

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK L

İSANS TEZİ

Asime Filiz ÇALIŞKAN

**KABAK SARI MOZAYİK VİRÜSÜ (ZUCCHINI YELLOW MOSAIC VIRUS,
ZYMV)' NÜN TANISI VE BİTKİ AKTİVATÖRLERİ KULLANILARAK
MÜCADELE OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA, 2007

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KABAK SARI MOZAYİK VİRÜSÜ (ZUCCHINI YELLOW MOSAIC VIRUS, ZYMV)' NÜN TANISI VE BİTKİ AKTİVATÖRLERİ KULLANILARAK MÜCADELE OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Asime Filiz ÇALIŞKAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu Tez 21/08/2007 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği ile Kabul Edilmiştir.

İmza.....İmza.....İmza.....

Yrd.Doç.Dr.MuharremA.KAMBEROĞLU Prof.Dr.Saadettin BALOĞLU Prof.Dr.Mehmet E. GÜLDÜR
DANIŞMAN ÜYE ÜYE

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

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: ZF2006YL92

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

KABAK SARI MOZAYİK VİRÜSÜ (ZUCCHINI YELLOW MOSAIC VIRUS, ZYMV)' NÜN TANISI VE BİTKİ AKTİVATÖRLERİ KULLANILARAK MÜCADELE OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Asime Filiz ÇALIŞKAN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Muharrem Arap KAMBEROĞLU
Yıl: 2007, Sayfa: 106

Jüri: Yrd. Doç. Dr. Muharrem Arap KAMBEROĞLU
Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU
Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR

Kabakgil yetiştiriciliği yapılan alanlarda Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV) ekonomik kayıplara neden olan en önemli virüs türlerinden biridir. Çalışma; Adana ve İçel illeri ile çevresinde örtü altı ve açık alanda yetiştirilen kabakgillerde saptanan ZYMV izolatının (ZYMV-FM) biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanısının yapılması ve bitki aktivatörlerinin ZYMV mücadelesinde kullanım olanaklarının araştırılması amacıyla 2006- 2007 yılları arasında yürütülmüştür.

Araziden toplanan ve virüslü olduğundan şüphelenilen bitkiler, öncelikle ELISA yöntemi ile testlenmiş ve hastalık oranı % 51.2 olarak hesaplanmıştır. ZYMV ile infekteli olan örnekler içerisinde biri kodlanarak, mekanik inokulasyon ve vektör ile taşıma denemesi çalışmalarında kullanılmıştır.

ZYMV ile infekteli test bitkilerinden total RNA ekstraksiyonu yapılmış ve bunlar RT-PCR yönteminde kullanılmıştır. Ayrıca ham bitki ekstraktı kullanılarak IC-RT-PCR yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforez ile test edilmiş ve beklenen band büyüklükleri gözlenmiştir.

Kabakgillerde ZYMV'ye karşı dayanıklılığın uyarılması çalışmalarında ise, ACTIGARD, MESSENGER ve ISR-2000 bitki aktivatörleri kullanılarak saksı ve arazi denemeleri ile bu hastalığa karşı etkinlikleri belirlenmiştir. ACTIGARD uygulandıktan 48 saat, MESSENGER ve ISR 2000 uygulandıktan 72 saat sonra ZYMV uygulanan bitkilerde kontrol bitkilerine göre semptom çıkış süresinde farklılıklar gözlenmiştir.

Yapılan histokimyasal boyamalar ile de; bitki aktivatörleri uygulanan bitkilerde teşvik edilmiş dayanıklılıktan dolayı meydana gelen Lignin sentezi ile H₂O₂ birikiminin varlığı saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: ZYMV, RT-PCR, Bitki Aktivatörü, SAR, Histokimyasal Boyama

ABSTRACT

MSc THESIS

<p style="text-align: center;">IDENTIFICATION OF ZUCCHINI YELLOW MOSAIC VIRUS (ZYMV) ISOLATE AND SEARCH OF POSSIBLE USING OF PLANT ACTIVATORS IN ZYMV CONTROL</p>
--

Asime Filiz CALISKAN

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

Supervisor: Asst. Prof. Muharrem Arap KAMBEROGLU
Year: 2007, Pages: 106

Jury: Asst. Prof. Muharrem Arap KAMBEROGLU
Prof. Dr. Saadettin BALOGLU
Prof. Dr. Mehmet Ertugrul GULDUR

Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV) is one of the major viruses causing economical losses in cucurbit production fields. The aim of this study, biological, serological and molecular detection of ZYMV growing cucurbit in greenhouse and field in Adana and Mersin provinces between 2006 and 2007 and possible using of plant activators in control of ZYMV.

Collected samples that suspicious infected virus of plants were firstly tested with ELISA and infection ratio was determined as 51.2% ZYMV. Positive one of them was coded and used for mechanical inoculation and vector transmission.

Total RNA extraction was done from ZYMV infected test plants and used for RT-PCR method. Moreover, plant extract was used for IC-RT-PCR method. DNA bands were observed in respected sizes after the PCR products were tested in agarose gel electrophoresis.

The effect of ACTIGARD, MESSENGER and ISR-2000 on viral disease development were determined with pot and field experiments in order to induce resistance against ZYMV on squash. ZYMV inoculation after 48 hours of ACTIGARD applications and 72 hours of MESSENGER and ISR-2000 applications were observed effective on symptom expression time compared to control plants.

Lignification and H₂O₂ mass were detected on plant activators treated and SAR developed plants by histochemical staining.

Key Words: ZYMV, RT-PCR, Plant Activator, SAR, Histochemical Staining

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Yard.Doç.Dr. Muharrem Arap KAMBEROĞLU' na sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı yapmış olduğum Viroloji Laboratuvarında başta Sayın Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU olmak üzere, laboratuvar çalışmalarlarımdaki yardımlarından dolayı Dr. Behçet Kemal ÇAĞLAR' a, Arş. Gör. Gökmen KOÇ'a ve Zir. Yük. Müh. Ayşe KARAMANLI' ya teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında büyük bir özveri ile bana yardımcı ve destek olan Zir. Yük. Müh. Bilge KÜÇÜK' e teşekkür ederim.

Çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Zir. Yük. Müh. Sencan ÜNLÜ, Zir. Müh. Fuat ÖZDEMİR, Zir. Müh. Kerem ÖZAYDIN, Zir. Müh. Ali ÇİĞİLOĞLU, Zir. Müh. Ela AKDOĞAN ve Cemal YILDIZ ile çalışmalarımı kullandığım kabak tohumlarının teminini sağlayan SEMİNİS Tohumculuk Firmasına teşekkür ederim.

Vektör ile taşıma denemesi çalışmalarımı yaprak biti temini sağlayan Sayın Doç. Dr. Serdar SATAR' a teşekkür ederim.

Dayanıklılığın uyarılması çalışmalarında yardımcı olan; M.K.Ü. Bitki Koruma Bölümü'nden Sayın Yard. Doç. Dr. Soner SOYLU ve Erciyes Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü'nden Sayın Yard. Doç. Dr. H. Handan ALTINOK'a teşekkür ederim.

Projemin yürütülmesinde çalışmalarımı maddi olarak sağlayan Ç.Ü. Araştırma Fonu Merkezine teşekkür ederim.

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

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	6
3. MATERYAL VE METOD	30
3.1.Materyal.....	30
3.1.1. Çal ışma Materyali Hakkında Bilgiler.....	30
3.1.2. Serolojik Çal ışmalarda Kullanılan Materyal.....	30
3.1.3. Vektör İle Taşıma Denemelerinde Kullanılan Materyal.....	31
3.1.4.Mekanik İnokulasyon Çalışmalarında Kullanılan Materyal	31
3.1.5. Total RNA Ekstraksiyonu Çal ışmalarında Kullanılan Materyal	32
3.1.6. Moleküler Çal ışmalarda Kullanılan Materyal.....	33
3.1.7. Agaroz Jel Elektroforez Çal ışmalarında Kullanılan Materyal.....	34
3.1.8. RFLP Yönteminde Kullan ılan Materyal.....	35
3.1.9. Dayan ıklılığın Uyarılması Çalışmalarında Kullanılan Materyal.....	35
3.1.10. Histokimyasal Boyama Çal ışmalarında Kullanılan Materyal.....	35
3.2. Metod	36
3.2.1. Bitki Örneklerinin Toplanması ve Muhafazası	37
3.2.2. Test Bitkilerinin Yeti ştirilmesi	37
3.2.3. Mekanik İnokulasyon Yöntemi.....	38
3.2.4. Vektör İle Taşıma Denemeleri	39
3.2.5. Serolojik Çal ışmalar.....	40
3.2.5.1. DAS-ELISA Testi	41
3.2.6. Total RNA Ekstraksiyonu	42

3.2.7. RT-PCR Çalışmaları	43
3.2.7.1. Amplifikasyon Sırasında Kullanılan Kimyasalların Optimum Konsantrasyonlarının Ayarlanması	46
3.2.8. RFLP Çalışmaları.....	46
3.2.9. IC-RT-PCR Çalışmaları.....	47
3.2.10. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları.....	48
3.2.11. Dayanıklılığın Uyarılması Çalışmaları.....	49
3.2.11.1. Saks Denemeleri.....	49
3.2.11.2. Arazi Denemeleri.....	51
3.2.11.3. Histokimyasal Boyamalarla Lignin Sentezinin Belirlenmesi... ..	52
3.2.11.4. Histokimyasal Boyamalarla H ₂ O ₂ Sentezinin Belirlenmesi.....	53
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	54
4.1. ZYMV İle Bulaşık Bitkilerin Belirlenmesi.....	54
4.2. Mekanik İnokulasyon Çalışmaları.....	57
4.3. Vektör ile Taşıma Denemeleri	65
4.4. ELISA Testleri.....	66
4.5. Total RNA Ekstraksiyon Çalışmaları.....	68
4.6. RT-PCR Çalışmaları.....	69
4.6.1. RT-PCR Uygulamalar 1.....	69
4.6.2. IC-RT-PCR Uygulamalar 1.....	72
4.6.3. RFLP Çalışmaları.....	73
4.7. Dayanıklılığın Uyarılması Çalışmaları.....	73
4.7.1. Saks Denemeleri.....	73
4.7.2. Arazi Denemeleri.....	78
4.7.3. Histokimyasal Boyamalarla Lignin Sentezinin Belirlenmesi.....	80
4.7.4. Histokimyasal Boyamalarla H ₂ O ₂ Sentezinin Belirlenmesi.....	83
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	86
KAYNAKLAR.....	90
ÖZGEÇMİŞ.....	103
EKLER.....	104

SİMGELER ve KISALTMALAR

ai	: Aktif Madde (active ingredient)
AT	: Aphid Transmissible
μ l	: Mikrolitre
bp	: Base Pair
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik asid
CMV	: Cucumber Mosaic Virus
DAB	: 3,3'-diaminobenzidine
dATP	: Deoksiadenozintrifosfat
dd	: Double Distile
dGTP	: Deoksiguanozintrifosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asid
dNTP	: Deoksinükleotidtrifosfat
dTTP	: Deoksitimidintrifosfat
ELISA	: Enzim-Linked Immunosorbent Assay
gr	: Gram
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
IC-RT-PCR	: Immunocapture- Reverse Transcriptase- Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ISR	: Uyarılmış Sistemik Dayanıklılık
kDa	: Kilo Dalton
Lt	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
M-MLV	: Moloney Murine Leukemia Virus
<i>Msp</i> I	: Endonükleaz Restriksiyon Enzimi
MW	: Moleküler Ağırlığı
nm	: Nanometre
NAT	: Non-Aphid Transmissible

PBS	: Potasyum fosfat-tuz tamponu
Pr	: Primer
PRSV	: Papaya Ring Spot Virus
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	: Ribonükleik asit
Rpm	: Dakikadaki Devir Say
RT	: Reverse Transcriptase
RT-PCR	: Reverse Transcriptase Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SAR	: Sistemik Kazanılmış Dayanıklılık
SqMV	: Squash Mosaic Virus
TAE	: Tris Asetik Asit EDTA
Taq	: Termo Stabil Polimeraz Enzimi
TBE	: Tris Borik Asit EDTA
Tm	: Termal Melting
TMV	: Tobacco Mosaic Virus
TSWV	: Tomato Spotted Wilt Virus
W/V	: Ağırlık/Hacim
WMV	: Watermelon Mosaic Virus
ZYMV	: Zucchini Yellow Mosaic Virus

ÇİZELGELER DİZİNİ SAYFA

Çizelge 3.1. Mekanik İnokulasyon Çalışmalarında Kullanılan Test Bitkileri.....	32
Çizelge 3.2. RT-PCR Çalışmalarında Kullanılan Primer Çiftleri ve Sentezlenen Bölgenin Moleküler Büyüklüğü.....	34
Çizelge 3.3. ZYMV-FM' in Tanılanması ve Dayanıklılığın Uyarılması Çalışmaları.....	36
Çizelge 3.4. Bitki Aktivatörlerinin Farklı Uygulama Dozları.....	51
Çizelge 4.1. Mekanik İnokulasyon Çalışmalarında İndikatör Bitkiler Üzerinde Gözlenen Simptomlar.....	57
Çizelge 4.2.ELISA Testi Sonuçlar.....	67
Çizelge 4.3. Bitki Aktivatörlerinin İnfeksiyon Oranı Üzerine Etkisi.....	77
Çizelge 4.4. Bitki Aktivatörlerinin İnfeksiyon Oranı Üzerin Etkisi.....	79

ŞEKİLLER DİZİNİ SAYFA

Şekil 4.1. Kabak Meyvesinde Deformasyon ve Si ğiller.....	54
Şekil 4.2. Kabak Meyvesinde İçe Doğru Çöküntüler.....	55
Şekil 4.3. Kabak Bitkisi Yapraklar ında Deformasyon ve İplikleşme.....	55
Şekil 4.4. Kabak Bitkisi Yapraklar ında Deformasyon ve İplikleşme.....	56
Şekil 4.5. Kavun Bitkisi Yapraklar ında Deformasyon ve Kabarcıklar.....	56
Şekil 4.6. Karpuz Bitkisi Yaprığında Deformasyon ve Kabarcıklar.....	59
Şekil 4.7. Karpuz Bitkisi Yapr ında Mozayik Simptomu.....	59
Şekil 4.8. Kavun Bitkisi Yapr ında Mozayik ve Kabarcıklar.....	60
Şekil 4.9. Kavun Bitkisi Yapr ında Damar Bantlaşması ve Mozayik.....	60
Şekil 4.10. Hıyar Bitkisi Yaprığında Mozayik ve Deformasyon.....	61
Şekil 4.11. Hıyar Bitkisi Yaprığında Mozayik ve Damar Bantlaşması	61
Şekil 4.12. Kabak Bitkisi Yaprığında Kabarcıklar.....	62
Şekil 4.13. Kabak Bitkisi Yaprığında Mozayik ve Kabarcıklar.....	62
Şekil 4.14. Kabak Bitkisinde Damar Bantlaşması	63
Şekil 4.15. Kabak Bitkisi Yaprığında İplikleşme ve Deformasyon.....	63
Şekil 4.16. <i>Chenopodium quinoa</i> Bitkisi Yaprığında Klorotik Lokal Lezyon.....	64
Şekil 4.17. <i>C. amaranticolor</i> Bitkisi Yaprığında Klorotik Lokal Lezyon.....	64
Şekil 4.18. <i>Gomphrena globosa</i> Bitkisi Yaprığında Lokal Lezyon.....	65
Şekil 4.19. Kabak Bitkisi Yaprığında Deformasyon ve Damar Açılması.....	66
Şekil 4.20. Kabak Bitkisi Yaprığında Mozayik ve Damar Açılması	66
Şekil 4.21. ZYMV'nin Agaroz Jeldeki Total RNA Bandları.....	69
Şekil 4.22. 5 nolu Primer Çifti İle Yapılan RT-PCR Sonuçları	70
Şekil 4.23. 1 nolu Primer Çifti İle Yapılan RT-PCR Sonuçları	71
Şekil 4.24. 5 nolu Primer Çifti İle Yapılan IC-RT-PCR Sonuçları	73
Şekil 4.25. ACTIGARD Uygulamasından Sonra Bitki Gelişimi.....	75
Şekil 4.26. MESSENGER Uygulamasından Sonra Bitki Gelişimi.....	76
Şekil 4.27. ISR-2000 Uygulamasından Sonra Bitki Gelişimi.....	76
Şekil 4.28. MESSENGER Uygulanan Bitkilerde Ligninleşmiş Dokular.....	81
Şekil 4.29. Bitki Aktivatörü Uygulanan Bitkilerde Oluşan H ₂ O ₂ Birikimi.....	85

1. GİRİŞ

Çukurova Bölgesi'nde, ekolojik ve ekonomik koşulların uygun olmasından dolayı, insan sağlığı ve beslenmesinde çok önemli bir yere sahip olan vitamin ve mineral maddeleri içeren sebzeler, yoğun olarak üretilmektedir. Bunlar içerisinde kabakgil (Kabak, kavun, karpuz ve hıyar) ve domates üretimi başı çekmektedir.

2004 yılı verilerine göre; Adana ili ve çevresi'nde, 580 321 ton ile karpuz üretimi dikkati çekerken, kavun 67 678 ton ile ikinci sırada yer almış, kabak üretimi de, 10 294 ton olarak gerçekleşmiş ve bu değeri 9 711 ton ile hıyar üretimi takip etmiştir. İçel ili ve çevresinde ise, hıyar üretimi 167 967 ton ile birinci sırada yer alırken, bunu 66 638 ton ile karpuz ve 31 340 ton ile kabak takip etmiştir (Anonymus, 2004).

Bitki virüs hastalıkları, diğer bitkilerde olduğu gibi, özellikle diğer hastalık etmenlerinden farklı olarak kimyasal mücadelesi olmamaları nedeniyle kabakgil yetiştiriciliğini tehdit eden en önemli problemlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu hastalık etmenleri bitkilerin normal gelişme düzenini bozmakta, anormal meyve oluşumuna neden olarak pazarlanabilir ürün miktarını düşürmekte veya meyve oluşumunu tamamen engelleyerek ekonomik anlamda büyük kayıpları meydana getirmektedir.

Kabakgillerde zararlı 32 adet virüs ve virüs benzeri hastalık etmeni rapor edilmiştir. Bunlar içerisinde; Kabak Sarı Mozayik Virüsü (Zucchini Yellow Mosaic Virus, ZYMV), Hıyar Mozayik Virüsü (Cucumber Mosaic Virus, CMV), Kabak Mozayik Virüsü (Squash Mosaic Virus, SqMV), Karpuz Mozayik Virüsü II (Watermelon Mosaic Virus II, WMV II), Papaya Ring Spot Virus (PRSV) kabakgillere zarar veren önemli virüslerden bazılarıdır (Lisa ve Lecoq, 1984; Purcifull ve ark., 1984).

Bu virüsler içerisinde, Kabak Sarı Mozayik Virüsü (ZYMV) kabakgil yetiştiriciliğini tehdit eden ve ekonomik olarak büyük ürün kayıplarına yol açan en önemli virüslerden bir tanesidir (Lovisol, 1980).

ZYMV, ilk olarak 1981 yılında İtalya'da saptanmış (Lisa ve ark., 1981) ve daha sonra dünyanın kabakgil yetiştirilen birçok ülkesinden rapor edilmiştir (Nameth

ve ark., 1983; Lesemann ve ark., 1984; Lisa ve Lecoq, 1984; Davis, 1986; Dolores ve Valdez, 1988).

Ülkemizde ise, ilk olarak 1984 yılında Davis ve Yılmaz tarafından saptanmış ve daha sonra kabakgillerde ekonomik olarak önemli kayıplara neden olan en yaygın virüslerden biri durumuna geldiği bildirilmiş ve üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan survey çalışmaları, ELISA testi ile testlenen 75 örneğin 58 tanesinde ZYMV enfeksiyonu saptanmıştır (Yılmaz ve ark., 1992; Yılmaz ve ark., 1994).

ZYMV, potyvirus üyesidir ve kırılımlı iplikli partiküllere sahiptir. 750 nm uzunlukta yaklaşık 9600 nükleotidli tek iplikçikli RNA içermektedir. 36 kDa büyüklüğünde kılıf proteini vardır.

Bu virüs hastalığı, bulaşık bitkilerde bodurluk, kloroz, deformasyon, mozayik, genç sürgünlerde iplikleşmeye ve çiçek azalmasına neden olmakta ve buna bağlı olarak da ürün kayıplarına yol açmaktadır (Blua ve Perring, 1992).

Başta *Aphis gossypii* ve *Myzus persicae* olmak üzere Aphididae takımından birçok yaprak biti ile non-persistent olarak (Ullman, 1991) çok etkin ve kolay bir şekilde yayılabilen ZYMV ile mücadele etmek için, vektörlere karşı kimyasal mücadele uygulanması, arazinin malç veya plastik örtülerle kaplanması, ayrıca transgenik bitki hatlarının kullanılması gibi yöntemler hastalığı belirli oranlarda azaltmakta ve bir miktar pazarlanabilir kalitede meyve üretimi yapılabilmektedir (Summers ve ark., 1995; Clough ve Hamm, 1995).

ZYMV'ye karşı en başarılı sonuçlar ise, cross protection çalışmalarında elde edilmiş ve ZYMV'nin zayıf ırkı (ZYMV-WK) şiddetli ırka karşı başarı ile kullanılmıştır (Wang ve ark., 1991).

Bitki virüs hastalıkları ile mücadele etmek amacıyla, kültürel önlemler, kimyasal (vektör mücadelesi amacıyla) ve fiziksel savaşımlar, karantina ve biyoteknolojik yöntemler kullanılmıştır. Son yıllarda ise, bunlara alternatif olabilecek kontrol yöntemleri üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Özellikle fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı başarı ile uygulanan ve bitkinin doğal savunma mekanizmasının uyarılması esasına dayanan "Sistemik Kazanılmış Dayanıklılık (SAR; Systemic Acquired Resistance)" yöntemi viral etmenler için yapılan çalışmalarda da ön plana çıkmaya başlamıştır.

İlk olarak 1933 yılında Chester adlı araştırmacı tarafından bildirilen bu görüş, bitkilerin doğal savunma mekanizmasının bir tetikleyici tarafından uyarılarak kendilerini patojen saldırılarına karşı korumalarına dayanmaktadır.

Uyarılmış dayanıklılıkta (IR); dayanıklılığın sistemik olarak bitkinin uygulama görmemiş kısımlarına yayılması Sistemik Kazandırılmış Dayanıklılık (SAR) olarak adlandırılmaktadır.

Doğal savunma sistemini harekete geçiren bu tetikleyicilere bitki aktivatörü denilmektedir. Bitki aktivatörleri; bitkilerin doğal savunma sistemlerini aktive eden, besin maddelerinden daha iyi yararlanmalarını sağlayan, stres koşulları ve benzeri dış etmen ve etkenlerden korunması için yardımcı olan ve/veya verimini ve ürün kalitesini olumlu yönde etkileyen doğal ve/veya kimyasal güçlendirici, direnç artırıcı, toprak yapısını düzenleyici özellikleri olan ve bu özelliklerden birini veya birkaçını bir arada taşıyan maddelerdir.

Günümüzde bitkilerde dayanıklılığın uyarılması çalışmalarında, patojen olmayan fungus veya bakteri inokulasyonu, fungus veya mayaların hücre duvarından ekstrakte edilen oligosakkaritler gibi biyotik uyarıcılar, Acibenzolar-S-Methyl (ASM), UV Işık, ISR 2000, Messenger, Crop-Set, Herbisitler, β Amino Butyric Asit (BABA) ve Salisilik Asit (SA) gibi abiyotik uyarıcılar kullanılmaktadır.

Son yıllarda çok yoğun olarak çalışılan ve salisilik asitin bir analogu olan Acibenzolar-S-methyl (ASM) uygulaması sonucu elde edilen tetiklenmiş dayanıklılık sayesinde, bitki korumada yeni bir koruma sistemi geliştirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, ASM'nin kavun bitkisinde uygulaması, fungal bir patojen olan *Colletotrichum lagenarium* ve viral bir etmen olan Cucumber Mosaic Virus (CMV)'ye karşı etkili olmuştur. Açık alanda ve serada yapılan bu çalışmada, SAR sonucu, sistemik bir kitinaz birikimi gözlemlenmiştir. ASM'nin 50 veya 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'si sera denemelerinde, CMV'nin yayılımını sınırlamıştır. Ayrıca fungal etmene karşı da tam bir koruma sağlamıştır. CMV'nin baskısı ortadan kalktığı anda, ASM'nin meyve üretimi üzerine herhangi bir olumsuz etkisi saptanmamıştır (Smith-Becker ve ark., 2003).

ABD'nin güneydoğusunda domateslerde sık sık meydana gelen ve *Frankliniella occidentalis* ve diğer thrips türleri ile de taşınan *Tomato Spotted Wilt*

Virus (TSWV)' in sebep olduğu lekeli solgunluk virüsü sorun oluşturmaktadır. Yapılan bir çalışmada, tarla denemeleri ile insektisitler, Acibenzolar-S-Methyl, siyah ve UV yansıtımlı malçların, çiçek thripslerinin canlı popülasyonu ve TSWV'nin yayılma oranı üzerine etkileri belirlenmiş ve mukayese edilmiştir. Siyah polietilen ve UV yansıtımlı malç üzerinde yetiştirilen domates alanları, thrips kontrolü için insektisit uygulanmış ve uygulanmamış, ASM uygulamalı ve ASM uygulamalı parsellere bölünmüştür. Bu çalışma sonucunda, UV yansıtımlı malç sistemi ile thripslerin kolonizasyonu ve bunun sonucu olarak TSWV'nin ilk infeksiyonu azaldığı ve siyah polietilen malçtan daha etkili olduğu saptanmıştır. 2000- 2002 yılları arasında hastalık baskısının yüksek olduğu dönemlerde, ASM uygulaması TSWV'nin hastalık şiddetini azaltmıştır. Bu arazi denemelerinde, UV yansıtımlı malç sistemi kullanılan, ASM uygulanan ve insektisit atılan ayrı ayrı parsellerde domates bitkilerinde TSWV oranında etkili bir azalma saptanmıştır (Momol ve ark., 2004).

Amerika'nın güneydoğu bölgesinde TSWV, domates bitkisine ilaveten, biber, tütün, fındık üretimini de sınırlayan en önemli faktörlerden bir tanesidir. Bu ürünler üzerinde TSWV'nin etkisini azaltmak amacıyla bazı programlar geliştirilmiştir. Yerfıstığı, domates ve biberde TSWV'ye karşı dayanıklı kültür hatları geliştirilmiş, fakat tütün için henüz böyle bir hat bulunamamıştır. Mandal ve ark. (2001) tarafından yapılan bir araştırma sonucunda; ASM ve/veya İmidacloprid uygulamasının tarla koşulları altında bu hastalık için zararını önemli ölçüde azalttığı ortaya konulmuştur. ASM uygulaması ile elde edilen SAR'ın bir sonucu olarak uygulama yapılan bitkilerde dayanıklılık mekanizması meydana gelmiştir. Başlangıçta elde edilen sonuçlarda SAR, ASM uygulamalı tütün bitkilerinde patojene bağlı proteinler (PR)'in seviyesini arttırmıştır.

Teşvik edicilerin uygulanması sonucunda bitkilerde biyokimyasal savunma reaksiyonları oluşarak, lokalize hücre ölümü (HR; Hypersensitive Reaction), lignifikasyon ve papilla oluşumu, patogeneze bağlı proteinlerin (PR) sentezi ile fitoaleksinlerin sentezi ve birikimi şeklinde çeşitli savunma mekanizmaları harekete geçirilmektedir. Bunlar içerisinde, lokalize hücre ölümü (HR) sonucunda, patojenin büyümesi sınırlanmakta ve böylelikle konukçu bitki patojene karşı dayanıklı hale

gelmektedir. Di ğer bir ifade ile HR, patojen infeksiyonu sonucu patojenin girdi ği noktadan itibaren konukçu bitki hücrelerinin hızla ölererek nekrotik bir durum alması sonucu patojenin bitki içerisinde yayılamaması olarak da ifade edilmektedir.

Bitkilerde dayanıklılığı teşvik eden bitki aktivatörleri kullanılarak, bitkilerde bulunan savunma mekanizmalarının virüslere karşı harekete geçirilmesi ve bunun pratikte uygulanabilirliği üzerine çeşitli araştırmalar yapılmış ve bitki aktivatörlerinin Tütün Mozayik Virüsü (TMV), Harpin Mozayik Virüsü (CMV), Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV) gibi bazı virüslerin infeksiyonu, hastalık şiddeti ve yaygınlığı üzerine etkisi ile di ğer bazı kültürel uygulamalarla mukayese edilerek virüslerin mücadelesinde kullanılabileceği araştırılmıştır (Smith-Becker ve ark., 2003; Momol ve ark., 2004).

Yapılan bu çalışmada, ACTIGARD (Acibenzolar-S-Methyl Ester), MESSENGER (Harpin-EA) ve ISR-2000 gibi bitkilerde hastalıklara karşı dayanıklılığı ve bitkinin gelişmesini teşvik eden aktivatörlerin, kabak bitkisi üzerinde ZYMV infeksiyonu, symptom çikliği ve hastalık oranı üzerine etkisi araştırılmıştır. Ayrıca bu çalışmada kullanılan ZYMV izolatının biyolojik, serolojik ve moleküler tanısı ile karakterizasyonu yapılmıştır.

Elde edilen bu ümit var sonuçların, bundan sonra yapılacak olan arazi çıkışlarıyla veya firmalar aracılığıyla kabakgil üreticiliği yapan çiftçilere aktarılması ve pratikte kullanılması sağlanacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. ZYMV ile İlgili Önceki Çalışmalar

ZYMV, potyvirus grubunun bir üyesi olup (Hollings ve Brunt, 1981; Murphy ve ark., 1995), 750 nm uzunluğunda ipliksi partiküllere sahiptir (Lisa ve ark., 1981). Bu virüs yaklaşık 9600 nükleoid uzunluğunda tek-iplikçikli RNA'dan ibarettir (Ballint ve ark., 1990).

