

**T.C.
ONDOKUZMAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SAMSUN İLİNDE FARKLI KÜLTÜR BİTKİLERİNDE
DOMATES LEKELİ SOLGUNLUK VİRÜSÜ (TSWV)'NÜN BULAŞIKLIK
DURUMUNUN BELİRLENMESİ VE BAZI TİCARİ DOMATES ÇEŞİTLERİNDE
DAYANIKLILIĞI KIRAN TSWV VARYANTLARININ ARAŞTIRILMASI**

HAVVA YILDIRIM

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**AKADEMİK DANIŞMAN
DOÇ. DR. MİRAY SÖKMEN**

SAMSUN-2010

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından 29 / 12 / 2009 tarihinde yapılan sınav ile Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Miray SÖKMEN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Haydar KARAKAYA

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nazlı D. KUTLUK YILMAZ

ONAY :

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

..... / / 2010

Prof. Dr. Hasan GÜMÜŞ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**SAMSUN İLİNDE FARKLI KÜLTÜR BİTKİLERİNDE
DOMATES LEKELİ SOLGUNLUK VİRÜSÜ (TSWV)'NÜN BULAŞIKLIK
DURUMUNUN BELİRLENMESİ VE BAZI TİCARİ DOMATES ÇEŞİTLERİNDE
DAYANIKLILIĞI KIRAN TSWV VARYANTLARININ ARAŞTIRILMASI**

ÖZ

Bu çalışmada, Samsun'un Bafra, Çarşamba, Alaçam, Vezirköprü ve Tekkeköy ilçelerindeki domates, biber ve tütün alanlarından 2008 yılında 414 adet örnek toplanmış ve örnekler *Domates lekeli solgunluk virüsü* (*Tomato spotted wilt virus*; TSWV) poliklonal antiserumu kullanılarak DAS-ELISA (Double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay) yöntemi ile test edilmiştir. Test edilen örneklerin 28 (% 6.8)'inin TSWV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Virüsün ilçelere göre bulaşıklık oranı Alaçam'da % 21.2, Vezirköprü'de % 9.6, Çarşamba'da % 7.5 ve Bafra ilçesinde % 6.3 olarak tespit edilirken, Tekkeköy ilçesinden alınan hiçbir örnekte TSWV enfeksiyonu saptanmamıştır. Surveyler sırasında toplanan tütün örneklerinin % 39.4'ü, domates örneklerinin % 35.6'sı, biber örneklerinin % 25'i TSWV ile bulaşık olarak tespit edilmiştir.

ELISA testi sonucuna göre biber, tütün ve domates örneklerine ait ve yüksek absorbans değerlerine sahip birer TSWV izolatı [sırasıyla Ba-Ağ-Bi (1), Al-Ka-Tü (1), Ba-Gü-Do (1)] seçilerek, konukçu reaksiyonlarına göre izolatların biyolojik olarak ayırımında ve dayanıklılık çalışmalarında kullanılmıştır. Seçilen 3 izolatın bazı bitkilerde oluşturdukları semptomlara göre, biyolojik olarak birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir.

TSWV'ye karşı dayanıklılıkta rol oynayan *Sw-5* genini içerdiği belirlenen Esin F1, Logero RZ F1, Swanson F1 ve Petek F1 domates çeşitleri ve kontrol olarak hassas olduğu bilinen Falcon çeşidi kullanılarak domateste dayanıklılığı kıran TSWV varyantlarının Samsun ilinde bulunup bulunmadığı araştırılmıştır. Bu çeşitlere ait bitkiler, Ba-Ağ-Bi (1), Al-Ka-Tü (1), Ba-Gü-Do (1) izolatları ile ayrı ayrı mekanik olarak inokule edilmişler ve 25 gün sonra ELISA ve RT-PCR ile test edilmişlerdir. Al-Ka-Tü (1) izolatının Esin F1 çeşidinde, Ba-Gü-Do (1) izolatının ise Logure RZ F1 ve Petek F1 çeşitlerinde dayanıklılığın kırılmasına sebep olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: TSWV, tütün, biber, domates, dayanıklılık, *Sw-5*

**DETERMINATION OF TOMATO SPOTTED WILT VIRUS (TSWV)
INCIDENCE IN VARIOUS CROPS GROWN IN SAMSUN PROVINCE
AND INVESTIGATION ON RESISTANCE-BREAKING VARIANTS OF TSWV
ON SOME COMMERCIAL TOMATO CULTIVARS**

ABSTRACT

In this study 414 pepper, tomato and tobacco samples were collected during surveys conducted in Alaçam, Bafra, Çarşamba, Vezirköprü and Tekkeköy districts of Samsun province in the 2008 growing season and tested by DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) using the polyclonal antiserum of *Tomato spotted wilt virus*. The results of ELISA tests showed that a total of twenty eight samples (6.8%) were infected with TSWV. Incidences of TSWV infection were 21.2 % in Alaçam, 9.6 % in Vezirköprü, 7.5 % in Çarşamba, 6.3 % in Bafra districts, but none of the samples collected from Tekkeköy district were found to be positive for TSWV. The percentages of TSWV infection in tobacco tomato, pepper samples collected during surveys were 39.4%, 35.6% and 25%, respectively.

Three TSWV isolates [Ba-Ağ-Bi (1), Al-Ka-Tü (1), Ba-Gü-Do (1) belonging to pepper, tobacco and tomato, respectively], which had higher absorbance values in ELISA tests, were selected to inoculate indicator plants and tomato cultivars for host reactions and resistance tests. It was found that these three isolates differ in biological characteristics in respect to their symptom occurrence in some test plants.

Tomato varieties (Esin F1, Logero RZ F1, Swanson F1 and Petek F1) containing resistance gene “*Sw-5*” were used to investigate whether TSWV isolates determined in Samsun province were resistant-breaking variants or not. Three seedlings of each tomato cultivars were mechanically inoculated with Ba-Ağ-Bi (1), Al-Ka-Tü (1), Ba-Gü-Do (1) isolates separately and tested by ELISA and RT-PCR 25 days after inoculation. The TSWV isolate named Al-Ka-Tü (1) was found to break resistance in Esin F1, and the other isolate, Ba-Gü-Do (1) in Logure RZ F1 and Petek F1 cultivars.

Key Words: TSWV, tobacco, pepper, tomato, resistance, *Sw-5*

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması, yürütülmesi ve yazımı sırasında beni yönlendiren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Miray SÖKMEN'e ve tezimin fotoğraf çekme aşamasında ve diğer çalışmalar esnasında bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Bölüm Başkanı Prof. Dr. Sebahat SULLIVAN' a ve bölüm hocalarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen ve bu çalışma sırasında da destek olan değerli babam Kadir YILDIRIM, annem Sebahat YILDIRIM'a, sevgili kardeşim Yusuf YILDIRIM'a, çalışmanın harita aşaması başta olmak üzere arazi sürveyleri ve diğer aşamalarında bana büyük bir özveri ile yardım eden ve tüm sıkıntılara ortak olan değerli eşim Harita Mühendisi Fatih AKIN'a ve diğer tüm aile fertlerime sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmanın tüm aşamalarında bana yardımcı ve destek olan arkadaşım Yük. Lis. Öğr. Nurcan ERDEM'e, çalışma sırasında yardımlarını gördüğüm bölüm arkadaşlarıma, laboratuvar aşamasında yardımlarını gördüğüm Toprak Bölümüne ve bu projenin yürütülmesindeki katkısından dolayı O.M.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (Proje no: 2-509) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA NO
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. TSWV'nin Simptomları.....	8
2. 1.1. TSWV'nin Domatesteki Simptomu.....	8
2.1.2. TSWV'nin Biberdeki Simptomu.....	9
2.1.3. TSWV'nin Maruldaki Simptomu.....	10
2.1.4. TSWV'nin Yerfıstığındaki Simptomu.....	10
2.1.5. TSWV'nin Süs Bitkilerindeki Simptomu.....	10
2.2. TSWV'nin Taşınması.....	11
2.2.1 Tripslerin Biyolojisi	11
2.2.2. Trips-Tospovirüs İlişkisi	12
2.3. TSWV'nin Coğrafi Dağılımı, Kültür Bitkilerinde Oluşturduğu Zararı ve Ekonomik Önemi.....	16
2.4. TSWV'nin Kontrolü.....	20
2.5. TSWV İle Mücadelede Dayanıklı Bitkilerin Kullanılması.....	21
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER	30
3.1. Materyal.....	30
3.1.1. Test Bitkileri.....	30
3.1.2. Enfekteli Bitki Örnekleri.....	31
3.1.3. Antiserum	31
3.1.4. ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler (gr/l).....	31
3.1.5. Mekanik İnokulasyon Sırasında Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	32
3.1.6. Mikropleytlar.....	32
3.1.7. PCR Çalışmalarında Kullanılan Primerler.....	32
3.2. Yöntemler.....	33
3.2.1. Survey Çalışmaları.....	33
3.2.2. Bitki Örneklerinin ELISA Yöntemi ile Test Edilmesi.....	33
3.2.3. Test Bitkilerinin Yetiştirilmesi.....	37
3.2.4. TSWV'nin Test Bitkilerine Mekanik Olarak Taşınması.....	38

3.2.5. TSWV İzolatlarının Elde Edilmesi ve Çoğaltımı	39
3.2.6. Dayanıklı ve Hassas Domates Çeşitlerine TSWV İzolatlarının İnokulasyonu.....	40
3.2.7. Dayanıklı ve Hassas Domates Çeşitlerinden DNA Ekstraksiyonu.....	40
3.2.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	41
3.2.9. Agaroz Jelin Hazırlanması.....	42
3.2.10. Dayanıklı Çeşitlerden RNA Ekstraksiyonu.....	42
3.2.11. RT-PCR Yöntemi İle TSWV'nin Nükleokapsid Protein (N) Geninin Amplifikasyonu.....	43
4. BULGULAR	44
4.1. Survey Çalışmasında Alınan Örneklerin ELISA Sonuçları.....	44
4.2. TSWV İzolatlarının Test Bitkilerinde Oluşturduğu Simptomlar	45
4.3. Dayanıklı Domates Çeşitlerinde Sw-5 Dayanıklılık Geninin Tespiti.....	55
4.4. TSWV İzolatlarının Dayanıklı ve Hassas Domates Çeşitlerinde Oluşturduğu Simptomlar.....	56
4.5. Dayanıklı Domates Çeşitlerinde TSWV Enfeksiyonunun ELISA Testi ile Araştırılması	60
4.6. RT-PCR Yöntemi İle Domates Çeşitlerinde TSWV'nin Nükleokapsid Protein (N) Geninin Belirlenmesi.....	61
5. TARTIŞMA.....	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	70
7. KAYNAKLAR.....	72
8. ÖZGEÇMİŞ.....	86

