	5	5	100
Biber	Mavikent	10	20000	2000	111	5	5	100

Çizelge 4.3.(b) Antalya ili Kumluca ilçesinde survey yapılan domates ve biber alanlarından elde edilen toplam veriler

Çeşit	Bölge	Alan Sayısı	Alan (da)	Testlenen Bitki Sayısı	İnfekteli Bitki Sayısı	Testlenen Bitkilerde Hastalık Oranı (%)
Domates	Kumluca	4	13	18	14	77.77
	Mavikent	1	0.75	2	2	100.0
	Beykonak	1	3	5	5	100.0
Toplam		6	16.75	25	21	84.00
Biber	Mavikent	13	60	65	63	96.92
	Beykonak	5	28	25	23	92.00
Toplam		18	88	90	86	95.55
Toplam		24	104.75	115	107	93.04

Çizelge 4.3.(b)' ye göre, Antalya ilinin Kumluca ilçesinde örtüaltı yetiştiriciliği yapılan alanlardaki domates yetiştirilen alanlarda enfeksiyon oranı, % 77.77 ile 100 arasında olup, toplam domates örneklerinde % 84.00 oranında tespit edilmiştir. Biberlerde bu oran % 92 ile 96.92 arasında olup toplam biber örneklerinde % 95.55 oranında saptanmıştır. Kumluca ilçesinde domates ve biber alanlarından toplam 115 örnekleme yapılmış ve 107 tanesi (% 93.04) infekteli bulunmuştur.

Mekanik inokulasyon çalışmalarında TSWV bulaştırılan indikatör bitkilerin ELISA yöntemi ile testlenmesi sonucunda da, TSWV' nin belirtilerini gösteren indikatör bitkilerde TSWV enfeksiyonu saptanmıştır. Böylece, yapılan bu çalışmalar sonucunda mekanik inokulasyon çalışmalarında elde edilen sonuçlar, ELISA testleri ile doğrulanmıştır.

TSWV ile infekteli bulunan arazi örneklerinden alınan biber ve domates tohumlarından da ELISA testleri yapılmış ve TSWV enfeksiyonunun varlığı saptanmıştır.

4.3. Mekanik İnokulasyon Çalışmaları

Yapılan ELISA testleri sonucunda, TSWV ile bulaşık olduğu saptanan, yaprak ve meyve simptomları gösteren bitkilerden seçilen A1, S1 ve K1 kodlu izolatlar kullanılarak, Çizelge 3.1.' de verilen indikatör bitkileri üzerine yapılan mekanik inokulasyonlarda Çizelge 4.4' de verilen sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı TSWV izolatları ile Yapılan Mekanik İnokulasyon Çalışmalarında Test Bitkileri Üzerinde Gözlenen Simptomlar

Test Bitkileri	A1 İzolatı	S1 İzolatı	K1 İzolatı
<i>Capsicum annuum</i>	YK, D, B, K, HL	YK, D, B, K, HL	YK, D, B, K, HL
<i>Chenopodium quinoa</i>	NLL	NLL	NLL
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	K, B, GÖ, NLL	K, B	K, B
<i>N. tabacum</i> L."Xanthii"	YK, D, B, K	YK, D, B, K	YK, D, B, K
<i>N. tabacum</i> L."Xanthii nc"	YK, D, B, K, HL	YK, D, B, K, HL	YK, D, B, K, HL
<i>N. tabacum</i> "Samsun"	YK, D, B, K	YK, D, B, K	YK, D, B, K
<i>N. rustica</i>	YK, D, B, K, HL	YK, D, B, K, HL	YK, D, B, K, HL

D: Yaprak deformasyonu, **HL:** Halkalı lekeler, **B:** Bodurlaşma, **YK:** Yaprak kıvrılması, **GÖ:** Geriye doğru ölüm, **K:** Kloroz, **NLL:** Nekrotik lokal lezyon, **-:** Simptomsuz

Değişik dönemlerde yaptığımız mekanik inokulasyon çalışmalarında kullandığımız TSWV izolatlarının hepsi *Chenopodium quinoa* bitkileri üzerinde nekrotik lokal lezyon simptomsu oluşturmuştur. Diğer indikatör bitkilerde de yaprak deformasyonu, halkalı lekeler, bodurlaşma, yaprak kıvrılması, geriye doğru ölüm, kloroz ve nekrotik lokal lezyon simptomsu gibi birbirlerine benzer veya farklı

simptomlar oluşturmuştur. Antigus ve ark (1996) ve Mohammadi ve ark (2000)' da yaptıkları çalışmalarda benzer sonuçlar bulmuşlardır.

TSWV' nin A1 izolatu indikatör bitkiler üzerinde aşılama tarihinden 7- 10 gün sonra symptom çıkışına sebep olurken, S1 (domates izolatu) ve K1 (biber izolatu) izolatları ile aşılı bitkilerde 20- 24 gün sonra symptom çıkışı gözlenmiştir. Bunun yanında A1 izolatu diğer izolatlardan farklı olarak *N. glutinosa* indikatör bitkisi üzerinde kloroz ve bodurluk symptomlarına ilaveten geriye ölüm ve nekrotik lokal lezyon symptomlarına da neden olmuştur (Şekil. 4.11)

TSWV'nin bu 3 izolatu içerisinde indikatör bitkilerde bir hafta gibi kısa bir sürede içerisinde symptom göstermeye başlayan A1 izolatu marul bitkisinden elde edilmiş olup, symptom oluşturmamasından kısa bir süre sonra bazı test bitkilerinin ölümüne neden olduğu ve bu izolatu aşılardığı test bitkilerinde görülen symptomların diğer test bitkilerinde görülen symptomlara oranla çok daha şiddetli ortaya çıktığı gözlenmiştir. S1 ve K1 izolatlarının A1 izolatuına göre daha ılımlı oldukları sonucuna varılmıştır.