ZYMV, ilk olarak 1981 yılında İtalya'da saptanmış (Lisa ve ark., 1981) ve daha sonra dünyanın kabakgil yetiştirilen birçok ülkesinden rapor edilmiştir (Nameth ve ark., 1983; Lesemann ve ark., 1984; Lisa ve Lecoq, 1984; Davis, 1986; Dolores ve Valdez, 1988).

Meyve ve yapraklarda şiddetli deformasyon şeklinde semptomlara neden olan bu virüs hastalığından dolayı, bazı ülkelerde %80 ve daha fazla oranlarda ürün kayıpları meydana gelmiş ve kabakgil üretimi sınırlandırılmıştır (Al-Shahwan, 1990; Stobbs ve Van Schagen, 1990).

ZYMV, diğer potyviruslerde olduğu gibi yaprak bitleri ile non-persistent olarak taşınmaktadır (Lisa ve ark., 1981; Lecoq ve ark., 1991). *M. persicae* ve *Aphis gossypii* ZYMV'nin en önemli vektörleri olarak bildirilmiştir (Lisa ve Lecoq, 1984; Purcifull ve ark., 1984; Castle ve ark., 1992). Bunlardan başka *Macrosiphum euphorbiae*, *Aphis citricola*, *Aphis craccivora*, *Aphis spiraecola* ve *Acyrtosiphon pisum*' da ZYMV'yi değişik oranlarda taşımaktadır (Adlertz, 1987).

Katis ve ark., (2006) laboratuvar koşullarında yaptıkları çalışmada, kabak bitkilerine Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV) taşıyabilme yeteneğinde olan 19 tür yaprak biti kullanılmışlar ve bunlardan 16 türü ZYMV'nin yeni vektörü olarak bulmuşlardır (*Aphis cracciae*, *Aphis fabae*, *Aphis nerii*, *Aulacorthum solani*, *Brachycaudus cardui*, *Brevicoryne brassicae*, *Hyalopterus pruni complex*, *Hyperomyzus lactucae*, *Macrosiphoniella sanborni*, *Macrosiphum rosae*, *Metopolophium dirhodum*, *Myzus cerasi*, *Rhopalosiphum maidis*, *R. padi*, *Semiaphis dauci* ve *Sipha maydis*). Bu virüsün taşınmasında bir yaprak biti bireyi bile etkilidir, fakat genelde taşıma oranı düşüktür (%0.1- 4.2). Araştırmacıların yaptıkları bu

çalışmada, *Myzus persicae* kontrol olarak kullanılmış ve bu virüsün en etkili vektörü olarak saptanmıştır (bitki başına bir yaprak biti, %41.1). *Hayhurstia atriplicis*, *Myzus ascalonicus* ve *Sitobion avenae* türleri ise, bu virüsü taşımamıştır. Altı yeni vektör dışında dördü açık alanda testlenmiş ve etkilerinden daha yüksek eğişimde bulunmuşlardır. Kuzey Yunanistan' daki kabak yetiştirilen alanlarda yapılan deneme sonuçları, vektör türleri ile ZYMV' nin yayılımı arasında bağlantı olduğunu göstermiştir. İki yıllık deneme boyunca *M. persicae*, *Aphis gossypii* ve *A. spiraeicola* en etkili yaprak biti vektörleri olmuştur. ZYMV epidemiyolojisinde daha önceden bilinen türler ile yeni 16 tür yaprak biti vektörlerinin kombinasyonlarının taşınmada etkili olduğu saptanmıştır.

Summers ve ark. (1995); Clough ve Hamm (1995), ZYMV ile mücadele etmek için, vektörlere karşı kimyasal mücadele uygulanmasının, arazinin malç veya plastik örtülerle kaplanması şeklindeki uygulamaların ve transgenik bitki hatlarının kullanılmasının enfeksiyonu belirli oranlarda azaltabildiğini ve bir miktar pazarlanabilir kalitede meyve üretildiğini bildirmişlerdir. Bunlara ilaveten, Al-Shahwan ve ark. (1995), ZYMV' ye karşı elde edilen dayanıklı bitki hatlarının bir kısmının gerçekte tolerant olduğunu, bazılarıının da virüsü bünyesinde bulundurduğunu, fakat sınırlandırılmış sonucunu elde etmişlerdir.

ZYMV mücadelesinde en başarılı sonuçlar, cross protection çalışmaları ile elde edilmiş ve ZYMV' nin zayıf ırklar (ZYMV-WK) şiddetli ırka karşı başarılı ile kullanılmıştır. Wang ve ark. (1991) yaptıkları bir çalışmada, ZYMV' nin zayıf ırkının uygulandığı alanlarda, kontrol bitkilere göre 40 kat daha fazla pazarlanabilir ürün elde edildiğini bildirmişlerdir.

Diğer virüs hastalık etmenlerinde olduğu gibi, ZYMV' nin biyolojik, serolojik ve moleküler düzeyde karakterizasyonu ve virüs izolatlarının çeşitliliğinin ortaya konulması, hastalığa karşı kullanılacak olan mücadele stratejilerinin belirlenmesinde ve dayanıklılık çalışmalarında etkili olmaktadır. Ayrıca, antijenik farklılıklardan dolayı teşhis yöntemlerinde ortaya çıkan problemlerin ortadan kaldırılması da gereklidir.

Desbiez ve ark. (1996) yaptıkları çalışmada, Martinique adasında farklı bölgelerden, farklı konukçular üzerinde 14 tane ZYMV izolatını toplamışlar ve bunlar

arasında biyolojik ve serolojik olarak çok belirgin farklar olduğu saptanmıştır. Aynı araştırmacılar, 1992 yılına kadar adada ZYMV epidemisinin gözlenmediğini, en azından virüsün meydana getirdiği tipik semptomlara rastlanmadığını, bu izolatların adaya tohum veya infekteli bitki materyalleriyle veya vektörler yoluyla girmiş olabileceğini bildirmişlerdir.

Sidek ve ark. (1999) ise, iki Malezya izolatını izole ettiklerini, bunların konukçu bitkiler üzerinde çok az farklılıklar gösterdiğini, kılıf proteini nükleotidlerini ve aminoasit dizilimlerini mukayese ettiklerinde, kılıf proteininin 9. ve 32. aminoasitlerinde fark olduğunu saptamışlardır.

ZYMV, ülkemizde ilk olarak 1984 yılında Davis ve Yılmaz tarafından saptanmış ve daha sonra kabakgillerde ekonomik olarak önemli kayıplara neden olan en yaygın virüslerden biri durumuna geldiği bildirilmiştir. Yapılan survey çalışmalarında ELISA testi ile testlenen 75 örneğin 58 tanesinde ZYMV enfeksiyonu saptanmıştır (Yılmaz ve ark., 1992; Yılmaz ve ark., 1994). Daha sonra, Fransa’da bu virüsün zayıf bir izolatı bulunmuş (Lecoq ve ark., 1991) ve ülkemizde de ZYMV ile mücadele amacıyla cross protection çalışmaları kullanılmıştır (Yılmaz ve ark., 1994).

Mahgoub ve ark. (1997), Gezira Bölgesi’nde (Sudan) 1993 yılında; yaprak ve meyvede ciddi şekil bozukluğu gösteren kabak bitkilerinden alınan örneklerden Zucchini Yellow Mosaic Potyvirusü izole etmişler ve bu izolatın (ZYMV-Su), İtalya ırkı ile aynı tip olmadığını, fakat serolojik olarak çok yakın akraba olduğu saptamışlardır. Aynı araştırmacılar, ZYMV’nin konukçularının genellikle Cucurbitaceae familyasına bağlı bitkiler olmasına rağmen, bu izolatın Sudan’da önemli olarak yetiştirilen susam (*Sesamum indicum*) bitkisinde sistemik enfeksiyona neden olduğunu, dayanıklı kavun çeşitlerinde mozayik semptomları meydana getirdiğini ve *Myzus persicae* ve *Aphis gossypii* ile non-persistent olarak taşındığını ortaya koymuşlardır.

Shih-Shuh ve ark. (2001), 5 cDNA klonisinden belirledikleri, Zucchini Yellow Mosaic Virus Taiwan izolatının (ZYMV TW-TN3) RNA genomundan nükleotid dizilim analizi yaparak, 3080 aminoasitlik kodsuz genişi polypeptinlerin (ORF) varlığını ortaya koymuşlardır. Bu TW-TN3 izolatını, daha önce rapor edilen

California (CA), Reunion Island (RU) ve Singapore (S) izolatları ile karşılaştırdıklarında, P1 proteinlerindeki aminoasitlerinin % 59.0- 93.2 arasında benzerlik gösterdiğini saptamışlardır. TW-TN3 izolatı, diğer izolatlar ile 5' UTR ucunda % 61.6- 83.3, 3' UTR ucunda ise, % 90.4- 95.7 oranında benzerlik göstermiştir. P1 proteinin yapılan dizilim analizi sonunda ortaya çıkan filogenetik haritada, TW-TN3 izolatı ile rapor edilen diğer 6 ZYMV izolatından 4' ü arasında önemli benzerlikler bulunmuştur.

Prieto ve ark. (2001), 1995 yılından beri Şili' de bilinen ve ELISA testi kullanılarak saptanan ZYMV' nin; otsu indikatör bitkiler üzerindeki simptomlara, immunospesifik elektron mikroskobu altında partikül morfolojisine ve 3' ucundaki 395 bp' lik baz dizilimine göre ZYMV izolatını tanımlamış ve karakterize etmişlerdir. Kavun, karpuz ve kabakta üzerinde saptanan ZYMV Şili izolatının 740 nm uzunluğunda esnek iplikli partikül yapısında ve yaklaşık olarak 36 kDa büyüklüğündeki bir protein yapısında olduğu saptanmıştır. Aynı araştırmacılar, 3' ucundaki kılıf proteininin nükleotid dizilimi karşılaştırıldığında, Connecticut ve Kaliforniya ırkı ile aşırı benzerlik gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Greber ve ark. (1988), yaptıkları çalışmada, Avustralya' nın dört farklı bölgesinden 6 kabakgil türünden Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV) izolatlarını elde etmişler ve serolojik, elektron mikroskobu ve biyolojik olarak tanımlamışlardır. 1986- 87 yıllarında kıyı bölgesi olan Queensland' in kıyı şeridinde yaptıkları surveylerde, güneydoğu Queensland, Bowen ve Ayr çevresi gibi önemli merkezlerde ZYMV' nin spesifik patotiplerini saptamışlar, fakat kuzeyde Townsville ya da Rockhampton etrafında ZYMV simptomuna rastlamamışlardır. Patotiplerin ayırmalarını, kavun, *Trichosanthes anguina* ve fasulye bitkileri kullanılarak yapmışlardır. Ayrıca, ZYMV' nin 3 izolatını, PRSV ve WMV' nin kabakgil ırkları ile karşılaştırmak amacıyla, 5 familyaya dahil 20 konukçu bitki üzerine aşılama yapmışlardır. Araştırmacılar, ticari olarak kabakgil yetiştiriciliği yapılan alanlarda kurdukları denemelerde yazlık ve güzlük kabak ile hıyar ve karpuzların ZYMV' den en fazla etkilendiğini ortaya koymuşlardır. Kabaktan elde edilen bir ZYMV izolatının tohum ve *Aphis gossypii* yaprak biti ile taşınabildiğini bildirmişlerdir.

2003 yılında Pakistan’ da geleneksel tarım yöntemi ile kavun yetiştirilen alanlarda bitkilerde sararma, yaprak kıvrıklığı ve deformasyon, damar açılması ve kontrol dışı gelişme gözlenmiş ve bu hastalık % 100 ürün kayıplarına neden olmuştur. 2004 yılında benzer belirtiler ve kayıplar ortaya çıkmıştır. Etmenin saptanması amacıyla, birkaç bölgeden infekteli bitki örnekleri toplanmış ve CMV ve ZYMV’ye karşı DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiştir. Örneklerin toplandığı bölgelerde kavun tarlalarına yakın yerlerde yetiştirilen domateslerde düşük oranda CMV saptanmış, fakat kavunda rastlanmamıştır. ZYMV, kavun bitkilerinden indikatör bitkiler üzerine (kavun, hıyar ve *Nicotiana benthamiana*) mekanik inokulasyon yöntemi ile taşınmış ve aşılama yapılan kavun fidelerinin genç yapraklarında ZYMV’ nin tipik belirtiler meydana gelmiştir. Yaygın kabakgiller potyviruslerinden Watermelon Mosaic Virus (WMV)’ ün konukçusu olan *Nicotiana benthamiana*’ da herhangi bir enfeksiyona rastlanmamıştır. Bu kavunda hastalığa sebep olan virüsün ZYMV olduğunu doğrulamıştır. ZYMV, Pakistan’ da kuzeybatı bölgesinde toplanan örnekler üzerinde % 15 oranında saptanmış ve daha önce rapor edilmesine rağmen bu çalışmada infekteli kavun bitkileri rapor edilmemiştir (Malik ve ark., 2006).

İlk olarak 1973 yılında İtalya’ da saptanan ve 1981 yılında tanımlanan Zucchini Yellow Mosaic Potyvirus (ZYMV), son on yıl içerisinde tüm kıtalarda teşhis edilmiş ve kabakgiller yetiştiriciliğinde ekonomik anlamda en önemli virüslerden biri olmuştur. ZYMV, hem yaprak bitleriyle non-persistent olarak, hem de yazlık kabaklarda tohum ile taşınabilmekte ve geniş alanlara çok hızlı bir şekilde yayılabilmektedir. ZYMV izolatlarının biyolojik değişkenliği ile ilgili olarak; konukçu çeşitliliği, semptomatolojik ve yaprak bitiyle taşınabilirliği göz önüne alınmıştır. En son yapılan çalışmalarda moleküler ve serolojik özellikleri göz önüne serilmeye çalışılmıştır. Çapraz korunma yöntemi ile zayıf ırkının ZYMV’ nin şiddetli ırkına karşı etkili olduğu gözlenmiştir. Dayanıklı genler uygulanarak iyi agronomik özellikler ile yetiştiriciliklere yenilik getirebilecek kabakgiller germplazmaları elde edilmiştir (Desbiez ve ark., 1997).

Fiziksel yapısı ve mevcut biçimleri ile Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV) ve Watermelon Mosaic Virus (WMV)’ ün yayılımında yaprak biti

vektörünün transgenik olmayan ZW-20H (geleneksel çeşit Freedom II) ve transgenik olan (ZW-20B) çeşitlerinde birbirini izleyen iki yıl boyunca, ZYMV ve WMV kılıf proteini genlerinin elde edilmesinde kullanılmışlardır. Birinci virüs kaynağından alınmış ve transgenik olan ve olmayan test bitkilerine mekanik inokulasyon yöntemi ile ZYMV ve/veya WMV bulaştırılmıştır. ELISA testlerinin sonucuna göre; bütün deneme alanlarında transgenik bitkilerin hiçbiri ZYMV ve WMV enfeksiyonunda sistemik belirtiler sergilememiş, fakat bazılarında lokalize olmuş klorotik lekeler ve/veya kabarcıklar veya düşük karışık enfeksiyon oranı; ZW-20H bitkilerinde %4 (139 bitkiden 6'sı) ve ZW-20B bitkilerinde %9 (139 bitkiden 13'ü) olarak meydana gelmiştir (Klas ve ark., 2006).

Polonya'da geleneksel yöntemlerle yetiştiricilik yapılan kabaklarda 2005 yılının Ağustos ayında yapraklarda sararma ve mozayik, yeşil meyvelerde sarı noktalar gibi belirtiler gözlenmiş ve belirtiler gösteren bitkilerden indikatör bitkiler üzerine yapılan mekanik inokulasyonlar sonucunda, *Citrullus lanatus*, *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *C. pepo* cvs. *giromontiina* ve *patissoniana*, *C. maxima* ve *Nicotiana benthamiana* bitkilerinde sistemik enfeksiyonlar meydana gelmiştir. Serada yetiştirilen ve virüs ile mekanik olarak infekteli kabak bitkileri (cvs. *giromontiina*) yapraklarında da şiddetli şekil bozuklukları ve bitkilerde bodurluk gibi belirtiler gözlenmiştir. ZYMV ile mekanik olarak infektelenmiş *C. pepo* cvs. *giromontiina* ve *Nicotiana benthamiana* bitkileri (DAS)-ELISA yöntemi ile testlenmiş ve daha sonra universal primerler kullanılarak yapılan (RT)-PCR testlerinde 1740 bp'lik kısımlar pGEM-T vektör içerisinde çoğaltılmıştır. Üç izolat tesadüfi olarak seçilmiş ve dizilimi yapılmıştır. 837 bp'lik dizilim bütün kılıf protein geninin uzunluğunu temsil etmektedir ve kısım diğer ZYMV izolatlarının dizilimi ile karşılaştırılmıştır. İzolatlar arası genetik farklılıklar, Kimura'nın iki parametre methodu ile hesaplanmıştır. Polish izolatının (ZYMV- Zug) Avrupa'dan daha çok Asya izolatı ile yakın akraba olduğu belirlenmiştir. ZYMV- Zug izolatı Çin'den Shangdong ve Shanxi izolatları ile %99 amino asit ve %94 nükleotid benzerlik ve diğer ZYMV Avrupa izolatları ile % 91-92 amino asit ve % 81-82 nükleotid benzerlik göstermiştir (Pospieszny ve ark., 2007).

Slovakya ve Çek Cumhuriyetleri'nde 2001 ve 2006 yılları arasında yazlık ve günlük kabaklar ile hıyardan toplanan 11 çeşitli ZYMV izolatının biyolojik ve moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Moleküler analizlerde, ZYMV genomunun hedeflenen 3 bölüme bölünmüş genomik bölgesi [P1, P3 ve (Cter) NIB- (Nter) CP] çoğaltılarak izolatlar arasında düşük seviyede nükleotid değişkenliği gözler önüne serilmiştir. Filogenetik analizler, Slovakya, Çek ve diğer Avrupa izolatlarının CP geninin 5' terminal ucunda vurguladığı yakınlıkla bağılantıya dayandırılmıştır. ZYMV izolatlarının Merkez Avrupa içinde düşük seviyedeki genetik farklılığı, Asya partiküllerinde diğer coğrafik bölgelerdeki izolatlar ile arasındaki farklılıklar gözlenmiştir. Dizilim karşılaştırması, şiddetli ve zayıf ZYMV izolatları arasında P3 proteinin N- terminal bölgesinde farklı bir aminoasidin olduğunu göstermiştir (Glaser ve ark., 2007).

Patojenik olmayan bir zayıf ırkın kullanımı çapraz korumada bitki virüslerinin kontrolü için esaslı bir yöntemdir. Üç aminoasidin değişikliği, Arg180→Ile180 (GA mutasyon), Phe205→Leu205 (GB mutasyon) ve Glu396→Asn396 (GC mutasyon) Zucchini Yellow Mosaic Virüsü'nün şiddetli ırkının (TW- TN3) helper component- protease'nin (HC- Pro) korunan yapısı; yeşil floresans proteinini taşıyan enfeksiyon yapabilen cDNA kolonileri tarafından meydana getirilmektedir. Enfeksiyon yapabilme yeteneğinde olan tek, çift yada üçlü mutasyonları içeren her bir mutant lokal ve sistemik konukçularda denenmiştir. *Chenopodium quinoa* bitkileri üzerinde GB mutantı nekrotik lezyonlara, GA, GC ve GBC mutantları klorotik lekeler ve GAB ve GAC mutantları ise, lokal enfeksiyonlara neden olmaktadır. Kabak bitkilerinde GA, GB, GC ve GBC mutantları hafif mozayiklere sebep olurken, GAC mutantı küçük yaprak lekelerine neden olmuş, GAB mutantı ise, dikkat çeken belirtiler oluşturmamıştır. Aynı zamanda, GAC mutantı yaprak bitleri ile virüsün taşınmasında tam bir çapraz koruma sağlamıştır (Lin ve ark., 2006).

Su kabağı (*Cucurbita pepo* L. Subsp. *pepo* var. *Styriaca* GREB.) fidelerine 48 saat sonra yapay olarak hücrelerdeki glutathione içeriğini arttırmak amacıyla, 1mM'lık OTC (L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid) uygulanmış ve uygulamadan 10 gün sonra bu bitkilere Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV) inokule edilmiştir.

OTC uygulamasının ve ZYMV enfeksiyonunun glutathione seviyesi üzerine etkileri, hücreler arası seviyede transmission elektron mikroskop (TEM) ile incelenmiştir. Bu etkiler diğer bir test olan HPLC yöntemi ile kök, kotiledon ve ilk gerçek yapraklarda OTC uygulamasından hemen sonra hücrenin farklı bölümlerinde glutathione seviyelerinin artması ile ZYMV uygulanmasında üç hafta sonra yaşlı ve genç yapraklar ile köklerde OTC uygulamasının semptom gelişimi ve glutathione seviyeleri arasındaki ilişkinin nasıl olduğu incelenmiştir. Immunocytological ve biokimyasal araştırmalar göstermiştir ki, OTC uygulamasından 48 saat sonra tüm araştırılan organlarda glutathione içeriği artmıştır. ZYMV inokulasyonundan üç hafta sonra glutathione seviyesindeki günlük infekteli yapraklarda bozulmamış hücreler içinde genç yapraklarda belirgin bir şekilde artış göstermiştir. TEM araştırmaları köklerde glutathione miktarının azaldığını göstermiştir. Biokimyasal çalışmalar; OTC uygulaması sonucunda ZYMV infekteli uygulama yapılmamış bitkilere oranla % 41-51 oranında ZYMV infekteli genç ve yaşlı yapraklarda glutathione seviyesinin yükseldiğini göstermiştir. Semptom gelişimi üzerine yapılan değerlendirmelerde tüm uygulamasız ZYMV infekteli bitkilerde semptomla rastlanırken, OTC uygulanmış ZYMV infekteli bitkilerde % 42 oranında semptom gözlenmiştir. ZYMV partiküllerinin miktarının OTC uygulamalı ve ZYMV infekteli bitkilerdeki tüm organlar uygulamasız ZYMV bitkilerindeki aynı organlar ile karşılaştırıldığı zaman beş haftalık periyotlar içinde ZYMV partiküllerinin miktarında belirgin bir azalma gözlenmiştir. Bu çalışmada, semptom görülen bitkilerde semptom gelişiminin geciktiği ve azaldığı gibi ZYMV semptomlarını bastırmada OTC uygulamalarının su kabağı bitkilerinde virüs içeriğini azaltırken glutathione içeriğini yükseltmiştir (Zechmann ve ark., 2006).

Yardımcı ve ark., (2004), Isparta ilinde kabakgöl tarlalarında ZYMV hastalığının semptomlarını gösteren yaprak ve meyve örnekleri toplanmışlar ve mekanik inokulasyon yöntemi ile test bitkilerine aşılamışlardır. Kabak bitkileri üzerinde sistemik semptomlar gözlenmiş ve bu bitkilerden double-stranded RNA (dsRNA)'lar CF-11 selüloz kromatografi yöntemi ile saflaştırılmıştır. Aynı araştırmacılar, ZYMV'nin hastalık oranını, Isparta'da gezdikleri 20 kabakgöl tarlasında

hastalık simptomsu gösteren bitkiler üzerinden hesaplam ışlar ve kabakgil tarlalar ında % 62.70 oranında, ZYMV infeksiyonu saptamışlardır.

2.2. Dayanıklılığın Uyarılması İle İlgili Önceki Çalışmalar

Bu çalışmada ZYMV' ye kar řı dayanıklılığın uyar ılması çalışmalarında bitki aktivatörü olarak kullanılan ACTIGARD, MESSENGER ve ISR-2000 hakkında bilgi ve çalışmalar aşağıda verilmiştir.

Son yıllarda çok yo ğun olarak çalışılan ve salisilik asitin bir analogu olan Acibenzolar-S-Methyl (ASM) uygulamas ı sonucu elde edilen te şvik edilmi ř dayanıklılık sayesinde, bitki korumada yeni bir koruma sistemi geli ştirilmiştir. ACTIGARD (Benzo [1,2,3] thiadiazole-7-carbothic acid-methyl ester) Acibenzolar-S-Methyl olarak bilinmektedir ve % 50 WG olarak formüle edilmiştir.

MESSENGER; *Erwinia amylovora* ' dan izole edilmi ştir ve %3 Harpin Ea proteini aktif maddesini olu şturmaktadır. Düşük toksisite ve kal ıntı azlığı nedeniyle harpin proteinleri fungusitlere kar řı alternatif olarak kullan ılabilmektedir. Bitkinin doğal savunma mekanizmasını harekete geçirmektedir.

MESSENGER' ın etkisi dört aşamada meydana gelmektedir;

- 1) Harpin proteinin bitki reseptörleri tarafından fark edilmesi,
- 2) Bunun sonucunda birçok genin harekete geçmesi ve biyokimyasal yollar ın uyarılması,
- 3) Dayanıklılık mekanizmasının aktif hale gelmesi,
- 4) MESSENGER' ın uygulamadan sonra hızlı bir şekilde bozulmasıdır.

Bu çalışmada kullanılan son aktivatör olan ISR-2000 ise; biyolojik, organik ve doğal ekstraktlar formülasyonundan olu şan yeni bir üründür. Etkili maddesi; *Lactobacillus acidophilus* , maya ekstrakt ı, bitki ekstrakt ı ve benzoik asit içermektedir. Bitkinin kendisinde var olan ancak normal koşullarda her zaman ortaya çıkmayan doğal savunma mekanizmasını harekete geçirmektedir.

ISR-2000 uygulandı ğında hastalıkları iki şekilde kontrol etmektedir.

a) ISR-2000 uygulamas ı sonucunda ince bir tabaka, yapraklar üzerini kaplayarak birikir. Bu film tabakas ı hastal ık olu Őturan patojenlerin bitki dokular ına tutunmasını zorlaŐtırır. Böylece, bitkide infeksiyon olu Őumu sonucu görülen hastal ık belirtisi en aza indirilmiŐ olur.

b) Uyar ılmış Sistemik Dayan ıklılık (Induced Systemic Resistance) (ISR) gelişimi yoluyla hastal ığın kontrolünde bitki direncini arttırır. ISR-2000, bitkiye atılır atılmaz, bitki üzerindeki reseptörler, bir patojen varl ığındaki gibi sinyal gönderirler ve istilacı organizmanın etkilerini en aza indirmek ve ileriki saldırılara karşı koymak için savunma sistemini aktif hale getirir. Bitki, kimyasal bazen de fiziksel savunma sistemlerini ISR-2000 elisitörüne karşı olu Őurmaya baŐlar. Bitki ISR elisitörünü, bitkide var olan bu savunma sistemlerini geliŐtiren bir patojen gibi tan ır. Bitki beklenen uyarının oluŐması sonucu, daha sonra muhtemel bir patojen saldırısına karşı en üst düzeyde alarmda kal ır ve böylece patojenik istilaya karşı kendini en iyi biçimde savunabilir. Bu olay insanlarda olduğu gibi aşılama olarak da tanımlanabilir (İmmünizasyon).

ISR-2000'nin kullan ımında sonucunda;

- Uyar ılmış Sistemik Dayan ıklılık (Induced Systemic Resistance- ISR) gelişimi yoluyla, bitki direncini art ırarak farklı hastal ık sistemlerindeki bitki hastalıklarının kontrolüne yardımcı olmakta,
- Enzim aktivitesi ile tohum ekimi, fide ve fidan ŐaŐırtmasında olu Őan stresin olumsuz etkilerini önlemekte,
- Toprak ve rizosferdeki faydal ı bakteri popülasyonunu ve aktivitesini arttırarak, optimum mikro besin emilimi sağlamakta,
- Simbiyoz yaŐamı desteklemekte (mycozoeria),
- Yapraktan fotosentez ve klorofil oluşumunu arttırmakta,
- Azot fiksasyonunu sağlayan bakteri popülasyonunun geliŐimini teşvik eder ve düzensiz sulama başta olmak üzere don, gece gündüz yüksek ısı

farklılıkları gibi stres koşullarının olumsuz etkilerinin giderilmesine yardımcı olmaktadır.

Smith-Becker ve ark. (2003), yaptıkları bir çalışmada, kavun bitkisinde ASM uygulamasının, Cucumber Mosaic Virus (CMV)'ye karşı etkili olduğunu ve ASM'nin 50 veya 100 µg/ml dozlarında kullanıldığı sera denemelerinde, CMV'nin yayılımının sınırlandığını saptamışlardır. SAR sonucu, sistemik bir kitinaz birikimi gözlemlendiği ve açık alan ve sera koşullarında yapılan bu çalışmada, ASM'nin meyve üretimi üzerine herhangi bir olumsuz etkisi ortaya çıkmamıştır.

Momol ve ark. (2004), tarla denemeleri ile insektisitler, Acibenzolar-S-Methyl, siyah ve UV yansıtımlı malç kullanımının, çiçek thripslerinin popülasyonu ve TSWV'nin yayılma oranı üzerine etkilerini belirledikleri bir çalışmada, UV yansıtımlı malç sisteminin, thripslerin kolonizasyonu üzerinde ve bunun sonucu olarak TSWV'nin ilk infeksiyonunda azalmaya sebep olduğunu saptamışlardır. Aynı araştırmacılar, UV yansıtımlı malç sistemi kullanılan, ASM uygulanan veya insektisit atılan domates bitkileri üzerinde TSWV infeksiyonu oranında belirgin bir azalma olduğunu gözlemişlerdir.

Mandal ve ark. (2001) tarafından yürütülen bir çalışmada, ASM ve/veya İmidacloprid uygulamasının tarla koşulları altında TSWV infeksiyonunun neden olduğu zararını önemli ölçüde azalttığı sonucu ortaya konulmuştur. ASM uygulaması ile elde edilen SAR'ın bir sonucu olarak uygulama yapılan bitkilerde dayanıklılık mekanizması meydana gelmiştir. SAR, ASM uygulamalı bitkilerde patojene bağlı proteinler (PR)'in seviyesini arttırmıştır.