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

A₄₀₅:	ELISA mikroyeıt okuyucusunda 405 nm’de elde edilen absorbands değeri
bp:	Baz çifti
CMV:	Hıyar Mozaik Virüsü
DAS-ELISA:	Double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay
FAO:	BM Gıda ve Tarım Teşkilatı (Food and Agricultural Organisation)
G₁ (=G_C):	TSWV membranında bulunan ve reseptör görevi yapan glikolizat proteini
G₂ (=G_N):	TSWV membranında bulunan ve reseptör görevi yapan glikolizat proteini
GP:	TSWV membranında bulunan glikolizat proteini
HR:	Aşırı hassasiyet (hipersensitif) reaksiyonu
kb :	Kilobaz
kDA:	Kilodalton
LRNA:	TSWV’ nin en büyük genomik parçası
M:	Molar (1 lt’deki mol sayısı)
MRNA:	TSWV’ nin ikinci büyük genomik parçası
N:	TSWV nükleokapsid protein geni
nM:	Nanomolar
nm:	Nanometre
PBS:	Fosfat buffer salin (Fosfat tampon çözeltisi)
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PVP:	Polyviniylpyrolidone
RdRp:	RNA replikasyonunda görev yapan RNA dependent-RNA polimeraz enzimi
RT-PCR:	Reverse transkripsiyon – polimeraz zincir reaksiyonu
SAR:	Sistemik kazanılmış dayanıklılık
Sw-5:	Domateste 9. kromozomda bulunan dayanıklılık geni
ss RNA:	Tek sarmal ribonükleik asit
Tsw:	Biberde 10. kromozomda bulunan dayanıklılık geni
TMV:	Tütün Mozaik Virüsü
UV:	Ultraviyole ışık

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sekil Adı</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1.	TSWV'nin elektronmikroskop görüntüsü.....	5
Şekil 2.2.	TSWV'nin partikül yapısı.....	6
Şekil 2.3.	TSWV'nin genomik organizasyonu	6
Şekil 2.4.	TSWV'nin domates yaprağındaki (A) ve meyvesindeki (B) simptomu	9
Şekil 2.5.	TSWV'nin biber meyvelerindeki simptomu.....	9
Şekil 2.6.	TSWV'nin maruldaki simptomu.....	10
Şekil 2.7.	TSWV'nin begonyada (A) ve krizantemdeki (B) simptomu...	11
Şekil 2.8.	Trips-Tospovirüs ilişkisi.....	14
Şekil 3.1.	Samsun ilinde örnekleme yapılan ilçeler ve köyler.....	35
Şekil 3.2.	Mekanik inokulasyon için yetiştirilen test bitkilerine ait fideler.....	37
Şekil 3.3.	Mekanik inokulasyon döneminde domates (sol) ve hıyar (sağ) bitkileri.....	37
Şekil 3.4.	TSWV'nin <i>N. rustica</i> bitkisine mekanik inokulasyonu.....	38
Şekil 3.5.	TSWV ile inokule edilmiş tütün bitkilerinin görünümü.....	39
Şekil 4.1.	Örnekleme yapılan bitki türlerine göre TSWV'nin bulaşıklık oranları.....	44
Şekil 4.2.	Araziden alınan TSWV ile enfekteli örnekler.....	45
Şekil 4.3.	TSWV ile bulaşık tütün yaprağındaki nekrotik lekeler.....	45
Şekil 4.4.	<i>C. sativus</i> bitkisinin inokule edilen yaprağında (A) ve üst yaprağında (B) Al-Ka-Tü(1) izolatının oluşturduğu simptomlar.....	49
Şekil 4.5.	<i>N. cleveandii</i> bitkisinde Ba-Ağ-Bi (1) izolatının neden olduğu nekrotik lekeler.....	49
Şekil 4.6.	<i>C. album</i> bitkisinde TSWV izolatlarının inokule edilen yapraklarda oluşturduğu nekrotik lekeler [soldan sağa Ba-Gü-Do (1), Ba-Ağ-Bi (1), Al-Ka-Tü (1)].....	50

Şekil 4.7.	<i>C. album</i> bitkisinde Al-Ka-Tü (1) izolatının oluşturduğu sistemik nekrotik lekeler.....	50
Şekil 4.8.	<i>N. rustica</i> bitkisinde Ba-Ağ-Bi (1) izolatının oluşturduğu sistemik nekrotik lekelenmeler (B) ve Al-Ka-Tü (1) izolatının inokule yaprakta neden olduğu klorotik halkalı lekeler (A).....	51
Şekil 4.9.	<i>N. tabacum</i> “xanthi-nc” de Ba-Ağ-Bi (1) izolatının inokule edilen yaprakta oluşturduğu nekrotik halkalı leke (A) ve sistemik nekrotik lekeler (B).....	51
Şekil 4.10.	<i>N. glutinosa</i> ’da Al-Ka-Tü (1) izolatının oluşturduğu nekrotik lekeler.....	52
Şekil 4.11.	<i>N. glutinosa</i> ’da soldan sağa Ba-Gü-Do (1), Ba-Ağ-Bi (1) ve Al-Ka-Tü (1) izolatlarının oluşturduğu belirtiler.....	52
Şekil 4.12.	A.) <i>L. esculentum</i> ’da Ba-Ağ-Bi (1) izolatının neden olduğu bodurluk (sol)ve sağlıklı bitki (sağ), B.) <i>C. annuum</i> ’da Ba-Gü-Do (1) izolatının oluşturduğu klorotik halkalı lekeler...	53
Şekil 4.13.	<i>N. benthamiana</i> bitkisinde Al-Ka-Tü (1) izolatının oluşturduğu belirtiler.....	53
Şekil 4.14.	<i>D. stramonium</i> bitkisinde Ba-Ağ-Bi (1) izolatının oluşturduğu mozayik ve yaprak deformasyonu.....	54
Şekil 4.15.	Al-Ka-Tü (1) izolatının <i>P. hybridae</i> ‘de oluşturduğu nekrotik lezyon lekeler.....	54
Şekil 4.16.	LogureRZ F1 dayanıklı çeşidine ait bitkilerde <i>Sw-5</i> geninin ve CT 220 fragmentinin PCR ile amplifikasyonu..	55
Şekil 4.17.	Dayanıklı ve hassas domates çeşitlerinde <i>Sw-5</i> geninin ve CT 220 fragmentinin amplifikasyonu.....	56
Şekil 4.18.	Ba-Ağ-Bi (1) izolatının Swanson F1 bitkisinin inokule edilen yaprağındaki nekrotik lekeler.....	58
Şekil 4.19.	Ba-Ağ-Bi (1) izolatının Petek F1 bitkisinin inokule edilen yaprağındaki nekrotik lekeler.....	58
Şekil 4.20.	Ba-Ağ-Bi (1) izolatının Esin F1 bitkisinin inokule edilen yaprağındaki nekrotik lekeler	59

Şekil 4.21.	Ba-Ağ-Bi (1) izolatının Logure RZ F1 bitkisinin inokule edilen yaprağındaki nekrotik lekeler.....	59
Şekil 4.22.	Ba-Gü-Do (1) Logure RZ F1 1.tekerrür bitkisinin üst yapraklarında oluşturduğu mozayik simptomsu.....	59
Şekil 4.23.	Dayanıklı ve hassas domates çeşitlerine ait ELISA Sonuçları (Sarı renkli alanlar pozitif).....	61
Şekil 4.24.	Dayanıklı domateslerden izole edilen toplam RNA'lar kullanılarak RT-PCR yöntemi ile TSWV kapsid protein geninin çoğaltılması.....	62

ÇİZELGELER LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>	<u>Çizelge Adı</u>	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 2.1.	Tospovirüs Cinsine Ait Bitki Virüsleri.....	4
Çizelge 2.2.	TSWV'yi Taşıyan Trips Türleri	13
Çizelge 3.1.	TSWV'nin Simptomatolojik Olarak Teşhisinde Kullanılan Test Bitkileri	30
Çizelge 3.2.	<i>Sw-5</i> Geninin Tespitinde Kullanılan Primerler ve Baz Dizileri.....	32
Çizelge 3.3.	TSWV'nin Nükleokapsid Protein Geni Tespitinde Kullanılan Primerler.....	32
Çizelge 3.4.	Samsun İli Domates Ekim, Üretim ve Verim miktarları.....	34
Çizelge 3.5.	Samsun İli Tütün Ekim, Üretim ve Verim Miktarları	34
Çizelge 3.6.	Samsun İli Biber Ekim, Üretim ve Verim Miktarları..... ..	34
Çizelge 3.7.	Örneklerin Alındığı İlçe, Köyler, Alındığı Alanların Büyükükleri ve Örnek Sayıları.....	36
Çizelge 4.1.	Toplanan Örneklerin İlçelere Göre TSWV ile Bulaşıklık Oranları.....	44
Çizelge 4.2.	TSWV İzolatlarının Test Bitkilerinde Oluşturduğu Simptomlar.....	46
Çizelge 4.3.	İzolatların Dayanıklılı Domates Çeşitlerinde Oluşturduğu Simptomlar	57

1. GİRİŞ

Sebzeler içerdikleri protein, karbonhidrat, mineral madde ve vitaminler yönünden besleyici özelliği sebebiyle insan vücudu ve sağlığı açısından oldukça önemli bir yere sahiptir (Vural ve ark., 2000). Kültür sebzeleri yetiştiriciliği açısından çok zengin bir ülke olan Türkiye, sebze tarımı için uygun bir ekolojiye sahiptir. Dünya’da sebze üreten ülkeler arasında Çin ve ABD’den sonra Türkiye 3. sırada yer almaktadır (FAO, 2007). Dünya’da ve ülkemizde en fazla üretimi yapılan sebze türü ise domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.)’tir (Abak ve ark., 2000). FAO’nun 2007 yılı sebze üretimi verilerine göre Dünya’da yaklaşık 4.626.232 ha alanda 126.246.708 ton domates üretimi yapılmaktadır. Türkiye’de ise 2007 yılı verilerine göre yaklaşık 270.000 ha alanda ve 9.919.673 ton domates üretilmiştir (FAO, 2007).

Domates’in anavatanı Orta ve Güney Amerika’dır ve sistematik olarak Tubuflora (Personata) takımının Solanaceae familyasının *Lycopersicon* cinsinde yer alır (Günay, 1992). Su içeriği % 94 ve kuru madde içeriği % 6 olan domates bitkisinde kuru maddenin % 4’ü karbonhidrat, % 0.8’i protein, % 0.2’ si yağ ve kalan kısmı ise vitamin ve minerallerden meydana gelmektedir. Domates meyvesinde protein, A, B1, B2 ve C vitaminleri, potasyum, fosfor, magnezyum, kalsiyum ve demir elementleri bulunmaktadır (Abak ve ark., 2000). Kullanım alanı oldukça geniş olan domates taze olarak tüketiminin yanısıra, salata, salça, ketçap ve turşu şeklinde de kullanılmaktadır (Günay, 1992; Vural ve ark., 2000). Kanseri riskini azaltan bir antikanserojen likopen antioksidanı içermekte olan domates, kanı durultup üre miktarını düşürür, vücudu gençleştirerek kalp, karaciğer, böbrek bozuklukları için fayda sağlar. Ülkemizde domates üretiminin % 73’ü taze ve % 25’i salça olarak tüketilirken % 2’si de yurtdışına ihraç edilmektedir (Abak ve ark., 2000).

Domatesin üretiminde bazı hastalık ve zararlılar ekonomik olarak önemli kayıplar meydana getirmektedir. Virüsler domates üretiminde verim kaybına sebep olan hastalık etmenleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Dünya’da yaklaşık 40 virüs türü domateste enfeksiyon oluşturmaktadır (Polston ve Anderson, 1997). Virüsler; mekanik olarak bitki öz suyu ile vektörler aracılığıyla ve enfekteli üretim materyalinin kullanılması nedeniyle tarım alanlarında kolayca yayılmaktadır. Bu nedenle virüs hastalıkları ile etkili bir mücadele zordur. Domates yetiştirilen alanlarda en fazla ürün

kaybına sebep olan virüslerin başında *Domates lekeli solgunluk virüsü* (*Tomato spotted wilt virus*: TSWV) gelmektedir (Goldbach ve Peters, 1994).