TSWV'nin A1, S1 ve K1 izolatları ile inokule edilmiş, *N. tabacum* "Xanthii" ve *N. tabacum* "Samsun" indikatör bitkilerinin yapraklarında deformasyon, kloroz, kıvrılma ile bitkide bodurluk symptomları oluştururken, *N. tabacum* "Xanthii nc" ve *N. rustica* yapraklarında bu symptomlara ilaveten halkalı lekeler de meydana gelmiştir (Şekil 4.8; 4.9; 4.10; 4.12).

İzolatların hepsi, *C. annum* bitkisi yapraklarında benzer olarak deformasyon, bodurluk, kloroz, yaprak kıvrılması ve halkalı leke symptomlarına neden olmuştur (Şekil 4.13).



Şekil 4.8. *N. rustica*'da deformasyon ve halkalı lekeler



Şekil 4.9. *N. tabacum* 'Samsun'da klorotik ve nekrotik lekeler



Şekil 4.10. *N. tabacum* 'Xanthii'de kloroz ve deformasyon



Şekil 4.11. *Nicotiana glutinosa*'da kloroz ve geriye ölüm



Şekil 4.12. *N. tabacum* 'Xanthii nc'de halkalı lekeler

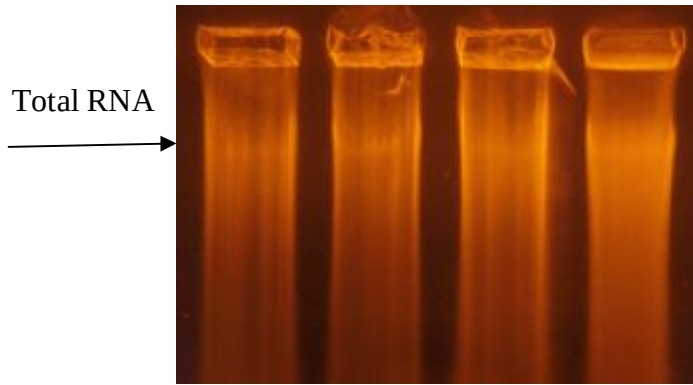


Şekil 4.13. Biber bitkisinde halkalı lekeler

4.4. Total RNA Ekstraksiyon Çalışmaları

RT- PCR işleminde kullanılacak olan total RNA' lar, ELISA testleri sonucunda TSWV izolatları ile bulaşık olduğu saptanan biber, marul ve domates bitkileri ile *N. rustica* indikatör bitkisinin taze yapraklarından saflaştırılmış ve TBE tampon çözeltisinde hazırlanan % 1.5'lik agaroz jel kullanılarak elektroforez yöntemi ile testlenmişlerdir.

Yapılan koşum işlemi sonunda, ethidium bromid ile boyanan jel üzerinde hastalıklı bitkilerden elde edilen total RNA' lar gözlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. TSWV izolatlarının agaroz jeldeki total RNA bandları

4.5. RT- PCR Çalışmaları

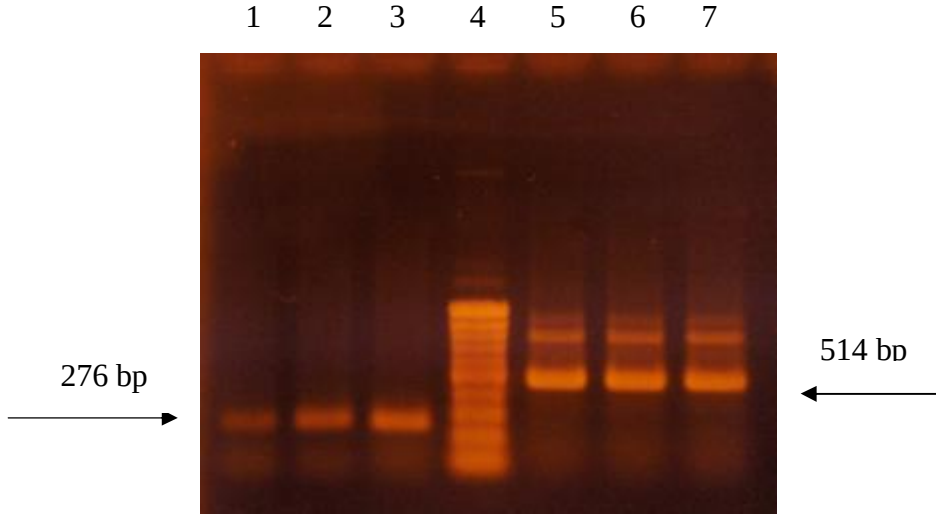
Günümüzde viroloji alanında yapılan çalışmalarda en yoğun şekilde kullanılan moleküler yöntemlerden biri olan RT- PCR yöntemi, TSWV'nin saptanması amacıyla optimize edilmiş ve başarı ile kullanılmıştır.

Bu amaçla ticari olarak sentezlettirilen,

1. L1TSWVR- L2TSWVF kodlu primer çifti 276 bp'lik
2. BR035- PDH006 kodlu primer çifti 514 bp' lik mesafeleri çoğaltılmak amacıyla kullanılmış ve beklenen band büyüklükleri elde edilmiştir.