Chaowen ve ark. (2001)'nin Çin'de uzun yıllar sarımsak ekimi yapılan alanlarda virüsleri kontrol altına almak amacıyla yaptıkları çalışmada, üç farklı gübreleme protokolü ve bitki aktivatörü olan Harpin-EA uygulamaları ve yapılan denemeler sonucunda; çiftçiler tarafından uygulanan 1. gübreleme protokolünde, sarımsak çiçek sapından elde edilen ürün miktarının kontrolden daha fazla olduğu, araştırmacılar tarafından uygulanan 2. protokolde ise, sap ve dâşlerin birbirine benzer şekilde erken ürün verdiği sonucunu elde etmişlerdir. Bu çalışma sonunda elde edilen veriler, gübreleme ya da Harpin-EA uygulamasının sarımsak virüsleri üzerine etkisiz

olduğunu göstermiş ve uygulamadaki bu başarısızlığın iklim ve uygulama dozlarından dolayı meydana geldiği bildirilmiştir.

Song ve ark. (2001), nitrik oksit (NO) serbest bileşiklerinin tütün bitkilerinde TMV'ye karşı uygulandığında, uygulamalı yapraklar üzerinde meydana gelen nekrotik lekelerin uygulama yapılmamış üst yapraklardakilerden çok daha küçük olduğunu gözlemişlerdir. Araştırmacılar, TMV enfeksiyonu sonucu meydana gelen lezyonların küçülmesi üzerinde NO serbest bileşiklerinden serbest kalan NO'nun etkili olduğunu ve NOC-18, diethylenetriamine, NO serbest bileşikten NO'nun serbest bırakılması ile lezyon boyutunun değiştiği sonucunu elde etmişlerdir.

Pappu ve ark. (2000a), bitki aktivatörü Actigard (Acibenzolar-S-Methyl)'in ve imidacloprid etkili maddeli insektisit TSWV yaygınlığına karşı etkisini değerlendirdikleri çalışmayı, Actigard, İmidacloprid, Actigard + İmidacloprid ve uygulamasız kontrol olmak üzere dört farklı alanda, K326 tütün çeşidini kullanılarak yapmışlardır. Bu çalışmada, 5-7 günlük iken şaşırtılan bitkilere, 2g ai/7000 bitki olacak şekilde Actigard ve 9.9g ai/1000 bitki olacak şekilde de imidacloprid uygulanmıştır. Tarla denemelerinde, 25g ai/A Actigard ve 22.7 g ai/A imidacloprid haftada 3 veya 4 kez uygulanmıştır. Her iki haftada bir araziden toplanan kök ve yaprak örnekleri ELISA testi ile testlenmiş ve bitkide TSWV'nin varlığı ve şiddeti saptanmıştır. TSWV'nin zararlı uygulama yapılmamış kontrol alanlarda %45 olarak saptanırken, diğer alanlarda sırasıyla, %26, %19 ve %8 olarak ortaya çıkmıştır. Bütün uygulamalar, TSWV'nin zararını azaltmıştır.

Csinos ve ark. (2001), tütünde Admire (İmidacloprid) ve Actigard (Acibenzolar-S-Methyl) uygulamalarının TSWV zararını azalttığını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada, TSWV'nin varlığı ELISA testi kullanılarak değerlendirilmiş ve TSWV'ye karşı en başarılı uygulamanın bulunması amaçlanmıştır. Araştırma sonucunda, dikim öncesi ve sonrasında tütün bitkileri üzerine Actigard uygulamasının semptom gösteren bitki sayısını belirgin bir şekilde azalttığı, Admire ve Actigard'ın ikisinin birden kullanımının ise, semptom gösteren bitkilerin sayısını daha da azalttığını saptamışlardır. Araştırmacılar, Actigard oranının artırılması ile fitotoksit etkinin görüldüğünü bildirmişlerdir.

Csinos ve ark. (2004), Actigard+ imidacloprid uygulanan veya uygulanmayan 6, 8 ve 10 haftalık tütün bitkilerini tesadüf bloklarlı deneme desenine göre arazi koşullarına şaşırtmışlar ve TSWV' nin yüksek oranda ortaya çıktığını, yüzde olarak bitkilerin büyük bir çoğunluğunu öldürdüğü ve çoğu parsellerde üründe ciddi azalmalara neden olduğunu saptamışlardır. Uygulama yapılmayan en genç fidelerde en yüksek TSWV enfeksiyonu ortaya çıkmıştır. Uygulama yapılmayan yaşlı bitkilerde veya Actigard ve imidacloprid uygulanan tüm bitkilerde direnç eğilimi çok yüksek olmuştur. ASM + imidacloprid uygulanan bitkilerin ürünleri, aynı yaştaki uygulama yapılmayan bitkilerden % 107 oranında daha yüksek olarak saptanmıştır. Bitkilerin yaşı artıkça TSWV'nin şiddeti azalmış ve ürün miktarı artmıştır. ASM+ imidacloprid uygulamaları hastalığı azaltmış ve tüm bitki yaşlarındaki ürün miktarı artmıştır.

Salisilik asit (SA), bitkide doğal olarak bulunan fenolik bir bileşiktir. SA'nın bitkide büyüme ve gelişmeyi düzenlemenin yanı sıra, hastalık ve zararlılara karşı bitkinin savunma mekanizmasında sinyal görevi gördüğü ve dayanıklılığı teşvik ettiği belirlenmiştir. Dayanıklı bitkilerin, patojen saldırısına maruz kaldıklarında duyarlı bitkilere oranla daha yüksek oranda SA sentezledikleri bildirilmiştir (Raksin, 1992).

Gaffney ve ark. (1993), salisilik asit (SA)' in sistemik dayanıklılıktaki rolünü araştırmak için, tütün bitkileri üzerine SA'yı katekol' a dönüştüren salisilat hidroksilaz enzimini kodlayan geni transfer etmişlerdir. Araştırmacılar, katekol' un dayanıklılığı teşvik etmediğini, SA biriken bu bitkilerde TMV'ye karşı sistemik dayanıklılığın oluşmadığını ve SA'nın sistemik dayanıklılığın gelişimi için mutlaka gerekli olduğu sonucunu saptamışlardır.

Teşvik edilen dayanıklılıkta, biyokimyasal savunma reaksiyonları oluşarak savunma mekanizması harekete geçirilmektedir. Bunlar; Hypersensitive Reaction (HR; Lokalize Hücre Ölümü), Lignifikasyon ve Papilla Oluşumu, Patogeneze Bağlı Proteinlerin (PR) Sentezi, Fitoaleksin Sentez ve Birikimi olarak sıralanabilir.

Birçok konukçu- patojen interaksiyonunda patojen saldırısına karşı konukçu hücre duvarlarında dayanıklılığı güçlendirici savunmaya bağlı bileşikler üretilir ve depolanır.

Bitkilerde avirüent fungal patojen veya elisitör uygulanmalar ı sonucu reaksiyon noktalarında; kalloz, lignin ve suberin içeren fenolik bileşikler, fenolik ve lignin benzeri materyaller, aminoasit hidroksi proline zengin glikoproteinler (HRGP), kalsiyum gibi mineral elementlerin birikti ği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir.

Çoğu konukçu-patojen interaksiyonlar ında, kısa sürede gerçekleşen olaylardan biri de, saldırıya uğramış konukçu bitki hücrelerinde hızlı ve geçici olarak aktive edilen ve Hipersensitive Reaction (HR)' da rol oynayan aktif oksijen türlerinin (AOS, Active Oxygen Species) üretimidir. Konukçu-patojen interaksiyonlar ında, Superoxide anion O_2^- , hydroxyl radikal OH ve hidrojen peroksit (H_2O_2) yaygın olarak gözlenmiştir (Kauss ve ark., 1993; Goodman ve Novacky, 1994; Shirasu ve ark., 1997). Aktif oksijen türlerinden H_2O_2 ' nin, bitkide PR proteinlerinin sentezine ve fitoaleksinin üretimine neden olarak SAR mekanizmasını tetiklediği bildirilmiştir. SAR mekanizmasının anahtar bir bileşiği olan SA, hücrede katalaz enzimini inhibe ederek ortamda H_2O_2 oluşumunu arttırmaktadır (Raksin, 1992; Chen ve ark., 1993; Low ve Merida, 1996).

Günümüzde kimyasal mücadeleye alternatif olabilecek kontrol yöntemleri üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Özellikle bitkilerde hastalıklara karşı dayanıklılığın uyarılması (Induced Resistance) konusunda çok sayıda araştırma yapılmıştır. Uyarılmış dayanıklılıkta amaç, bitkilerin savunma mekanizmalarını önceden aktive ederek patojen saldırısına karşı hazır hale getirmektir. Uyarılmış dayanıklılıkta etmen bitkinin nekroz bölgesinin etrafında lokalize olmuştusa lokal kazandırılmış dayanıklılık (LAR; Localized Acquired Resistance), dayanıklılık sistemik olarak bitkinin uygulama görmemiş kısımlarına yayılırsa sistemik kazandırılmış dayanıklılık (SAR; Systemic Acquired Resistance) olarak adlandırılır (Ramussen ve ark., 1991; Hammerschmidt ve Smith-Becker, 1999). Dayanıklılığın uyarılmasına (IR) yönelik olarak günümüze kadar olan çalışmalarda, patojen olmayan fungus, bakteri, fungus veya mayaların hücre duvarından ekstrakte edilen oligosakkaritler gibi biyotik uyarıcılar, Acibenzolar-S-Methyl (ASM), herbisitler, β Amino Butyric Asit (BABA) ve Salisilik Asit (SA) gibi abiyotik uyarıcılar kullanılmıştır. Özellikle bitkilerde gelişmeyi düzenleyici Rhizobakterilerin (PGPR)

tohum veya toprağa uygulamasıyla bitkilerde SAR mekanizmasının aktive edildiği ve patojen infeksiyonlarına karşı önemli oranda koruma sağlandığı bildirilmiştir. (Tüzün ve ark., 1986; Weller, 1988; Tüzün ve Kloepper, 1995; Van Loan ve ark., 1998; Hammerschmidt ve Smith-Becker, 1999; Tüzün ve Bent, 1999).

Günümüze kadar olan çalışmalarda, dayanıklılığın uyarılması (IR)'na yönelik olarak patojen olmayan fungus, bakteri gibi biyotik uyarıcılar veya UV, herbisitler, β -amino butyric asit (BABA) ve salisilik asit (SA) gibi abiyotik elisitör olarak isimlendirilen uyarıcılar kullanılmıştır. Biyotik ve abiyotik uyarıcıların uygulaması ile bitkilerin patojen infeksiyonu varmış gibi tepki göstererek dayanıklılığı sonuçlayan savunma mekanizmalarını aktive ettiği bildirilmiştir (Kuc, 1987).

Konukçu bitkilerde bulunan dayanıklılık mekanizmasını harekete geçiren uyarıcılara elisitör adı verilmektedir. Abiyotik ve biyotik uyarıcılarla patojen ve konukçu bitkideki reseptör etkileşimi aktif hale geçirilmekte ve bunun sonucunda, konukçuda bulunan ve dayanıklılığı yöneten dayanıklılık genleri harekete geçmektedir (Hahlbrock ve Scheel, 1987; Isaac, 1992; Ebel ve Cosio 1994).

SA en başta olmak üzere, isonicotinic asit (INA), hidrojen peroksit, jasmonik asit (JA), β -amino butyric asit (BABA) ve indol asetik asit (IAA) gibi doğal kaynaklı birçok elisitör, bitki dayanıklılığında SAR'ı teşvik eden sinyal bileşikleri olarak rol oynamaktadırlar (Niki ve ark., 1998; Staswick ve Lehman, 1999).

Pappu ve ark. (2000b), Gürcistan'da yaptıkları çalışmada, tütün bitkisinde TSWV tarla denemelerinde, Acibenzolar-S-Methyl (Actigard) tek başına ve Admire (R) ve Provado (R) ile kombine halde uygulamışlar ve 1997 yılında yapılan ilk deneme ve 1998'de yapılan ikinci deneme sonucunda, hastalığın gözle görülür bir şekilde azaldığını saptanmışlardır. Bu çalışmada, imidacloprid tek başına kullanıldığında uygulama yapılan alanların 1/4'ünde virüsün etkinliğinin azaldığı saptanmıştır. Acibenzolar-S-Methyl (Actigard), Admire (R) ve Provado (R) kombine halde uygulandığında ise, tarla denemesinin 3/4 bölgesinde hastalıkta önemli bir azalış gözlemlenmiştir. Dördüncü bölgede de hastalık oranı düşük bulunmuş ve diğer uygulamalar arasında fark olmamıştır. 3/4 bölgede ELISA'da pozitif çıkan bitki oranının, semptom gösteren bitki oranından fazla olmadığı saptanmıştır. Tarla denemelerinde Actigard'ın uygulanmasında 2/4 bölgede ELISA'da pozitif çıkan

bitki oranı azalmıştır. İmidacloprid' in Actigard ile birlikte uygulandığı bölgelerde ELISA' da pozitif çıkan bitki oranı azalmıştır. Aynı araştırmacılar, bitkide aktivatörlerin kullanımının, örneğin Actigard' in tek başına veya İmidacloprid ile kombine olarak kullanımını, tütünde TSWV' ye karşı korunmada potansiyel bir alternatif olduğunu bildirmişlerdir. Ekonomik olarak önemli olan bir virüs hastalığını etkili bir şekilde önlemek için Actigard uygulaması ilk kez bu çalışmada yapılmıştır.

Marais ve ark. (1985), Kaliforniya' da yaptıkları bahçe denemelerinde Crop-Set uygulamasında Mineola tangelo ağaçlarında meyve boyutu ve renginde etkileyici gelişme olduğunu ve meyve boyutlarındaki % 18' lik artış ile meyve veriminde de aynı oranda artış gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Bu denemelerde iç ve dış kalitenin de iyileştiğine işaret edilmiş ve yaprak analizleri sonucu, Crop-Set uygulanan ağaçlarda uygulanmayan kontrol grubundakilere göre nitrojen, fosfor, potasyum, magnezyum, bakır ve bor miktarının önemli ölçüde daha yüksek olduğunu saptanmıştır. Bu bulgular, bitki ekstraktı içeren Crop-Set' in toprakta besin maddelerinin mineralizasyonu arttırdığını gösteren araştırmaları desteklemektedir.

Crop-Set uygulamasının Marsh greyfurtlarının veriminde %80' in üzerinde ve meyve boyutunu %400 oranında, Rose greyfurtlarının veriminde %40' in üzerinde ve meyve boyutunu %12' den daha fazla, Star Ruby greyfurtlarında veriminde %80' in üzerinde, meyve boyutunda %90' dan fazla artış sağladığı gözlemlenmiştir. Meyve boyutlarında %22' lik artışa bağlı olarak, verimde %8.5' luk bir artış sağlanmıştır (Marais ve ark., 1996).

Tütün bitkisi üzerinde ilk yapraklı dönem ile kotiledon döneminde bitki aktivatörü ASM uygulamasının yaprak biti popülasyonunu bastırmak ve lekeli solgunluk virüsü' nün (TSWV) risklerini azaltmada erken dönemde thrips etkisinin rolünün araştırıldığı bir çalışmada, Actigard, İmidacloprid (Admire) ve bu ikisinin kombinasyonu thrips popülasyonlarını az miktarda etkilemiş, fakat bitkiler şaşırtıldıktan sonra 4 ve 5 haftalık bitkilerde Admire uygulaması thrips yoğunluğunu daha çok düşürmüştür. Actigard ve Admire uygulamaları 2 yıllık olan bu çalışmada TSWV semptomlu bitki oranını belirgin bir şekilde azaltmıştır. TSWV semptomunun azalmasında Actigard' in tek başına uygulanmasından çok Actigard ve Admire kombinasyonunun uygulanması daha iyi sonuç vermiştir. Thrips popülasyonu

yoğunluğunda tütünün 3. yapraklı döneminde Actigard uygulaması etkisiz olmuş, fakat TSWV' nin ortaya çıkışını azaltmıştır. Tütün thrips' i *Frankliniella fusca* (Hinds.) her yıl thrips kompleksinin %92- 95' ini oluşturmaktadır. ELISA yöntemi kullanılarak testlenen *F. fusca* TSWV için pozitif sonuç vermiştir. Actigard ve her iki ilacın beraber uygulaması ürün miktarını artırırken, uygulamasız bitkilerde TSWV oranı artmıştır. Kompleks ve Actigard uygulaması bitki boyunu az da olsa artırmıştır. Actigard ve Admire uygulaması tütünde TSWV' nin ortaya çıkış riskini etkili bir şekilde azaltmada başarılı olmuştur (Mcpherson ve ark., 2004).

Virginia' da yetiştirilen tütün alanlarında potansiyel olarak önemli bir hastalık olan TSWV' nin ortaya çıkışının baskı altına alınmasında Actigard ve Admire uygulaması ile ilgili 2003 yılında yürütülen 2 tarla denemesinde, uygulama yapılmayan kontrol, Admire, Actigard ya da Admire + Actigard uygulamaları karşılaştırılmış tütün fidelerini ya da karşıtımadan önce Actigard + Admire ya da Actigard uygulamalı ya da karşıtımadan sonra 1 ve 2 haftalık Actigard uygulamalı bitkiler kullanılmış ve sonuçta TSWV' nin ortaya çıkış oranı uygulamasız kontrol parsellerinde %4- %5 arasında doruk noktaya ulaşmıştır. Uygulamalar arasında virüs oranı açısından belirgin farklar gözlenmemiştir. Fakat serada Admire kullanımı kontrolle karşılaştırıldığında bitki boyunun azalmasına sebep olmuştur. Bitki boyu üzerinde Admire yada Actigard uygulamasının etkisi yada TSWV' nin ortaya çıkışı bağdaştırıldığında ekonomik değer, ürün fiyatı ve ürün miktarında bir fark görülmemiştir. Tütün gelişim ve büyümesinde Actigard, Admire yada her ikisinin kullanımını sonucunda TSWV' nin zararının azaltabileceği az da olsa gözlenmiştir (Reed ve ark., 2003)

Mcgriff ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada, tütünde tarlanın şerit şeklinde sürülmesi ile TSWV' nin yaygınlığının azalması arasındaki bağlantıyı tespit edebilmek amacıyla, 2003- 2004 yılları arasında; uygulamasız kontrol, imidacloprid uygulamalı bitkiler ile şerit şeklinde ve geleneksel sürüm yapılan alanlarda yürütmüşler ve TSWV' de belirgin azalmayı şerit şeklinde sürülen alanlar ile Imidacloprid uygulamalı alanlarda %20.2 ile %28.7 oranında saptamışlardır. Uygulamasız alanlarda bu oranın % 26.9 ile % 53.5 arasında değiştiği gözlenmiştir.

Şili’ de biber yetiştirilen ve doğal *Phytophthora capsici* bulaşmasının olduğu bir alana bu etmene karşı bitki büyüme ve gelişmesi ile ilgili olarak toprak direnci sağlayan Ridomil Gold (Mefenozam) uygulaması yapılmış ve genç yaprak uygulaması olan Actigard ile karşılaştırılmıştır. 2 aylık Araheim TMR 23 çeşidi Şili biberlerine 100 mg a.i/ lt oranında tek uygulamalı Ridomil Gold ya da 3 uygulamalı Actigard 75 mg a.i/ lt oranında verilmiştir. Bitkiler suya ihtiyaç duydukları anda (her 2-3 günde bir) yada iki aylık periyot içinde her iki haftada bir 48 saatlik salma sulama periyoduna maruz bırakılmışlardır. Sulama yapılmamış ve sulama yapılmış toprakta, canlı kalma ve bitkilerin gelişmesi uygulama yapılmamış biberlerle karşılaştırıldığında Actigard uygulanmış bitkiler belirgin bir fark gözlenmiş ve bitkiler aşırı şekilde büyümüşür. Fakat Ridomil Gold verilen bitkilerin değerlerine bakıldığında Actigard uygulanmış bitkilerden belirgin bir şekilde daha yüksek olduğu görülmüştür. Sulanan toprakta, Ridomil Gold uygulamalı bitkilerdeki kök gelişimi Actigard uygulanmış bitkilerden daha büyüktür fakat bitkilerin suya ihtiyacı olduğu zaman kimyasal uygulamalar arasında belirgin bir fark kaydedilmemiştir (Matheron ve ark., 2000).

Jacobs ve ark. (2004) bir virüs enfeksiyonuna karşı, diğer bir virüs enfeksiyonu ile çapraz korunma sağlanabileceğini ve TSWV’ ye karşı cross-protection sağlama girişiminde bulunmak için TMV kullanımının gözle görülür bir seçenek olduğunu bildirmişlerdir. Bu amaçla yaptıkları çalışmada, TMV’ nin zayıf ırkını saflaştırmışlar ve 0.01 M’ lik fosfat buffer ile karıştırarak, 260 bitki üzerine el spreyi ile uygulamışlardır. Bu bitkileri dört farklı lokasyona dağıtmışlar ve inokule edilmeyen bitkilere Admire, Actigard + Admire uygulaması yaparak 4 lokasyondan elde edilen ürünleri biriktirmişlerdir. Çalışma sonunda, TMV inokulasyonunun tüm bölgelerde TSWV’ nin azalmasına neden olduğu sonucunu ortaya koymuşlardır.

Seçici ve sistemik bir bileşik olan Actigard 50WG tütünde TSWV’ yi durdurmak için kullanılmış ve 2004 yılında yapılan çalışmada, 8 bölgede Actigard’ ın etkisi değerlendirilmiştir. Her bir bölge, uygulamasız ve Admire, Actigard + Admire uygulamalı her bir uygulama 4 tekrardan olacak şekilde tesadüfi olarak dikilmiştir. Bitkilere 1000 bitkiye 1.8 oz olacak şekilde Admire uygulanmıştır. Tüm Actigard uygulanan tarlalara acre başına 0.5 oz oranında Actigard 50WG uygulanmıştır.

Uygulamasız bitkilerle karşılaştırıldığında (%43), Actigard+Admire (%27.9) ve Admire (%33.4) TSWV oranını azaltmış, fakat birbirinden farklı olmamıştır (Smith ve ark., 2004).

Acibenzolar- S- methyl (ASM) ve Imidacloprid (Admire) kombine edilerek veya tek başlarına K- 326 tütünlerine uygulanmıştır. Uygulamalar; uygulamasız, Imidacloprid (1000 bitkiye/ 1.4 oz), ASM (7000 bitkiye/ 2 g ai) ve her ikisinin kombinasyonu şeklindedir. Tarla uygulamaları, ASM (0.5oz/lt, 50WP), uygulamasız, 0:14:28; 0 ve 14, 0 ve 28, 14 ve 28 ve 0, 14, 28. günlerde karşılaştırılmış bitkilere uygulanmıştır. Thrips popülasyonu, martın ikinci haftasında itibaren her hafta tarlaya yerleştirilen yapışkan tuzaklara yapışan thripslerin sayımı ile tahmin edilmiştir. Uygulamasız kontrollerde karşılaştırıldığı zaman bitki boylarında fark olmadığı kaydedilmiştir. Fakat, birkaç uygulamada transgenik standartlarla karşılaştırıldığında gelişme azalmıştır. TSWV enfeksiyonunun yüzde oranı (% 8- 45 oranında) geç ASM uygulanmış ve ASM ve Imidacloprid uygulanmış yerlerde azalmıştır. Mart ve Nisan aylarında thrips popülasyonu azalmış fakat Mayıs ayının ilk haftaları boyunca pik yapmıştır. Bu çalışma sonucunda, TSWV belirtilerinin ortaya çıkış oranında büyük bir azalma sağlanmıştır (Csinos ve ark., 2004).

Georgia'da her yıl yaklaşık olarak 20.5 milyon dolarlık gelir kaybına neden olan toprak kökenli böcekler ve TSWV'ye karşı benzer kimyadaki iki ürün olan Admire 2F ve Platium 2SC başarılı bir şekilde kullanılmakta ve bu etmenlerin seviyesini azaltmaktadır. Hardison ve ark. (2004) yaptıkları araştırmada; Admire 2F ve Platium 2SC'nin çeşitli oranlarda uygulanması ile TSWV ve toprak kökenli böceklerin kontrolünü baskı altına alma oranı karşılaştırılmış ve uygulamalar, uygulamasız kontrol, her 1000 bitkiye 1.0 ve 1.8 oz Admire 2F, 0.8 ve 1.3 oz Platium 2SC oranında uygulanmış ve bitkiler seraya karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada ateşböceği, tel kurdu ve kesici kurtlar olmak üzere 3 toprak kökenli böcek değerlendirilmiş ve her bir Admire 2F ve Platium 2SC uygulaması, böcek beslenmesi sonucunda zararlanan bitki oranını yüzde olarak azaltmıştır. 1.8 oz oranında uygulanan Admire 2F, serada TSWV kontrolünde belirgin bir şekilde azalma sağlamıştır. Ayrıca, 2.8 oz oranında büyük ölçüde azalma sağlamıştır.

Tütün bitkisinde TSWV'nin simptomatolojik olarak ortaya çıkışı üzerine thrips popülasyonunun etkisi incelenmiş ve bir insektisit olan Admire 2F ve bitki aktivatörü Actigard 50WG uygulamalarının, serada yetiştirilen ve şaşırtılan bitkilerde TSWV'nin ortaya çıkışını azalttığı saptanmıştır. Bu iki materyalin birlikte kullanımı tek başına uygulamalarından daha çok etkili olmuştur. Genç yapraklara Actigard uygulamaları bitkiler şaşırtıldıktan sonra (3 ya da 4 uygulama) TSWV'nin ortaya çıkışını azaltmıştır. Acephate insektisiti (bitkiler şaşırtıldıktan sonra ilk 4 hafta boyunca 4 uygulama) ve Acephate+Actigard uygulamaları, denemede TSWV'nin etkisini azaltırken, uygulamasız kontrol bitkilerinde TSWV enfeksiyonu simptomatolojik olarak %50 oranında artmıştır. Böylelikle yönetim seçenekleri tütünde TSWV'yi bastırabilmiştir. Direnç uygulamaları TSWV'nin azalmasıyla oldukça etkili bulunmuş, fakat bazı erken sezonlarda genç yapraklara uygulama yapılmasının daha da etkili olabileceği bildirilmiştir (Mcpherson ve ark., 2004).

Blackley ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada, Actigard'ın özellikle Admire ile birlikte kullanıldığında tütünde TSWV'nin ortaya çıkışını azalttığını göstermişlerdir. Çeşitli zaman aralıklarında uygulanan Actigard'ın tütünde TSWV'nin ortaya çıkışı ve zamanı üzerine etkisini ortaya koymak amacıyla, 2002- 2003 yılları arasında kurulan tarla denemelerinde, Actigard 50WG 4.6g/ 10.000 bitki oranında günlük şaşırtılmamış bitkilere 7, 14 ve 21. günlerde uygulanmıştır. Admire ise 3 günlük şaşırtılmamış bitkilere 100 oz/ 10.000 bitki oranında uygulanmıştır. 2 hafta sonra araziye şaşırtılan bitkiler üzerinde TSWV görsel olarak 2 haftadan 12 haftaya kadar değerlendirilmiştir. Actigard uygulaması 21 günlük genç fidelerle değerlendirilen 7 bölgenin 4'ünde belirgin bir şekilde kayıpla sonuçlanmıştır. TSWV zararında Actigard'ın etkili olduğu zaman saptanamamıştır.

Bertrand ve ark. (2004) 2000- 2002 yılları arasında yaptıkları gözlemlerde, TMV simptomsu gösteren tütün bitkileri üzerinde beklenenden daha düşük TSWV enfeksiyonu olduğunu saptamışlardır. 2003 yılında, 2500 Admire uygulamalı ve 2500 uygulamasız tütün bitkisi şaşırtılmış ve TMV solüsyonu bitki üzerine spreylenecek şekilde inokule edilmiştir. Bunu takiben bu bitkiler hemen döner makine ile budanmış ve su içerisinde 4 gün bekletilerek karşılaştırma olarak kullanılan uygulamasız bitkiler ile birlikte arazi koşullarına dikilmiştir. Deneme, iki bölgeden her biri 4 sıra tütünden

oluşmuş ve ortada 2 s ıra inokulasyonlu ve inokulasyonsuz K- 326 tütün çe şidinden bulunmuştur. D ışıdaki iki s ıra TMV'ye dayanıklı NC- 297 tütün çe şidi doğal TMV yayılımını en aza indirmeye yardım etmek için dikilmiştir. TSWV, bitkiler şaşırtıldıktan 2, 5, 8 ve 12. haftalarda görsel olarak değerlendirilmiştir. Şaşırtılan bütün bitkiler, tipik TMV semptomu göstermeyen inokulasyonlu bitkiler ile 5 haftalık şaşırtılmamış bitkilerde TMV için ELISA ile testlenmiştir. Testlerin sonucu % 100 başarılı inokulasyonu ortaya koymuştur. İnokulasyon her iki bölgedeki tütünlerde gelişmeyi geriletmiş ve TMV inokulasyonu, inokule edilmeyen bitkiler ile karşılaştırıldığında TSWV oranında belirli bir şekilde azalma göstermiştir.

Melton (2005) yaptığı çalışmada, seralarda fidelere yapraklardan uygulama olarak, Platinum veya Admire ile bunların kombinasyonlarının veya yalnız olarak Actigard uygulamasının etkili ve ekonomik bir yönetim olarak ümit var olduğunu bildirmiştir. Yapıtığı uygulamalar sonucunda, TSWV ile infekteli bitkilerin oranı kontrol alanında %27.1, Admire (1.8oz/ 1000 bitki) yalnız kullanıldığında %13.3, Actigard (1 oz / 50 000 bitki) yalnız kullanıldığında % 13.4 ve Admire+Actigard kullanımında % 7.2 olarak kaydedilmiştir. Platinum' un yalnız kullanılmasında ise, TSWV' de önemli bir azalma meydana gelmez iken, Platinum ve Actigard' ın beraber kullanımında oran, Admire ve Actigard' ın kullanımı kadar etkili olmuştur. Araştırma, Actigard' ın hava akımı ile suda kullanılmasını denemek için 2005 yılında da devam etmiş, fakat bu yöntem TSWV infeksiyonunu azaltmanın yanında belirgin bir şekilde fitotoksiste etki yaratmıştır.