TSWV, Dünya’da ilk olarak 1915 yılında Brittlebank tarafından Avustralya’da tespit edilmiştir (Murphy ve ark., 1995; Adkins, 2000). Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde A1 karantina listesinde olan TSWV (Griep ve ark., 2000), ekonomik olarak ciddi kayıplara yol açması sebebiyle Türkiye’de iç ve dış karantinaya tabi virüs etmenleri arasında yer almaktadır.

TSWV, on farklı trips (Insecta; Thysanoptera; Thripidae) türü tarafından propagatif (vektör bünyesinde çoğalma özelliği) olarak taşınır (Whitfield ve ark., 2005). TSWV’nin Dünya’da farklı kültür bitkilerinde 1 milyar ABD dolarından fazla kayıp meydana getirdiği tahmin edilmektedir (Griep ve ark., 2000). Çok geniş bir konukçu çevresi olan TSWV, monokotiledon ve dikotiledon özellikte 80 familyaya ait 1100’den fazla bitki türünü enfekte etmektedir. Tropik ve subtropik bölgelerde yetiştirilen birçok sebze, meyve, süs bitkisi ve bazı yabancı otlar TSWV’ye hassastır (Peters, 2004; Griep ve ark., 2000; Chatzivassiliou ve ark., 2001; Momol ve ark., 2002).

Hem virüs hem vektörün konukçu çevresinin geniş olmasından dolayı TSWV’nin kontrolü oldukça zordur (Yudin ve ark., 1986; Edwardson ve Christie, 1986). TSWV enfeksiyonunun kontrolü için dayanıksız olmayan ürünlerde rotasyon veya yabancı ot konukçularının dönüşümlü olarak ortadan kaldırılması gibi kültürel önlemler mücadelede etkiye sahip değildir. Diğer yandan farklı ürünlerde de TSWV enfeksiyonunu azaltmak için trips kontrolünde insektisit uygulaması, çok etkili olmamaktadır (Cho ve ark., 1989; Todd ve ark., 1994).

Virüs epidemisini azaltmak için en etkili yöntem dayanıklı çeşit kullanmaktır (De Haan ve ark., 1996; McPherson ve ark., 1992). TSWV’ye dayanıklı domates çeşitlerinin geliştirilmesinde *Lycopersicon peruvianum* en iyi kaynak olarak görülmektedir (Rosello ve ark., 1998). *Lycopersicon esculentum* ve *L. peruvianum* çeşitlerinin melezlenmesi sonucu farklı TSWV izolatlarına dayanıklı Stevens adı verilen domates çeşidi elde edilmiştir (van Zijl ve ark., 1986). Stevens çeşidinin TSWV’ye dayanıklılıkta rol oynayan Sw-5 dayanıklılık genini içerdiği tespit edilmiştir (Stevens ve ark., 1992; Cho ve ark., 1996). Günümüzde dayanıklı olan bu çeşidin kullanılmasıyla virüsün neden olduğu ekonomik kayıplar azaltılabilmektedir.

Daha sonraları yapılan bazı çalışmalarda TSWV’nin domateste (Aramburu ve Marti, 2003) ve biberde dayanıklılık geninin etkisini yitirmesine sebep olan yeni ırkları

(strainleri) belirlenmiştir. Ancak biberdeki dayanıklılığı kıran ırklar dayanıklı domates varyetelerinde, yine domateste dayanıklılığı kıran ırklar ise biberde enfeksiyona sebep olmamıştır. Bu durum dayanıklılık ile ilgili domateste *Sw-5* lokusunun, biberde ise *Tsw* lokusunun farklı özelliklere sahip olduğuna işaret etmiştir (Roggero ve ark., 2002).

Türkiye’de üretimi yapılan domatesin % 5’lik bölümü (7.000 ha ekiliş alanı ve 371.000 ton üretim miktarı) Samsun ilinde özellikle Bafra ve Çarşamba ovalarında yetiştirilmektedir (Samsun İl Tarım Müdürlüğü 2007 verileri). Bölgede domates bitkisinde yapılan bir çalışmada TSWV bulaşıklık oranının 2002 yılında % 14.6, 2003 yılında ise % 18.11 olduğu belirlenirken TSWV’nin domates bitkilerinde % 95.5 oranında pazarlanabilir değer kaybına, % 42.14 oranında verim kaybına sebep olduğu belirlenmiştir (Şevik, 2007). Ancak, Samsun ilinde TSWV’nin değişik kültür bitkilerinde farklı streynlerinin veya varyantlarının enfeksiyon oluşturup oluşturmadığı ve bunlara karşı TSWV’ye dayanıklı olduğu bilinen bazı ticari domates çeşitlerinin reaksiyonu bilinmemektedir. Bu çalışmanın ilk aşamasında Samsun’da yetiştirilen farklı kültür bitkilerinde (domates, biber ve tütün), TSWV’nin bulaşıklık durumunun belirlenmesine ve elde edilen TSWV izolatlarının biyolojik olarak ayırımına çalışılmıştır. Daha sonra TSWV’ye dayanıklı ticari domates çeşitlerinde, çalışma sırasında elde edilen bu izolatların sistemik enfeksiyon oluşturup oluşturmadığı araştırılmış ve dayanıklılık kırıcı TSWV strainlerinin veya varyantlarının bölgede varlığı konusunda ilk bulgulara ulaşılması amaçlanmıştır.

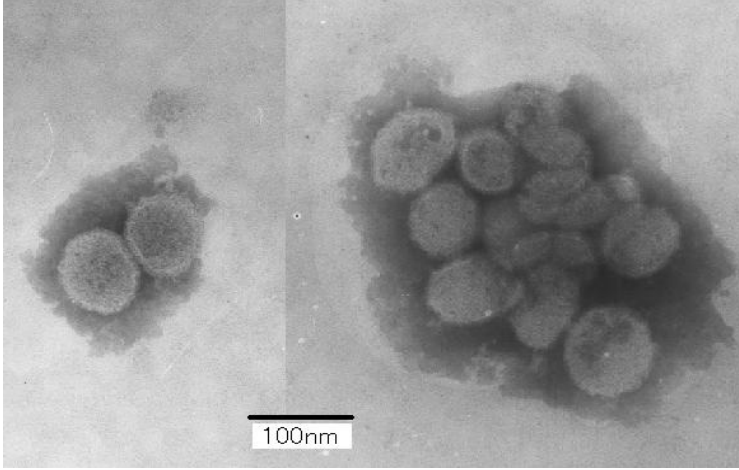
2. GENEL BİLGİLER

TSWV, taksonomik olarak böceklerde ve omurgalı hayvanlarda enfeksiyon oluşturan RNA virüslerinin yoğun olarak bulunduğu Bunyaviridae familyası içinde yer alan (Bunyavirus, Phlebovirus, Nairovirus, Hantavirus ve Tospovirus) Tospovirus cinsine ait bir virüstür. Bu familyada yalnızca Tospovirus cinsi bitkilerde enfeksiyon oluşturan virüs türlerini içermektedir (Uhrig ve ark., 1999; Adkins, 2000; Thomas-Carroll ve Jones, 2002). Onbeş virüs türünün yer aldığı bu virüs grubunda (Çizelge 2.1) tarımsal ürünlerde en tahripkar olanı, TSWV (German ve ark., 1992)'dir. Vektörün trips aracılığı ile geniş alanlara taşınması bu virüsün önemini bir o kadar daha artırmıştır. Bölgelere göre değişmekle birlikte en etkili vektörü *Frankliniella occidentalis*'dir (Ullman ve ark., 1992).

Çizelge 2.1. Tospovirus Cinsine Ait Bitki Virüs Türleri

No	Virüs Adı		
1	Domates Lekeli Solgunluk Virüsü	<i>Tomato spotted wilt virus</i>	TSWV
2	Impatiens nekrotik leke virüsü	<i>Impatiens necrotic spot virus</i>	INSV
3	Karpuz gümüşü mozayik virüsü	<i>Watermelon silver mottle virus</i>	WSMV
4	Karpuz tomurcuk nekroz virüsü	<i>Watermelon bud necrosis virus</i>	WBNV
5	Kavun sarı leke virüsü	<i>Watermelon yellowspot virüs</i>	MYSV
6	Domates klorotik leke virüsü	<i>Tomato chlorotic spot virus</i>	TCSV
7	Biber kloroz virüsü	<i>Capsicum chlorosis virus</i>	CaCV
8	Kabak öldürücü kloroz virüsü	<i>Zucchini lethal chlorosis virus</i>	ZLCV
9	Yerfıstığı halkalı leke virüsü	<i>Groundnut ringspot virus</i>	GRSV
10	Yer fıstığı tomurcuk nekroz virüsü	<i>Peanut bud necrosis virus</i>	PBNV
11	Yer fıstığı klorotik virüsü	<i>Peanut chlorotic fan virus</i>	PCFV
12	Yer fıstığı sarı leke virüsü	<i>Peanut yellow spot virus</i>	PYSV
13	Süsen sarı leke virüsü	<i>Iris yellow spot virus</i>	IYSV
14	Krizantem gövde nekroz virüsü	<i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i>	CSNV
15	Fenerotu şiddetli mozayik virüsü	<i>Physalis severe mottle virus</i>	PSMV

TSWV partikülleri (virionları) 80-120 nm çapında ve küresel görünümlüdür (Şekil 2.1), yapısında % 5 nükleik asit (RNA), % 70 protein, % 20 lipit ve % 5 karbohidrat bulunmaktadır (Kormelink, 2005).



Şekil 2.1 TSWV'nin elektronmikroskop görüntüsü

(<http://www.jpnp.ne.jp/fukuoka/wadai/tswv/1b.jpg>) (05.05.2008)

TSWV genomu negatif veya “ambisense” tek sarmal RNA (ssRNA)’dan oluşmaktadır (Adkins, 2000). TSWV genomu, 3 ayrı segment (genomik parça) içermektedir. Bunlar;

a.) LRNA (9 kb)

b.) MRNA(4.8 kb)

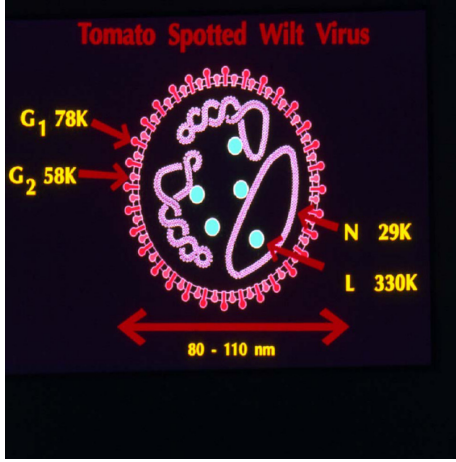
c.) SRNA (3 kb) olarak adlandırılmaktadır (Tsompana ve ark., 2005) (Şekil 2.2 ve Şekil 2.3).

a) LRNA: Negatif polariteye sahip olan bu molekül, cRNA (komplementer RNA)’yı oluşturduktan sonra enfekteli hücrelerde replikasyondan sorumlu viral RNA-dependent-RNA polimeraz (RdRp) enzimi olarak görev yapan bir protein sentezlemektedir. Bu proteinin büyüklüğü 331.5 kDa’dur (Chapman ve ark., 2003; Whitfield ve ark., 2005).