Bu primerlerden 1 nolu primer çifti TSWV' ye spesifik, 2 nolu primer çifti ise Tospovirüslere spesifiktir.

Direkt arazi örneklerinden ve mekanik inokulasyon yöntemi ile TSWV bulaştırılan indikatör bitkilerden saflaştırılan total RNA' lar kullanılarak yapılan RT-PCR işlemlerinin sonucunda, testlenen örnekler, kullanılan primer çiftleri ile beklenen büyüklüğe sahip bandlar vermiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. 1 ve 2 nolu primer çiftleri ile yapılan RT-PCR sonuçları.
1. A1; 2. S1; 3. K1; 4 Marker; 5. A1; 6. S1; 7. K1 izolatu

RT- PCR işleminde elde edilen bu sonuçlar, çalışmada saptanan domates, biber ve marul bitkilerinden elde edilen A1, S1 ve K1 kodlu izolatların TSWV olduğunu ve aşılanan indikatör bitkilerin yapraklarında saptanan deformasyon, halkalı lekeler, kıvrılma, kloroz, bitkilerde bodurluk, geriye ölüm ve nekrotik lokal lezyon gibi semptomlarının TSWV enfeksiyonu sonucu meydana geldiğini göstermektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, Adkins ve ark. (2005) ve Mumford ve ark. (1996)'nın, TSWV için L1TSWVR- L2TSWVF primer çiftlerini kullanarak yaptıkları çalışma ile uygunluk göstermektedir. Aynı araştırmacılar, RT- PCR çalışmalarında 276 bp büyüklükte band elde etmişlerdir.

Eiras ve ark (2001) yaptıkları çalışmada ise, Tospovirüsler için BR035-PDH006 primer çiftlerini kullanmışlar ve 514 bp'lık bandlar elde etmişlerdir. Buna paralel olarak bu çalışmada da aynı büyüklükte band elde edilmiş ve sonuçlar uygunluk göstermektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Dünyada ve ülkemizde birçok viral hastalık vektörler arayıcılığı ile çok daha uzak alanlara yayılabilmekte ve infekte ettikleri alanlarda çok ciddi kayıplara yol açmaktadırlar. Antalya ilinde özellikle örtüaltı yetiştiriciliği yoğun olarak yapılmakta ve bu alanlar vektör böceklerin yaşaması ve yayılması açısından çok uygun ekolojiye sahiptirler. Vektör böceklerle karşı, uygun ve etkin mücadele yöntemlerinin uygulanması ile virüs hastalıklarının yayılmasının az da olsa kontrol altına alınabilmesine yardımcı olmaktadır. Fakat kesin sonuç vermemektedir. Bu yüzden hastalığın bölgeye girişini veya bölge içerisinde yayılmasını engellemek, öncelikle hastalığın teşhisinin yapılması, varsa vektörünün saptanması ve buna göre gerekli kültürel önlemlerin alınması ile mümkün olmaktadır.

Antalya ilinde domates, biber ve marul bitkileri üzerinde çalışılan TSWV, thripsler arayıcılığı ile uzak alanlara kolaylıkla yayılıp, ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Yapılan bu çalışmada öncelikle hastalığın varlığı biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak ortaya konulmuştur. Ayrıca, TSWV izolatlar arasındaki farklılıklar indikatör bitkiler üzerinde biyolojik olarak saptanmıştır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda verildiği gibi özetlenebilir.

1. Antalya ili Merkez, Serik ve Kumluca ilçelerinde örtü altı yetiştiriciliği yapılan alanlardan toplanan şüpheli domates, biber ve marul örnekleri öncelikle ELISA testine tabi tutulmuş ve pozitif sonuç veren izolatlar test bitkilerine aşılanarak TSWV'nin biyolojik tanısı ve karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca spesifik primerler kullanılarak RT-PCR yöntemi ile moleküler olarak saptanmıştır.

2. Arazi çıkışlarında toplam 596 örnek toplanmış ve ELISA testi sonucunda 526 örnekte TSWV'nin varlığı saptanmıştır. Toplam 42 domates serasından 193 örnek, 69 biber serasından 345 örnek, 12 marul serasından 58 örnek alınmış ve ELISA yöntemi ile testlenmiştir. Buna göre 156 domates örneği (% 80.82), 316 biber örneği (% 91.59), 54 marul örneği (% 93.10) TSWV ile infekteli bulunmuştur.

3. Antalya ili Merkez'de örtüaltı domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda en düşük infeksiyon oranı, % 68 ile Aksu bölgesinde elde edilmiş olup, en yüksek hastalık oranı % 92.30 ile Altınova bölgesinden elde edilmiştir. Toplamda Antalya ili

Merkez'den alınan domates bitkilerinden 98 örnekten 77' si infekteli bulunup hastalık oranı % 78.57 olarak saptanmıştır.

Biberlerde en düşük hastalık oranı % 88 ile Kurşunlu bölgesinden, en yüksek hastalık oranı ise % 92.72 ile Altınova' da elde edilmiştir. Antalya ili Merkez' den toplam 175 biber örneği alınmış ve 158 tanesi infekteli bulunup, genel hastalık oranı % 90.28 olarak tespit edilmiştir.