Patojenlere karşı bitkilerde teşvik edilmiş direnç (ISR) önemle incelenmiş ve geniş yayılım göstermiştir ve bitki korumada kullanılan potansiyel bir yol olarak görülmektedir. ISR; virüs, fungus ve bakterilere karşı etkili olan geniş spektrumlu ve uzun süre kalıcı olan ve bir hastalık direncinin sistemik ifadesi için yol gösteren salisilik aside bağlı olarak kullanılan bitki aktivatörleri tarafından bitkilerin verdiği lokal bir tepki olarak meydana gelmektedir. Patojenle ilişkili olan proteinler tarafından hücre duvarının yapısında bulunan bileşiklerin değişmesi, örneğin kitinaz, glukanaaz ve fitoaleksinlerin sentezi direnç ile ilgili olmaktadır. Bu botaniksel çalışmada ISR ve bir merkez işaretli jasmonik asit tarafından herbivora karşı teşvik edilmiş direnç arasındaki interaksyonlar gözlenmiştir (Heil ve ark., 2002).

Sclerankimanın hücre duvar 1 katman 1 içerisinde ligninin fiziksel birikimi, seconder ksilem hücre duvarının lignifikasyon şeklinden farklılıklar göstermektedir. Yonca boğum arası dönemi süresince hücre duvarının otoflorasansı ve histokimyasal boyaması, ligninin ilk olarak farklılaşmış sklerankimanın seconder hücre duvarında biriktiğini açıkça göstermiştir. Seconder duvardan önceki ilk duvara lignin eklenmesi, seconder ksilemde geniş bir şekilde rapor edilen lignifikasyonun şeklinden zıt olduğu belirlenmiştir. Lignin birikiminin başlangıcında fiziksel değişimler, dokunun yoğunluğuna bağlı olarak di-methyl-lignin monolignolün sıklığında farklılıklar ile birleştirilmiştir. Lignin birleşiminin modifikasyonları yonca boğum arasının fizyolojik durumu ile de ilişkilendirilmiştir (Vallet ve ark., 1996).

TSWV, Georgia’da 1985’den beri tütün üretiminde önemli bir sorun oluşturmaktadır. Fakat bu virüs artan tütün üretiminde yıllık bir faktör olarak görülmemektedir. Bundan dolayı yetiştiriciler maksimum kayıplardan ürünlerini korumak için bütün mümkün adımları almaya çalışmışlardır. Şaşırtmadan önce seralardaki bitkiler üzerine Actigard ve Admire’in kombine kullanımının TSWV’nin infeksiyon oranını yaklaşık olarak %50 azaltabileceği gösterilmiş ve bu tedavide TSWV kayıplarını azaltmıştır (Johnson, 2006).

Georgia’da yapılan bir çalışmada, Prelude II çeşidi kabaklar ticari önemi olan boş bir tarlaya dikilmesi ve önerilen standart insektisit, fungusit ve gübreleme programları kullanılmıştır. Parseller basıncılı sırt pülverizatörü ile CO₂ ile spreyleneş, Actigard ve Messenger uygulamaları bitkilerin hepsi ya da %75’i ortaya çıktığında başlanmıştır. Her iki aktivatörde 2 haftalık programda iki kereden fazla uygulanmıştır. Admire tohumlar ekilirken toprağın altına ve üstüne olmak üzere ikişer kez uygulanmıştır. Denemenin yapıldığı alanda hava genellikle sıcak ve kuru geçmiştir. Günlere göre değerlendirilmeye bakıldığında virüsün zararını değiştirmede bu uygulamalar arasında bir fark görülmemiştir. Kimyasal uygulamaların hiçbirinde fitotoksit etki gözlenmemiştir (Langston ve ark., 2000).

Langston ve ark. (2000)’nin Admire ile bitki aktivatörlerinin kombine edilerek kullanılmasının, domateste TSWV’yi bastırabildiği ortaya koymak amacıyla yaptıkları çalışmada, şaşırtılmış 5 günlük domates bitkilerine sera içerisinde Actigard, Admire ve Messenger uygulanmıştır. Actigard uygulaması, haftada iki kez

olacak şekilde tekrarlanmış iş ve sonuç olarak, TSWV'nin belirtileri üzerine uygulamaların arasında bir fark görülmemiştir.

Boyhan ve ark. (2000)' n in domates üzerinde TSWV enfeksiyonu için yeni kontrol uygulamaları belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada, denemeler 2x2x2 faktoriyel deneme deseni şeklinde kurulmuş ve değişkenler Rutgers ve BHN444 çeşitlerini içermiştir. İkinci değişken toprak direnci sağlamak için Admire uygulamalı ve uygulamasız alanlar, üçüncü değişken ise, Malathion ve Karate kombinasyonunu içeren uygulamalı ve uygulamasız bitkilerden oluşmuştur. Elde edilen sonuçlar, bitki dayanıklılığının bu hastalığın kontrolünde iyi bir method olarak tercih edilmesi gerektiğini açık olarak göstermiştir. Malathion ve Karate kombinasyonunun kontrol olarak bazen tercih edilebileceği, fakat bitki dayanıklılığı kadar iyi olmadığı bildirilmiştir.

MLO yapısı/ fonksiyonu çalışmalarını genişletmek amacıyla, MLO dayanıklı allellerden kısken direnç veren sadece ikisi araştırılmıştır. Yabani tip MLO' nun sınırlandırılmış hücre duvarında, epidermal hücre duvarında fungal penetrasyonun olduğu noktalarda, hidrojen peroksit oluşumu görülmüştür. Mezofil hücreler bir ikinci oksidasyonun oluşumunu durdurmakta ve hücre ölümü gerçekleşmektedir. Buna rağmen MLO'lu bitkilerde ölü hücrelere sebep olan *Bgh* fiziksel ve geçici olarak dayanıklılıktan ayrılmasına rağmen bu işlemler birbiri ile bağlantılıdır. İnokulasyonsuz mutant bitkiler kendiliğinden mezofil hücre ölümü gösterir ki bunun hızlanmış yaprak yaşlanmasından olabileceği ortaya konmuştur (Piffanelli ve ark., 2002).

TMV' nin iki lokal lezyon simptomu gösteren konukçular *Xanthi-nc* ve transgenik NahG tütünlerinin yapraklarında antioksidant durumu incelenmiş ve salisilik asit birikiminin olmadığı yerlerde sisemik kazandırılmış dayanıklılığın (SAR) gelişmediği gözlenmiştir. Antioksidatif dayanıklılık birkaç enzimin aktivitesi ile bağlantılıdır ve glutathione, chlorogenetic ve rutin çalışılmıştır. Antioksidant enzimlerin en önemlisi enfektersiz NahG bitkisinde *xanthi-nc* bitkisinden daha az aktif durumdadır. Ayrıca, önemli enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidantlar *xanthi-nc* ile karşılaştırıldığında TMV enfekteli NahG bitkilerinde daha düşük seviyelerde bulunmuştur. Buna karşılık olarak enfekteli

xanthi-nc' lerde antioksidantların seviyesini güçlendirmek için SA uygulanmış fakat NahG bitkilerine uygulanmamıştır. NahG tütünlerinde antioksidantların durumu SAR oluşumundan sonra daha da azalsa bile, xanthi-nc tütünlerinde SAR başanlı bir şekilde meydana gelmiş ve antioksidant seviyesi artmıştır. İnfeksiyondan sonra, superoksit ve hidrojen peroksidin daha çok birikimi ve daha şiddetli bir nekrotizasyonun görülmesi NahG tütün bitkilerinin yaprak dokularının kapasitesinin azaldığı ile pozitif yönde ilişkilendirilmektedir (Király ve ark., 2002).

Nekrotik patojenlerin bitkilerde infeksiyonu, sonraki patojen bulaşmalarında geniş spektrumlu dayanıklılık meydana getirebilir. İnfekteli yapraktan bitkinin her tarafına hareket eden bu sistemik kazandırmış dayanıklılığın (SAR), vasküler sinyaller tarafından harekete geçirildiği düşünülmektedir. Yapılan çok sayıda çalışma salisilik asit (SA) tarafından SAR oluşumunun meydana getirildiğini göstermiştir (Vernooij ve ark., 1994).

Momol ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada, TSWV infeksiyonuna karşı UV-yansıtmalı metalik malç, SAR teşvik edici Actigard ve risk azaltıcı insektisidin (spinosad) kombine veya ayrı ayrı kullanımlarının etkilerini belirlemeye çalışılmışlar ve metalik malç kullanımının hastalık oranının azalması en etkili yöntem olduğunu, methamidophos etkili maddeli Spinosad'ın geç ve erken sezon boyunca hastalığın yayılımını azalttığını, metalik malç, Actigard ve insektisidlerin birlikte kullanımının sonucunda da, TSWV zararının % 76 oranında düştüğünü bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma Materyali Hakkında Bilgiler

Bu tez çalışmasının farklı aşılamalarında kullanılan ZYMV izolatının elde edilmesi amacıyla, Adana ve İçel illeri ile çevresinde kabakgil yetiştiriciliği yapılan alanlarda, ZYMV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen kabakgillere ait bitkilerinden alınan örnekler, materyal olarak kullanılmıştır.

Çalışma, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarına ait Bitki Virüsleri Araştırma Serası ile mevcut klima odalarında ve Bitki Koruma Bölümü Araştırma ve Uygulama Arazisi'nde yürütülmüştür.

3.1.2. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Materyal

Serolojik çalışmalarda, arazide ZYMV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen kabakgil bitkilerinden alınan bitki dokuları materyal olarak kullanılmıştır. Ayrıca, biyolojik tanı amacıyla yapılan mekanik inokulasyon çalışmaları sonunda semptom gözlenen indikatör bitkiler ile saksı ve arazi denemelerinde bitki aktivatörleri uygulanan bitkiler de ELISA yöntemi ile testlenmiştir.

ELISA testlerinde, ticari olarak BİOREBA firmasından temin edilen ZYMV, CMV, PRSV, WMV ve SqMV'ne spesifik ELISA kitleri, tampon çözeltiler, NUNC marka 96 kuyulu ELISA pleytleri, otomatik pipetler ve pipet uçları ile saf su kullanılmıştır.

ELISA testleri sonucunda örneklerin absorbans değerleri, Medispec ESR 200 markalı ELISA okuyucusunda okunmuştur.

3.1.3. Vektör ile Taşıma Denemelerinde Kullanılan Materyal

Bu çalışmanın farklı aşamalarında kullanılan ZYMV izolatının yaprak biti ile taşınıp taşınmadığının ortaya konulması amacıyla yapılan vektör ile taşıma denemelerinde, ELISA testi sonucunda ZYMV ile bulaşık olduğu saptanan bitkilerden alınan yaprak dokuları materyal olarak kullanılmıştır. Taşıma denemeleri, sağlıklı kabak indikatör bitkileri üzerine *Myzus persicae* türü yaprak biti bireyleri kullanılarak yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan *Myzus persicae* yaprak biti türüne ait koloni, Ç.Ü.Z.F. Bitki Koruma Bölümü Entomoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Serdar SATAR' dan temin edilmiştir.

3.1.4. Mekanik İnokulasyon Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Mekanik inokulasyon çalışmalarında, araziden toplanan ve ELISA testleri sonucunda ZYMV ile bulaşık olduğu saptanan kabakgil bitkilerinden alınan bitki dokuları materyal olarak kullanılmıştır.

Virüsün biyolojik tanısı amacıyla, *Cucurbita pepo*, *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. rustica*, *Nicotiana tabacum* test bitkileri üzerine mekanik inokulasyon çalışmaları yapılmıştır.

Ayrıca, saksı ve arazi çalışmalarında kullanılan ve farklı bitki aktivatörlerinin uygulandığı kabak bitkileri üzerine de ZYMV'nin bulaştırılması amacıyla mekanik inokulasyonlar yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan bitkilerin üzerine yapılan mekanik inokulasyon çalışmalarında, havan ve havan eli, cam spatül, fosfat tampon çözeltisi, mercaptoethanol, karborandum tozu ve çeşme suyu kullanılmıştır.

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 ve tohum firmalarından temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Mekanik İnokulasyon Çalışmalarında Kullanılan Test Bitkileri

Türkçe Adı	Latince Adı
Tütün Türleri	<i>Nicotiana rustica</i> <i>Nicotiana glutinosa</i> L. <i>Nicotiana benthamiana</i> <i>Nicotiana tabacum</i>
Kabak	<i>Cucurbita pepo</i>
Kavun	<i>Cucumis melo</i>
Hıyar	<i>Cucumis sativus</i>
Karpuz	<i>Citrullus lanatus</i>
Hanım düğmesi	<i>Gomphrena globosa</i>
Akkaz Ayağı	<i>Chenopodium quinoa</i> Wild. <i>C. amaranticolor</i> Costa & Reyn

3.1.5. Total RNA Ekstraksiyonu Çalışmalarında Kullanılan Materyal

ELISA testleri sonucunda ZYMV ile infekteli olduğu saptanan arazi örnekleri ile mekanik inokulasyon yöntemi kullanılarak ZYMV bulaştırılan kabak bitkilerinden alınan bitki dokularından elde edilen bitki öz suları 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 çal ışmalarında kullanılan solüsyonlar Ek 2' de yer almaktadır.

3.1.6. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Materyal

ZYMV'nin moleküler tan ısı amacıyla, RT-PCR ve IC-RT-PCR yöntemleri uygulanmıştır.

RT-PCR çal ışmalarında, ZYMV ile bula şık kabak bitkilerinden elde edilen total nükleik asit preparasyonları materyal olarak kullanılmıştır.

IC-RT-PCR çal ışmalarında ise, vektör taşıma denemeleri sonucunda, simptom gösteren bitkilerden elde edilen ham bitki ekstraktları ve Bioreba firmasından ticari olarak temin edilen ZYMV' ye spesifik antiserum kullanılmıştır.

RT-PCR işlemleri, 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), çe şitli tampon çözeltiler, saf su, pipet ve steril pipet uçları, PCR tüpleri ile Çizelge 3.2' de verilen İONTEK Firması'ndan ticari olarak temin edilen ZYMV'ye spesifik primerler (10mM) kullanılarak yapılmıştır.

Virüs genomu üzerindeki hedef bölgelerin ço ğaltılması işlemini için gerekli sıcaklıklar, TECHNO GENIUS marka termocycle cihazı kullanılarak sağlanmıştır.

Çizelge 3.2. RT-PCR Çal ışmalarında Kullan ılan Primer Çiftleri ve Sentezlenen Bölgenin Moleküler Büyüklüğü

Primer Çiftleri	Dizi	Moleküler Büyüklüğü (bp)
PNibF1 PCPR1	GGBAAYAATAGTGGNCAACC GGGGAGGTGCCGTTCTCDATRCACCA	1.2
FI 1778	GAG GCA TTG AAR ATG TTI IT AGG ATC CTG GGT AAT TC	675
FR 1778	GAG GCA TTG AAR ATG TTI IG AGG ATC CTG GGT AAT TC	675
ZY-FR 26 1778	GGT GAG GAG CAT TGA AGA ATG TTI IG AGG ATC CTG GGT AAT TC	1069
ZYMV-F1 ZYMV-R1	ACTGGCAGTACCTACAAGC CTTGGCAGCTACTACTGTTTTTC	250

R=A ve G; Y=C ve T; B=C, G veT; D=A, G ve T; N=A, C ,G ve T

3.1.7. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Agaroz jel elektroforez çalışmalarında, total nükleik asit ekstraksiyonu işlemi sonunda elde edilen total RNA' lar ve RT-PCR çal ışmalarında elde edilen PCR ürünleri ile RFLP çal ışmaları sonunda kesim yapılmış PCR ürünleri materyal olarak kullanılmıştır.

Agaroz jel elektroforez işleminde, agaroz, tampon çözeltiler, BIORAD marka Mini Sub. DNA Cell Elektroforez cihaz ı ve güç kayna ğı, UVP Ultraviolet Transilluminator marka UV ışık kaynağı, poloraid film ve poloraid Gel Cam marka fotoğraf makinesinden yararlanılmıştır.

3.1.8. RFLP Yönteminde Kullanılan Materyal

Araziden elde edilen ve bitki aktivatörlerinin ZYMV üzerine etkisinin ortaya konulması amacıyla yapılan saksı ve arazi çalışmaları sırasında kullanılan ZYMV izolatının yaprak bitleri ile taşınıp taşınmadığını (AT veya NAT) kontrol etmek üzere uygulanan RFLP yönteminde, RT-PCR ürünleri, MspI enzimi, ethidium bromide, agaroz, tampon çözeltiler, UVP Ultraviolet Transilluminator marka UV ışık kaynağı ve BIORAD marka Mini Sub. DNA Cell Elektroforez elektroforez aparatı ve güç kaynağı materyal olarak kullanılmıştır.

3.1.9. Dayanıklılığın Uyarılması Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Saksı denemeleri ve arazi koşullarında yapılan dayanıklılığın uyarılması çalışmalarında, MESSENGER, ISR-2000 ve ACTIGARD olmak üzere üç farklı bitki aktivatörü, biyolojik, serolojik ve moleküler tanı yapılmış ZYMV izolatı ile kabak bitkileri materyal olarak kullanılmıştır.

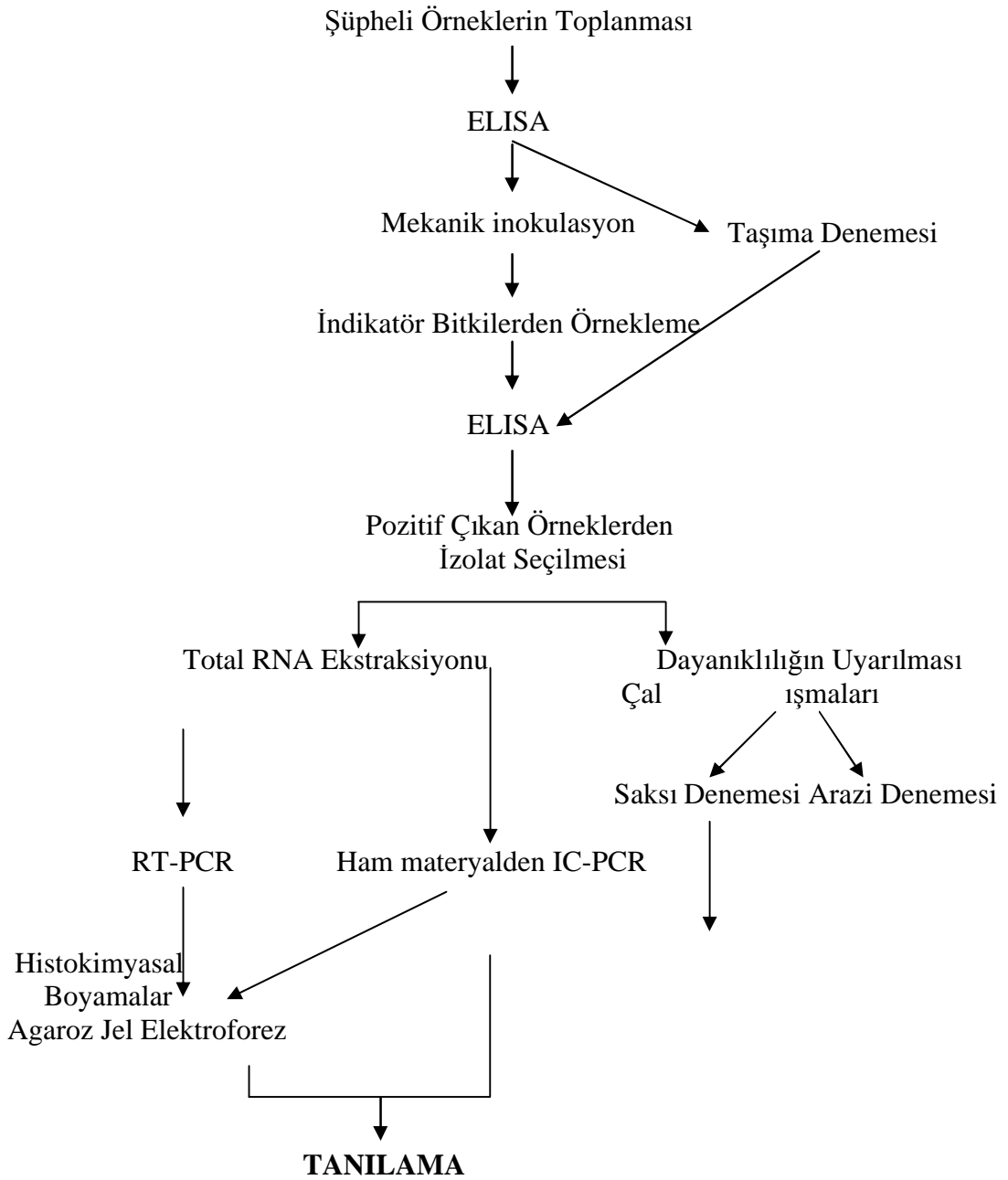
3.1.10. Histokimyasal Boyama Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Histokimyasal boyama çalışmaları sırasında, MESSENGER, ISR-2000 ve ACTIGARD olmak üzere üç farklı bitki aktivatörü uygulanarak yapılan saksı denemeleri sonunda, dayanıklılığın uyarıldığı kabak bitkilerinden alınan kök, gövde ve yaprak parçaları ile cam şişeler, steril bistüri, pens, DAB boyama seti, Phloroglucinol, Chloralhydrate, methanol, saf su ve 40X faz kontrast mikroskobu materyal olarak kullanılmıştır.

3.2. Metod

Bu çalışmada kullanılan ve ZYMV-FM olarak kodlanan izolat ın saptanması ve tan ılanması ile dayan ıklılığın uyar ılması çal ışımlarında izlenen yollar, Çizelge 3.3.' de verilmiştir.

Çizelge 3.3. ZYMV-FM' in Tan ılanması ve Dayan ıklılığın Uyar ılması Çalışmaları



3.2.1. Bitki Örneklerinin Toplanması ve Muhafazası

Çalışmada kullanılan ZYMV-FM izolatının elde edilmesi amacıyla, Adana ve İçel İlleri ile çevresinde yapılan arazi çıkışlarında, simptomatolojik olarak ZYMV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen kabakgil bitkilerinden sap, gövde, yaprak ve meyve örnekleri alınmış ve kağıt torbalara konulmuştur. Torbalar numaralandırılarak buz kutusu içerisinde uygun koşullarda laboratuara getirilmiş ve yapılacak olan çalışmalarda kullanılmaya kadar, 4- 7 gün gibi kısa bir süre için +4 °C’ de, daha uzun bir süre için ise, -20 °C’ de muhafaza edilmiştir.

Ayrıca, saksı ve arazi denemelerinde kullanılan kabak bitkilerinden de yukarıda anlatıldığı şekilde örnekleme yapılmış ve çalışmada kullanılmıştır.

Arazi çıkışları, 2005- 2006 yılları arasında ilkbahar ve yaz aylarında yapılmıştır.

Arazi koşullarında, ZYMV ile bulaşık olan bitkilerin belirlenmesi amacıyla öncelikle simptomatolojik gözlemler yapılmıştır. Örnek alınan bitkilerde, ZYMV’nin neden olduğu, bitkide bodurluk, kloroz, deformasyon, mozayik, genç sürgünlerde iplikleşme ve çiçek azalması gibi belirtiler aranmıştır. ZYMV tarafından meydana getirilen bu belirtilerin bir veya birkaçını gösteren kabak bitkilerinden yukarıda anlatıldığı şekilde bitki dokuları alınmış ve çalışmada kullanılmıştır.

3.2.2. Test Bitkilerinin Yetiştirilmesi

Çalışmada kullanılan ZYMV-FM izolatının biyolojik olarak tanımlanması amacıyla yapılan mekanik inokulasyon çalışmalarında, Çizelge 3.1’ de verilen test bitkileri kullanılmıştır.

Bu test bitkilerinden tütün, akkaza ve hanım düğmesi tohumları, önce metil bromid ile fumige edilmiş, toprak, kum, torf ve yanmış hayvan gübresi 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.

Kavun, karpuz ve kabak tohumları ise, toprak, kum, torf ve yanmış hayvan gübresi karışımını içeren plastik viollere tek tek ekilerek yetiştirilmiştir.

Test bitkileri, Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarı'na ait klima odasında, 22- 24 °C sıcaklık, % 70 nem, 16/ 8 saat (Işık/ Karanlık) ve 5000 Lüks aydınlatma koşullarında çimlendirilmiş, yetiştirilmiş ve muhafaza edilmiştir (Choueiri ve ark., 1993).

Yetiştirilen test bitkileri, zararlı-hastalık ve semptom gelişimi için araştırma boyunca periyodik olarak kontrol edilmiş ve bitkilerin sağlıklı büyümeleri için gerekli makro ve mikro besin elementleri sulama suyuna ilave edilerek bitkilere verilmiştir. Ayrıca, hastalık ve zararlılara karşı gerektiğinde pestisit uygulamaları yapılmıştır (Anonymous, 1990).

3.2.3. Mekanik İnokulasyon Yöntemi

Mekanik inokulasyon çalışmaları;

1. ELISA testleri sonucunda ZYMV ile bulaşık olduğu saptanan bitkilerden elde edilen ZYMV-FM izolatının biyolojik tanısı,
2. Total RNA izolasyonu çalışmalarında kullanılan bitki materyalinin elde edilmesi,
3. Saksı ve arazi denemelerinde kullanılan ZYMV-FM ile bulaşık yeterli miktarda bitki dokusunun elde edilmesi,
4. Saksı ve arazi çalışmaları bitki aktivatörü uygulanan kabak bitkilerine ZYMV-FM'nin bulaştırılması amacıyla, Mandal ve ark. (2001)'e göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

ZYMV-FM ile bulaşık bitkilerden alınan bitki dokuları, 1: 5 oranında 2-Mercaptoethanol ve/veya %1'lik sodyum sülfid içeren 0.02 M Fosfat tampon çözeltisi (pH; 7.0) içeren steril porselen havanda ezilmiş ve bitki özsuğu daha önceden karborandum tozu serpilmiş test bitkilerinin yapraklarına cam spatül kullanılarak mekanik olarak inokule edilmiştir. Birkaç dakika beklendikten sonra inokule edilen yapraklar çeşme suyu ile yıkanmıştır.

Daha sonra indikatör bitkiler simptom ç ıkışının gözlenmesi amacıyla, klima odasında, 22- 24 °C sıcaklık, % 70 nem, 16/ 8 saat (I ışık/ Karanlık) ve 5000 Lüks aydınlatma koşullarında muhafaza edilmişlerdir.

İnokule edilen bitkiler aşağıda verilen simptomlar bakımından periyodik olarak kontrol edilmiştir;

Nicotiana tabacum, *N. glutinosa*, *Nicotiana rustica* , *Nicotiana benthamiana*; ZYMV tütün türlerinde simptom göstermemektedir. Buna rağmen alınan örneklerin diğer bir virüsle daha bulaşık olup olmadığının testlenmesi amacıyla tütün bitkileri üzerine mekanik inokulasyonlar yapılmıştır.

Cucurbita pepo, *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Citrullus lanatus*; yapraklarda mozayik, damar bantlaşması ve sararma, genç yapraklarda ayakkabı bağı oluşumu şeklinde deformasyon, bitki gelişmesinde gerileme

Gomphrena globosa; sistemik olmayan lokal lezyonlar,

Chenopodium quinoa Wild. ve *C. amaranticolor* Costa & Reyn; sistemik olmayan klorotik lokal lezyonlar

3.2.4. Vektör ile Taşıma Denemeleri

Bu tez çalışmasının farklı aşamalarında kullanılan ZYMV-FM izolatının biyolojik karakterizasyonu kapsamında, yaprak biti ile taşınıp taşınmadığının kontrol edilmesi amacıyla *Myzus persicae* türüne ait yaprak bitleri kullanılarak yapılan vektörle taşıma denemeleri, Dijkstra ve Jager (1998)' e göre aşağıda anlatıldığı şekilde modifiye edilerek yürütülmüştür.

1. Üzerinde yaprak biti çoğaltılan virüsten arı olan pamuk bitkisinin bir yaprağı, üzerinde bulunan yaprak bitleri ile alınarak viroloji laboratuvarına getirilmiş ve bir petri kabının içerisinde buzdolabına +4 °C' ye yerleştirilmiştir.

2. Yaprak bitlerinin soğuktan dolayı hareketleri kısıtlanması ve aç kalmaları sağlanması amacıyla, 2- 3 saat süre ile bekletilmiş ve daha sonra yaprak biti bireyleri pamuk yaprağı üzerinden tek tek alınarak ZYMV ile infekteli kabak bitkisinin yaprakları üzerine konulmuştur.

3. Yapılan taşıma denemelerinde 10' ar adet 10-14 günlük kabak fideleri kullanılmış ve her bir kabak bitkisinin üzerine en az 10' ar adet yaprak bitinin gelmesine dikkat edilmiştir.

4. Sağlıklı kabak bitkileri üzerinde en az 1 saat beslenmesi sağlanan yaprak bitleri uygun bir insektisit ile ilaçlanmış ve simptom çikışının gözlenmesi amacıyla, 22-24 °C sıcaklık, %70 nem, 16/8 saat (Işık/Karanlık) ve 5000 Lüks ışık aydınlatma koşullarına sahip kontrollü klima odasında, tül kafes içerisinde (virüs vektörü olabilecek diğer zararlıların bulaşmasının engellenmesi amacıyla) muhafaza edilmiştir.

Yaprak bitlerinin stiletlerinin kırılmasının engellenmesi amacıyla, pamuk bitkisinin yaprağı üzerinden alınmadan önce sulu boya fırçasının ucu ile yaprak bitine hafifçe dokunulmuş ve stiletini bitkiden çektiğinden emin olduktan sonra, aynı fırça ile dikkatli bir şekilde alınarak ZYMV-FM ile infekteli kabak bitkisinin yaprağı üzerine aktarılmıştır.