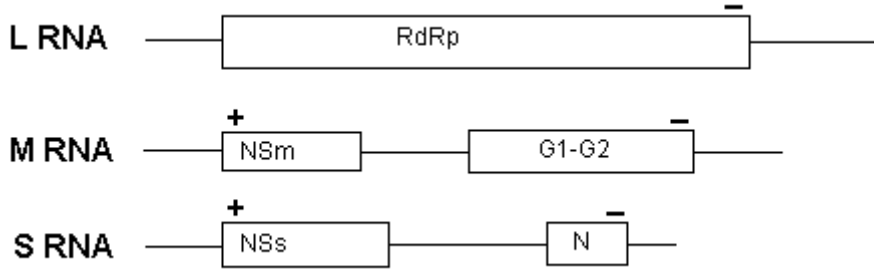
b) MRNA: Bu molekül ambisense özellikte olup, önce çoğalıp pozitif kopyasını yapıp daha sonra negatif polaritede kendi orijinal molekülünü oluştururken aynı zamanda 33.6 kDa’luk partikül yapısında yer almayan, ama virüsün fonsiyonel proteinlerinden biri olan (NSm) (+) proteinini kodlar. Bu protein virüsün hücreden hücreye taşınmasını sağlar. Ayrıca, MRNA molekülü G1 (=Gc) ve G2 (=Gn) membran proteinlerini oluşturan 127.4 kDa’luk bir proteini kodlamaktadır. G1 (=Gc) ve G2 (=Gn) proteinleri viriyonun hem bitkide, hem de virüsün vektörü olan trips bünyesinde lokalizasyonunda ve çoğalmasında önemli bir rol oynamaktadır (Takeda ve ark., 2002; Kormelink ve ark., 1992; Snippe ve ark., 2007).

c) SRNA: MRNA gibi ambisense özelliktedir ve RNA susturulmasının (RNA silencing) baskılanmasında etkili olan 52.4 kDa’luk (NSs) (+) proteini ve ayrıca virüsün yaşam

döngüsünde önemli olan 29 kDA'lık kılıf proteini (N)'nin sentezlenmesini sağlamaktadır (Griep ve ark., 2000; Pappu ve ark., 2000; Tsompana ve ark., 2005).



Şekil 2.2. TSWV'nin partikül yapısı (Moyer, 2006)



Şekil 2.3. TSWV'nin genomik organizasyonu (Tsompana, 2005)

TSWV'nin konukçuları arasında domates, biber, patlıcan, marul, yer fıstığı, kabakgiller (hıyar, kavun, karpuz), enginar gibi ürünler, süs bitkileri ve bazı yabancı otlar yer almaktadır (Marchoux ve ark., 1991). Süs bitkisi olarak *Chrysanthemum* konukçuları arasındadır. TSWV, Japonya'da krizantem üretimini sınırlayan en önemli faktörlerden birisidir (Matsura ve ark., 2002).

TSWV'nin konukçularının çoğu *Astreaea*, *Solanecea* ve *Fabaceae* familyalarında yer almaktadır (Herrero ve ark., 2000). Yabancı otlar ise hem virüse, hem virüs vektörü tripslere konukçuluk yaparak hastalığın daha geniş alanlara yayılmasına neden olmaktadır (Wilson, 1998). Bu nedenle kültür bitkilerinin bulunduğu alanlarda yabancı ot populasyonunun azaltılması hastalıkla mücadelede önemlidir (Chatzivassilliou ve ark., 2001). TSWV'nin bilinen başlıca yabancı ot konukçuları; *Dendranthema*, *Amaranthus* spp., *Galinsoga* spp., *Plantoga rugelii*, *Cerastium*

vulgatum, *Cardamine hirsuta*, *Geranium carolinianum*, *Polygonum lapathifolium*, *Solanum nigrum*, *Stellaria media*, *Conyza bonariensis*, *Portulaca oleracea*, *Ranunculus* spp. *Senecio vulgaris*, *Taraxacum officinale*, *Datura stramonium*, *Lactuca florida*, *Sonchus* spp., *Sonchus oleraceus* (Johnson ve ark., 1995; Finetti Sailer ve ark., 2002; Groves ve ark., 2002)'dir .

Yunanistan'ın kuzey bölgesinde 2007 yılında tütün alanlarından TSWV'yi taşıyan vektör *Trips tabaci* örnekleri alınmış ve virüsün bu vektör aracılığı ile *Amaranthus retroflexus* (Amaranthaceae), *D. stramonium*, *S. nigrum* (Solaneceae) ve *S. oleraceus* (Asteraceae) gibi yabancı otlarda taşınma oranlarındaki farklılığı tespit etmek amacıyla bu bitkilere beslenmeleri için bırakılmıştır. Çalışma sonucunda TSWV'yi taşıyan tripslerin virüsü farklı oranlarda *S. nigrum* (% 17.5), *L. serriola* (% 16.3), *S. oleraceus* (% 14.3) bitkilerine taşıyabildiği tespit edilmiştir (Chatzivassiliou ve ark., 2007).

İtalya'da yapılan bir çalışmada, domates, biber, patlıcan, ve marul gibi önemli kültür bitkileri ile *D. Stramonium* ve *S. oleraceus* yabancı otlarından TSWV şüphesi gösteren örnekler toplanmış ve reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemine tabi tutularak bu örneklerde TSWV enfeksiyonu saptanmıştır (Finetti Sailer ve ark., 2002).

İspanya'nın kuzey doğusunda 1992 ve 1993 yılları süresince toplam 51 yabancı ot türü toplamış ve bu örneklerin 25 türünde *Cucumber mosaic virus* (CMV) tespit edilirken, 15 türünde ise TSWV olduğu saptanmıştır. TSWV ile enfekteli belirlenen yabancı otlar; *Convolvulus arvensis*, *Malva sylvestris* ve *Sonchus tenerrimus* olarak tespit edilmiştir (Lavinia ve ark., 1996).

TSWV, Meksika'da birkaç üründe tomatillo, *Physalis ixocarpa*, domates, tütün, biber ve krizantem bitkilerinde tespit edilmiştir (Ochoa ve ark., 1996).

2001 yılında Bulgaristan'da yapılan çalışmada domates, biber, tütün ve süs bitkileri ve yabancı otlardan alınan örneklerde ELISA uygulaması sonucu TSWV izolatları belirlenmiştir (Hristova ve ark., 2001).

Avustralya'da marul üretim alanlarından toplanan marul örnekleri ile 18 farklı türden yabancı ot örnekleri toplanmış ve bu bitkilere ELISA testi uygulanmıştır. Test sonucunda yabancı otlarda TSWV enfeksiyonuna rastlanmıştır. Bu türler arasında *Arctotheca calendula*, *Brassica rapa*, *S. oleraceus*, *Trifolium* spp., *Capsella bursa-pastoris*, *Erodium moschatum*, *Malva sylvestris*, *Medicago polymorpha*, *Rumex* spp., *Solanum nigrum* yer almaktadır (Wilson, 1998).

2005 yılında Samsun ve çevresinde yapılan srvey çalışmasında biber ve bazı yabancı otlardan örnekler toplanmış ve bu örneklerden *A. retroflexus* ve *Hibiscus trionum* bitkilerinde TSWV tespit edilmiştir. (Arlı Sökmen ve ark., 2005).

Denizli ilinde 2005-2006 yıllarında yapılan çalışmada bazı yabancı otlarda ve serada yetiştirilen domatestede TSWV varlığı belirlenmiştir. Çalışmada 71 yaprak ve 7 meyve rneğinde ELISA ile TSWV saptanmıştır. Daha sonra virüs izolatları *N. rustica*, *N. glutinosa* ve *D. stramonium* test bitkilerine inokule edilmiş ve bu bitkilerin inokule edilen yapraklarında klorotik, nekrotik ve halkalı lekeler sistemik olarak mozayik, yaprak deformasyonu ve nekrotik alanlar oluştuğu bildirilmiştir (zdemir ve ark., 2007).

2.1. TSWV'nin Simptomları

TSWV'nin oluşturduğu belirtiler, bitkinin hassasiyetine, tür ve çeşidine ve ekolojik şartlara bağlı olarak farklılık göstermektedir. Ayrıca, belirtilerin görüntüsü ve şiddeti; bitkinin gelişme dönemine, yaşına ve virüs ırkına bağlı olarak farklılık göstermektedir (German ve ark., 1992; Soler ve ark., 1998; Mau ve Martin, 2007). Etmen nekroz, kloroz, geriye doğru ölüm, boğum aralarında kısılma, mozayik, konsantrik halka lekeler ve yapraklarda şekil bozukluğu gibi belirtilere neden olmaktadır (Mumford ve ark., 1996).

2. 1.1. TSWV'nin Domatesteki Belirtisi:

Yapraklar üzerinde önce kahverengi daha sonra bronz rengine dönüşen lekeler oluşmaktadır (şekil 2.4). Bazen bronzluk nekroza dönüşerek bitkiyi kurutabilir. Yapraklar aşağı ve ie doğru kıvrılır ve kırılğan bir yapı alır. Yaprak sapında, gövdede ve yeni gelişen sürgünlerde koyu kahverengi çizgiler gözlenirken, sürgün uçlarında geriye doğru ölüm, bitkide bodurlaşma ve solgunluk meydana gelmektedir. Meyveler üzerinde çok sayıda i ie geçmiş, merkezi kabarık olan halkalı lekeler görülmektedir. Enfeksiyondan sonra ise olgunlaşmamış, yeşil renkli meyvelerde şekil bozukluğu ve i içe geçmiş yuvarlak lekeler görülür. Olgunlaşmış meyvelerde ise çok sayıda konsantrik ve etrafı sarı renkte olan daire şeklinde lekeler oluşur (Roja ve ark., 1997; Aramburu ve ark., 2000; şevik, 2007).



-A-

-B-

Şekil 2.4. TSWV'nin domates yaprağındaki (A) ve meyvesindeki (B) simptome
<http://edis.ifas.ufl.edu/pp134> (22.04.2008)

2.1.2. TSWV'nin Biberdeki Simptome:

Bitkinin tümünde genel bir bodurluk ve sararma ile solgunluk en tipik belirtisidir. Yapraklarda, klorotik çizgili lekeler ya da nekrotik lekeler dikkati çeker. Tepe sürgünlerde beneklenmelerle birlikte ölümler meydana gelmektedir. Olgun meyvede konsantrik sarı halkalı noktalar veya nekrotik çizgiler gözlenirken meyvede sarı ve konsantrik lekeler oluşmaktadır (Şekil 2.5) (Zitter ve ark., 1989).



-A-

-B-

Şekil 2.5. TSWV'nin biber meyvelerindeki simptome

A) <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/brief/2003/pepper/image/jalapeno1sm.jpg> (01.05.2008)

B) <http://www.scielo.cl/fbpe/img/agrtec/v65n3/at01img04.jpg> (01.05.2008)

2. 1. 3. TSWV'nin Maruldaki Simptomu:

Bitkinin tek tarafındaki yapraklarda, klorotik kahverengi beneklenmelerle başlar ve renk değişimleri göbekteki yapraklara kadar yayılır (Şekil 2.6). Bitki de tek taraflı gelişme meydana getirerek sebzeden ürün alınamayacak kadar zarar verir (Gracia ve ark., 1999).



Şekil 2.6. TSWV'nin maruldaki simptomsu

(http://193.209.42.51/data/kso/Kasvintarkastus/Kasvintuhoojat/tswv_salaatti.jpg)
(05.05.2008)

2.1.4. TSWV'nin Yerfıstığındaki Simptomu:

TSWV yer fıstığında çok değişik belirti oluşturmakla birlikte enfekteli bitkiler üzerindeki yapraklarda genel olarak eş merkezli halkalar şeklinde görülür. Bitki bodurlaşır, genç yapraklarda halkalar ve benekler oluşur. TSWV bazı durumlarda, enfekteli bitkide ölüme neden olabilir. Bitki üzerinde sonradan oluşan yapraklar, genellikle normalden küçüktür ve kloroz /beneklenme görülür (Öztürk, 2007).