Antalya ili Merkez' de marul yetiştirilen alanlarda ise en düşük hastalık oranı % 90 ile Kurşunlu bölgesinden, en yüksek hastalık oranı % 100' lük bir oranla Altınova' dan saptanmıştır. Toplamda 58 test edilen örnekten 54 tanesi infekteli bulunmuş ve % 93.10 oranında hastalık tespit edilmiştir.

Antalya ili Merkez' de domates, biber ve marul alanlarından toplam 331 adet örnekleme yapılmış ve bunların 289 tanesi (% 87.31) infekteli bulunmuştur.

4. Antalya ilinin Serik ilçesinde örtüaltı domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda en düşük enfeksiyon oranı, % 82 ile Serik merkezde elde edilmiş olup, en yüksek hastalık oranı % 85' lik bir oranla Çakallık bölgesinde saptanmıştır. Toplamda Antalya ilinin Serik ilçesinden alınan domates bitkilerinden 70 örnekten 58' i infekteli bulunup hastalık oranı % 82.85 olarak tespit edilmiştir.

Biberlerde en düşük hastalık oranı % 87.5' lik oran ile Serik merkezden elde edilip, en yüksek hastalık oranı % 92.5 ile Çakallık' dan elde edilmiştir. Serik ilçesinden alınan biber bitkilerinden toplam 80 örnek alınmış ve 72 tanesi infekteli bulunup, hastalık oranı % 90 olarak tespit edilmiştir.

5. Antalya ilinin Kumluca ilçesinde örtüaltı domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda en düşük enfeksiyon oranı, % 77.77 ile Kumluca merkezden elde edilmiş olup, en yüksek hastalık oranı % 100' lük oranla Mavikent ve Beykonak bölgesinde saptanmıştır. Toplamda Antalya ilinin Kumluca ilçesinden alınan domates bitkilerinden 25 örnekten 21' i infekteli bulunup hastalık oranı % 84 olarak tespit edilmiştir.

Biberlerde en düşük hastalık oranı % 92' lik oran ile Beykonak bölgesinden, en yüksek hastalık oranı ise % 96.92 ile Mavikent' den elde edilmiştir. Antalya ilinin Kumluca ilçesinde biber bitkilerinden toplam 90 örnek alınmış ve 86 tanesi infekteli bulunup, genel hastalık oranı % 95.55 olarak tespit edilmiştir.

6. Mekanik inokulasyon çalışmalarında bütün TSWV izolatları *Chenopodium quinoa* test bitkileri üzerinde nekrotik lokal lezyon simptomsu oluşturmuştur. Marul bitkisinde elde edilen TSWV A1 izolatı diğer izolatlardan farklı olarak *N. glutinosa* indikatör bitkisi üzerinde geriye ölüm ve nekrotik lokal lezyon simptomlarına neden olmuştur. Ayrıca bu TSWV izolatı 7- 10 gün içerisinde simptom oluşumuna neden olurken, S1 ve K1 izolatları ile aşılı indikatör bitkilerde inokulasyondan 20- 24 gün sonra simptom çıkışı gözlenmiştir. Buna göre A1 izolatının diğer TSWV izolatlarından daha agresif olduğu sonucuna varılmıştır.

7. Tüm izolatlar, *Nicotiana tabacum* L.''Xanthi', *Nicotiana tabacum* L. ''Samsun'' test bitkilerinde genç yapraklarda kıvrılma, deformasyon, bodurlaşma ve kloroz oluşumuna sebep olurken, *Nicotiana tabacum* L.''Xanthi nc'', *N. rustica* ve *Capsicum annum* test bitkilerinde bunlara ilave olarak halkalı leke simptomsu da gözlenmiştir.

8. TSWV' nin domates, biber ve marul izolatları ile bulaşık bitkilerden total RNA'lar elde edilmiş ve agaroz jel elektroforeze tabi tutularak bandlar görüntülenmiştir. Bu total RNA' lar ile TSWV ve tospovirüs grubuna spesifik primerler kullanılarak RT-PCR çalışmaları yapılmış ve sonuçta elde edilen ve jelde görüntülenen bandlar (L1TSWVR ve L2TSWVF primer çifti için 276 bp, BR035 ve PDH006 primer çiftlerini kullanarak 514 bp' lik mesafede bulunan) örneklerin Tospovirüs grubundan TSWV ile bulaşık olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak, ülkemiz ve bölgemiz için ekonomik açıdan önemli domates, biber ve marul yetiştiriciliğini sınırlayan ve etkin bir mücadele yöntemi bulunmayan TSWV' nin Antalya ilinde survey çalışması ELISA testi ile yapılmış ve sonuçlar RT-PCR yöntemi ile desteklenerek bulaşıklığı ortaya konulmuştur. Ayrıca, elde edilen TSWV izolatları, indikatör bitkiler üzerine yapılan mekanik inokulasyon çalışmalarıyla biyolojik olarak karakterize edilmiştir.

Bu çalışma, TSWV konusunda Antalya ilinde yapılan ilk araştırma olması dolayısıyla da ayrıca bir öneme sahiptir. Elde edilen sonuçlar, hem pratikte fikir vermesi açısından faydalı olacak, hem de bilimsel açıdan bundan sonra yapılacak çalışmalara basamak teşkil ederek bir literatür eksiğini tamamlayacak niteliktedir.