3.2.5. Serolojik Çalışmalar

Serolojik çalışmalarda;

1. Arazi çikışlarında toplanan ve simptomatolojik olarak ZYMV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen kabakgil bitkileri,
2. Mekanik inokulasyon çalışmaları sonunda simptom gözlenen indikatör bitkiler,
3. Saksı ve arazi denemelerinde bitki aktivatörlerinin uygulandığı kabak bitkileri,
4. Vektör ile taşıma denemelerinin sonunda simptom gözlenen kabak bitkileri, Double Antibody Sandwich (DAS) ELISA yöntemi ile ZYMV, CMV, SqMV, PRSV ve WMV' e karşı testlenmiştir.

3.2.5.1. DAS-ELISA Testi

DAS-ELISA çalışmaları, Clark ve Adams (1977) tarafından bildirilen yöntemine göre yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan sulandırma oranları ELISA kitlerinin temin edildiği ticari firmanın belirttiği oranlar dikkate alınarak yapılmış ve modifiye edilerek aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

1. Testlenen virüse spesifik γ -globulin, kaplama tamponu içerisinde belirli oranda sulandırılarak, ELISA pleytlerine her çukura 100 μ l konulmuştur.

2. Pleytler, 30 $^{\circ}$ C'de 4 saat inkübasyona tabi tutulduktan sonra, yıkama tamponu ile her yıkama 3'er dakika olacak şekilde 3 kere yıkanmıştır.

3. Ekstraksiyon tampon çözeltilisinde 1/10 oranında hazırlanmış olan bitki ekstraktından her kuyuya 100'er μ l konulmuş ve pleytler +4 $^{\circ}$ C'de bir gece inkübasyona bırakıldıktan sonra yıkama tamponu ile yukarıdaki şekilde yıkanmıştır.

4. Konjugat tamponu çözeltilisi içerisinde sulandırılmış olan enzimle işaretli γ -globulinden (Konjugate) her kuyuya 100'er μ l konulmuş ve 30 $^{\circ}$ C'de 5 saat inkübasyondan sonra pleytler yıkama tamponu ile yukarıdaki şekilde tekrar yıkanmıştır.

5. Son olarak pleytlerin herbir kuyusuna substrate tampon çözeltilisinde 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 herbir örnek için işer kuyu kullanılmış ve her bir ELISA pleytinde birer adet pozitif (infekteli), negatif (sağlıklı) ve buffer kontrol bulunmasına dikkat edilmiştir.

ELISA testleri sonunda, ELISA kuyucusunda negatif kontrol için 405 nm'de okunan 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).

ELISA testlerinde kullanılan tampon çözeltiler ve bunların hazırlanması Ek 1’de verilmiştir.

3.2.6. Total RNA Ekstraksiyonu

ELISA testi sonucunda ZYMV ile infekteli olduğu saptanan arazi örneklerinden ve mekanik inokulasyon yöntemi ile ZYMV-FM aşılanan indikatör bitkilerden alınan genç yapraklar kullanılarak yapılan total RNA izolasyon çalışmaları, Astruc ve ark., (1996)’nin önerdiği yönteme göre yürütülmüştür.

Total RNA ekstraksiyonu yönteminde izlenen basamaklar:

1. Bitki örnekleri ekstraksiyon tamponu (100mM Tris-HCl pH.8.0, 50mM EDTA b-pH. 7.0, 500 NaCl, 10mM 2. mercapto-ethanol (1/1000)) içerisinde 1: 2 (w/v) oranında sulandırılarak ekstrakte edilmiş ve bitki özsuyu steril tülbentten süzümüştür.

2. Bitki öz suyundan 1ml alınarak eppendorf tüpleri içerisine yerleştirilmiş ve örnekler 3 dakika 4.000 rpm’de santrifüj edilmiştir.

3. Pelet üzerine % 20’lik sodium dodecyl sulfat (SDS)’den 50 µl ilave edilerek vortekste karıştırılmış ve sonra tüpler 65 °C’de 30 dakika su banyosunda inkübe edilmiştir.

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

5. Elde edilen süpernatant iki kısma ayrılmış ve 500 µl’i yeni hazırlanmış eppendorf tüplerine konarak -70 °C’de saklanmıştır.

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

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

7. Örnekler 15 dakika 14.000 rpm' de santrifüj edilerek süpernatant kısmı ortamdan uzaklaştırılmıştır.

8. Eppendorf tüpleri filtre kağıdı üzerinde ters çevrilerek 5 dakika kurutulmuş ve pellet üzerine % 70' lik ethanolden 1ml ilave edilmiştir.

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

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

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

3.2.7. RT-PCR Çalışmaları

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), 1980' li yıllardan itibaren in vitro ortamda spesifik bir DNA parçasının kopyalarının kısıtlı zincirli oligonükleotid primerler yardımı ile yönlendirilerek enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanmaktadır.

DNA molekülündeki dizisi bilinen iki bölge arasındaki spesifik DNA parçasını çoğaltmak amacıyla, çok az miktarda mRNA' dan cDNA' lar oluşturularak bitki patojenleri' nin nükleik asit dizileri belirlenebilmektedir. 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 yardımı ile cDNA' lar elde edilir ve daha sonra bu cDNA' lar PCR işlemiyle çoğaltılır (RT-PCR).

Bu tez çalışmasında kullanılan ZYMV-FM izolatının moleküler yöntem ile tanımlanması, şiddetli veya zayıf olduğu, yaprak bitleri ile taşınıp taşınmadığı ve bir potyvirus üyesi olduğu gibi özelliklerini ortaya koymak amacıyla RT-PCR ve RFLP çalışmaları yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan ZYMV izolatının moleküler olarak tanımlanması

amacıyla, mekanik inokulasyon yöntemi ile ZYMV-FM a şılanan indikatör bitkilerden alınan dokularından elde edilen total RNA preparasyonları, potyviruslere ve ZYMV' ye spesifik, s ırasıyla PNIBF1 + PCPR1 ve ZYMV-F1 + ZYMV-R1 primer çiftleri ile RT-PCR işleme tabi tutulmuştur.

ZYMV izolat ının şiddetli veya zayıf olduğu nun moleküler olarak ortaya konulması amacıyla da, FI + 1778 (Zayıf), FR + 1778 (Şiddetli) ve FR26 + 1778 (Şiddetli) şeklinde kombine edilmiş primer çiftleri kullan ılarak RT-PCR yöntemi uygulanmıştır.

RT-PCR işlemi, Finetti- Sialer ve ark. (1999)' n in bildirdi ği yöntem modifiye edilerek aşağıdaki şekilde yürütülmüştür.

İki aşamada yapılan RT-PCR yönteminde I. aşamada; RT (Reverse transcription) işlemi ile cDNA'lar elde edilmiş, II. aşamada ise, bu cDNA' lar kullanılarak PCR işlemi yapılmıştır.

I. RT aşamasında; her PCR tüpüne, elde edilmiş total RNA' dan 3 µl konulmuş ve üzerine 2 µl reverse primer ve 10 µl ddH₂O ilave edilerek 95 °C' de 3 dakika bekletilmiştir. Daha sonra tüpler buz üzerine alınmış ve bu PCR tüplerine, 3.6 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 (10 mM), 0.3 µl RNase ve 0.1 µl RT enzimi ilave edilerek, 42 °C' de 60 dakika inkübe edilmiştir. Sonuçta, cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

II. PCR aşamasında ise, ayrı bir PCR tüpüne, yukarıdaki işlemlerden elde edilen cDNA' dan 10 µl konulmuş, üzerine 26.5 µl saf su, 5 µl 10X PCR tampon çözeltisi (100 mM) Tris- HCl (pH 8.8), 500 mM KCl, % 0.8 Nonidet P40), 3 µl MgCl₂ (25mM), 2 µl dNTP (10 mM), 0.5 µl Taq DNA polymerase, 2 µl forward primer ve 1 µl reverse primer ilave edilmiştir.

Daha sonra tüpler;

94 °C'de 4 dakika	1 döngü
94 °C ' de 30 saniye	35 döngü
56- 62 °C' de 1 dakika	
72 °C ' de 2 dakika	
72 °C'de 10 dakika	1 döngü

olacak şekilde ayarlanmış termocycler'a yerleştirilerek PCR aşaması tamamlanmıştır.

RT-PCR çalışmaları, agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak gözlenmiştir.

RT-PCR yönteminin I. a şamasında tüp içerisindeki karışımın toplam hacmi 25 µl, II. a şamasındaki toplam hacim ise, 50 µl olacak şekilde hesaplanarak hazırlanmıştır.

Çalışmada kullanılan farklı sıcaklıklar ve bunların neden kullanıldıkları aşağıda verilmiştir.

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

b. 94 °C' de 4 dakika; 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 a şamasında bu cDNA çoğaltılacaktır.

c. 94 °C' de 30 saniye; 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. 52 °C' de 1 dakika; Kullanılan primerlerdeki G, C, A ve T baz miktarları göz önünde bulundurularak $Tm=(G+C) \times 4 + (A+T) \times 2$ formülü (Tm =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 dakika; 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 çalışacak şekilde ayarlanmıştır.

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

3.2.7.1. Amplifikasyon Sırasında Kullanılan Kimyasalların Optimum Konsantrasyonlarının Ayarlanması

ZYMV için kullanılan primerler farklı pmol konsantrasyonlarında purifiye edilmişlerdir. Amplifikasyon sırasında kullanılmak amacıyla PNIbF1 10\57, PCPR1 10\57, FI 10\ 70, 1778 10\ 75, FR 10\ 40, ZY-FR 26 10\ 37, ZYMV-F1 10\ 57, ZYMV-R1 10\ 59 (Pr/ H₂O) oranında ddH₂O ile sulandırılarak 10 pmol'e ayarlanmıştır.

3.2.8. RFLP Çalışmaları

Çalışmada kullanılan ZYMV-FM izolatının yaprak bitleri ile taşınır olup olmadığı (AT veya NAT) ortaya konulması amacıyla, FR26 + 1778 (şiddetli) primer çifti ile yapılan RT-PCR işlemi sonucunda elde edilen PCR ürünleri, MspI enzimi ile muameleye tabi tutulmuş ve sonuç agaroz jel elektroforezde gözlenmiştir.

RFLP işlemi firmanın önerileri doğrultusunda modifiye edilerek aşağıdaki şekilde yürütülmüştür;

PCR tüpü içerisinde aşağıdaki karışım hazırlanmış;

8 µl saf su

Tampon çözelti (Y tango, MBI Fermentas)

PCR ürünü

MspI (MBI Fermentas)

Bu PCR tüpleri 1 saat süre ile 37 C' de reaksiyona bırakılmış ve sonuçlar agaroz jel elektroforezde gözlenmiştir.

3.2.9. IC-RT-PCR Çalışmaları

Yaprak biti taşıma denemeleri sonunda ZYMV-FM bulaştırılan indikatör bitkilerden alınan bitki dokuları kullanılarak yapılan IC-RT-PCR yöntemi, Wetzel ve ark. (1992)' nin bildirdiği yönteme göre modifiye edilerek aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

1. PCR tüplerine BIOREBA firmasının bildirdiği prosedüre uygun olarak kaplama tampon çözeltisi (pH 9.6) içerisinde 1/ 1000 oranında hazırlanan ZYMV' ye spesifik γ - globulinden (IgG) 50 μ l konulmuştur.

2. Tüpler 37 °C' de 4 saat inkübe edildikten sonra yıkama tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi her biri 3'er dakika olmak üzere 3 kez tekrarlanmıştır. Yıkama işlemi sonunda tüplerin iyice kurulanmasına dikkat edilmiştir.

3. IgG kaplanan tüplere, ekstraksiyon tampon çözeltisinde 1:10 oranında sulandırılarak hazırlanan bitki öz suyundan 50 μ l ilave edilmiş ve tüpler buzdolabında +4 C' de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

4. Tüpler yukarıdaki şekilde tekrar yıkanmış ve içerisine; 26.5 μ l saf su, 5 μ l 10X PCR tampon çözeltisi (100 mM) Tris- HCl (pH 8.8), 500 mM KCl, % 0.8 Nonidet P40), 3 μ l MgCl₂ (25mM), 2 μ l dNTP (10 mM), 0.5 μ l Taq DNA polymerase, 2 μ l forward Primer, 1 μ l reverse primer, 5 μ l RT tampon çözeltisi (250 mM Tris- HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTI), 0.3 μ l RNase ve 0.1 μ l RT enzimi ilave edilmiş ve daha sonra tüpler aşağıdaki verilen programa göre ayarlanmış termocycle' a yerleştirilmiştir.

42 °C' de 60 dakika	1 döngü
94 °C' de 4 dakika	1 döngü
94 °C ' de 30 saniye	35 döngü
56 °C ' de 1 dakika	
72 °C ' de 2 dakika	
72 °C' de 10 dakika	1 döngü

IC-RT-PCR i şleminin sonuçları, agaroz jel elektroforez yöntemi ile test edilmiştir.

3.2.10. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları

Total nükleik asit, RT-PCR, IC-RT-PCR ve RFLP i şlemlerinin sonuçları aşağıdaki şekilde hazırlanan %1' lik agaroz jel elektroforez yöntemine tabi tutularak gözlenmiştir. Gallitelli ve Minafra (1994)' e göre uygulanan yöntemde;

1. Cam erlen içerisine 300 mg agaroz ve 30 ml 1 X TBE veya 1 X TAE tampon çözeltisi (4.84 gr Tris, 2 ml 0.5 M Na₂EDTA, 1.142 ml Glucial Asetic Acid/1lt) konulmuş ve agaroz tam olarak eriyinceye kadar mikrodalga fırında tutulmuştur. Daha sonra, üzerine tampon çözeltiden ilave edilerek son hacim 30 ml olacak şekilde ayarlanmıştır.
2. Karışım bir süre soğumaya bırakılmış ve elektroforez aparatında jel hazırlanan kısma boşaltılarak tarak takılmıştır.
3. Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çekilmiş ve bu kısım elektroforez tankına yerleştirilerek üzerine jeli 1-2 mm geçecek kadar 1 X TAE tampon çözeltisi ilave edilmiştir.
4. Örnekler, 15 µl örnek ve 3 µl 6x Loading buffer olacak şekilde hazırlandıktan sonra toplam 18 µl karışım jeldeki kuyulara dikkatli bir şekilde yüklenmiştir. İlk kuyuya marker (5 µl marker, 1 µl loading buffer) konulmuştur.

5. Loading buffer içerisindeki turuncu renk (Orange G) jelin sonuna gelene kadar elektroforez tankına 40 V elektrik akımı verilmiştir.
6. Jel, elektroforez işlemi sonunda, oda sıcaklığında 10 dk. süre ile 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.
7. Yıkanan jel, UV Transilluminatör üzerine konularak, UV ışıkta ortaya çıkan bantlar gözlenmiş ve fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.11. Dayanıklılığın Uyarılması Çalışmaları

Bitki aktivatörleri kullanılarak kabak bitkilerinin uyarılması ve bunun ZYMV' ye karşı mücadelede kullanılabileceğinin ortaya konulması amacıyla yapılan dayanıklılığın uyarılması çalışmaları, saksı ve arazi koşullarında olmak üzere iki farklı şekilde yürütülmüştür.

Her iki denemede kabak bitkileri kullanılmış ve bunlar üzerine 3- 4 yapraklı döneme geldikleri zaman MESSENGER, ISR-2000 ve ACTIGARD isimli bitki aktivatörleri ile uygulamalar yapılmıştır.

Kullanılan bitki aktivatörlerinin etkinlikleri ZYMV-FM ile bulaşık olan veya olmayan bitki sayısı ile simptom çıkış süreleri ve hastalık oranı dikkate alınarak saptanmıştır.

3.2.11.1. Saksı Denemeleri

Saksı denemeleri, öncelikle ZYMV-FM' ye karşı dayanıklılığın uyarılması çalışmalarında kullanılan üç farklı etkili maddeye sahip olan bitki aktivatörlerinin uygulanacak doz miktarları ile bitkide en etkili oldukları zamanın belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Saksı denemeleri; tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş ve her bir deneme deseni 3 tekerrürden oluşturulmuştur. Her bir karakter (bitki aktivatörü)

için kontrol (Bitki aktivatörü uygulanmamış ZYMV-FM ile inokule edilen bitkiler) ile birlikte 20' şer bitki kullanılmıştır.

ACTIGARD 0.2 g/lt, MESSENGER (EDEN BIOSCIENCE, AMC-TR) 0.5 g/lt, ISR- 2000 (IMPROCROP, ARES) 10 ml/lt konsantrasyonlarında çeşme suyu içerisinde hazırlanmış ve her bir kabak fidesine 15 ml gelecek şekilde uygulanmıştır (Kang ve Buchenauer, 2001; Baysal ve ark., 2003).

Bitki aktivatörlerinin bitki bünyesinde en etkili olduğu zamanın belirlenmesi amacıyla, bunların bitkiye uygulanmasından sonraki 24, 48, 72 ve 96 saatleri takiben aynı bitkiler üzerine, biyolojik ve moleküler tanımlanmış ZYMV-FM izolatını mekanik inokulasyon yöntemi ile bulaştırılmıştır (Louws ve ark., 2001; Kang ve Buchenauer, 2001; Bokshi ve ark., 2003; Baysal ve ark., 2003). Uygulamadan sonraki 7- 21 gün süre içerisinde bu kabak bitkileri üzerinde ZYMV belirtilerinin varlığı ve bu belirtilerin çıkış zamanı, takip edilmiş ve var/ yok ve erken/ geç şeklinde değerlendirilmiştir.

Bu çalışmanın sonuçlarının değerlendirilmesi, dayanıklılığı teşvik edicilerin uygulanmadığı kontrol bitkiler üzerinde ilk belirtiler çıkışının gözlenmesi ile başlamıştır. Dayanıklılık uyarıcılar uygulandıktan sonra belirlenen zaman aralıklarında virüs inokulasyonu yapılarak, bitkide ZYMV' ye karşı bir reaksiyon olarak gelişen SAR mekanizmasının en aktif olduğu optimum zaman aralığı ve uygun doz belirlenmiştir.

Bitki aktivatörlerinin ZYMV' ye karşı kullanılabilecek en etkin dozlarının belirlenmesi amacıyla yapılan saksı denemeleri de aşağıdaki şekilde yürütülmüştür.

Bu amaçla yapılan çalışmalarda, ticari olarak üretilmiş olan bitki aktivatörlerinin kullanım prosedürlerinde belirtilen doz miktarı ile bu dozun yarısı ve iki katı şeklinde 3 farklı tip uygulama yapılmıştır. Bu denemeler, diğer çalışmalarda olduğu gibi tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş ve 3 tekrardan oluşmuştur. Bu denemelerde her bir karakter için kontrol ile birlikte 20' şer kabak bitkisi kullanılmıştır. Kullanılan bitki aktivatörlerinin dozları çizelge 3.4' de verildiği şekilde uygulanmıştır.

Bitki aktivatörlerinin uygun dozunun saptanması amacıyla yapılan çalışmalar, kabak bitkilerine bitki aktivatörlerinin tek uygulaması ve ayrıca belirtiler çıkışını

takiben bir kısımlı bitkilere ikinci bir uygulamada tekrar yapılması şeklinde yürütülmüş ve değerlendirilmiştir.

Simptomatolojik olarak gözlenen ve değerlendirilen bu bitkilerden alınan kök, gövde ve yaprak dokuları histokimyasal boyamalarda materyal olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. Bitki Aktivatörlerinin Farklı Uygulama Dozları

	DOZ1	DOZ2	DOZ3
ACTIGARD	0.1g/lt	0.2g/lt	0.4g/lt
MESSENGER	0.25g/lt	0.5g/lt	1g/lt
ISR- 2000	5ml/lt	10ml/lt	20ml/lt

3.2.11.2. Arazi Denemeleri

Saksı denemelerinde uygulama dozları, uygulama zamanları ve etkinlikleri belirlenen dayanıklılık uyarıcılarının arazi koşullarında da etkinlikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Ç.Ü.Z.F. Bitki Koruma Bölümü Araştırma ve Uygulama Arazisi'nde 24 m X 4 m boyutlarında kurulan iki alçak tünelde, Mayıs-Temmuz ayları arasında Alba kabak çeşidiyle deneme kurulmuştur. Tesadüf blokları deneme desenine göre 5 tekerrürlü olarak kurulan denemede her karakter için 30'ar bitki kullanılmıştır. Bitkilerde hastalık etmenlerine karşı dayanıklılığı teşvik edici olarak da kullanılan ACTIGARD, MESSENGER ve ISR- 2000 üretici firmaların önerdiği şekilde ve dozda, 3- 4 yapraklı kabak fidelerinin yeşil aksamına, şaşırtılmadan önce püskürtme şeklinde uygulanmıştır.

Bitki aktivatörlerinin uygulanmasından sonraki 24, 48, 72 ve 96 saatleri takiben aynı kabak bitkileri üzerine, biyolojik ve moleküler tanı yapılmış ZYMV-FM izolatı mekanik inokulasyon yöntemi ile bulaştırılmıştır (Louws ve ark., 2001; Kang ve Buchenauer, 2001; Bokshi ve ark., 2003; Baysal ve ark., 2003). Daha sonra ZYMV inokule edilen bu kabak fideleri araziye 50 X 50 cm olacak şekilde şaşırtılmıştır. Bitki aktivatörü uygulanmış ve ZYMV-FM inokule edilmiş bu kabak

bitkileri üzerinde 7- 21 gün süre ile ZYMV belirtilerinin varlığı, belirtilerinin çıkış zamanı ve hastalık oranı takip edilmiştir.

Arazi denemesi süresince klasik yetiştiricilik işlemleri uygulanmıştır. Sulama damlama sulama sistemiyle gerçekleştirilmiş ve bitkiler şaşırtıldıktan bir ay sonra sulamadan hemen önce üre uygulanmıştır. Şaşırtmadan on beş gün sonra topraktaki kaymak tabakasını kırmak amacıyla çapalama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.11.3. Histokimyasal Boyamalarla Lignin Sentezinin Belirlenmesi

Dayanıklılığın uyarıldığı kabak bitkilerinden alınan yaprak, kök ve gövde parçaları kullanılarak, bitki aktivatörlerinin kullanılması sonucu, infekteli bitki dokularının enfeksiyon ve reaksiyon yerlerinde ortaya çıkan lignin sentezi, Floroglucinol/HCl Testi ile belirlenmiştir.

Saksı denemelerinde, ACTIGARD, ISR- 2000 ve MESSENGER uygulamaları yapılan kabak bitkileri saksılardan kök bölgesi zararlanmadan çıkarılmış çeşme suyunda yıkanmıştır. Bu bitkilerin kök ve gövdelerinden steril bir bistüri ile 3- 5 mm uzunluğunda, yapraklardan ise, 5 mm çapında kesitler alınmıştır. İnfekteli dokulardaki klorofiller, %1 Phloroglucinol (MERCK) içeren %100' lük metanol içerisinde, oda sıcaklığında 1 gece bekletilerek uzaklaştırılmıştır. Daha sonra beyazlaşan doku örnekleri, kloral hidrat (2.5 g/ml) içerisinde en az 24 saat bekletilerek dokular şeffaflaştırılarak temizlenmiştir. Metanol yardımı ile klorofil uzaklaştırılarak kloral hidrat (MERCK) ile temizlenen dokular steril bir lam üzerine alınarak, üzerine 1-2 damla konsantre HCl ilave edilerek 10 dak. bekletilmiştir. Daha sonra bu dokuların üzerine birkaç damla %50' lik gliserol çözeltisi damlatılmış ve lamel kapatılarak bu şekilde hazırlanan preparatlar incelenmiştir. İnfekteli dokuların üzerine HCl eklendikten ortalama 10 dak. sonra, ligninleşmiş yapılar koyu pembe-turuncu bir renk oluşturmuştur. Boyanmış dokuların 3-5 saat sonra renklerini kaybetmeleri nedeniyle preparatlar, mümkün olduğunca kısa süre içerisinde, faz kontrast ışık mikroskop kullanılarak 20X ve 40X büyütmede incelenmiş ve görüntü alınmıştır (Gahan 1984; Vallet ve ark., 1996; Soylu, 1999). Boyama işlemleri, pozitif ve negatif kontrol bitkilerinin her ikisi için yapılmıştır.

3.2.11.4. Histokimyasal Boyamalarla H₂O₂ Sentezinin Belirlenmesi

Dayanıklılığın uyarıldığı kabak bitkilerinde, infekteli dokularda infeksiyon ve reaksiyon yerlerinde meydana gelen H₂O₂ sentezi, DAB (3,3'-diaminobenzidine) testi ile belirlenmiştir.

Bu yöntemde de, saksı denemelerinde, ACTIGARD, MESSENGER ve ISR-2000 uygulaması yapılan kabak bitkileri saksılardan kök bölgesi zararlandırılmadan çıkarılmış ve çeşme suyunda yıkanmıştır. Bu bitkilerin kök ve gövdelerinden steril bir bistüri ile 3-5 mm uzunluğunda, yapraklarından ise 5 mm çapında kesitler alınmıştır. İnfekteli dokular önce karanlıkta 15- 25 dak. arası DAB içerisinde bekletilerek yıkanıp bitki dokularından klorofilin uzaklaştırılması için metanol içerisinde bir gece bekletilmiştir. Beyazlaşan doku örnekleri, kloral hidrat (2.5 g/ml) içerisinde en az 24 saat bekletilerek dokular şeffaflaştırılarak temizlenmiştir. Metanol yardımıyla klorofil uzaklaştırılarak kloral hidrat (Merck) ile temizlenen dokular steril bir lam üzerine alınarak, üzerine birkaç damla %50' lik gliserol çözeltisi damlatılmış ve lamel kapatılarak bu şekilde hazırlanan preparatlar incelenmiştir. Dayanıklılığın uyarıldığı yerlerde kahverengi renk değişimleri gözlenmiştir. Boyanmış dokuların 3-5 saat sonra renklerini kaybetmeleri nedeniyle, hazırlanan preparatlar, mümkün olduğunca kısa süre içerisinde, faz kontrast mikroskobu kullanılarak 20X ve 40X büyütmede incelenecek ve görüntü alınacaktır (Soylu, 1999).

Boyama işlemleri, pozitif ve negatif kontrol bitkilerinin her ikisi için yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. ZYMV ile Bulaşık Bitkilerin Belirlenmesi

Bu tez çal ışmasında kullanılan ve biyolojik, serolojik ve moleküler olarak tanılanması yapılan ZYMV-FM izolat ının elde edilmesi amacıyla, örtü alt ı ve açıkta kabakgil üretimi yapılan alanlarda öncelikle simptomatolojik gözlemler yapılmıştır.

Genel olarak örneklemelerin yapı ldığı bitkilerin yapraklar ında mozayik, kloroz, deformasyon, genç sürgünlerin yapraklar ında ayakkab ı ba ğı simptomu, bitkide gelişme gerili ği ve bodurluk, çiçeklenmede azalma, meyve üzerinde deformasyon ve kabarc ık simptomları aranmıştır. Bu simptomlardan bir veya birkaçını gösteren kabakgil bitkilerinden testlemek amacıyla yaprak ve meyveleri alınmıştır (Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5).

Buna göre; Adana ve İçel illeri ile ba ğlı ilçelerde yapılan arazi ç ıkışlarında; 126 kabak, 4 kavun ve 1 karpuz bitkisinden örneklemeler yapı lmış ve toplam 131 kabakgil bitkisi ELISA yöntemi ile testlenmiştir.

ELISA testleri sonucunda, ZYMV ile infekteli oldu ğu saptanan örneklerden bir tanesi seçilmiş ve mekanik inokulasyon, RT-PCR, IC-RT-PCR ve dayan ıklılığın uyarılması çal ışmalarında ZYMV-FM izolat ı olarak kullan ılmıştır. Bu izolat ın seçilmesinde öncelikle arazi gözlemleri dikkate alınmıştır.



Şekil 4.1. Kabak meyvesinde deformasyon ve siğiller



Şekil 4.2. Kabak meyvesinde içe doğru çöküntüler



Şekil 4.3. Kabak bitkisi yapraklarında deformasyon ve iplikleşme



Şekil 4.4. Kabak bitkisi yapraklarında deformasyon ve iplikleşme



Şekil 4.5. Kavun bitkisi yapraklarında deformasyon ve kabarcıklar

4.2. Mekanik İnokulasyon Çalışmaları

Arazi çıkışlarında ZYMV' nin neden olduğu yaprak ve meyve belirtilerini gösteren ve yapılan ELISA testleri sonucunda ZYMV ile bulaşık olduğu saptanan kabak bitkisinden elde edilen ZYMV-FM kodlu izolatın Çizelge 3.1.'de verilen indikatör bitkileri üzerine yapılan mekanik inokulasyon çalışmaları sonucunda Çizelge 4.1' de verilen sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.1. Mekanik İnokulasyon Çalışmalarında İndikatör Bitkiler Üzerinde Gözlenen Belirtiler

İndikatör Bitkiler	Latince Adı	Gözlenen Belirtiler
Tütün Türleri	<i>Nicotiana rustica</i>	-
	<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	-
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	-
	<i>Nicotiana tabacum</i>	-
Kabak	<i>Cucurbita pepo</i>	D, M, GG, AB, K, DB
Kavun	<i>Cucumis melo</i>	D, M, GG, K, DB
Hıyar	<i>Cucumis sativus</i>	D, M, GG, K, DB
Karpuz	<i>Citrullus lanatus</i>	D, M, K
Hanım düğmesi	<i>Gomphrena globosa</i>	LL
Akkaz Ayağı	<i>Chenopodium quinoa</i> Wild.	CLL
	<i>C. amaranticolor</i> Costa & Reyn	CLL

D: Yaprak deformasyonu, **M:** Mozayik, **GG:** Gelişme geriliği, **DB:** Damar bantlaşması, **LL:** Lokal lezyon, **CLL:** Klorotik Lokal Lezyon, **AB:** Ayakkabı Bağı Belirtileri, **K:** Kloroz, **-:** Belirtilersiz

Çizelge 4.1.' e göre, farklı dönemlerde tekrarlanan mekanik inokulasyon çalışmaları sonunda, kullanılan ZYMV-FM kodlu ZYMV izolatı, *Nicotiana rustica*, *N. glutinosa* L., *N. benthamiana* ve *N. tabacum* bitkileri üzerinde herhangi bir belirtiler oluşturmemiştir. Buna karşılık, kavun ve hıyar bitkisi üzerinde, yapraklarda

deformasyon, mozayik, kloroz ve damar bantlaşması simptomları ile birlikte bitkide genel bir gelişme geriliği gözlenmiştir (Şekil 4.8, 4.9, 4.10 ve 4.11). Kabak bitkisinde bu simptomlar daha şiddetli ve belirgin olarak ortaya çıkmış ve ileriki aşamalarda bunlara ilaveten yapraklarda ayakkabı bağı simptomsu da ortaya çıkmıştır (Şekil 4.12, 4.13, 4.14 ve 4.15). Karpuz bitkisinde ise, yapraklarda deformasyon, mozayik ve kloroz simptomları meydana gelmiştir (Şekil 4.6 ve 4.7).