2. 1.5. TSWV'nin Süs Bitkilerindeki Simptomu:

Türe bağlı olarak belirtiler farklılık gösterir. Gövdede siyah çizgiler ve solgunluk tipik belirtisidir. Büyüme engelleyen yaprak mozayikleri ve beneklenmeler şeklinde semptomlarla klorotik lekeler, yaprakta renk bozulması, yaprak ve gövde nekrozları, bitkinin genelinde şekil bozukluğu ve damar açılması görülür (Şekil 2.7). TSWV ile bulaşık alanlardan ürün almak mümkün olmamaktadır (Matsura ve ark., 2002).



-A-

-B-

Şekil 2.7. TSWV'nin begonyada (A) ve krizantemdeki (B) simptomsu

A.) <http://www.hort.uconn.edu/ipm/greenhs/pics/begonia.jpg> (05.05.2008)

B.) <http://www.defra.gov.uk/planth/pestpics/tswv.jpg>.(05.05.2008)

2.2. TSWV'nin Taşınması

TSWV, Tripsle (doğada) ve mekanik olarak (laboratuar şartlarında) taşınmaktadır. Tripsler emgi yaparak bitkinin klorofil yapılarını bozmalarının yanı sıra virüslere vektörlük ederek de zarar yapmaktadırlar. TSWV'nin çok düşük oranda tohumla taşındığına dair eski kaynaklarda bazı bilgiler olsa da günümüzde bu bilgi pek kabul görmemektedir (<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=412>).

2.2.1 Tripslerin Biyolojisi

Tripsler, Tysanoptera takımının Thripidae familyasında yer alıp, birçok bitkide (kavun, karpuz, fasulye, biber, bamy, yerfıstığı, soğan ve sarımsak gibi) beslenmelerinden dolayı polifag böcekler olarak adlandırılmaktadır (Uygun, 2006). Vücutları uzun ve oval yumurtaları beyaz renkli, dişiler 0.9-1 mm boyunda olup erkeklerden daha uzundurlar. Gelişmelerini yumurta, 1. ve 2. larva, pupa ve ergin olarak 4 dönemde tamamlamaktadırlar (Ohnishi ve ark., 2001). Sıcaklığa bağlı olarak yumurtadan ergin hale geçinceye kadar 20-30 gün süre geçmektedir (Sherwood, 2005). Şubat sonundan itibaren populasyon artışı başlayan tripsin yaşam süresi 20-40 gün'dür. Kışı genellikle pupa olarak bitki artıkları arasında geçirirken nadiren kışın larva olarak da bulunurlar. Dişiler yumurtalarını bitki dokusu içine teker teker bırakır ve bir dişinin

80 yumurta bıraktığı gözlenmiştir. Partenogenetik olarak çoğalabildikleri için erkek birey olmaması üremelerini engellemez (Demirsoy, 1990). Yılda 3-6 döl verip kısa sürede popülasyonunu arttıran tripslerin yaşamaları için ideal sıcaklık 25-27°C dir (Murphy ve ark., 2004). Tripslerin canlı kalma oranını TSWV izolatu, konukçu bitki türü ve sıcaklık etkilemektedir (Stumpf ve Kennedy, 2005).

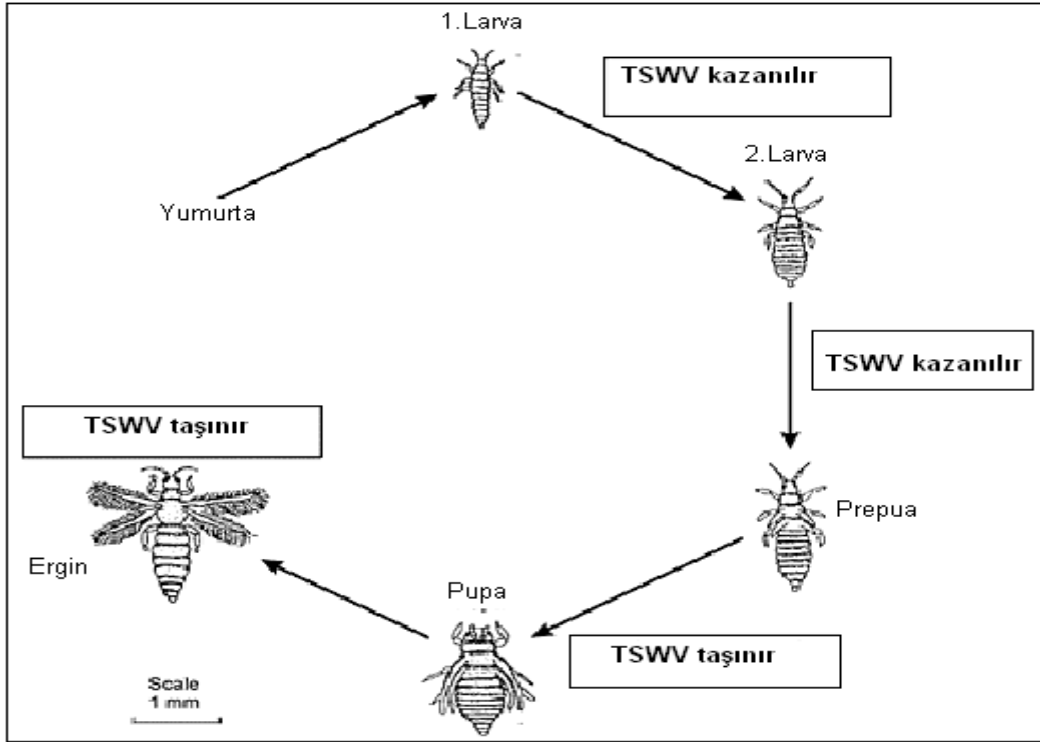
2.2.2. Trips-Tospovirüs İlişkisi

Tripsler birçok bitkide bitki özsuynunu emerek klorofil yapısına zarar vermesinin yanı sıra vektör olarak virüs taşınmasına neden olmaktadır. TSWV, on trips türü tarafından taşınabilmektedir (Tsompana ve ark., 2005, Ullman ve ark., 2002; Mound, 2001) (Çizelge 2.2). Daha sonra yapılan çalışmalar ile *F. tenuicornis* Uzel ve *Scirtotrips dorsalis* Hood.'in TSWV'nin vektörleri olarak rapor edilmiş olsalar bile deneysel olarak yapılan çalışmalarda TSWV'yi *F.occidentalis* ve *T.tabaci* gibi taşıyamadığı tespit edilmiştir (Ullman ve ark., 1997). Yapılan başka bir çalışma ile TSWV'nin, *F. gemina* ile de taşınabildiği tespit edilmiştir (De Borbon ve ark., 2006). Virüsün trips tarafından kazanılmasında virionda yer alan GP proteinleri görev yapar (Sherwood, 2005). TSWV'nin bitkiden bitkiye taşınmasında etkili olan tripsler virüsü yalnızca 1. larva dönemindeyken 15-30 dakikalık bir beslenme süresi sonunda kazanmakta, 2. larva ve/veya ergin dönemdeyken virüsün sağlıklı bitkilere bulaştırılması gerçekleşmektedir (Şekil 2.8) (Nagata ve ark., 2002). Erginlerde virüs bulaştırma yeteneği daha çok gelişmiştir (Wijkamp ve Peters, 1993; Sadof ve Cloyd, 1993). Vektör bünyesine alınan virüs önce bağırsak hücrelerine geçerek replike olmakta ve daha sonra salgı kanallarına taşınmaktadır. Erginlerde orta barsak duvarının kalınlığı, virüsün vektör bünyesinde geçişine engel olduğu için TSWV sadece 1. larva döneminde kazanılmaktadır (German ve ark, 1992). Trips konukçu bitkide beslenirken taşıdığı virüsü tükürük bezlerinden gelen salgıyla birlikte dışarı atmakta ve bulaştırma gerçekleşmektedir. Virüsün ergin tripsin yumurtasına geçme durumu yoktur (Sherwood, 2005).

Çizelge 2.2 TSWV'yi Taşıyan Trips Türleri

Trips türleri	Tospovirüs
<i>F. occidentalis</i> Pergande	TSWV
<i>F. schultzei</i> Trybom	TSWV
<i>F. fusca</i> Hinds	TSWV
<i>F. intonsa</i> Trybom	TSWV
<i>T. tabaci</i> Lindeman	TSWV
<i>T. setosus</i> Moulton	TSWV
<i>T. palmi</i> Karny	TSWV
<i>S. dorsalis</i> Hood	TSWV
<i>F. bisipinosa</i> Morgan	TSWV
<i>F. gemina</i>	TSWV

2000 yılında Nagata tarafından yapılan bir çalışmada, *F. occidentalis*'in TSWV ile enfekteli petunya bitkisinde beslenmesinin ardından vektör bünyesinde virüsün hangi aşamalardan geçtiği incelenmiş, larvanın 24 saatlik beslenmesinin ardından midede epitel hücrelerde % 83.3 oranında, 24-96 saatlik beslenmeden sonra hem midede hem epitelyum hücrelerinde, 96 saatlik bir beslenmenin ardından ise % 97.1 oranında mide epitelyum ve kas hücrelerinde bulunduğu tespit edilirken, ergin bireylerde beslenmenin ardından ise TSWV % 100 oranında midede saptanmıştır (Nagata ve ark., 2002). Bir bitkinin TSWV ile enfekteli olabilmesi için tripsin bitkide en az 5 dk emgi yapması gerekmektedir. Tripsin prepupa ve pupa döneminde gömlek değiştirmesi sırasında meydana gelen epitel kayıp nedeniyle trips bünyesinde virüs konsantrasyonu azalmakta ve sadece enfekteli doku ile sınırlı kalmaktadır (Mumford ve ark., 1996).



Şekil 2.8. Trips-Tospovirus İlişkisi

http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/Images/Tomato/Tom_SptWilt/ThripLifecycl eB.jpg (05.05.2008)

TSWV vektör trips tarafından taşınarak bir çok ülkede salgın hale gelmiştir. İspanya’da domates, biber ve marul alanlarında üretimi önemli derecede sınırlayan TSWV, temel vektör olan *F. occidentalis* tarafından ürünlerde önemli kayıplara neden olmuştur (Lavina ve ark., 1996).

TSWV’nin en önemli vektörü olan *F. occidentalis*, ilk kez 1989 yılında Macaristan’da saptandıktan sonra çok kısa sürede ülkede seralarda yayılım göstermiş ve bir çok bitkinin meyvesinde önemli derecede zararlara neden olmuştur (Hatalo ve Kiss, 2008)

1987-1988 yılları arasında *F. occidentalis*, Finlandiya’da salgın hale geçerek özellikle 1987 yılında Ağustos ayında sorun oluşturmuştur. Daha sonra vektöre karşı yapılan biyolojik çalışmalar ile vektör popülasyonunun azaldığı tespit edilmiştir (Rautapoa, 2008).

1991 yılında Fransa’da yapılan çalışmada, TSWV’nin *F. occidentalis* tarafından taşınması araştırılmıştır. Domates, biber, patlıcan, marul ve krizantem gibi bitkilerden alınan TSWV izolatlarının test bitkilerine inokulasyonunun ardından bu bitkilerde

vektör *F. occidentalis*'in beslenme durumu ve TSWV'nin vektör bünyesine geçip geçmediği ELISA testi ile saptanmıştır (Marchoux ve ark., 1991).