KAYNAKLAR

- ANONYMOUS, 2004. Tarımsal Yapı ve Üretim. T.C. Başbakanlık DİE Ankara.
- ABOU-JAWDAH, Y., EL MOHTAR, C., and SOBH, H., 2006. First Report of Tomato Spotted Wilt Virus on Tomatoes in Lebanon. *Plant Diseases*, 90: 376.
- ADKINS, S., ZITTER, T., and MOMOL, T., 2005. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Published October 2005. Tospoviruses (Family Bunyaviridae, Genus Tospovirus).
- ADKINS, S., ZITTER, T., and MOMOL, T., 2005. Tospoviruses (Family Bunyaviridae, Genus Tospovirus). Fact Sheet PP- 212, One of a Series of The Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Services Institute of Food And Agricultural Sciences, University of Florida.
- ANTIGNUS, Y., LAPITOD, M., GANAIM, N., COHEN, J., LACHMAN, O., PEARLSMAN, M., RACCAH, B., and GERA, A., 1997. Biological and Molecular Characterization of Tomato Spotted Wilt Virus in Israel. *Phytoparasitica* 25(4): 319- 330.
- ARLI SOKMEN, M., MENNAN, H., SEVIK, M.A., and ECEVIT, O., 2005. Occurrence of Viruses in Field- grown Pepper Crops and Some of Their Reservoir Weed Hosts in Samsun, Turkey.
- ARLI SOKMEN, M., and SEVIK, M., 2006. Viruses infectig field- grown tomatoes in Samsun, Turkey. 2006. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 39(4): 283- 288.
- ASTRUC, N., MARCOS, J.F., MACQUARIE, G., CANDRESSE, G.T. and VICENT P., 1996. Studies on the Diagnosis of hop Stunt Viroid in Fruit Trees: İdentification of New Host and Application of a Nucleic Acid Extraction Procedure Based on Non-Organik Solvents. *European Journal of Plant Pathology*, 102, 837- 846.
- AZERI, T., 1981. Preliminary Report of Tomato Spotted Wilt Virüs and its Epidemy on Tobacco in the Çanakkale Region of Turkey. *J Turkish Phytopathology*, 10(2-3): 79- 87.
- AZERI, T., 1994. Detection of Tomato Spotted Wilt Virüs in Tabacco and Tomato Cultivars by Enzyme Linked İmmunosorbent Assay. *J. Turkish Phytopathology*, 23(1): 37- 46.

- BARBA, M., and RICCIONI, L., 1993. Improvement of Diagnostic Methods to Detect Plum Pox Virus in Apricot Plants. *Agriculture*, 139- 141.
- BITTERLICH, I., and MACDONALD, L.S., 1993. The Prevalence of tomato spotted wilt virus in weeds and crops in southwestern British Columbia. *Canadian Plant Disease Survey*, 73: 2, 137- 142.
- BLACK, L.L., 1973. Research on virus diseases of peppers in Louisiana. Pages 12- 13 in: *Proc. 1st Natl. Pepper Conf.* B. Villalon, ed. Pickle Packers Intl., St. Charles, IL.
- BOND, W.P., WIHITAM, H.K., and BLACK, L.L., 1983. Indigeneus Weeds as Reservoirs of Tomato Spotted Wilt in Louisiana. *Phytopathology*, 73: 499.
- CULBREATH, A.K., CSINOS, A.S., BERTRANT, P.F.and DEMSKI, J.W., 1991. Tomato Spotted Wilt Virüs. Epidemic in Flue- Cured Tobacco in Georgia. *Plant Disease*, 75: 483- 485.
- CHO, J.J., MITCHEL, W.C., MAU, R.F. L., and SAKIMURA, K., 1987. Epidemiology of Tomato Spotted Wilt Virüs Disease on Crisphead Lettuce in Hawaii. *Plant Disease*, 71: 505- 508.
- CHO, J.J, MAU, R.F.L., GERMAN, T.L., HARTMANN, R.W., YUDIN, L.S., GONSALVES, D., and PROUVIDENTI, R., 1989. A Multidisciplinary Approach to Management of Tomato Spotted Wilt Virüs. in Hawaii. *Plant Disease*, 73: 375- 383.
- CHOUEIRI, E., DIGIARO, M., MINAFRA, A., and SAVINO, V., 1993. A Survey of Peach Viruses in apulia. *Adv. Hort. Sci.* 7: 61- 62.
- CLARK, M.F., and ADAMS, A.N., 1977. Charecteristic of Microplate method of Enzyme- linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses, *J.Gen.Virol.*, 34: 475- 483.
- ECKEL, C.S., CHO, K., WALGENBACH, J.F., KENNEDY, G.G., and MOYER, J. W., 1996. Variation in Thrips Species Composition in Field Crops and Implications for Tomato Spotted Wilt Epidemiology in North Carolina.*Entomol.exp.*, 78: 19- 29.
- FAROOQ, A.A., AKANDA, A.M., and ISLAM, D., 2007a. Impact of Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) on Yeald Contributing Characters of Eight Tomato Varieties Under Field Condition . *Int. J. Sustain. Crop. Prod.*, 2 (2): 1-9.