ZYMV-FM kodlu ZYMV izolatından *Gomphrena globosa*, *Chenopodium quinoa* Wild. ve *C. amaranticolor* Costa & Reyn indikatör bitkileri üzerine yapılan mekanik inokulasyonlar sonucunda ise, yapraklarda lokal lezyonlar gözlenmiştir (Şekil 4.16, 4.17 ve 4.18).

Mekanik inokulasyon yöntemi ile ZYMV-FM bulaştırılan indikatör bitkiler üzerinde simptomlar, inokulasyonun yapıldığı tarihten sonraki 7- 10 gün içerisinde ortaya çıkmıştır. Simptom çıkışı, ilk olarak kabak bitkisinde, daha sonra sırasıyla kavun, hıyar ve karpuz bitkilerinde gözlenmiştir.

Literatürlerde ZYMV'nin yabancı ot konukçusu olarak adları geçen ve mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan *G. globosa*, *C. quinoa* Wild., *C. amaranticolor* Costa & Reyn indikatör bitkileri üzerinde ilk simptom çıkışı, *Chenopodium quinoa* Wild.'da saptanmış ve daha sonra sırasıyla *C. amaranticolor* Costa & Reyn ve *Gomphrena globosa* üzerinde gözlenmiştir.

C. quinoa Wild. ve *C. amaranticolor* Costa & Reyn yaprakları üzerindeki klorotik lokal lezyonların ileriki aşamalarda kuruyup döküldüğü fark edilmiştir. *Gomphrena globosa*'da ise sadece lokal lezyonlar saptanmış ve herhangi bir dökülme olmamıştır.

Greber ve ark.'nın 1988 yılında 5 familyadan 20 bitki türü üzerine ZYMV bulaştırarak yaptıkları bir çalışmada; kullandıkları test bitkilerinden *C. amaranticolor* Costa & Reyn üzerinde kırmızı lezyonlar, *Citrullus* sp.cv. Egusi üzerinde mozayik simptomlar, *Cucumis melo* üzerinde mozayik, cüceleşme ve klorotik nekrozlar, *Cucumis sativus* üzerinde mozayik ve *Cucurbita maxima* ve *pepo* üzerinde şiddetli

mozayikler meydana getirdi ğini saptam ıŐlardır. Bu bulgular bu çalışmada ortaya çıkan sonuçlarla baĝdaŐmaktadır.



Şekil 4.6. Karpuz bitkisi yapraĝında deformasyon ve kabarcıklar



Şekil 4.7. Karpuz bitkisi yapraĝında mozayik simptome



Şekil 4.8. Kavun bitkisi yaprağında mozayik ve kabarcıklar



Şekil 4.9. Kavun bitkisi yaprağında damar bantlaşması ve mozayik



Şekil 4.10. Hıyar bitkisi yaprağında mozayik ve deformasyon



Şekil 4.11. Hıyar bitkisi yaprağında mozayik ve damar bantlaşması



Şekil 4.12. Kabak bitkisi yaprağında kabarcıklar



Şekil 4.13. Kabak bitkisi yaprağında mozayik ve kabarcıklar



Şekil 4.14. Kabak bitkisi yaprağında damar bantlaşması



Şekil 4.15. Kabak bitkisi yaprağında iplikleşme ve deformasyon



Şekil 4.16. *Chenopodium quinoa* Wild. bitkisi yaprağında klorotik lokal lezyon



Şekil 4.17. *C. amaranticolor* Costa & Reyn bitkisi yaprağında klorotik lokal lezyon



Şekil 4.18. *Gomphrena globosa* bitkisi yaprağında lokal lezyon

4.3. Vektör ile Taşıma Denemeleri

Bu tez çalışmasında kullanılan ZYMV-FM kodlu ZYMV izolat ının biyolojik karakterizasyonu kapsam ında, yaprak biti *Myzus persicae* ile kabak bitkilerine yapılan vektör ta őıma denemeleri sonunda, ZYMV-FM izolat ının kabak bitkileri üzerine taşınması gerçekleŐmiŐtir.

Uygulama tarihinden sonra peryodik olarak her gün takip edilen kabak bitkilerinin yapraklar ında ta őıma denemesinin yap ıldığı tarihten sonraki 5 gün içerisinde simptom  ıkışı meydana gelmi őtir. Yaprak bitleri ile ZYMV-FM bulaştırılan bu kabak bitkilerinin yapraklar ında damar a ılması ile ba őlayan belirtiler mozayik, sararma, şiddetli deformasyon ve ayakkab ı ba đı belirtiler i őekline dÖnüşerek devam etmiştir (Şekil 4.19, 4.20).



Şekil 4.19. Kabak bitkisi yaprağında deformasyon ve damar açılması



Şekil 4.20. Kabak bitkisi yaprağında mozayik ve damar açılması

4.4. ELISA Testleri

Bu tez çalışmasının farklı aşamalarında kullanılacak olan ZYMV izolatının elde edilmesi amacıyla, arazi çikışları sonunda simptomatolojik olarak ZYMV ile bulaşık olduğu şüphelenilen 126 kabak, 4 kavun ve 1 karpuz olmak üzere toplam 131 kabakgil bitkisinden örneklemeler yapılmış ve alınan bitki dokuları ELISA yöntemiyle testlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. ELISA Testi Sonuçları

Testlenen Bitki Türü	Saptanan Virüs/ Virüsler	İnfekteli Bitki Sayısı
Kabak	ZYMV	66
	CMV	11
	WMV	6
	PRSV	3
	SqMV	5
	ZYMV+WMV	13
	ZYMV+PRSV	3
	ZYMV+SqMV	2
	ZYMV+CMV	5
	CMV+WMV	1
	WMV+SqMV	2
	PRSV+SqMV	3
	WMV+PRSV	6
	CMV+SqMV	4
Kavun	ZYMV+SqMV	4
Karpuz	ZYMV	1
TOPLAM		131

Çizelge 4.2.' den de görülece ği üzere, testlenen 126 kabak örne ğinden 66' sının ZYMV, 11' inin CMV, 6' s ının WMV, 3' ünün PRSV ve 5' inin de SqMV olmak üzere toplam 91 örne ğin tek bir virüs ile bula şık oldu ğu saptanmıştır. Geriye kalan 35 kabak örne ğinde ise, kar ışık virüs enfeksiyonu oldu ğu görülmü ştür. Buna göre; bu örneklerin 13' ü ZYMV + WMV, 3' ü ZYMV + PRSV, 2' si ZYMV + SqMV, 5' i ZYMV + CMV, 1' i CMV + WMV, 2' si WMV + SqMV, 3' ü PRSV + SqMV, 6' sı WMV + PRSV ve 4' ü CMV + SqMV ile bulaşık olarak saptanmıştır.

Kavun bitkisinden alınan 4 örnekte ZYMV + SqMV karışık virüs enfeksiyonu bulunurken, karpuz örneğinin sadece ZYMV ile infekteli olduğu saptanmıştır.

Adana ve İçel illeri ile ba ğlı ilçelerde aç ık alanlar ile örtü alt ı yeti ştiricilik yapılan yerlerden toplanan kabakgil örneklerdeki enfeksiyon oranlar ına bakıldığında, karışık virüs enfeksiyonları hariç, ZYMV' nin %51.2, CMV' nin %8.4, WMV' nin %4.6, PRSV' nin %2.3 ve SqMV' nin %3.8 oran ında bitkiler üzerinde enfeksiyon

yaptığı saptanmıştır. Bunlara ek olarak karışık infeksiyon görülen bitkilerdeki en yüksek infeksiyon oranı %9.92 ile ZYMV+WMV karışık infeksiyonunda belirlenmiştir.

Bunlardan başka, saksı ve arazi denemelerinde üzerine bitki aktivatörü uygulanan kabak bitkilerinden simptom gösterenler ve göstermeyenlerden alınan bitki dokularında ELISA yöntemi ile testlenmiş ve simptom gözlenen bitkilerde ZYMV-FM'nin varlığı ortaya konulmuştur. Simptom göstermeyen bitkilerden yapılan ELISA testleri sonucunda ise herhangi bir infeksiyon varlığı saptanmamıştır.

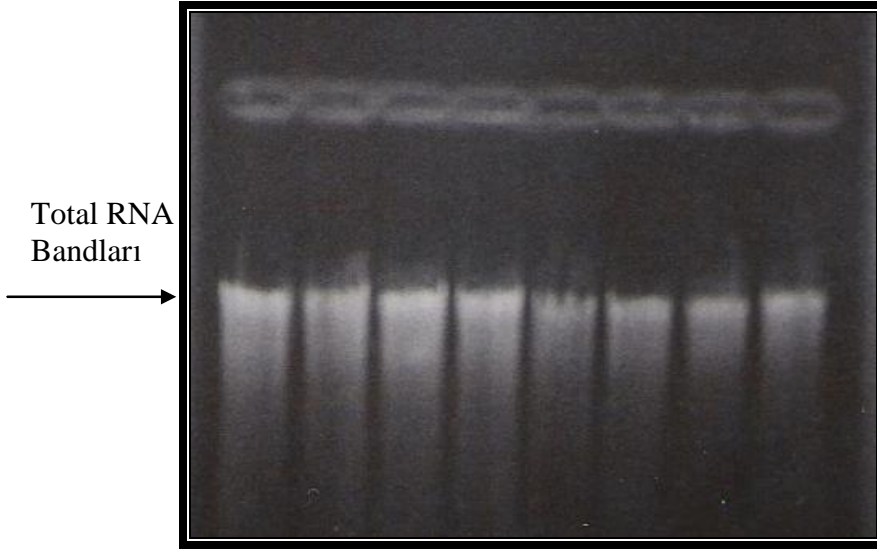
Ayrıca, mekanik inokulasyon çalışmaları sonunda, ZYMV-FM inokule edilen kullanılan indikatör bitkilerde ELISA yöntemi ile testlenmiş ve başka bir virüsle bulaşıklık olup olmadıklarına bakılmıştır. Simptom gösteren indikatör bitkilerin sadece ZYMV-FM ile bulaşık olduğu saptanmıştır. Belirti vermeyen indikatör bitkilerde (*Nicotiana rustica*, *N. glutinosa* L., *N. benthamiana*, *N. tabacum*), herhangi bir latent infeksiyonun bulunma olasılığı dikkate alınarak testlenmiş, fakat bu bitkilerde ZYMV infeksiyonu belirlenmemiştir. Böylece, mekanik inokulasyon çalışmalarında elde edilen sonuçlar ELISA testleri ile doğrulanmıştır.

Yaprak biti ile yapılan vektör taşıma denemelerinin sonunda ise ortaya çıkan simptomlu kabak bitkileri de yine ELISA yöntemi ile yukarıda belirtilen ZYMV, CMV, WMV, PRSV ve SqMV'ye spesifik antiserumlar ile testlenmiş ve bu bitkilerin sadece ZYMV ile bulaşık olduğu saptanmıştır.

4.5. Total RNA Ekstraksiyon Çalışmaları

RT-PCR işlemlerinde kullanılacak olan total RNA'lar, ELISA testleri sonucunda ZYMV ile bulaşık olduğu saptanan kabak bitkilerinin taze yapraklarından elde edilmiş ve TBE tampon çözeltisinde hazırlanan %1.5' luk agaroz jel kullanılarak elektroforez yöntemi ile testlenmiştir.

Elektroforez işlemi 40 V akım altında gerçekleştirilmiş ve yapılan koşum işlemi sonunda, ethidium bromid ile boyanan jel üzerinde hastalıklı bitkilerden elde edilen total RNA'lar gözlenmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. ZYMV' nin agaroz jeldeki total RNA bandları

4.6. RT-PCR Çalışmaları

4.6.1. RT-PCR Uygulamaları

Günümüzde bitki virolojisi alan ında yapılan araştırmalarda yoğun bir şekilde kullanılan moleküler yöntemlerden biri olan RT-PCR yöntemi, bu tez çalışmasında ZYMV'nin saptanması ve moleküler karakterizasyonu amacıyla optimize edilmiş ve ZYMV-FM izolat ı ile bula şık kabak bitkilerinden elde edilen total RNA' lar kullanılarak başarı ile uygulanmıştır.

RT-PCR çalışmalarında, ticari olarak sentezlettirilen,

1. PN1bF1- PCPR1 kodlu primer çifti 1.2 bp'lik (Potyvirus)
2. FI -1778 kodlu primer çifti 675 bp'lik (ZYMV-Zayıf)
3. FR-1778 kodlu primer çifti 675 bp'lik (ZYMV-Şiddetli)
4. ZY-FR 26-1778 kodlu primer çifti 1069 bp'lik (ZYMV-Şiddetli)
5. ZYMV-F1-ZYMV-R1 kodlu primer çifti 250 bp'lik (ZYMV- Genel)

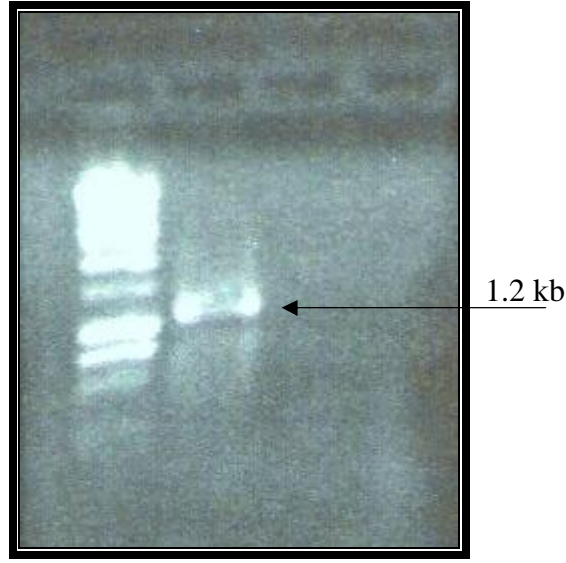
gen parçalarını çoğaltılmak amacıyla kullanılmış ve 1, 4 ve 5 nolu primer çiftlerinde beklenen band büyüklükleri elde edilmiştir (Şekil 4.22, 4.23).

Bu primer çiftleri ile elde edilen RT-PCR sonuçları, çalışmada kullanılan ZYMV-FM kodlu izolatın, potyvirus grubuna dahil ZYMV olduğunu ve ZYMV'nin de şiddetli izolatı olduğunu göstermiştir. Zira çalışmada kullanılan 1 nolu primer çifti potyvirus grubunu, 2 nolu primer çifti ZYMV'nin zayıf izolatlarını, 3 ve 4 nolu primer çiftleri de ZYMV'nin şiddetli izolatlarını saptamak amacıyla kullanılmıştır. Elimizde bulunan bitki örneğinin ZYMV ile bulaşık olup olmadığı da, ZYMV'nin moleküler tanısında genel olarak kullanılan 5 nolu primer ile ortaya konulmuştur.

Ayrıca mekanik inokulasyon ve vektör taşıma denemeleri sonunda kabak yapraklarında sararma, mozayik, deformasyon ve ayakkabı bağı belirtilerinin de ZYMV enfeksiyonu sonucu meydana geldiğini RT-PCR yöntemi ile doğrulanmıştır.



Şekil 4.22. 5 nolu primer çifti ile yapılan RT-PCR sonuçları
A; Marker, B, D,F; ZYMV izolatları



Şekil 4.23. 1 nolu primer çifti ile yapılan RT-PCR sonuçları A; Marker, B; ZYMV izolatı

ZYMV' nin zayıf izolatlarının saptanması amacıyla kullanılan 2 nolu primer çifti ile yapılan RT-PCR çalışmalarında herhangi bir band gözlenmez iken, ZYMV' nin şiddetli izolatının saptanmasında kullanılan 4 nolu primer çiftinde istenilen band büyüklüğü (1069 bp) gözlenmiş, fakat net bir fotoğraf elde edilememiştir.

3 nolu primer çifti ile yapılan RT-PCR çalışmalarında ise, gerek total RNA izolasyonu, gerekse PCR işleminde uygun koşulların sağlanması ve ayrıca değişik PCR programları ile farklı oranlarda kimyasalların kullanılmasına rağmen herhangi bir band gözlenememiştir.

RT-PCR çalışmalarında kullanılan ve Promega firmasından temin edilen 1kb'lik DNA Marker' ın en düşük baz büyüklüğü 250-253 bp' den başlamakta ve 10.000 bp' ye kadar devam etmektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, Yueh-Chwen Hsu ve ark. (2005) tarafından bildirilen sonuçlar ile uyum içerisindedir. Aynı araştırmacılar, saflaştırılmış viral RNA' lar ile PNIbF1-PCPR1 ve ZYMV-F1-ZYMV-R1 primer çiftlerini kullanarak yaptıkları RT-PCR işleminde potyviruslerin ve ZYMV' nin varlığını saptamışlardır. Yaptıkları bu çalışma sonucunda, agaroz jel elektroforez yöntemi ile potyvirusler için 1.2 kb' lik band, ZYMV için ise 250 bp' lik band gözlemişlerdir.

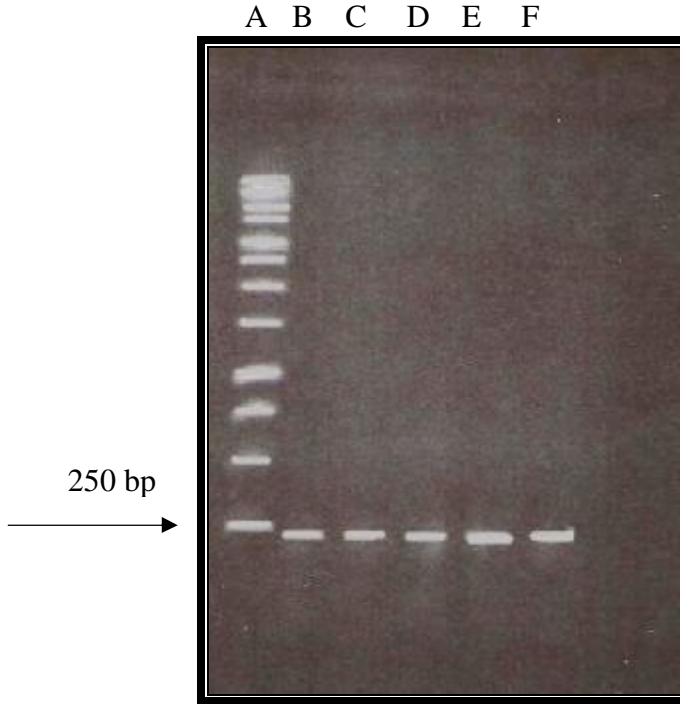
Ayrıca (Herve HUET, Kişisel Görüşme)' in, FI-1778, FR-1778 ve ZY-FR 26-1778 primer çiftlerini kullanarak yapt ığı RT-PCR al ışmalarının sonuçları ile de bu çalışmada elde edilen sonuçlar aras ında bir paralellik vardır. Ara ştırıcı, yukarıda isimleri verilen Primer çiftleri kullan ılarak ZYMV'nin zayıf ve şiddetli izolatlarının ayırımını moleküler olarak yapabildi ği ve sırasıyla, 675 bp, 675 bp ve 1069 bp' lik bandlar elde etmiştir.

4.6.2. IC-RT-PCR Uygulamaları

RT-PCR yönteminin di ğer bir versiyonu olan IC-RT-PCR alı şması, bu tez çalı şmasında vektör taşıma denemeleri sonunda elde edilen ve semptomatolojik ve serolojik olarak ZYMV ile bula şık oldu ğu saptanan örneklerin moleküler tan ısında kullanılmıştır.

RT-PCR alı şmasından farklı olarak bu yöntemde total nükleik asit izolasyonuna gerek kalmadan ham bitki ekstraktı materyal olarak kullanılmış ve PCR tüpleri öncelikle ZYMV' ye spesifik antibody ile kaplanmıştır.

ZYMV-F1-ZYMV-R1 primer çiftleri kullan ılarak yapılan IC-RT-PCR alı şması sonucunda beklenen büyüklükte bandlar elde edilmiştir (Şekil 4.25). Yapılan agaroz jel elektroforez i şleminde kontrol olarak RT-PCR ürünü de kullanılmıştır.



Şekil 4. 24. 5 nolu primer çifti ile yapılan IC-RT-PCR sonuçları
A, Marker; B, C, E, F, IC-RT-PCR ürünü; D, RT-PCR
sonucu elde edilen PCR ürünü

4.6.3. RFLP Çalışmaları

ZYMV-FM izolatının şiddetli olduğunun saptanması amacıyla, 4 nolu primer çifti kullanılarak RT-PCR çalışmaları yapılmış ve sonucunda, istenilen band büyüklüğü (1069 bp) elde edilmiştir. Şiddetli bir izolat olduğu saptanan ZYMV-FM'nin yaprak bitleri ile taşınabildiğinin de moleküler olarak ortaya konulması için RFLP işlemi yürütülmüş, fakat bu RT-PCR ürününün miktarının az olmasından dolayı net bir sonuç elde edilememiştir.

4.7. Dayanıklılığın Uyarılması Çalışmaları

4.7.1. Saksı Denemeleri

Bitkilerde dayanıklılığın uyarılması çalışmalarının bir bölümü olan ve uygun dozun ve zamanın belirlenmesi amacıyla yapılan saksı denemeleri, dayanıklılık uyarıcılar ACTIGARD, MESSENGER ve ISR-2000 kullanılarak Bölüm 3.2.9'da belirtildiği şekilde yapılmıştır.

ACTIGARD, MESSENGER ve ISR-2000 uygulandıktan sonra 24, 48, 72 ve 96 saat sonra virüs uygulaması sonucu bitkilerde gözlenen semptomlar inokulasyondan sonraki kontrol bitkilerinde ilk semptom çıkış tarihinden itibaren değerlendirilmeye başlanmıştır.

Kontrol (+) olarak kullanılan bitkiler üzerinde ilk semptomlar mekanik inokulasyondan sonraki 7 gün içerisinde yapraklarda damar açılması ve mozayik şeklinde gözlenmiştir.

Kabak bitkilerine ACTIGARD uygulamasından 48 saat sonra yapılan ZYMV-FM inokulasyonu semptomun çıkış süresi üzerine etkili olmuş ve kontrol bitkilere göre uygulama yapılan bitkilerde 15- 20 gün süre ile semptom çıkışında gecikme gözlenmiştir. Bu bitki aktivatörünün, uygulamadan 24, 72 ve 96 saat sonra yapılan ZYMV-FM bulaştırmalarında ise, bitkilerde semptom çıkış zamanı üzerine belirgin bir etkisi olmadığı saptanmıştır. Bu durumda, bitkide SAR'ın tetiklenmesinin 48 saat içerisinde en üst seviyeye ulaşacağı ve ACTIGARD uygulamasından 48 saat sonra ZYMV-FM inokulasyonunun, SAR mekanizmasının tetiklenmesi için en uygun zaman aralığı olduğu ortaya konulmaktadır.

Kabak bitkilerine MESSENGER ve ISR-2000 uygulamalarının her ikisinde de 72 saat sonra yapılan ZYMV-FM inokulasyonu semptomun çıkış süresi üzerine etkili olmuş ve kontrol bitkilere göre uygulama yapılan bitkilerde MESSENGER' da 10 gün, ISR-2000' de 15- 20 gün süre ile semptom çıkışı gecikmiştir. Bu bitki aktivatörlerinin uygulanmasından 24, 48 ve 96 saat sonra yapılan ZYMV-FM bulaştırmalarında ise, bitkilerde semptom çıkış zamanı üzerine belirgin bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Bitkide SAR'ın bitki aktivatörü uygulanmasından 72 saat sonra tetiklenerek en üst seviyeye ulaşacağı ve böylece MESSENGER ve ISR-2000 uygulamasından 72 saat sonra ZYMV-FM inokulasyonunun, SAR mekanizmasının uyarılması için en uygun zaman aralığı olduğu ortaya konulmuştur.



Şekil 4.25. ACTIGARD uygulamasından sonra bitki gelişimi

Uygulanan bitki aktivatörlerinin bitki gelişimi üzerine etkilerine bakıldığında; ISR-2000 uygulamasının 24, 48, 72 ve 96 saat de ğerlendirmeleri, bu aktivatörün bitkilerin büyüme ve gelişmesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. ACTIGARD uygulamalarının 48, 72 ve 96 saat de ğerlendirmeleri olumlu bulunmuş, buna rağmen MESSENGER uygulamalarının 48, 72 ve 96 saat de ğerlendirmeleri sonucu bu aktivatörün bitki büyüme ve gelişmesi üzerine çok bariz olmayan bir etki yaptığı gözlenmiştir (Şekil 4.25, 4.26, 4.27).



Şekil 4.26. MESSENGER uygulamasından sonra bitki gelişimi



Şekil 4.27. ISR-2000 uygulamasından sonra bitki gelişimi

Kabak bitkileri üzerine ZYMV-FM izolat ının bitki aktivatörlerinden 24, 48, 72 ve 96 saat sonra mekanik inokulasyon yöntemi ile bula ştırılması sonucu saptanan infeksiyon oranları Çizelge 4.3' de verilmiştir. Buna göre; kontrol bitkilerinde infeksiyon oranı yaklaşık olarak %53- 86 arasında saptanırken, aktivatör uygulanan bitkilerde ise, bu oran %0- 46 arasında değişmiştir.

Kontrol bitkilerinde ilk semptom çıkışı meydana geldiği zaman bitki aktivatörleri uygulanan bitkilerde gözlenmiş ve infekteli bitki sayısı kaydedilmiştir.

En iyi sonuç, ISR-2000 uygulamaları yapılan kabak bitkilerinin 24, 48 ve 72 saat sonra ZYMV-FM izolat ı ile mekanik inokulasyonu yapılan bitkilerden elde edilmiş ve gözlem yapılan tarihte herhangi bir bitki üzerinde semptomatolojik olarak ZYMV infeksiyonu saptanmamıştır.

Çizelge 4.3. Bitki Aktivatörlerinin İnfeksiyon Oranı Üzerine Etkisi

Bitki Aktivatörleri	ZYMV-FM İnokulasyonu	İnfeksiyon Oranı (%)
ACTIGARD	24 saat	27 (4/ 15 Bitki)
	48 saat	14.28 (2/ 15 Bitki)
	72 saat	20 (3/ 15 Bitki)
	96 saat	20 (3/ 15 Bitki)
MESSENGER	24 saat	46.7 (7/ 15 Bitki)
	48 saat	26.7 (4/ 15 Bitki)
	72 saat	20 (3/ 15 Bitki)
	96 saat	20 (3/ 15 Bitki)
ISR-2000	24 saat	0 (0/ 15 Bitki)
	48 saat	0 (0/ 15 Bitki)
	72 saat	0 (0/ 15 Bitki)
	96 saat	13.3 (2/ 15 Bitki)
KONTROL	24 saat	66.66 (10/ 15 Bitki)
	48 saat	80 (12/ 15 Bitki)
	72 saat	53.33 (8/ 15 Bitki)
	96 saat	86.66 (13/ 15 Bitki)

4.7.2. Arazi Denemeleri

Arazi koşullarında, ACTIGARD, MESSENGER ve ISR-2000' in ZYMV' ye karşı en etkili zaman ının belirlenmesi amacıyla, saks ı denemelerine paralel olarak yapılan arazi denemelerinde, bitki aktivatörleri uygulandıktan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra ZYMV-FM uygulamas ı yapılmış ve kontrol bitkilerinde ilk symptom çıkışından itibaren değerlendirmeler başlamıştır.

Arazi denemelerinde kontrol olarak kullanılan kabak bitkileri üzerinde ilk symptomlar, mekanik inokulasyondan sonraki 7 gün içerisinde yapraklarda damar açılması ve mozayik şeklinde gözlenmiştir.

Buna göre; kabak bitkileri üzerine ACTIGARD uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra yapılan ZYMV-FM inokulasyonlarının symptom çıkış süresi üzerine etkisi olmuş ve kontrol bitkilere göre uygulama yapılan bitkilerde 7- 8 gün kadar symptom çıkışında gecikme gözlenmiştir. Bu bitki aktivatörünün, uygulamadan 96 saat sonra yapılan ZYMV-FM bulaştırmalarında ise, bitkilerde symptom çıkış süresi üzerine belirgin bir etkisi olmamıştır.

MESSENGER uygulamas ının 24 saat sonra yapılan ZYMV-FM inokulasyonunun symptom çıkış süresi üzerine etkili olması ve kontrol bitkilere göre uygulama yapılan bitkilerde 3- 4 gün kadar symptom çıkışında gecikme gözlenmiştir. Bu bitki aktivatörünün, uygulamadan 48, 72 ve 96 saat sonra yapılan virüs bulaştırmalarında ise, bitkilerde symptom çıkış süresi üzerine belirgin bir etkisi olmamıştır.

ISR-2000 uygulamas ı ise, 24, 48, 72 ve 96 saat sonra yapılan ZYMV-FM inokulasyonlarının symptom çıkış süresi üzerine etkisi olmuş ve kontrol bitkilere göre uygulama yapılan bitkilerde 8- 10 gün kadar symptom çıkışında gecikme gözlenmiştir.

Kabak bitkileri üzerine ZYMV-FM izolat ının bitki aktivatörlerinden 24, 48, 72 ve 96 saat sonra mekanik inokulasyon yöntemi ile bulaştırılması sonucu saptanan infeksiyon oranları Çizelge 4.4.' de verilmiştir. Buna göre; kontrol bitkilerinde infeksiyon oranı yaklaşık olarak %40- 67 arasında saptanırken, aktivatör uygulanan bitkilerde ise, bu oran %0- 100 arasında değişmiştir.