İsrail'de 1994-1998 yılları arasında seralarda ve açık alanda TSWV ile bulaşık olduğundan şüphe edilen bitkiler ELISA ile test edilmiş ve bu bitkilerde hem TSWV enfeksiyonu hem de hızla yayılmasında etkili olan *F. occidentalis* saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada TSWV'nin taşınabilirlik oranını saptamak amacıyla *D. stramonium* ve *Petunia hybrida* yaprakları üzerinde trips bireyleri beslenmeleri için bırakılmış ve çalışmanın sonucunda *F. occidentalis*'in % 26 oranında TSWV'yi taşıdığı saptanmıştır (Gera ve ark., 2008).

1997 yılında İspanya'nın doğu ve kuzey doğu bölgelerinde saptanan enfekteli bitkilerde *F. occidentalis*'in larvalarının beslenmesi sağlandıktan sonra vektörün *L. esculentum* ve *D. stramonium* gibi test bitkilerine virüsü taşıdığı tespit edilmiştir (Roja ve ark., 1997).

TSWV, Yunanistan'da ilk olarak 1972 yılında ülkenin kuzey kısmında tütün bitkisinde rapor edilmiştir. Enfeksiyonun ülkeye *T. tabaci* ile giriş yaptığı ve daha sonra *F. occidentalis* ile 1988 yılında salgın hale geldiği tespit edilmiştir (Roditakis, 1991). 1989 yılında ise Yunanistan'da domates ve biber bitkilerinde ilk enfeksiyonlar tespit edilmiştir (Katis ve Avgelis, 1991). Yunanistan'da 1999 yılında pırasadan elde edilen TSWV izolatını *T. tabaci*'nin % 11.6 oranında *F. occidentalis*'in ise % 38.4 oranında bulaştırdığı tespit edilmiştir (Chatzivasilliou ve ark., 1999).

1992 yılında Çek Cumhuriyeti'nde ilk olarak tespit edilen TSWV, enfekteli bitkilerin yok edilmesine rağmen, vektör *F. occidentalis*'in salgın yaptığı seralarda tekrar ortaya çıkmış ve TSWV olduğundan şüphe edilen bitkilere ELISA uygulaması yapılarak virüsün varlığı test ile saptanmıştır. Virüsün daha çok süs bitkilerini enfekte ettiği, bunun yanı sıra domates ve biberde de çok sık enfeksiyon oluşturduğu tespit edilmiştir (Mertelik ve Mokra, 1998).

2001 yılında Arnavutluk'ta TSWV ilk kez domates, hıyar ve yabancı otlarda tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada domates, hıyar ve yabancı otlarda beslenen TSWV vektörü *F. occidentalis*, sarı ve mavi yapışkan tuzaklar kullanılarak yakalanmış ve vektöre karşı ELISA uygulaması yapılması sonucunda TSWV'yi taşıdığı saptanmıştır (Çota ve Merkuri, 2005).

Samsun ilinde, TSWV'nin domates üretim alanlarında bulaşma ve yayılmasındaki etkenleri belirlemek için yapılmış bir çalışmada bölgede trips türlerinden *Frankliniella*

intonsa Trybom ve *T. tabaci* Lindeman saptanmıştır (Şevik, 2007). Ancak en son olarak, 2009 yılında Samsun ili Çarşamba ilçesinde seradan alınan biber bitkileri üzerinde *F. occidentalis* bireylerine rastlanmıştır (Sözlü görüşme, Akça, 2009).

2.3. TSWV'nin Coğrafi Dağılımı, Kültür Bitkilerinde Oluşturduğu Zararı ve Ekonomik Önemi

Dünya'da bir çok tarım ürününü olumsuz olarak etkileyen TSWV ilk olarak 1915 yılında Avustralya'da Brittlebank tarafından domateste tespit edilmiştir (Adkins, 2000) 1968 yılında ise TSWV'nin farklı ırkları (streynleri) tanımlanmıştır (Stevens ve ark., 1994).

Sıcak bölgeler başta olmak üzere Kuzey ve Güney Amerika, Afrika ve Avrupa kıtalarında bir çok ülkede çok sayıda kültür bitkisi, süs bitkisi ve yabancı otta şiddetli enfeksiyona neden olan TSWV (Avila ve ark., 2006), ekonomik öneminden dolayı Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde A1 karantina listesine dahil edilmiş olup (Griep ve ark., 2000), ülkemizde ise iç ve dış karantina listesindeki virüsler arasında bulunmaktadır. Dünya'daki en zararlı ilk 10 virüs içinde yer alan TSWV'nin yılda 1 milyar ABD dolarından fazla ekonomik kayıp oluşturduğu rapor edilmiştir (Uhrig ve ark., 1999; Griep ve ark., 2000; Prins ve Goldbach, 1998).

İsrail'de 1994-1998 yıllarında yapılan çalışmada seradan ve açık alanlardan TSWV benzeri simptom gösteren domates, biber, marul, lahana, hıyar ve patlıcan bitkilerinden örnekler alınmış ve ELISA ile örneklerin TSWV ile bulaşık olduğu saptanmıştır (Gera ve ark., 2008).

TSWV 1999 yılında Güney Amerika'da *Melampodium divericatum* bitkisinde ortaya çıkmıştır. Enfekteli bitkilerden *M. divericatum* ve *Nicotiana benthamiana* bitkisine mekanik olarak bulaştırılmış ve inokulasyondan 45 gün sonra *Melampodium* bitkisinde mozayik, *N. benthamiana* bitkisinde ise kloroz, mozayik ve solgunluk gözlenmiştir. Bu örneklerin DAS-ELISA ile testlenmesi sonucunda TSWV ile bulaşık olduğu belirlenmiştir (Holcomb ve Valverde, 2000).

İran'da 1999-2000 yılları arasında soya bitkisinde yapılan bir çalışma ile TSWV'ye spesifik "poliklonal antikor" kullanılarak DAS-ELISA yöntemi ile TSWV belirlenmiştir. Ülkenin 5 farklı ilinde yapılan deneme sonucunda soya bitkisinde TSWV'nin ortaya çıkış oranı % 5.4 olarak saptanmıştır (Golnaraghi, 2001).

Güney Afrika'da ilk olarak 2000 yılında *Agapanthus (Agapanthus praecox* subsp. *orientalis*) bitkisinde TSWV'nin konsantrik halkalı lekeler ve düzensiz klorotik leke şeklinde simptomlarını gösteren bitki örneklerine yapılan ELISA ve PCR uygulamaları sonucunda bitkide TSWV enfeksiyonu saptanmıştır (Jain ve ark., 1998).

2001 yılında Arjantin'de domatesi enfekte eden Tospovirüslerin dağılımını belirlemek için yapılan çalışmada ve domates alanından toplanan örnekler ELISA uygulaması yapıldığında örneklerin % 8.8'inin TSWV ile bulaşık olduğu saptanmıştır (Williams ve ark., 2001) .

2001 ve 2002 yıllarında İspanya'da yapılan bir çalışmada marul alanlarında TSWV olduğundan şüphe edilen bitkiler ELISA ile test edildiğinde, TSWV ile bulaşık olduğu belirlenmiştir (Moreno ve ark., 2003).

RT-PCR yöntemi, TSWV'nin teşhis edilmesinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Inoue-Nagata ve ark., 1997; Okuda ve Hanada, 2001). 2005 yılında yapılan bir çalışmada, TSWV simptomlarına benzer simptomlar sergileyen 24 domates örneği ELISA ile test edilmiş ve örnekler TSWV ile enfekteli bulunmuştur. Örnekler aynı zamanda RT-PCR yöntemi uygulanarak izole edilen virüsün nükleik asitleri çoğaltılmış ve 800 bp'lik bantlar elde edilmiştir. Pozitif olan TSWV izolatları mekanik inokulasyon yöntemiyle domates bitkisine aşılandığında, domates yapraklarında klorotik halkalar ve nekrotik lezyonlar elde edilmiştir. Çalışmada diğer bir test bitkisi olarak da *Nicotiana glauca* kullanılmış ve bu bitkide yapraklarda inokulasyon sonucu iç içe geçmiş halkalı lekeler elde edilmiştir. Simptom gösteren bitkilerin tamamı hem ELISA ile hem de RT-PCR ile testlenmiş, simptomlu bitkilerde TSWV saptanırken, simptom göstermeyen bitkilerde TSWV tespit edilmemiştir (Holguin- Pena ve Rueda Puente, 2007).

Tunus'ta yapılan bir çalışmada ülkenin 3 farklı bölgesinde virüs olduğundan şüphe edilen bitki örnekleri, ELISA ile test edilmiş ve test sonucunda TSWV varlığı saptanmıştır. Ayrıca bu virüsün bölgeden bölgeye bireysel olarak taşınmasında tripslerin etkili olduğu saptanmıştır (Ben Moussa ve ark., 2008).

2009 yılında Kore'nin 2 farklı bölgesinden TSWV'nin patates, domates, susam, kırmızı biber ve domates izolatları elde edilmiş ve bu izolatların gen bankasındaki başka izolatlar ile nükleotit ilişkilerini ve biyolojik özelliklerini belirlemek amacıyla izolatlar *Chenopodium quinoa*, *N. glutinosa*, *N. rustica* ve *L. esculentum* bitkilerine inokule edilmiştir. İnokulasyon sonucunda *C. quinoa*'da inokule edilen yapraklarda nekrotik

lekeler, *N. glutinosa*'da inokule edilen yaprakta nekrotik lezyonlar, üst yapraklarda ise şekil bozuklukları, *L. esculentum*'da ise inokule edilen yapraklarda nekrotik lekeler ve üst yapraklarda şekil bozuklukları ve renk açılması tespit edilmiştir. Elde edilen bu izolatlara ait PCR ürünleri (777 bp), gen bankasındaki Japonya AB010997, Amerika AY870391, Almanya D13926, Brezilya DQ915947 ve Hollanda D00645 izolatları ile karşılaştırılmış ve bu izolatın sadece Japonya'daki izolat ile benzer olduğu saptanmıştır (Cho ve ark., 2009).

TSWV, bir çok kültür bitkisi ve süs bitkilerinde epidemik hale geçerek (Goldbach ve Peters, 1994) % 30 ile % 100 arasında değişen verim kayıplarına neden olmuştur (Cho ve ark., 1986; German ve ark., 1992; Rosello ve ark., 1996). TSWV, 1988-1989 yıllarında A.B.D'nin Georgia eyaletinde ilk olarak tütünde rapor edilmiştir (Culbreath ve ark., 1991). 1996 yılında yapılan çalışmada Georgia'da domates, biber, yer fıstığı ve tütün bitkilerinde TSWV'den kaynaklanan yıllık verim kaybının yaklaşık 100 milyon dolar olduğu saptanmıştır (Riley, 2004). Yine 1989 yılında TSWV ABD ve Kanada'da salgın hale geçerek domates ve biberde % 100'e varan verim kayıpları meydana getirmiştir (Gitaitis ve ark., 1998).

Japonya Ibaraki Prefecture'de 1978 ve 1979 yıllarında tatlı biberde nekrotik ve klorotik lekeler gösteren TSWV izolatının % 20 oranında ürün kaybı meydana getirdiği ve zararın ekonomik boyutunun 320 milyon Japon yeni olduğu saptanmıştır (Yoneyama, 1980).