- _____, 2007b. Symptoms and Prevalence of Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) Infection in Bangladesh. *Int. J. Sustain. Crop prod.* 2 (5): 51- 58.
- GALLITELLI, D., and MINAFRA, A., 1994. Electroforesis. Course on Plant Virus Diagnosis, 15- 30 October 1994. Adana-Turkey. Page: 89- 99.
- GENDA, Y., TSUDA, S., NUNOMURA, O., and ITO, T., 2007. Development of an assay system using thrips-mediated inoculation to evaluate resistance of *Capsicum spp.* to Tomato spotted wilt virus. *J Gen Plant Pathol.*, 74: 171- 175.
- GERMAN, T.L., ULLMAN, D.E. and MOYER, J.W., 1992. Tospoviruses: Diagnosis, Molecular Biology, Phylogeny and Vector Relationships. *Ann. Rev. Phytopathol.* 30: 315- 348.
- GIBBS, A.J., 1983. Tomato Spotted Wilt Virüs. *Viruses of Plants*, 1312- 1316 .
- GITAITIS, R.D., DOWLER, C.C., and CHALFANT, R.B., 1998. Epidemiology of Tomato Spotted Wilt in Pepper and Tomato in Southern Georgia. *Plant Disease*, 82: 752- 756.
- GNAYEM, N., 1995 Epidemiological and Biological Aspects of Tomato Spotted Wilt Virüs-TSWV. M. Sc. Thesis Submitted to the Faculty of Agriculture of Hebrew University of Jerusalam, Rehavot, Israel.
- GOLDBACKH, R., and PETERS, D., 1994. Possible Causes of the Emergence of Tospovirüs Diseases. *Seminers in Virology*, 3: 113- 120.
- GREENOGH, D.R., BLACK, L.L., STORY, R.N., NEWSON, L.D., and BOND, W.P., 1985. Occurance of *Frankliniella occidentalis* in Lousiana: A possible cause for the increased incidence of Tomato Spotted Wilt Virüs (Abstr.) *Phytopathology*, 75: 1362.
- GREENOGH, D.R., BLACK, L.L., and BOND, W.P., 1990. Aluminum-Surfaced Mulç an Approach to the Control of Tomato Spotted Wilt Virüs in Solanaceous Crops. *Plant Disease*, 74:805- 808.
- GOLNARAGHI, A.R., 2001. First Report of Tomato Spotted Wilt Virüs on Soybean in Iran. *Plant Disease*, 85 (12): 1290
- GROVES, R.L., WALGENBACH, J.F., MOYER, J.W., and KENNEDY, G.G., 2002. The Role of Weed Hosts and Tobacco Thrips, *Frankliniella fusca* , in the Epidemiology of Tomato Spotted Wilt Virüs. *Plant Disease*, 86: 573- 582
- GÜLDÜR, M.E., 1995. Güneydoğu Anadolu Projesi (GAP) Alanına Giren Şanlıurfa, Diyarbakır ve Mardin İllerinde Yetiştirilen Domateslerde Zararlı Virüsler.

Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Ana Bilimdalı. Doktora Tezi
ADANA. 120 s.

- GÜLDÜR, M.E., MARCHOUKS, M.G.M., YURTMEN, E., and YILMAZ, M.A., 1995. Mersin ve Çevresinde Yetiştirilen domateslerde Zararlı Yeni bir Virüs: Tomato Spotted Wilt Virüs. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 26- 29 Eylül 1995, Adana. Bildiriler, 303- 306.
- EIRAS, M., RESENTE, R.O., MISSIAGGIA, A.A., and DE AVILA, A.C., 2001. RT- PCR and Dot Blot Hybridization Methods for a Universal Detection of Tospoviruses. Fitopatol. Bras. Vol. 26 no. 2 Brasilia.
- HAAN, P., WAGEMARKERS, L., PETERS, D., and GOLDENBACH, R., 1990. J.Gen. Virul. 71: 1001.
- HAGAN, A.K., WEEKS, J.R., FRENCH, J.C., GUDAUSKAS, R.T., MULLEN, J. M., GAZAWAY, W. S., and SHELBY, R., 1990. Tomato Spotted Wilt Virüs in Peanut in Alabama. Plant Disease, 74: 615.
- HAUSBECK, M.K., WELLIVER, R.A., DERR, M.A., and GILDOW, F.E., 1992. Tomato Spotted Wilt Virus Survey Among Greenhouse Ornamentals in Pennsylvania. Plant Dis. 76: 795- 800.
- HELGUERA, P.R., DOCAMPO, D.M., NOME, S.F. and DUCASSE, D.A., 2002. Enhanced Detection of Prune Dwarf Virus in Peach Leaves by İmmunocapture- Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction with Nested Polymerase Chain Reaction (IC- RT- PCR Nested PCR). J. Phytopathology 150, 94- 96. Blackwell Wissenschafts- Verlag, Berlin.
- HSU, H.T., and LAWSON, R.H., 1991. Direct Tussie Blotting for Detection of Tomato Spotted Wilt Virüs in İmpatiens. Plant Disease, 75: 292- 295.
- HOLCOMB, G.E., and VALVERDE, R.A., 2000. First Report of Oidium sp. Powdery Mildew and Tomato Spotted Wilt Virüs on *Melampodium divaricatum*. Plant Disease, 84: 1152.
- HOLGUIN PENA, R.J., and RUEDA PUENTE, E.O., 2007. Detection of tomato spotted wilt virus in Tomato in the Baja California Peninsula of Mexico. Plant Disease, 91(12): 1682.
- JAIN, R.K., S.S., PAPPU, H.R., CULBREATH, A.K., and TODD, J.W., 1998. Molecular Diagnosis of Tomato Spotted Wilt Tospovirüs Infection of Peanut and Other Field and Greenhouse Crops. Plant Disease, 82: 900- 904.