Kontrol bitkilerinde ilk simptom ç ıkışı meydana geldi ği zaman bitki aktivatörleri uygulanan bitkiler de gözlenmiş ve infekteli bitki sayısı kaydedilmiştir.

En iyi sonuç, ACTIGARD ve ISR-2000 uygulamalar ı yapılan kabak bitkilerinin 24 saat sonra ZYMV-FM izolat ı ile mekanik inokulasyonu yapılan bitkilerden elde edilmiş ve gözlem yapılan tarihte herhangi bir bitki üzerinde simptomatolojik olarak ZYMV enfeksiyonu saptanmamıştır.

Bu aktivatörlerin 48 saat uygulamalar ıda MESSENGER' e göre, daha iyi sonuç vermiş ve ACTIGARD uygulanan bitkilerde enfeksiyon oranı %6.67 olur iken, bu oran ISR-2000' de %10 olarak saptanmıştır. Diğer uygulamalar (72 ve 96 saat) da MESSENGER ile karşılaştırıldığı zaman ümit var olarak görülmektedir.

Çizelge 4.4. Bitki Aktivatörlerinin İnfeksiyon Oranı Üzerine Etkisi

Bitki Aktivatörleri	ZYMV-FM İnokulasyonu	İnfeksiyon Oranı (%)
ACTIGARD	24 saat	0 (0/ 30 Bitki)
	48 saat	6.67 (2/ 30 Bitki)
	72 saat	23.33 (7/ 30 Bitki)
	96 saat	26.66 (8/ 30 Bitki)
MESSENGER	24 saat	16.66 (5/ 30 Bitki)
	48 saat	36.66 (11/ 30 Bitki)
	72 saat	100 (30/ 30 Bitki)
	96 saat	50 (15/ 30 Bitki)
ISR-2000	24 saat	0 (0/ 30 Bitki)
	48 saat	10 (3/ 30 Bitki)
	72 saat	23.33 (7/ 30 Bitki)
	96 saat	13.33 (4/ 30 Bitki)
KONTROL	24 saat	40 (12/ 30 Bitki)
	48 saat	63.33 (19/ 30 Bitki)
	72 saat	46.66 (14/ 30 Bitki)
	96 saat	66.66 (20/ 30 Bitki)

4.7.3. Histokimyasal Boyamalarla Lignin Sentezinin Belirlenmesi

Saksı denemeleri sonucunda dayanıklılığın uyarıldığı kabak bitkilerinden alınan ve Bölüm 3.2.9.3’de belirtilen yöntemle göre lignin boyaması yapılan kök, gövde ve yaprak dokularının faz kontrast mikroskop altında 20X ve 40X büyütmelemlerde incelenmesi sonucu; ACTIGARD uygulanan bitkilerde 48 saat sonra, MESSENGER ve ISR-2000 uygulanan bitkilerde ise, 72 saat sonra yapılan ZYMV-FM inokulasyonunun, SAR mekanizmasının uyarılması için uygun zaman aralığı olduğu histokimyasal boyama ile belirlenmiştir.

Bitki aktivatörü uygulanan bitkilerde, lignifikasyonun yoğunluğunda ve dağılımında farklılıklar gözlenmiştir. Lignin boyanmasında; Phloroglucinol; HCl ile reaksiyona girmekte ve lignin oluşum noktalarını sabitleyerek koyu turuncu veya pembemsi bir renk almasını sağlamaktadır.

Aktivatör uygulamasından 24 saat sonra virüs inokulasyonu yapılan bitkilerin boyama sonuçlarına bakıldığı zaman MESSENGER’da lignin sentezinin en fazla olduğu (Şekil 4.29) ve bunu sırasıyla ACTIGARD ve ISR-2000’in izlediği gözlenmiştir.

48 saat bitkileri incelendiği zaman, MESSENGER’da boyanma şiddetinin azaldığı ve ISR-2000 ile ACTIGARD uygulanan bitkilerde boyanma şiddetinin arttığı, bunun yanında ISR-2000 uygulanan bitkilerden alınan dokuların daha da fazla boyandığı tespit edilmiştir.

Bu artışta, ISR-2000’de uyarılma sonucu daha yeni başlayan lignin oluşumuna rağmen, diğer uyarıcılarda biriken ligninin şiddetinin artması ve buna paralel olarak ligninin yapısında bulunan ve Phloroglucinol ile reaksiyona giren Cinamil Aldehit grubunun oksidasyona uğraması ile yapısının değişmesi bu sebepten dolayı da Phloroglucinol spesifitesinin azalmasının neden olduğu düşünülmektedir.

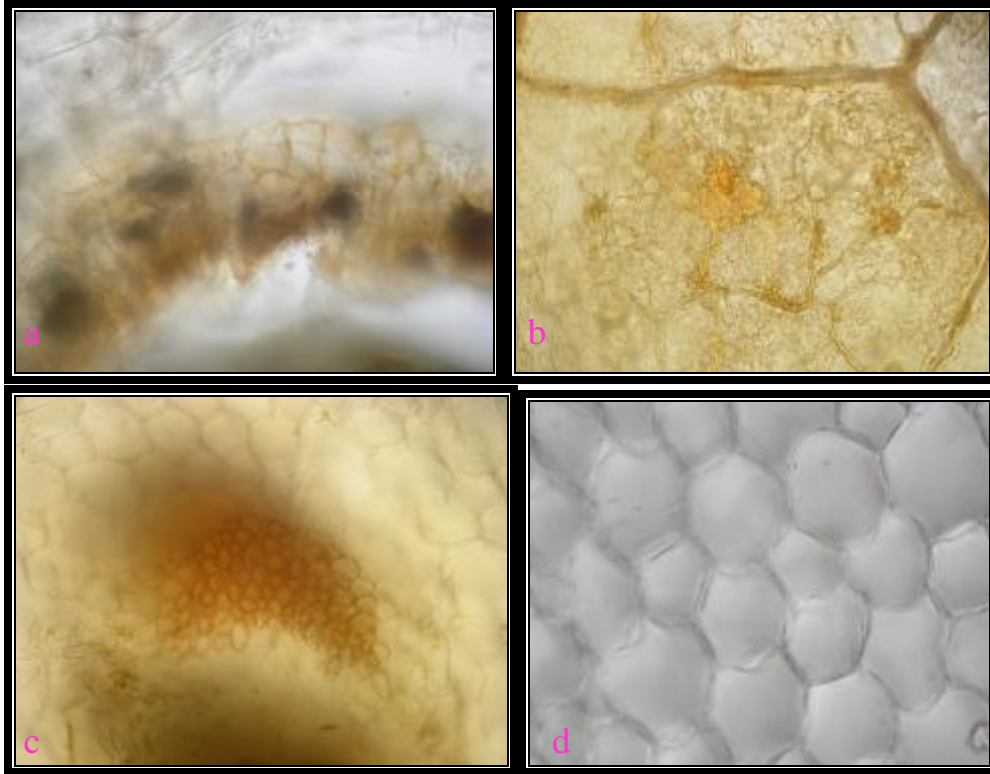
Bitki aktivatörleri uygulanan bitkilerde 72 saat ve 96 saat boyamalarında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir.

Dayanıklılığın uyarıldığı bu bitkilerde infekteli dokularda infeksiyon ve reaksiyon yerlerinde sentezlenen lignin yoğunluğu, saksı denemelerinden elde edilen sonuçları destekler niteliktedir. Bitkilerin elisitörler veya avirulent fungal patojenler ile uygulanmaları sonucu reaksiyon noktalarında fenolik ve lignin benzeri

materyallerin biriktiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Hornby ve Fitt, 1981; Aist, 1983; Stoltzenburg ve ark., 1984; Nicholson ve Hammerschmidt, 1992).

Abiyotik ve biyotik uyarıcılarla dayanıklılığın uyarıldığı bitkilerde, bitki hücre duvarında fenolik bileşiklerden lignin oluşumu, hücre duvarının mekanik gücünü arttırmaktadır. Bitki hücre duvarlarında sentezlenen lignin oluşumları, histokimyasal boyamalar ile belirlenebilmektedir (Aist, 1983; Gahan, 1984; Biggs ve Miles, 1988; Isaac, 1992; Vallet ve ark., 1996).

Patojene karşı bir duyarlılık tepkimesi olan HR, birçok araştırmacı tarafından yıllar önce konukçu bitki hücrelerinde gözlenmiş ve patojen infeksiyonu sonucu konukçu bitkinin patojeni tanımasının ardından, patojen ve konukçu bitki arasında uyumsuz bir ilişkinin sonucunda oluştuğu bildirilmiştir. Bu hızlı hücre ölümleri patojenin infeksiyon noktasında durdurulmasında oldukça etkili olup, patojen saldırısından sonra ne kadar hızlı hücre ölümü olursa, bitki o kadar çok infeksiyona dayanıklılık kazanmaktadır (Dixon, 1986; Dixon ve Harison, 1990; Isaac, 1992).



Şekil 4.28. MESSENGER uygulanan bitkilerin mezofil hücrelerinde infeksiyon ve reaksiyon yerlerinde ligninleşmiş dokular (a,b,c: MESSENGER 24 saat Yapraktaki Mezofil Hücrelerinde Lignin Boyanması, d: Kontrol)

Uygun dozun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda kullanılan doz miktarları şekil 3.4’ de verilmiştir. Yapılan bu çalışmada uygulanan dozlardan en etkili olanı firmanın önerdiği prosedüre uygun olarak kullanılan doz olarak tespit edilmiştir. Uygulama dozunun yarısında herhangi bir etki gözlenmemiş, fakat dozun iki katı uygulanmış bitkilerde fitotoksite meydana gelmiştir. Doz uygulaması yapılmış olan bitkilerden alınan dokular ile yapılan lignin boyama çalışmalarının sonucuna bakıldığında; ACTIGARD da tek uygulama yapılan DOZ1, DOZ2, DOZ3 bitkilerinden yapılan lignin boyamasında; DOZ1 ve DOZ2 arasında fark görülmemiş, DOZ3’ de gövde, kök ve yaprakta diğer uygulamalara göre boyanma şiddetinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

ACTIGARD’ın DOZ1, DOZ2, DOZ3 olarak II. Defa uygulama yapılan bitkilerde lignin boyama sonucunda ise; DOZ3’ de boyanma şiddetinin azaldığı, DOZ2’ de en iyi şekilde lignin sentezinin olduğu ve bunu DOZ1’ in izlediği saptanmıştır. II. uygulamalı bitkiler aynı şekilde tek uygulama yapılan bitkilere oranla daha şiddetli boyamalara neden olduğu gözlenmiştir.

ISR-2000 uygulanan bitkilerden yapılan boyama çalışmaları; I. Uygulamalı DOZ1, DOZ2, DOZ3 bitkilerinde; DOZ2’ de boyanmanın en şiddetli olduğu ve bunu DOZ1 ve DOZ3’ ün izlediği tespit edilmiştir.

ISR-2000 II. Uygulamalı DOZ1, DOZ2, DOZ3 bitkilerinde lignin boyamasında; en iyi boyanmanın DOZ2’ de olduğu ve bunu DOZ1 ve DOZ3’ ün takip ettiği görülmüştür.

II. uygulamalarda tek uygulama yapılan bitkilere göre daha yüksek oranda boyanma görülmektedir.

MESSENGER uygulanan bitkilerde de; en etkili olan dozun firmanın önerdiği doz olduğu saptanmıştır.

4.7.4. Histokimyasal Boyamalarla H₂O₂ Sentezinin Belirlenmesi

Dayanıklılığın uyarıldığı kabak bitkilerinde, infekteli dokularda infeksiyon ve reaksiyon yerlerinde meydana gelen H₂O₂ sentezi, DAB (3,3'-diaminobenzidine) testi ile Bölüm 3.2.9.4' de belirtilen yöntemle göre faz kontrast mikroskop altında 20X- 40X büyütmelemlerde belirlenmiştir. Saksı denemeleri sonucunda dayanıklılığın uyarıldığı bitkilerden alınan kök, gövde ve yaprak dokuları ile yapılan bu çalışmada; ACTIGARD, MESSENGER, ISR-2000 uygulandıktan sırasıyla 48, 72, 72 saat sonra virüs inokulasyonunun, SAR mekanizmasının uyarılması için uygun zaman aralığı olduğu belirlenmiş ve dayanıklılığın en yüksek seviyede uyarıldığı bu bitkilerden alınan dokularda, H₂O₂ birikimi belirlenmiştir. H₂O₂ boyamasında; DAB ile H₂O₂ reaksiyona girmiş ve peroksidaz varlığında kahverengi renge dönüşmüştür.

Bitki aktivatörü uygulanan bitkilerde, H₂O₂ yoğunluğunda ve dağılımında farklılıklar gözlenmiştir. ACTIGARD uygulamasından 24 saat sonra virüs inokulasyonu yapılan bitkilerden alınan bitki dokularından yapılan DAB boyaması sonucunda bu bitkilerde H₂O₂ birikiminin var olduğu fakat şiddetinin az olduğu ve bu boyanmanın iletim demetlerinde olup yaprakta olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.30). MESSENGER 24 saat bitkilerinde; H₂O₂ birikiminin iletim demetlerinde olduğu fakat şiddetinin çok az ve bazı bölgelerde ortadan kalktığı gözlenmiştir. ISR-2000 24 saat bitkilerinde; H₂O₂ birikimi olduğu fakat şiddetli olmadığı gözlenmiştir.

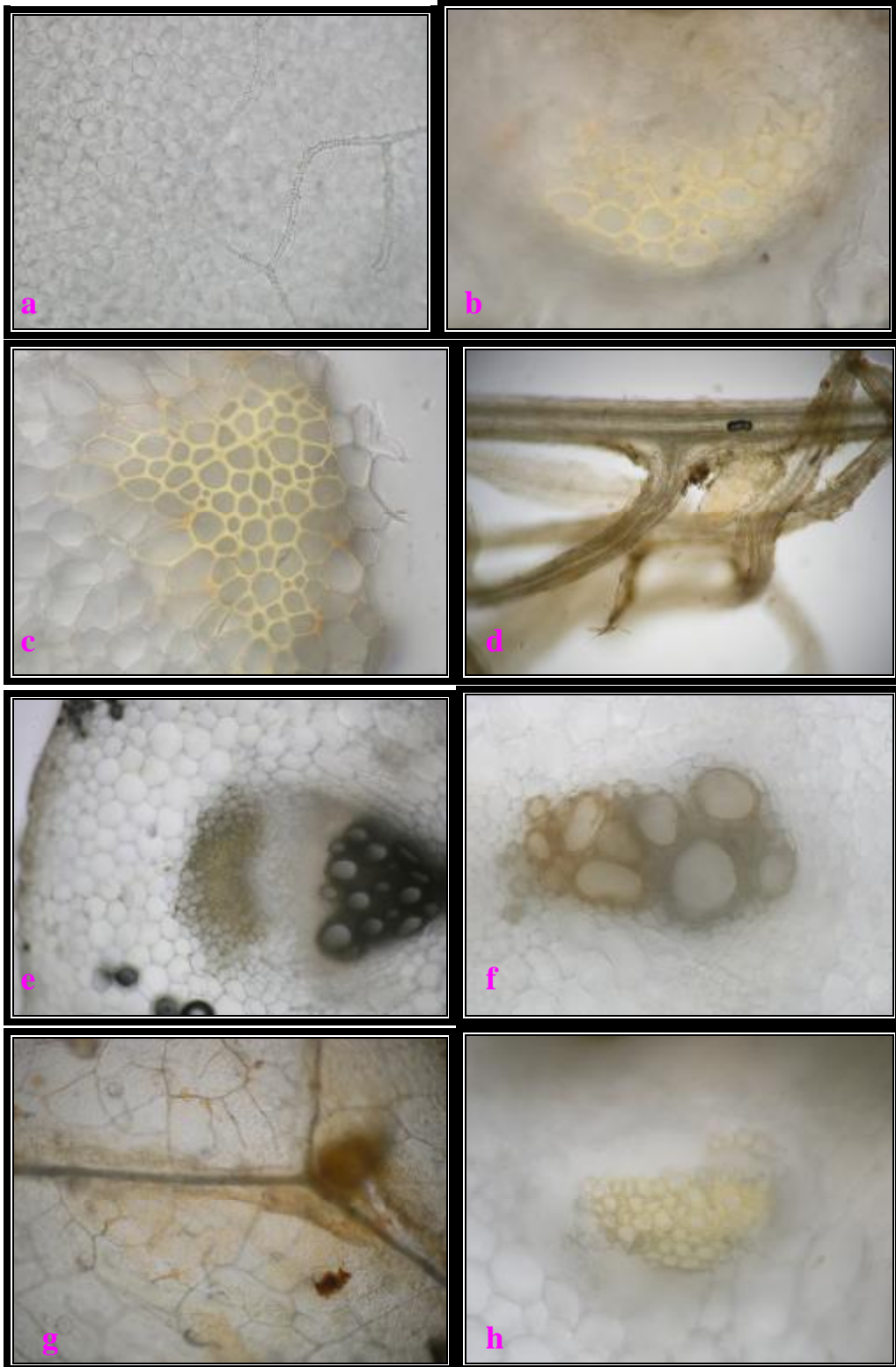
ACTIGARD 72 saatte gövdede H₂O₂ oluşumu varlığı tespit edilmiş fakat yaprakta saptanmamıştır. Kullanılan bütün bitki aktivatörlerinde en iyi H₂O₂ birikiminin 72 saatte olduğu gözlenmiştir.

Doz uygulaması yapılmış olan bitkilerden alınan dokulardan yapılan H₂O₂ boyaması çalışmalarına bakıldığında; ISR-2000 tek uygulama yapılan DOZ1, DOZ2, DOZ3 bitkilerinden alınan yaprak dokusundan hazırlanan preparatlarda; yaprakta tam bir boyanma olmadığı fakat iletim demetlerinin boyandığı görülmüştür. Uygulanan diğer dozlarla kıyasla DOZ 2' de H₂O₂ birikiminin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

ISR-2000 II. defa uygulama yap ılan DOZ1, DOZ2, DOZ3 bitkilerinde; iletim demetlerinden hazırlanan preparatta; DOZ2 ve DOZ3' de H₂O₂ boyanması olduğuna fakat DOZ1' de hiÇbir boyanma belirtisine rastlanmamıştır.

ACTIGARD tek uygulama yap ılan DOZ1, DOZ2, DOZ3 bitkilerinde; gövdeden alınan preparatlarda; DOZ1 ve DOZ2' de H₂O₂ birikimi görülmemiş fakat DOZ3 bariz bir Şekilde boyanma gözlenmiştir.

ACTIGARD II. defa uygulama yap ılan DOZ1, DOZ2, DOZ3 bitkilerine bakıldığında; DOZ1' de II. uygulamadan dolayı ı boyama Şiddeti fazlalaŐtıĐı, DOZ2 ve DOZ3 arasında ise herhangi bir fark olmad ığı fakat DOZ2' nin daha etkili oldu Đu gözlenmiştir.



Şekil 4.29. Bitki aktivatörü uygulanan bitkilerde oluşan H_2O_2 birikimi (**a**: Kontrol, **b**: ISR 2000 72h İletim Demetleri, **c**:ISR 2000 72h İletim Demetleri, **d**: ISR 2000 72h Kök, **e**: ASM 72h İletim Demetleri, **f**: Messenger 72h İletim Demetleri, **g**: ASM DOZ 3 Mezofil hücreleri, **h**: ASM 96h İletim Demetlerinde H_2O_2 birikimi).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada kullanılan ZYMV izolatının bulunması için yapılan survey yerleri olan Adana ve Mersin illeri ile çevresi, sebze ve meyve yetiştiriciliği için uygun iklim koşullarına ve ekonomik yapıya sahiptir. Ürün çeşidinin çok geniş olduğu bu bölgelerde birçok zararlı ve hastalık etmeni büyük kayıplara yol açmaktadır. Bu hastalık etmenleri içerisinde virüsler, gerek kimyasal mücadele yöntemlerinin bulunmaması, gerekse vektörler yardımıyla çok uzak ve geniş alanlara kolayca yayılabilmeleri yüzünden ayrı bir öneme sahiptirler. Bunlara ilaveten, vektör böcekler ile yapılan kimyasal mücadelenin de virüslerin yayılmasını engellemede çok etkili olmaması, bu hastalık etmenlerinin önemini daha da arttırmaktadır.

Kabakgöl üretimi içinde zarar veren virüs hastalıklarından en önemlilerinden biri ZYMV'dir. Uzun yıllardan beri bu virüs hastalığı ülkemizde kabakgöl yetiştiriciliği açısından oldukça önemlidir ve bu önemi son yıllarda da gittikçe artmaktadır. Vektörü olan yaprak bitleri aracılığıyla etkili bir şekilde çok geniş alanlara kolayca taşınabilmesi ve tüm kabakgöller ile bazı yabancı otlar dahil olmak üzere çok geniş konukçu dizisine sahip olması bu hastalık etmeninin önemini daha da arttırmaktadır.

Özellikle kabak alanlarında, ekonomik anlamda büyük kayıplara neden olan ZYMV'ye karşı mücadele edebilmek için çeşitli kültürel önlemler alınmalıdır. Bu virüs etmeninin çıkışı ve yayılmasının (mekanik yollarla veya vektörler aracılığıyla) engellenmesine yönelik olarak alınabilecek bu önlemlerin belirlenmesi için, öncelikle hastalık etmeninin saptanması ve kesin tanısının yapılarak yaygınlık oranının ortaya konulması gerekmektedir.

Bu çalışma, ZYMV'nin Adana ve Mersin illeri ile çevresinde; survey yapılan kabak, karpuz, kavun ve hıyar yetiştirilen alanlarda saptanan bir izolatının biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak saptanması, tanılanması ve uygulanan çeşitli bitki aktivatörleri ile bu virüse karşı kabak bitkilerinde sistemik kazandırılmış dayanıklılığın (SAR) teşvik edilerek bu virüsün bitkideki ekonomik zararının en aza indirilmeye çalışılması amacıyla yapılmıştır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.

1. Yapılan surveylerde, 126 kabak, 4 kavun ve 1 karpuz örneği olmak üzere toplam 131 bitki örneği toplanmış ve ELISA testine tabi tutulmuştur. Testlenen örneklerden 67 kabak (%51.2) bitkisinde ZYMV saptanmıştır. Toplanan kabakgil örnekleri kabakgillerde hastalık yapan diğer virüslere (PRSV, WMV, SqMV ve CMV) karşı da ELISA ile testlenmiş ve geneli karışık infeksiyon olarak saptanan örneklerde hastalık oranı % 100 olarak hesaplanmıştır.

2. ZYMV ile bulaşık ve bu virüsün şiddetli ırkının karakteristik simptomlarını (yapraklarda deformasyon, mozayik ve iplikleşme, meyvelerde siğil oluşumu ve deformasyon) gösteren örneklerden bir tanesi bu çalışmada kullanılacak izolat (ZYMV-FM) olarak seçilmiş ve taşıma denemesi çalışmalarında kullanılmıştır.

3. Taşıma denemesinde bu virüsün vektörlerinden biri olan *Myzus persicae* türü yaprak bitleri kullanılmış ve bu çalışma sonucunda saf ZYMV-FM simptomuna sahip infekteli kabak bitkileri elde edilmiştir. Daha sonra bu bitkiler, mekanik inokulasyon, RT-PCR ve IC-RT-PCR çalışmaları ile bitki aktivatörleri ile dayanıklılığın uyarılması çalışmalarında kullanılmıştır.

4. Mekanik inokulasyon çalışmalarında;

Seçilen izolat, *Cucurbita pepo*, *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Citrullus lanatus* test bitkilerinin yapraklarında deformasyon, mozayik, damar bantlaşması, bitkide bodurlaşma, kloroz ve iplikleşme simptomlarına neden olmuştur. Diğer test bitkilerine göre en kısa sürede simptom kabak bitkisi üzerinde gözlenmiştir.

Chenopodium quinoa Wild., *C. amaranticolor* Costa & Reyn test bitkilerinde; klorotik lokal lezyona, *Gomphrena globosa* test bitkisinde ise sadece lokal lezyona sebep olmuştur. Ayrıca en geç simptom gösteren bitkidir.

Nicotiana rustica, *Nicotiana glutinosa* L., *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum* test bitkilerinde herhangi bir simptom gözlenmemiştir.

Bu izolat ile aşıllı kabakgil bitkilerde 4- 10 gün içerisinde simptom gözlenmiş, bununla birlikte diğer test bitkilerinde ise, 15- 21 gün gibi bir sürede simptom çıkışına neden olmuştur.

5. ZYMV-FM izolatına ait total RNA elde edilmiş ve agaroz jel elektroforezde görüntülenmiştir. Bu preparasyonlar, potyvirusler ve ZYMV'ye spesifik primerleri ile RT-PCR ile testlenmiş ve beklenen büyüklüklerde bandlar elde edilmiştir. Ayrıca şiddetli ve zayıf izolata spesifik primerler kullanılarak yapılan RT-PCR çalışması sonunda ZYMV-FM izolatının şiddetli olduğu moleküler olarak saptanmıştır.

6. Taşıma denemesi sonucunda elde edilen semptomlu bitkilerden alınan ham doku örnekleri kullanılarak yapılan IC-RT-PCR çalışmasında ZYMV'ye spesifik primerler kullanılmış ve yine beklenen büyüklükte band elde edilmiştir.

Böylece, bu çalışma ile son yıllarda yapılan birçok çalışmada rutin olarak kullanılan moleküler bir yöntem, bölgemizde de ZYMV enfeksiyonunu saptamak için başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

7. Dayanıklılığın uyarılması çalışmaları saksı ve arazi denemeleri olmak üzere iki kısımda yürütülmüştür.

Saksı denemelerinde; uygulanacak bitki aktivatörlerinin kullanılacak uygun dozu ve uygulama zamanı belirlenmiş ve aktivatör uygulanan bitkilerden lignin sentezi ve H₂O₂ birikiminin belirlenmesi amacı ile histokimyasal boyamalar yapılmış ve faz kontrast mikroskopta bakılarak resimleri çekilmiştir. Boyama çalışmaları sonucunda aktivatör uygulanan bitkilerde dayanıklılığın teşvik edildiği ve en iyi uygulama zamanının ACTIGARD için 48 saat, MESSENGER ve ISR-2000 için ise 72 saat olduğu belirlenmiştir.

Uygulanan bitki aktivatörlerinden ACTIGARD'ın 48 saat sonra yapılan ZYMV-FM inokulasyonunda semptom çıkışını 15-20 gün, MESSENGER' da 72 saat uygulamasının 10 gün, ISR-2000 72 saat uygulamasında ise 15-20 gün geciktirdiği saptanmıştır. Bu bitkilerde belirlenen enfeksiyon oranına bakıldığında, aktivatör uygulanan bitkilerde bu oran %0- 46 arası iken kontrol bitkilerinde % 53- 86 arasında değişmiştir.

Yapılan doz denemesi sonucunda; firmanın önerdiği uygun doz ile bu dozun yarı miktarı ile iki katı kabak bitkilerine uygulanmış ve en uygun dozun firmanın önerdiği şekilde uygulanan doz olduğu saptanmıştır.

Arazi denemelerinde; kullanılan bitki aktivatörlerinden ACTIGARD'ın 24, 48 ve 72 saat uygulamasından sonra yapılan ZYMV-FM inokulasyonunda simptom çıkış süresini 7-8 gün, MESSENGER'ın 24 saat uygulamasından sonra yapılan ZYMV-FM inokulasyonunun 3-4 gün ve ISR-2000'in 24, 48, 72 ve 96 saat uygulamasından sonra yapılan ZYMV-FM inokulasyonunun 8-10 gün süre ile geciktirdiği belirlenmiştir.

Arazi denemeleri sonucunda belirlenen infeksiyon oranı kontrol bitkilerinde yaklaşık olarak % 40- 67 arasında saptanırken, aktivatör uygulanan bitkilerde bu oran % 0- 100 arasında değişmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada, kabakgil yetiştiriciliğini sınırlayan ve etkin mücadele yöntemi bulunmayan ZYMV'nin saptanması ve tanılanması amacıyla kullanılan biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler başarı ile uygulanmıştır.

Dayanıklılığın uyarılması çalışmalarda kullanılan bitki aktivatörlerinin uygulama zamanlarının ZYMV simptom çıkışı ve infeksiyon oranına etkisinin olduğu saptanmıştır ve bu çalışmalarda elde edilen sonuçların gelecekte ümit var nitelikte olduğu görülmüştür.

Gelecekte yapılması planlanan çalışmalarda, bu çalışmada elde edilen ZYMV-FM izolatının dizi analizlerinin yapılması ve diğer ZYMV izolatları ile aralarındaki farklılıkların moleküler olarak ortaya konulması gerekmektedir.

Ayrıca bu çalışmada dayanıklılık teşvik edici olarak kullanılan ve ümit var sonuçlar veren bitki aktivatörleri ile ZYMV'nin vektörü olan yaprak bitlerine spesifik insektisitlerin kombine edilerek kullanılması ve sonuçlarının değerlendirilmesi de araştırma konusu olabilmektedir. Böylelikle, ZYMV'nin hem bitki bünyesinde baskı altına alınması sağlanacak, hem de vektörler ile diğer bitkilere taşınması engellenecektir.