1986-1992 yıllarında ABD'de TSWV yerfıstığında % 95 oranında verim kaybı meydana getiren virüs (Hoffman ve ark., 1998), 1995 yılında ise ABD'de domates, biber tütün ve yer fıstığında % 70 ve % 90 oranında yoğunluk göstermiştir (Todd ve ark., 2002).

İtalya'nın kuzey batısında yer alan Liguria bölgesinde ise TSWV ilk olarak 1989 yılında tespit edilmiş olup, çoğu ürünü şiddetli bir şekilde etkilemiştir (Vaira ve ark., 1993). Yine aynı bölgede 2000 yılında seralardan alınan 1000 adet *Euphorbia eritrea* (Sütleşen) bitkisinde klorotik ve nekrotik lekeler nedeniyle TSWV'nin ürünlerde % 20 kayıp meydana getirdiği tespit edilmiştir (Salomena ve ark., 2003).

1994 yılında Arjantin'de yapılan çalışma ile TSWV'nin etkilediği başlıca ürünlerin domates, biber ve marul olduğu tespit edilmiştir ve bu bölgede bir çok alanda domates ve marul hasatı yapılamamıştır. Bu alandan toplanan örneklerin % 32.7'sinin

bu virüsle bulaşık olduğu ve ciddi kayıpların meydana geldiği saptanmıştır (Gracia ve ark., 1999).

İspanya’da domates alanlarında yapılmış olan bir çalışmada, TSWV’nin domates üretimini önemli derecede sınırlayan bir etmen olduğu saptanmıştır (Lavinia ve ark., 1996).

2000 yılında Kuzey Florida’da Habanera (*Capsicum chinense*) ve Tabasco (*Capsicum frutescens*) biber çeşitlerinde yapılan çalışmada TSWV’ye benzer belirtiler görülmüş ve örnekler DAS-ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Çalışmada Habanero biber türündeki TSWV oranı % 1.57 iken Tabasco biber türünde ise bu oran % 0.97-0.80 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada “Immuno Capture Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction” (IC-RT-PCR) uygulaması yapılması sonucunda 800 bp büyüklüğünde PCR ürünü elde edilmiştir (Momol, 2000).

2000 yılında Kenya’da yapılan bir çalışma ile TSWV’nin domates alanlarında % 80 oranında ürün kaybı meydana getirdiği saptanmıştır. Belirtilen domates örneklerinin DAS- ELISA ve RT-PCR ile test edilmesi sonucunda TSWV’nin varlığı belirlenmiştir (Wangai ve ark., 2001).

Türkiye’de ilk kez TSWV Mersin’de marul bitkisinde (Tekinel ve ark., 1969) saptandıktan sonra Antalya’da domates bitkisinde (Tekinel, 1973), Samsun’da tütünde (Azeri, 1994), Muğla’da domates bitkisinde (Fidan, 1995), 1995 yılında ise Adana-Mersin bölgesinde domates alanlarında yapılan çalışmada belirlenmiştir [Turhan ve Korkmaz, 2006; (Güldür ve ark., (1995)’den]. Ayrıca 1995 yılında Şanlıurfa’da domates bitkisinde TSWV tespit edilmiştir [Şevik, 2007; Yılmaz ve ark., (1995)’den].

Samsun ilinde biber alanlarında 1998 ve 1999 yıllarında yapılan surveylerde alınan örneklerin TSWV ile enfekteli olduğu DAS-ELISA yöntemi ile belirlenirken, virüs ile bulaşıklık oranı 1998 yılında % 2.2, 1999 yılında ise % 9.2 olarak tespit edilmiştir (Arlı-Sökmen ve ark., 2005).

Samsun ilinde yapılan başka bir çalışmada TSWV’nin domates tarımını olumsuz etkileyen bir viral etmen olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada TSWV’nin domateste % 42.1 oranında ürün kaybına ve % 95.5 oranında birinci sınıf pazarlanabilir bir değer kaybına neden olduğu saptanmıştır. Yine bölgede yapılan çalışma ile TSWV bulaşıklık oranının 2002 yılında % 14.6, 2003 yılında ise % 18.11 olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda ilçelere göre bulaşıklık oranı incelendiğinde en fazla bulaşıklık Tekkeköy

ilçesinde (% 22.5), sırasıyla Çarşamba'da (% 21) ve Merkez ilçede (% 21) tespit edilirken, en az bulaşıklık Terme ilçesinde (% 4.28) saptanmıştır (Şevik, 2007).

2003 yılında Çanakkale'de yapılan çalışmada ise domates yetiştiriciliği yapılan açık alanlardan alınan 200 örnek testlenerek 9 tanesi TSWV ile enfekteli bulunmuştur (Turhan ve Korkmaz, 2006).

2006 yılında Adana'da yapılan survey çalışmasında 130 tanesi biber ve 90 tanesi domates olmak üzere toplam 220 bitki toplanmış. Bitkilere ELISA testi uygulandığında % 45.4 oranında TSWV tespit edilmiştir (Küçük, 2006).

Bozdoğan (2009), Antalya ili Merkez, Serik ve Kumluca ilçelerinde yaptığı çalışmada 193 domates, 345 biber ve 58 marul bitkisi olmak üzere toplam 596 bitki örneğini ELISA ile test etmiş ve domates örneklerinin % 80.8'inin, biber örneklerinin % 91.6'sının ve marul örneklerinin ise % 93.1'inin TSWV ile enfekteli olduğu saptanmıştır.

2.4. TSWV'nin Kontrolü

Dünya'da tarım alanlarında bakteri, fungus ve virüs hastalıklarının neden olduğu ürün kayıpları her geçen gün artmaktadır. Bu hastalıklardan özellikle virüslerin tropik ve subtropik bölgeler başta olmak üzere bir çok ülkede ürün kalitesi ve miktarı yönünden yaptıkları zarar önemli boyutlardadır. Virüs enfeksiyonlarına karşı günümüzde değişik metotlarla korunma yollarına gidilmektedir. Bunların başında doku kültürü yöntemi ve termoterapi uygulaması ile virüsten arındırılmış bitki üretimi gelmektedir. Ayrıca bulaşık bitkilerin tarım alanından uzaklaştırılması, böcek ve nematod gibi virüs taşıyıcı vektörlerle mücadele edilerek virüs taşınmasının bitkiden bitkiye geçişi engellenmektedir (Özcan, 2001).

Bitki virüslerine karşı yapılan diğer mücadele yöntemleri yeterince etkili olmadığı için en etkili yol dayanıklı tür ve çeşitlerin kullanılmasıdır. Viral hastalıklarının tarımda oluşturduğu kayıpları kontrol altına almak için 80 yıldır bitki dayanıklılığı kullanılmaktadır (Kang ve ark., 2005).

Bitki virüslerine karşı pratik mücadele olanakları oldukça kısıtlıdır. TSWV, kontrolü en zor olan virüslerden birisidir. Vektöre karşı bitkinin yapraklarına insektisit uygulayarak TSWV'nin kontrol altına alınmasına çalışılmaktadır. Fakat bu yöntem vektörün ve virüsün yoğunluğunu azaltmada çok fazla etkili olmamaktadır. Vektörün nimflerinin bulunduğu alanlarda kullanılan ilaçlar tam olarak nimflere

ulaşamadığı için ilaçların etkisi sınırlı kalmaktadır. Ayrıca toprağın iyi işlenmesi, bitki artıklarının ortadan kaldırılması ve yabancı otlarla mücadele tripslerin populasyon yoğunluklarını düşüren diğer yöntemlerdir (Demirsoy, 1990). Trips türleri içinde TSWV'nin en önemli vektörleri ise *F. occidentalis* ve *T. tabaci*' dir (Krisha-Kumar ve ark., 1993; Mau ve Martin, 2002). TSWV epidemisinde virüsün taşınmasında en önemli rolü ergin tripsler oynamaktadır (Cho ve ark.,1989).

Tripse karşı bazı insektisitler (Disulfoton, fenamiphos, carbofuran, terbufos ve aldicarb gibi sistemik insektisitler) kullanılarak trips ve TSWV'nin yoğunluğu azaltılabilmektedir. Trips ve TSWV'ye karşı kullanılan ilaçlardan birisi de Neonicotinoid insektistlerdir. Tohum veya toprak etrafına uygulanarak bitkinin kökleri tarafından hızla emilerek alınan bu kimyasal, vektörün populasyonunu düşürdüğü için virüsünde yayılmasını engellemektedir. Vektöre karşı İmidacloprid'in uygulanması ile *F. fusca* ve TSWV'nin yoğunluğunun azaldığı tespit edilmiştir (Pappu ve ark., 2000; Csinos ve ark., 2001; Culbreath ve ark., 1999).

ABD-Florida'da 2000-2002 yılları arasında yapılan çalışmalarda TSWV ve tripslere karşı UV ışığını yansıtan malçların kullanılmasıyla trips populasyonunda azalma olduğu belirlenmiştir (Momol ve ark., 2004). Tripslere karşı uygulanan diğer bir kimyasal, ticari ismi Laser ve etkili maddesi Spinosad olan biyolojik bir preparattır. Bu ilaç *Saccharopolyspora spinosa* bakterisinden elde edilen 2 metabolidin karışımını içerir ve bu metabolide Spinosad adı verilmiştir. Tripsin yanı sıra birçok böcekte ve Lepidopterler'de de etkili bir ilaçtır. Domates, biber, patlıcan, kabakgiller, elma, üzüm, armut ve süs bitkilerinde kullanılabilir bir ilaçtır. Kullanım dozu düşük ve çevreye dost bir ilaç olduğu için 1999 yılında Yeşil Kimyasal Atılım ödülünü, 2001 İsviçre'de organik ürünlerde kullanılmış ve 2003'de İtalya'da da ruhsat almış bir ilaçtır (Tescari ve ark., 2004).

2.5. TSWV İle Mücadelede Dayanıklı Bitkilerin Kullanılması

Bitkilerde patojen saldırılarına karşı oluşturulan bir savunma mekanizması mevcuttur. Bu mekanizmaya sahip bitkiler patojen istilası ile karşılaştığında bu istilayı tanıır ve patojene cevap vererek patojenin çoğalmasını engeller (Tör, 1998). Bitkiler patojen istilasını durdurabilmek için uyarılabilir savunma tepkilerini de kullanırlar (Ryals ve ark., 1996).

Bitki patojene karşı savunma mekanizması ile 2 farklı direnç göstermektedir.

1. HR (Hypersensitive reaction; Aşırı hassasiyet reaksiyonu)
2. SAR (Systemic Acquired reaction; Sistemik kazanılmış dayanıklılık)

SAR: Bitkide salisilik asit oluşumuna bağlı olarak ortaya çıkan dayanıklılık mekanizmasıdır (Tör, 1998).