- KORBIN, M., 2005. Assessment of Gerbera plants genetically modified with TSWV Nükleokapsid Gene. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research Vol. 14 (Suppl. 1), 2006: 85- 93.
- KORMELINK, R., KITAJIMA, E.W., DE HAAN, P., ZUIDEMA, D., PETERS, D., and GOLDBACH, R., 1991. The Nonsutrucltural Protein (NSs) Encoded by the Ambisense S RNA segment of Tomato Spotted Wilt Virüs is Associated With Fibrous Structures in Infected Plant Cells. Virology, 181: 459- 468.
- KÜÇÜK, B., 2006. Adana ve Mersin illerinde domates lekeli solgunluk virüsü (Tomato Spotted Wilt Virus, TSWV)' nin değişik yöntemlerle saptanması. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Ana Bilimdalı Yüksek Lisans Tezi ADANA. 72 s.
- MANDAL, B., PAPPU, H.R., and CULBREATH, A.K., 2001. Factors Affcting Mechanical Transmission of *Tomato Spotted Wilt Virüs* to Peanut (*Arachis hypogea*). Plant Disease, 85: 1259– 1263.
- MANDAL, B., PAPPU, H.R., CULBREATH, A.K., HOLBROOK, C.C., GARBET, D.W., and TODD, J.W., 2002. Differential Response of Selected Peanut (*Arachis hypogea*) Genotypes to Mechanical İnoculation by Tomato Spotted Wilt Virüs. Plant Disease, 86: 939- 944.
- MANDAL, B., CSINOS, A.S., MARTINEZ- OCHOA, N., and PAPPU, H.R., 2008. A rapid and efficient inoculation method for Tomato spotted wilt tospovirus. Journal of virological Methods, 149: 195- 198.
- MAVRIC, I., and RAVNIKAR, M., 2001. First Report of Tomato spotted wilt virus and Impatiens necrotic spot virus in Slovenia. Plant Disease 85 (12): 1288.
- MERTELIK, J., GOTZOVA, B., and MOKRA, V., 1996. Epidemiological Aspects of Tomato Spotted Wilt Virus Infection in the Czech Republic. ISHS Acta Horticulturae 432: IX International Symposium on Virus Diseases of Ornamental plants.
- MOHAMMADI, M., ESMAEELI- FAR, A., ZAD, J., and OKHOVAT, M., 2000. Serological detection and Symptomology of Tomato Spotted Wilt Virus in Tehran Province, Iran. J. Arg. Sci. Tech. (2000) Vol. 2: 107- 117.
- MOMOL, M.T., 2000. First Report of Tomato Spotted Wilt Virüs in Habanero and Tabasco Peppers in Florida. Plant Disease, 84(10): 1154.
- MOMOL, M.T., FUNDERBURK, J.E., OLSON, S., and STAVISKY, J., 2002. Management of Tomato Spotted Wilt Tospovirus (TSWV) on Tomatoes with

- UV- Reflective Mulch and Acibenzolar-S-methyl. Proceedings of the 7th International Symposium of Thysanoptera Australian National Insect Collection, Canberra. pp. 111- 116.
- MUMFORD, R.A., BARKER, I., and WOOD, K.R., 1994. The Detection of Tomato Spotted Wilt Virus Using The Polymerase Chain Reaction. *J. Virol. Methods*, 46: 303- 311.
- MUMFORD, R.A., BARKER, I., and WOOD, K.R., 1996. The Biology of the Tospoviruses. *Ann. Appl. Biol*, 128: 159- 183.
- MUMFORD, R.A., BARKER, I., and WOOD, K.R., 1996. An improved method for the detection of Tospoviruses using polymerase chain reaction. *Journal of Virological methods* 57: 109- 115.
- MUN, H.Y., PARK, M.R., LEE, H.B., and KIM, K.H., 2008. Outbreak of Cucumber mosaic virus and Tomato spotted wilt virus on Bell pepper Grown in Jeonnam Province in Korea. *Plant Pathol. J.* 24 (1): 93- 96.
- PAPPU, S.S., PAPPU, H.R., GITAITIS, R.D., and GAY, J.D., 1998. First Report of Tomato Spotted Wilt Tospovirus infection of Watermelon in Georgia. *Plant Disease*, 82: 351.
- POURRAHIM, R., FARZADFAR, Sh., MOINI, A.A., and SHAHRAEEN, N., 2001. First Report of Tomato Spotted Wilt Virüs on Potatoes in İran. *Plant Disease*, 85: 442.
- SAMUEL, G., BALD, J. G., and PITTMAN, H.A., 1930. *Bull. Count Scient. İnd. Res. Melbourne* 44, 65 pp.
- SIVPARSAD, B.J., and GUBBA, A., 2008. Isolation and moleculer characterization of Tomato spotted wilt virus (TSWV) isolates occurring in South Africa. *African Journal of Agriculture research* Vol. 3 (6), pp. 428- 434
- ŞEVİK, M.A., ve ARLI-SÖKMEN, M., 2007. Domates Lekeli Solgunluk Virüsü' nün Thrips Türleri (Thrips tabaci Lindeman ve Frankliniella intonsa Trybom) İle Yayılış Durumunun İncelenmesi. *Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi* 27- 29 Ağustos 2007, Isparta.
- TODD, J.V., CULBREATH, A.K., and BROWN, S.L., 1995 Dynamics of vector populations and progress of spotted wilt disease relative to insecticide use in peanuts. *ISIS Acta Horticulture* 431: Tospoviruses and thrips of floral and vegetable crops.