KAYNAKLAR

- ADLERTZ, W.C., PURCIFULL, D.E., SIMONE, G.W., and HIEBERT, E. 1987. Zucchini Yellow Mosaic Virus: A Pathogen of Squash and other Cucurbits in Florida. Proc. Fla. State Hort. Soc. 96:72-74.
- AIST, J.R., 1983. Structural Responses as Resistance Mechanisms. (J.A. Bailey and B.J. Deverall eds.) The Dynamics of Host Defence. Academic Press, Sydney, p.33-70.
- AL-SHAHWAN, I.M. 1990. First Report of Zucchini Yellow Mosaic Virus in Cucurbits in The Central Region of Saudi Arabia. J. King Saud Univ., Agric. Sci.(2):251-260.
- AL-SHAHWAN, I.M., ABDALLA, O.A., and AL-SALEH, M.A., 1995. Response of Greenhouse-Grown Cucumber Cultivars to an Isolate of Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV). Plant Dis. 79: 898-901.
- ANONYMOUS, 1990 . Tarımsal Yapı ve Üretim. T.C. Başbakanlık TİE Ankara.
- ANONYMOUS, 2004 . Tarımsal Yapı ve Üretim. T.C. Başbakanlık TİE Ankara.
- 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.
- BALINT, R., PLOOY, I., and STEELE, C., 1990. The Nucleotide Sequence of Zucchini Yellow Mosaic Potyvirus. (Abstr.) Int. Congr. Virol. 8:84-107.
- BAYSAL, Ö., SOYLU, E.M. and SOYLU, S., 2003. Induction of Defence- Related Enzymes and Resistance by the Plant Activator Acibenzolar-S-Methyl in Tomato Seedlings Against Bacterial Canker Caused by *Clavibacter Michiganensis* ssp. *Michiganensis*. Plant Pathol., 52: 747-753.
- BARBA, M. and RICCIONI, L., 1993. Improvement of Diagnostic Methods to Detect Plum Pox Virus in Apricot Plants. Agriculture, 139- 141.

- BERTRAND, P., DEOM, M., ROBERTS, R. 2004. Effect of TMV on the Incidence of Spotted Wilt in Tobacco. Paper Presented At 41 St Tobacco Worker's Conference, The University Of Georgia.
- BIGGS, A.R. and MILES, N.W., 1988. Association of Suberin Formation in Uninoculated Wounds with Susceptibility to *Leucostoma cincta* and *L. Persoonii* in Various Peach Cultivars. *Phytopathology*, 78: 1070-1074.
- BLACKLEY, R.H., BERTRAND, P.F., VON WALDNER, M.D., FRANKS, R.W., 2004. The Effect of Time of Actigard Application to Transplants on the Final Incidence of Spotted Wilt. Paper Presented At 41 St Tobacco Worker's Conference, The University of Georgia.
- BLUA, M.J., and PERRING, T.M. 1992. Alatae Production and Population Increase of Aphid Vectors on Virus-infected Host Plants. *Oecologia* 92: 65-70.
- BOKSHI, A.I., MORRIS, S.C. and DEVERALL, B.J. 2003. Effect of Benzothiadiazole and Acetylsalicylic Acid on B-1,3-Glucanase Activity and Disease Resistance In Potato. *Plant Pathol.*, 52: 22-27.
- BOYHAN, E.G., LANGSTON, B.D., RILEY, G.D., GRANDBERRY, M.D., HILL, R.C., CURRY, E.D., TORRANCE, R.L., 2000. Evaluation of Tomato Variety, Admire Drench, And Malathion/Karate Insecticides on Tomato Spotted Wilt Virus. Georgia Vegetable Extension-Research Report, The University Of Georgia.
- CASTLE, S.J., PERRING, T.M., FARRAR, C.A., and KISHABA, A.N. 1992. Field And Laboratory Transmission of Watermelon Mosaic Virus II and Zucchini Mosaic Virus by Various Aphids Species. *Phytopathol.* 82:235-240.
- CHAOWEN, L., YUNGLIANG, P., YIBING, C., JINGJING, H., HONGLI, J., EVERAARTS, A., KUMAR, P., 2001. Effects of Fertilization and Messenger®. Application on Garlic Yield and Diseases in Pengzhou District. Vegsys EU 5 Framework INCO2 Funded Research Project, Contact No : ICA4CT-2001-10054.
- CHEN, Z., SILVA, H. and KLESSSIG, D. F., 1993. Active Oxygen Species in the Induction of Plant Systemic Acquired Resistance by Salicylic Acid. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 262:1883-1885.

- CHOUËIRI, E., DIGIARO, M., MINAFRA, A. and SAVINO, V. 1993. A Survey of Peach Viruses in Apulia. *Adv.Hort. Sci.* 7: 61-64.
- CLARK, M.F. and ADAMS, A.N., 1977. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.
- CLOUGHT, G. H., and HAMM, P.B. 1995. Coat Protein Transgenic Resistance to Watermelon Mosaic and Zucchini Yellow Mosaic Virus in Squash and Cantaloupe. *Plant Dis.* 79:1107-1109.
- CSINOS, A.S., PAPPU, H.R., MCPHERSON, R.M., STEPHENSON, M.G., 2001. Management of Tomato Spotted Wilt Virus in Flue-Cured Tobacco with Acibenzolar-S-Methyl and Imidacloprid. Department of Crop and Soil Sciences, University of Georgia. Plant Dis.D-2000-1215-01R, 2001.
- CSINOS, A.S., STEPHENSON, M.G., LASKA, J. AND MULLIS, S. 2004. Pre and Post Plant Applications of Asm for Management of TSVW in Flue-Cured Tobacco. Paper Presented At 41 St Tobacco Worker's Conference, University of Georgia.
- CSINOS, A.S., MARTINEZ-OCHOA, N., STEPHENSON, M.G., 2004. Tomato Spotted Wilt Virus Severity Influenced by Acibenzolar-S-Methyl, Imidacloprid and Age of Tobacco Transplants. Department of Plant Pathology and Crop and Sciences, University of Georgia, Tifton, GA 31794. Publication No. P-2004-0008-NCA.
- DAVIS, R.F. 1986. Partial Characterization of Zucchini Yellow Mosaic Virus Isolated From Squash in Turkey. *Plant Dis.* 70:735-738.
- DESBIEZ, C., LECOQ, H., 1997. Zucchini Yellow Mosaic Virus. Inra. Station de Pathologie Vegetale, 84143 Montfavet Cedex, France. *Plant Pathology* 46, 809-829.
- DESBIEZ, C. and WIPF-SCHEIBEL, C. 1996. Biological and Molecular Variability of Zucchini Yellow Mosaic Virus on The Island Of Martinique. *Plant Dis.* 80:203-207.
- DIXON, R.A., 1986. The Phytoalexin Response: Elicitation, Signalling and Control of Host Gene Expression. *Biological Reviews*, 61:239-291.

- DIXON, and HARRISON, M.J., 1990. Activation, Structure and Organisation of Genes Involved in Microbial Defence in Plants. *Advances in Genetics*. 28: 165-234.
- DIJKSTRA, J. and DE JAGER, C.P., 1998. Virus Transmission by Aphids. In *Practical Plant Virology. Protocols and Exercises*. 148- 158. ISBN 3- 540- 63759- 1 Springer- Verlag Berlin Heidelberg New York.
- DOLOREZ, L.M., and VALDEZ, R.B. 1988. Identification of squash viruses and screening for resistance. *Philipp. Phytopathol.* 24:43-52.
- EBEL, J., COSIO, E.G., 1994. Elicitors of Plant Defense Responses. *International Review of Cytology*, 148:p.1-36.
- FINETTI-SIALER, M.M., CILLO, F., BARBAROSSA, L. and GALLITELLI, D., 1999. Differentiation of Cucumber Mosaic Virus Subgroups by RT-PCR RFLP. *Journal of Plant Pathology*, 81 (2), 145-148.
- GAFFNEY, T., FRIEDRICH, L., VERNOOJI, B., NEGROTTO, D., UKNESS, N.G., WARD, S., KESSMAN, E. and RYALS, J., 1993. Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance, *Science*, 261:754-756.
- GAHAN, P.B., 1984. *Plant Histochemistry and Cytochemistry*. Academic Press, London. 291p.
- GALLITELLI, D., and MINAFRA, A., 1994. Electroforesis. Course on Plant Virus Diagnosis, 15-30 October 1994. Adana-Turkey. Page: 89-99.
- GLASA, M., SVOBODA, J., NOVAKOVA, S., 2007. Analysis of the Molecular and Biological Variability of Zucchini Yellow Mosaic Virus Isolates from Slovakia and Czech Republic. *Virus Genes* 35: 415-421.
- GOODMANN, R.N. and NOVACKY, A.J., 1994. *The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens*. Aps Press, St. Paul. Minn., 244p.
- GREBER, R.S., PERSLEY, D.M., AND HERRINGTON, M.E., 1988. Some Characteristics of Australian Isolates of Zucchini Yellow Mosaic Virus. *Aust. J. Agric. Res.*, 1988, 39, 1085-94.

- HAHLBROCK, K. And SCHEEL, D., 1987. Biochemical Responses of Plant to Pathogens. (I.Chet ed.) Innovative Approaches to Plant Disease Control. John Wiley & Sons. Inc., Canada, p.229-254.
- HAMMERSCHMIDT and SMITH-BECKER, J.A., 1999. The Role of Salicylic Acid in Disease Resistance (A.A Agrawal, S. Tüzün, and E. Bent, eds.) Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores. APS Press, St. Paul, Minn.,p.19-36.
- HARDISON, G., JONES, D.C., OTTS, T.C., 2004. Comparison of Admire 2F and Platium 2SC for Soil Insect Control and Suppression of Tomato Spotted Wilt Virus (TSVW) in Flue-Cured Tobacco. Paper presented at 41 st Tobacco Worker's Conference, University of Georgia.
- HEIL, M., BOSTOCK, M.R., 2002. Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences. Annual of Botany 89: 503-512.
- HOLLINGS, M., and BRUNT, A.A., 1981. Potyviruses. Handbook of Plant Virus Infection: Comparative Diagnosis. 731-807. Elsevier/ North Holland.
- HORNBY, D. And FITT, B.D.L., 1981. Effects of Root Invading Fungi on Structure and Function of Cereal Roots. (P.G. Ayres ed.) Effect of Disease on the Physiology of the Growing Plant. Cambridge University Press, Cambridge p.101-130.
- HELGUERA, P.R., DOCAMPO, D.M., NOME, S.F. and DUCASSE, D.A., 2002. Enhanced Detection of Prune Dwarf Virus in Peach Leaves by Immunocapture- Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction with Nested Polymerase Chain Reaction (IC-RT-PCR Nested PCR). J. Phytopathology 150, 94-96. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin.
- ISAAC, S., 1992. Fungal-Plant Interactions. Chapman & Hall, London, 418p.
- JACOBS, J.L., CONNELLY, F.J., MCGRIFF, D.E., MULLIS, S., BERTRAND, P.F., MORORE, J.M. 2004. The Effect of TMV Inoculation on The Incidence of Spotted Wilt In Tobacco. University of Georgia Cooperative Extension Service, Tifton, Georgia 31794.

- JOHNSON, A., 2006. Tomato Spotted Wilt Virus Information. Flue-Crued Tobacco Cooperative Stabilization Corporation is the Grower Owned and Supported Cooperative That Serves Flue-Crued Tobacco Growers in Virginia, North Carolina, South Carolina, Georgia, Alabama And Florida.
- KANG Z. and BUCHENAUER, H., 2001. Ultrastructural Studies on the Mode of Action of Fluorescent Pseudomonas Alone and in Combination With Acibenzolar-S-Methyl Effective Against Fusarium Oxysporum F.Sp.Lycopersicum in Tomato Plants. Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz. 108(5): 513-529.
- KATIS, N.I., TSITSIPIS, J.A., LYKOURESSIS, D.P., PAPAPANAYOTOU, A., MARGARITOPOULOS, J.T., KOKINIS, G.M., PERDIKIS, D.CH and MANOUSSOPOULOS, I.N., 2006. Transmission of Zucchini Yellow Mosaic Virus by Colonizing and Non-colonizing Aphids in Greece and New Aphid Species Vektors of the Virus. J. Phytopathology 154, 293-302. Blackwell Verlag, Berlin.
- KAUSS, H., FRANKE, R., KRAUSE, K., CONTRATH, U., JEBLICK, W., GRIMMING, B. and MATERN, U., 1993. Conditioning of Parsley (*petroselinum crispum* L.) Suspension Cells Increases Elicitor-Induced Incorporation Of Cell Wall Phenolics. Plant physiol., 102: 459-466.
- KIRALY, Z., BARNA, B., KECSKES, A., FODOR, J., 2002. Down-Regulation of Antioxidative Capacity in a Transgenic Tobacco Which Fails to Develop Acquired Resistance to Necrotization Caused by TMV. Free Radical Research, Vol., 36(9), Pp. 981-991.
- KUC. J., 1987. Immunization and its Applicability for Disease Control. (I.Chet ed.) Innovative Approaches to Plant Disease Control. John Willey & Sons, New York, p.255-274.
- KLAS, E.F., FUCHS, M., GONSALVES, D., 2006. Comparative Spatial Spread Overtime of Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV) ve Watermelon Mosaic Virus (WMV) in Fields of Transgenic Squash Expressing the Coat Protein Genes of ZYMV and WMV, and in Fields of Nontransgenic Squash. Transgenic Res. 15:527-541.

- LANGSTON, Jr., D.B and FLANDERS, J.T. 2000. Evaluation of Actigard and Admire Alone and in Combination for Suppression of Mosaic Virus Incidence in Summer Squash in Grady Co. Ga. Georgia Vegetable Extension-Research Report, The University of Georgia.
- LANGSTON, Jr., D.B and FLANDERS, J.T. 2000. Evaluation of Actigard and Admire alone and in Combination for Suppression of Tomato Spotted Wilt Virus of Tomato. Georgia Vegetable Extension-Research Report, The University of Georgia.
- LECOQ, H., LEMAIRE, J.M., and WIPF-SCHEIBEL, C. 1991. Control of Zucchini Yellow Mosaic Virus in Squash by Cross Protection. *Plant Dis.* 75:208-211.
- LESEMANN, D.E., MAKKOUK, K.M., KOENING, R., and SAMMAN, E.N., 1984. Natural Infection of Cucumbers by Zucchini Yellow Mosaic Virus in Lebanon. *Phytopathol. Z.* 108: 304-313
- LIN, S., WU, H., JAN, F., HOU, R.F, and YEH, S., 2006. Modification of the Helper Component-Protease of Zucchini Yellow Mosaic Virus for Generation of Attenuated Mutants for Cross Protection Against Severe Infection. *Phytopathology* Published by The American Phytophological Society Vol. 97, No. 3: 287-296.
- LISA, V., and LECOQ, H. 1984. Zucchini Yellow Mosaic Virus. No:282 in: *Descriptions of Plant Viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England.*4p.
- LISA, V., BOCCARDO, G., D'AGOSTINO, G., DELAVALLE, G., and D'AQUILIO, M. 1981. Characterization of a Potyvirus That Causes Zucchini Yellow Mosaic Virus. *Phytopath.* 71:667-672.
- LOUWS, F.J., WILSON, M., CAMPBELL, H.L., CUPPELS, D.A., JONES, J.B., SHOEMAKER, P.B., SAHIN, F. and MILLER, S., 2001. Field Control of Bacterial Spot and Bacterial Speck of Tomato Using a Plant Activator. *Plant Dis.*, 85: 481-488.
- LOVISOLO, O. 1980. *Acta Horticulturae* 88:33-82.
- LOW, P.S. and MERIDA, J.R., 1996. The Oxidative Burst in Plant Defence: Function and Signal Transduction. *Physiological Plantarum*, 96: 533-542.

- MAHGOUB, H.A., DESBIEZ, C., WIPF-SCHEIBEL, C., DAFALLA, G., AND LECOQ, H. (1997). Characterization and Occurrence of Zucchini Yellow Mosaic Virus in Sudan. Inra, Station De Pathologie Vegetale, Domaine Saint Maurice, B.P. 94, 84143 Montfavet Cedex, France; and Plant Pathology Center, University of Gezira, Wad Medani, Sudan.
- MALIK, A.H., MANSOOR, S., IRAM, S., BRIDDON, W.R., ZAFAR, Y., 2006. A Severe Outbreak of Melon Disease Caused by Zucchini Yellow Mosaic Virus in the Punjab Province of Pakistan. *Plant Pathology* 55, 285.
- MANDAL, B., PAPPU, H.R., CSINOS A.S., 2001. Suppressive Effect of Acibenzolar-S-Methyl(ASM) on Tomato Spotted Wilt Virus. Department of Plant Pathology, University of Georgia.
- MARAIS and BREYTENBACH, 1996. The Effect of Tristeza Stem Pitting on the Star Ruby Grapefruit Industry in Southern Africa.
- MARAIS and KOTZE., 1985. Fidanlı kılarda Yaprak Bitleriyle Taşıyan Virüslere Karşı Koruma Amaçlı Yapılan Hafif Türü Virüs Aşılamaları ve Bitki Aktivatörlerinin Etkileri.
- MATHERON, M.E. and PORCHAS, M. 2000. Comparative Effect of Actigard and Ridomil Gold on Development of Phytophthora Crown and Root Rot on Chile Peper Plants. Yuma Agricultural Center, University of Arizona, Yuma, AZ 85364. Publication No. P-2000-0039-PCA.
- MCGRIF D.E. and BERTRAND, P., 2001. The Effect of Strip Tillage on the Incidence of TSWV in Tobacco.
- MCPHERSON R.M., STEPHENSON M.G., LAHUE S.S., MULLIS S.W. 2004. Impact of Early Season Thrips Management on Reducing the Risks of Spotted Wilt Virus and Suppressing Aphid Population in Flue-Cured Tobacco. Paper Presented At The 41 St Tobacco Workers' Conference, The University Of Georgia.
- MCPHERSON R.M., MOORE, J. M., CONNELLY, F.J., JACOBS, J.L., JONES, D.C., 2004. Options for Managing Thrips and Tomato Spotted Wilt Virus on Flue-Crued Tobacco. Paper Presented At The 41 St Tobacco Workers' Conference, The University of Geoergia.

- MELTON, AT., 2005. Tomato Spotted Wilt Virus, P. Sterling Southern Department Extension Leader _Entomology , Associate State Program Leader_Anrr/Grd.
- MOMOL, M.T., OLSON, S.M., FUNDERBURK, J.E., STAVISKY, J., MAROIS, J.J., 2004. Integrated Management of Tomato Spotted Wilt on Field-Grown Tomatoes. North Florida, Research and Education Center, University of Florida. Plant Disease., Vol.88 No.8.
- MOMOL, M.T., OLSON, S.M., FUNDERBURK, J.E., STAVISKY, J., 2000. Management of TSWV on Tomatoes with UV-reflective Mulch and Acibenzolar-S-methyl. North Florida, Research and Education Center, University of Florida.
- MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D., 1995. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology, Supplement 10.
- NAMETH, S.T., DODDS, J.A., and PAULUS, A.O. 1983. A New Potyvirus Associated with Severe Disease of Cantaloupe (*Cucumis Melo*) in Southern California. (Abstr.) Phyttopath. 73:793.
- NICHOLSON, P., and HAMMERSCHMIDT, R., 1992. Phenolic Compounds and Their Role in Disease Resistance. Annu. Rev. Phytopsthol., 30: 369-389.
- NIKI, T., MITSUHARA, I., SEO, S., OHTSUBO, N.and OHASHI, Y., 1998. Antagonistic Effect of Salicylic Acid and Jasmonic Acid on the Expression of Pathogenesis- Related (PR) Protein Genes in Wounded Mature Tobacco Leaves. Plant Cell Physiol.,39:500-507.
- PAPPU, H.R., CSINOS, A.S., MCPHERSON, R.M., STEPHENSON, M.G., 2000a. Activity of Acibenzolar-S-Methyl and Imidacloprid on TSWV in Tobacco. University of Georgia. Publication No. P-2000-0004-SOA.
- PAPPU ,H.R., CSINOS A.S., MCPHERSON,R.M., JONES, D.C., STEPHENSON, M.G.,2000b. Effect of Acibenzolar-S-Methyl and Imidacloprid on Suppression of Tomato Spotted Wilt Tospovirus In Flue-Cured Tobacco. Crop Protection, Volume 19, Number 5,Pp. 349-354(6)

- PIFFANELLI, P., ZHOU, F., CASAIS, C., ORME, J., JAROSCH, B.,
 SCHAFFRATH, U., COLLINS, N.C., PANSTRUGA, R., and SCHULZE-
 LEFERT, P. 2002. The Barley MLO Modulator of Defense and Cell Death is
 Responsive to Biotic and Abiotic Stress Stimuli. *Plant Physiology*, Vol.129,
 pp. 1076-1085.
- POSPIESZNY, H., HASIOW, B., ve BORODYNKO, N., 2007. A Polish Isolate of
 Zucchini Yellow Mosaic Virus from Zucchini is Distinct from Other
 European Isolates. *Plant Dis.* 91:639, Published online as doi: 10.1094/PDSI-
 91-5-0639B.
- PRIETO, H., BRUNA, A., HINRICHSEN, P. and MUNOZ, C. 2001. Isolation and
 Molecular Characterization of a Chilean Isolate of Zucchini Yellow Mosaic
 Virus. *Plant Dis.* 85:644-648.
- PURCIFULL, D.E., ADLERZ, W.C., SIMONE, G.W., HIEBERT, F., and
 CHRISTIE S.R. 1984. Serological Relationships and Partial Charecterization
 on Zucchini Yellow Mosaic Isolated from Squash in Florida. *Plant Dis.*
 98:230-233.
- RAKSIN, I., 1992. Role of Salicylic Acid in Plants. *Annual Review of Plant
 Physiology and Plant Mol. Biol.*, 43:439-463.
- RAMUSSEN, J.B., HAMMERSCHMIDT, R. and ZOOK, M.N., 1991. Systemic
 Induction of Salicylic Acid Accumulation in Cucumber After Inoculation
 with *Pseudomonas Syringae* Pv. *Syringae*. *Plant Physiol.*, 97: 1342-1347.
- REED T.D., SEMTNOR P.J., JOHSON C.S. and PARRISH M. 2003. Actigard and
 Admire for Tomato Spotted Wilt Virus Control for Flue-Crued Tobacco in
 Virginia in 2003. Publication no. P-2005-0016-PTA.
- SHIH-SHUN LIN, ROGER F. HOU, and SHYI-DONG YEH. 2001. Complete
 Genome Sequence and Genetic Organization of a Isolate of Zucchini Yellow
 Mosaic. Graduate Institute of Agricultural Biotechnology and Department of
 Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan 402,
 Republic Of China.
- SHIRASU, K., NAKAJIMA, H., RAJASEKHAR, V.K., DIXON, R.A. and LAMB,
 C., 1997. Salicylic Acid Potentiates an Agonist- Dependent Gain Control

- That Amplifies Pathogen Signals in the Activation of Defence Mechanisms. *The Plant Cell*, 9: 261-270.
- SIDEK, Z., TOKUMASU, T. and SAKO, N. 1999. Biological Properties and Coat Protein Sequence Comparison of Two Isolates of Zucchini Yellow Mosaic Potyvirus in Malaysia. *Proceedings MARRS Fifth International Conference on Plant Protection in the Tropics*. 415-418p.
- SMITH, J.E., JACOBS, J.L., COOK, J., BOLAND, R.T., VARNADORE, T., BERTRAND, P.F., MOORE, J.M. 2005. The Effect of Actigard Field Sprays on the Incidence of Spotted Wilt in Tobacco. University of Georgia Cooperative Extension Service, Tifton, Georgia 31793.
- SMITH-BECKER, J., KEEN, N.T., BECKER, J.O., 2003. Acibenzolar-S-methyl Induces Resistance to *Colletotrichum lagenarium* and Cucumber Mosaic Virus in Cantaloupe. Department of Plant Pathology, University of California. *Crop Protection* .,22:769-774.
- SONG, F., GOODMAN, R.M., 2001. Activity of Nitric Oxide is Dependent on But is Partially Required for Function of Salicylic Acid in the Signaling Pathway in Tobacco Systemic Acquired Resistance. *Molecular Plant- Microbe Interactions* vol:14 No:12:1458-1462.
- SOYLU, E.M., 1999. Mildiyö Etmeni (*Peronospora parasitica*) ve Konukçusu *Arabidopsis thaliana* Arasındaki İlişkilerin Sıto ve Histokimyasal Yöntemlerle İncelenmesi. Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Doktora Tezi. 160s.
- STASWICK, P.E. and LEHMAN, C.C., 1999. Jasmonic Asit- Signaled Responses in Plants. (A.A. Agrawal, S.Tüzün ad E. Bent, eds.) *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores*. Biochemistry, Ecology and Agriculture. APS Press St. Paul, Minn., p.117-136.
- STOBBS, L. W., and VAN SCHAGEN, J.G. 1990. First Report of Zucchini Yellow Mosaic Virus in Squash in Arkansas. *Plant Dis.* 70-78.
- STOLTZENBURG, M.C., AIST, J.R. and ISRAEL, H.W., 1984. The Role of Papillae in Resistance to Powdery Mildew Conditioned by the MI-o Gene in Barley. I: Correlative Evidence. *Physiological Plant Pathology*, 25: 337-346.

- SUMMERS, C.G., STAPLETON, J.J., NEWTON, A.S., DUNCAN, R. A., and HART, D. 1995. Comparison of Sprayable and Film Mulches in Delaying the Onset of Aphid-Transmitted Virus Diseases in Zucchini Squash. *Plant Dis.* 79:1126-1131.
- TÜZÜN, S., NESMITH, W., FERRISS, R.S. and KUC, J., 1986. Effects of Stem Injections with *Peronospora tabacina* on Growth of Tobacco and Protection Against Blue Mold in the Field. *Phytopath.*, 76:938-983.
- TÜZÜN, S. and BENT, E., 1999. The Role of Hydrolytic Enzymes in Multigenic and Microbially-Induced Resistance in Plants. (A.A Agrawal, S. Tüzün., and E.Bent eds.) *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores. Biochemistry, Ecology and Agriculture.* Press, St. Paul, Minn.,p. 95-115.
- TÜZÜN, S. and KLOEPPER, J., 1995. Practical Application and Implementation of Induce Resistance. (R. Hammerschmidt and J. Kuc, eds.) *Induce Resistance to Disease in Plants.* Kluwer Academic Publishers, London. p. 152-168.
- ULLMAN, E. D., CHO, J.J. and GERMAN, T.L., 1991. Occurrence and Distribution of Cucurbit Viruses in the Hawaiian Islands. *Plant Dis.* 75:367-370.
- VALLET, C., CHABBERT, B., CZANINSKI, Y. and MONTIES, B., 1996. Histochemistry of Lignin Deposition During Sclerencyma Differentiation in Alfalfa Stems. *Annals of Botany*, 78:625-632.
- VAN LOAN, L.C., BAKKER, P.A.H.M. and PIETERSE, C.M.J., 1998. Systemic Resistance Induced by Rhizosphere Bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 36:453-483.
- VERNOOIJ, B., FRIEDRICH, L., MORSE, A., KOLDITZ-JAWHAR, R., WARD, E., UKNES, S., KESSMANN, H and RYALS, J., 1994. Salicylic Acid is Not the Translocated Signal Responsible for Inducing Systemic Acquired Resistance But is Required in Signal Transduction. *The Plant Cell*, Vol. 6, 959-965.
- WANG, H.L., GONSALVES, D., PROVVIDENTI, R., and LECOQ, H.L., 1991. Effectiveness of Cross Protection by Mild Strain of Zucchini Yellow Mosaic Virus in Cucumber, Melon, and Squash. *Plant Dis.* 75: 203-207.

- WELLER, D.M., 1988. Biological Control of Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere With Bacterial. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 26: 379-407.
- WETZEL, T., T. CANDRESSE, M. RAVELONANDRO and J. DUNEZ. 1991. A Polymerase Chain Reaction Adapted to Plum Pox Potyvirus Detection. *J. Virol. Methods*, 33: 355-365.
- YARDIMCI, N., KORKMAZ, S., 2004. Studies on Spread and Identification of Zucchini Yellow Mosaic Virus Disease in the North-West Mediterranean Region of Turkey by Biological Indexing and Double-Stranded RNA Analysis. *Plant Pathology Journal* 3 (1): 1-4.
- YILMAZ, M.A., ABAK, K., LECOQ, H., BALO ĞLU, S., SARI, N., KES İCİ, S., ÖZASLAN, M., and GÜLDÜR, M. 1994. Control of Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV) in Cucurbits by ZYMV-WK Strain. 9th Congress of Mediterranean Phytopathological Union-Kuşadası-Aydın-Türkiye.353-356
- YILMAZ, M.A., LECOQ, H., ABAK, K., BALO ĞLU, S., ve SARI, N., 1992. Türkiye’de Kabakgil Sebze Türlerinde Zarara Yapan Virüsler. Türkiye I. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, İzmir. Cilt 2, 439-442.
- YUEH-CHWEN, H., TZU-JUNG, Y., YA-CHUN, C., 2005. A New Combination of RT-PCR and Reverse Dot Blot Hybridization for Rapid Detection and Identification of Potyviruses. *Journal of Virological Methods* 128: 54–60.
- ZECHMANN, B., ZELLNIG, G., URBANEK-KRAJNE, A., and MULLER, M., 2006. Artificial Elevation of Glutathione Affects Symptom Development in ZYMV-infected *Cucurbita pepo* L. plants. *Arch Virol* 152:747-762.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Adana’da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Adana’da tamamladım. 2000 yılında okumaya hak kazandığım Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünden 2004 yılında Ziraat Mühendisi olarak mezun oldum. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim dalına kaydoldum. 2005 yılında başlayan yüksek lisans öğrenimimi, 2006-2007 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	$_2\text{PO}_4$
2.9 gr	Na	$_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ veya
2.3 gr	Na	$_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1.44. gr	Na	$_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1.15 gr	Na	$_2\text{HPO}_4$ (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	$_2\text{CO}_3$
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 NaN₃ konmuş ve HCl ile pH 9.8' e ayarlanarak 1 litreye tamamlanmıştır. 3

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 s ırasıyla çözülmü ş pH ayarlaması yapılmış ve toplam hacim 200 ml' ye tamamlan ıştır. Daha sonra 1/1000 oranında 2-Mercaptoethanol ilave edilmiştir.

% 20 Sodium Dodecyl Sülfate (SDS)

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

Potassium asetat (CH_3COOK) (5M)

49.075 gr potassium asetat 60 ml su içerisinde çözülmü ş ve volum 100 ml ye tamamlanmıştır.

Sodium asetat CH_3COONa (3M)

40.824 gr sodium asetat 60 ml su içerisinde çözülmü ş ve volum 100 ml ye tamamlanmıştır.

% 70 lik Ethanol

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