- TURHAN, P., ve KORKMAZ, S., 2006. Çanakkale İlinde Domates Lekeli Solgunluk Vürüsünün Serolojik ve Biyolojik Yöntemlerle Saptanması. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi 12(2) 130- 136.
- ULLMAN, D.E., Cho, J.J., MAU, R.F.L., WESTCOT, D.M., and CUSTER, D.M., 1992. A midgut barrier to *Tomato Spotted Wilt Virüs* acquisition by adult western flower thrips. Phytopathology, 82: 1333- 1342
- WANGAI, A.W., MANDAL, B., PAPPU, H.R., and KILONZO, S., 2001. Outbreak of *Tomato Spotted Wilt Virüs* in Tomato in Kenya. Plant Disease, 85: 1123
- WILLIAMS, L.V., LOPEZ-LAMBERTINI P.M., SHOHARA, K., and BIDERBOST, E.B., 2001. Occurrence and Geographical Distribution of Tospovirus Species Infecting Tomato Crops in Argentina. Plant. Disease, 85: 1227- 1229.
- WILSON, C.R., WILSON, A.J, and PETEHYBRIDGE, 2000. First Report of *Tomato Spotted Wilt Virüs* in Common Agapanthus. Plant Disease, 84: 491.
- WHITFIELD, A.E., CAMPBELL, R., SHERWOOD, J.L., and ULLMAN D.E., 2003. Tissue Blot Immunoassay for Detection of *Tomato Spotted Wilt Virus* in *Ranunculus asiaticus* and Other Ornamentals. Plant Disease, 87: 618- 622
- WOLCAN, S., RONCO, L., DAL BO, E., LORI, G., and ALIPPI, H., 1996. Disease on Lisianthus in Argentina. Plant Disease, 80: 223
- YUDIN, L.S., TABASHNIK, B.E., CHO, JOURNALJOURNAL, and MITCHELL, W.C., 1990. Disease Prediction and Economic Models for Managing *Tomato Spotted Wilt Virüs* Disease in Lettuce. Plant Disease, 74: 211- 216.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Adana'nın Seyhan ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Adana'nın Seyhan ilçesinde tamamladım. 2002 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünden Ziraat Mühendisi olarak mezun oldum. 2006 yılı Bahar döneminde Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Bitki Koruma Anabilim dalının öğrencisi olarak kaydoldum. 2006 yılında başlayan yüksek lisans öğrenimimi, 2007-2009 yılları arasında yapmış olduğum tez çalışmasının sona ermesi ile tamamlamış bulunmaktayım.

EKLER

Ek 1.

ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4 (Fosfat tampon çözeltisi)

8.0 gr	NaCl
0.2 gr	KH ₂ PO ₄
2.9 gr	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O veya
	2.3 gr Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O
	1.44. gr Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O
	1.15 gr Na ₂ HPO ₄ (anhdrous)
0.2 gr	KCl
0.2 gr	NaN ₃

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH sı 0.1 N NaOH veya 0.1 N HCl ile ayarlanmış ve 4 °C’ de saklanmıştır.

2. Coating buffer pH 9.6 (Kaplama tampon çözeltisi)

1.59 gr	Na ₂ CO ₃
2.93 gr	NaHCO ₃
0.2 gr	NaN ₃

Yukarıda miktarı verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH sı ayarlanmış ve 4 °C’ de saklanmıştır.

3. Washing Buffer (Yıkama tampon çözeltisi)

Bir litre PBS tamponu 0.5 ml Tween-20 ilave edilerek hazırlanmıştır.

4. Sample Extraction Buffer (Örnek tampon çözeltisi)

Bir litre yıkama tamponu çözeltisi içine 20 gr Polyvinylpyrrolidone (PVP-40) ilave edilerek hazırlanmıştır

5. Enzyme Conjugate Buffer (Konjugat tampon çözeltisi)

Bir litre örnek tampon çözeltisine 2 gr ovalbumin (egg albumin) ilave edilerek hazırlanmıştır.

6. Substrat Buffer pH 9.8 (Substrat tampon çözeltisi)

97 ml Diethanolamine 800 ml saf su içine ilave edildikten sonra 0.2 gr NaN_3 konmuş ve HCl ile pH 9.8'e ayarlanarak 1 litreye tamamlanmıştır.

Ek. 2

Total RNA Analizlerinde Kullanılan Solüsyonlar

Ekstraksiyon Buffer (100mM Tris-HCl pH.8.0, 50mM EDTA pH. 7.0, 500 NaCl, 10mM 2. mercapto-ethanol (1/1000))

Tris-HCl	2.4228 gr
EDTA	3.7224 gr
NaCl	5.844 gr

Yukardaki miktarlar 150 ml distile su içerisinde sırasıyla çözülmüş, pH ayarlaması yapılmış ve toplam hacim 200 ml' ye tamamlanmıştır. Daha sonra 1/1000 oranında 2- Mercaptoethanol ilave edilmiştir.

% 20 Sodium Dodecyl Sülfate (SDS)

20 gr sodium dodecyl sülfate 80 ml distile su içerisinde çözülmüş ve toplam hacim 100 ml' ye tamamlanmıştır.

Potassium asetat (CH_3COOK) (5M)

49.075 gr potassium asetat 60 ml su içerisinde çözülmüş ve volum 100 ml' ye tamamlanmıştır.

Sodium asetat CH_3COONa (3M)

40.824 gr sodium asetat 60 ml su içerisinde çözülmüş ve volum 100 ml' ye tamamlanmıştır.

% 70' lik Ethanol

70 ml %99' luk ethanol ile 29 ml su karıştırılarak % 70' lik ethanol hazırlanmıştır.