Günümüzde bitki virüsleri ile mücadele amaçlı dayanıklı çeşit geliştirme çalışmaları 2 yönde ilerlemektedir. Bunlardan ilki özellikle moleküler biyoloji ve biyoteknolojideki gelişmeler sonucunda 90'lı yıllardan sonra elde edilen transgenik dayanıklılıktır. Bu tip çalışmalarda viral genlerde manipulasyonlar yapıldıktan sonra bitkilere aktarılmakta ve virüsün bitki hücresinde çoğalması engellenmeye çalışılmaktadır. 1990'lı yılların başında TSWV' ye dayanıklı transgenik domates ve biber bitkileri elde edilmiştir (Moyer, 2006). Dayanıklı çeşit geliştirmede kullanılan diğer yol klasik ıslah yöntemlerini içermektedir. Tospovirüslere karşı dayanıklılığın kaynağı tespit edilmiş ve dayanıklı domates çeşitleri geliştirilmiştir. Ayrıca, TSWV'ye doğal dayanıklı krizantem, marul ve biber bitkileri bulunmaktadır. TSWV'ye karşı 2 dominant gen; domateste *Sw-5*, biberde ise *Tsw* geni mevcutken, şu ana kadar yapılan dayanıklılık çalışmalarında marulda bulunan dayanıklılık, bir gen ile adlandırılmamıştır, tütün bitkisinde ise TSWV'ye dayanıklılık saptanamamıştır (John ve ark., 2000). Domates ve biberde bulunan dayanıklılık genlerinin ikisi de bitkide hipersensitif reaksiyona (aşırı hassasiyet reaksiyonu; HR) neden olmaktadır. HR sırasında bitki virüs ile enfekteli olmuş hücre etrafında ölü alanlar meydana getirerek, patojeni bu alanda hapsedip diğer bölgelere yayılmasını engellemektedir. Bu olay sonucunda bitkide nekrotik lokal lezyonlar oluşmaktadır (Maris, 2004). Bu esnada bitkide PR proteinleri (Pathogenesite related; patojenisite ile ilgili) birikmekte ve bu proteinlerin birikmesi ile bitkide sistemik direnç oluşmaktadır. Konukçu hücre içinde PR proteinleri hem lokal, hem sistemik direnç süresince meydana gelmektedir. PR proteinlerinin ilk kez *Tütün mozayik virüsü* (TMV) ile enfekte edilmiş tütün yapraklarında yapılan çalışmada HR sonucu meydana geldiği tespit edilmiştir (Tör, 1998).

TSWV'nin mücadelesinde önemli bir yere sahip olan dayanıklılık konusunda birçok çalışma yapılmış ve halen bu çalışmalar devam etmektedir. TSWV'ye karşı ilk dayanıklı domates çeşitleri 1988 yılında geliştirilmiş (Thompson ve van Zijl, 1996), ve daha sonra ticari olarak bu çeşitler uygulamada yer almıştır. Bu dayanıklı çeşitler

Amelia (Hmx-0800), EX 1405037, BHN 444, BNN 640'dır. Stevens ve ark., (1992) tarafından yapılan çalışma ile *Lycopersicon pimpinellifolium* (Jusl.) Mill., *L. hirsutum* Humb.& Bonpl., ve *L. esculentum* hatlarının melezlenmesi ile elde edilen domates çeşitlerinden "Rey de los Tempranos" ve "Manzana" çeşitlerinde dayanıklılık tespit edilirken, Stevens ve ark. (1994) tarafından yapılan başka bir dayanıklılık çalışmasında *L. pimpinellifolium*'dan ise Pearl- Harbor, *L. peruvianum* (L.) Mill.'dan ise "Anahu" ve "Stevens" dayanıklı çeşitleri türetilmiştir. Domateste TSWV'ye dayanıklılıkta etkili olan gen bölgesi domatesin 9. kromozomda belirlenmiş ve *Sw-5* olarak kodlanmıştır (Stevens ve ark., 1995). Bu geni bulunduran çeşitler kullanılmadığında zarar oranı önemli düzeyde artış göstermektedir. Domateste *Sw-5* geninin eksikliğinden dolayı aşırı hassas çeşitlerde şiddetli olarak yaprak ve meyvede TSWV enfeksiyonunun neden olduğu belirtiler oluşmaktadır (Garland ve ark., 2005).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla TSWV'nin domateste ve biberde dayanıklılık geninin etkisini yitirmesine sebep olan yeni strainler (ırklar) belirlenmiştir. İspanya'da daha önceki çalışmalarda TSWV'ye dayanıklı olduğu tespit edilmiş olan Bodar, Bond, Lisboa ve Maresme domates çeşitlerine GRAU olarak isimlendirilen TSWV izolatının inokule edilmesi sonucu bu hibrit çeşitlerde hem lokal, hem de sistemik belirtiler saptanmıştır. Lokal belirtiler bitkideki *Sw-5* dayanıklılık geninin etkisiyle HR sonucunda oluşmuştur. Fakat TSWV izolatı Bodar dayanıklı domates çeşidinde bu dayanıklılığı ortadan kaldırarak bitkide sistemik enfeksiyona neden olmuştur (Aramburu ve Marti, 2003).

Amerika'nın güneyinde 3 farklı fıstık çeşidinde [Georgia Green (standart çeşit), C-99R (TSWV'ye azda olsa dayanıklı çeşit) ve Georgia Runner (TSWV'ye hassas çeşit)] mekanik inokulasyon çalışması yapılarak TSWV'nin bu çeşitlerdeki dayanıklılık durumları karşılaştırılmıştır. Çalışma 2 farklı sıcaklık değerinde (25-30°C) ve (30-37°C) yürütülmüştür. Georgia Green çeşidinde Georgia Runner'a göre daha şiddetli gelişme geriliği ve ürün kaybı oluşurken, C-99R çeşidinin TSWV'ye karşı en dayanıklı çeşit olduğu tespit edilmiştir (Mandal ve ark., 2002).

Brezilya'da TSWV'nin patlıcanda önemli derecede ekonomik kayıplara neden olduğu belirlenmiş ve Brezilya'nın değişik bölgelerinden alınan patlıcan genotiplerine TSWV, *Groundnut ring spot virus* (GRSV), *Chrysanthemum stem necrotic virus* (CSNV) izolatları inokule edilerek inokulasyon sonrasında yapraklarda nekrotik lekeler, klorotik lekeler, mozayik, yaprak bozukluğu, gövde ve yaprak sapında nekrozlar tespit

edilmiştir. Bu çalışma ile bazı patlıcan türlerinin Tospovirüs cinsindeki virüslere oldukça hassas, bazılarının ise daha toleranslı olduğu belirlenmiştir (Lima ve ark., 2002).

TSWV'ye karşı dayanıklı veya hassas domates türlerinin belirlenmesine yönelik bir çalışmada *L. cheesmanii*, *L. chilense*, *L. chmielewski*, *L. hirsutum*, *L. parviflorum*, *L. penelli* ve *L. peruvianum* domates hatlarından 1088 tane bitki TSWV'nin 85-9, Glox ve T-2 izolatlarına dayanıklılık durumları için taranmış ve bitkilere TSWV izolatları inokule edildikten sonra ELISA ile bitkiler test edildiğinde, *L. penelli*, *L. parviflorum*, *L. hirsutum*, *L. cheesmanii*, *L. chmielewski* türlerine ait hatların TSWV izolatlarına hassas olduğu, *L. chilense*, *L. peruvianum* hatlarında ise dayanıklılığın kırılmadığı saptanmıştır (Stevens ve ark., 1994).

İspanya'da 1999 yılında TSWV'ye karşı dayanıklılık için yeni kaynakların tespiti amacıyla virülensi yüksek TSWV izolatları (HA-931100, T-941117) *Sw-5* dayanıklılık geni aktarılmış olan *L. peruvianum*'un PI-126935, PI-126944, CIAPAN-16, PE-18 ve CIAPAN-17 hatlarına hem mekanik olarak, hem virüs vektörü trips tarafından bulaştırılmıştır. Çalışmada hassas kontrol olarak *L. esculentumun* Ne-1 hattı kullanılmıştır. İzolatlar domates hatlarına verildikten sonra simptom oluşumu için gözlenmiştir. PE-18 hattına ait bazı bitkilerin yetiştirme koşullarına iyi adapte olamadığı için hemen simptom göstererek öldüğü tespit edilirken, en yüksek dayanıklılık PI-126935 ve PI-126944 hatlarında saptanmıştır. CIAPAN-16 ve CIAPAN-17 hatlarında ise trips tarafından TSWV bulaştırılması ile % 6.25 oranında dayanıklılığın kırıldığı saptanmıştır. Yine aynı araştırmacı tarafından yapılan başka bir çalışmada *L. esculentumun* un 3 hattının (RDD, UPV1, UPV2) TSWV'ye dayanıklılığı araştırılmıştır. Bu hatlardan RDD hattına *Sw-5* dayanıklılık geni aktarılmış, diğer 2 hat ise normal şartlarda geliştirilerek bu hatlara, *F. occidentalis* tarafından TSWV'nin yüksek virülensliğe sahip İspanya izolatu mekanik inokulasyon yöntemi ile ayrı ayrı bulaştırılmıştır. Çalışmada *F. occidentalis*'in mekanik inokulasyon yöntemine göre, daha yüksek oranda bulaşma sağladığı belirlenmiş ve RDD ile UPV 1 hatlarında dayanıklılık seviyesinin yüksek oranda olduğu tespit edilirken, UPV2 hattında yüksek dayanıklılık belirlenememiştir (Rosello ve ark., 1999).

Biberde *Tsw* olarak adlandırılan dayanıklılık geni *Capsicum chinense*'de 10. kromozomda tespit edilmiştir (Boiteux ve de Avila, 1994 ; Boiteux, 1995; John ve ark., 2000). TSWV'ye karşı yapılan mücadeleye yönelik çalışmalarda dayanıklılık geni ıslah

pogramlarında geniş ölçüde kullanılmaktadır. Yapılan bu dayanıklılık çalışmalarında biberde bulunan *Tsw* dayanıklılık geninin de izolatlara ve inokulasyon koşullarına bağlı olarak kırılabilirdiği önceden saptanmıştır. Rosello ve ark. (1997), dayanıklılıkları saptanmış olan *C. chinense*'nin PI-152225 ve PI-159236 biber hatlarında dayanıklılığın kırılıp kırılmadığını araştırmışlardır. Buna göre iki farklı sıcaklık değeri seçilerek (gündüz/gece; 25°C-18°C, 28°C-18°C) TSWV'nin virülensi yüksek T-941117 izolatu, dayanıklı bitkilere 4-6 yapraklı dönemde iken mekanik inokulasyon yöntemi ile bulaştırılmıştır. Bir ay boyunca yapılan gözlemler ile bitkilerde TSWV'nin tipik belirtileri tespit edilmiş ve bitkilere serolojik yöntem olarak ELISA testi uygulanmış ve belirsiz olan bitkilerde de TSWV saptanmıştır. Kontrol olarak kullanılan Negral çeşidinde TSWV izolatu sarı halkalar, yaprak kıvrıcılığı, inokule edilen yapraklar üzerinde nekrotik lekeler ve uç yapraklarda da nekroz oluşturmuştur. Diğer taraftan PI-152225 ve PI-159236 biber hatlarında 25°C'de inokule edilen yapraklarda lokal lezyon, 28°C'de ise hem lokal lezyon hem de sistemik nekroz oluşmuştur. İspanya'da biber bitkilerinde TSWV ile yapılan bir çalışmada tek etkili yöntem olarak biberdeki dayanıklılık geni *Tsw* kullanılmıştır. Bir başka çalışmada, TSWV'ye karşı dayanıklı olan *C. chinense* bitkisinin PI 152225 dayanıklı hattına mekanik inokulasyon yöntemi ile TSWV'nin BR 01 ve P105 izolatları verilmiş ve inokule edilen yapraklar üzerinde nekrotik lekeler oluşurken, inokule yapılmayan yapraklarda ise sistemik belirtiler ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Bu bitkiden alınan yaprakların ELISA ile testlenmesi sonucunda TSWV saptanmıştır. Bitkinin inokule yapılmayan üst yapraklarından alınan yaprak örnekleri ile TSWV'yi tespit etmek için nükleokapsid genine özel primerler kullanılarak RT-PCR uygulaması yapılmış ve 800 bp'lik bir ürün elde edilmiştir. Daha sonra bu ürün klonlanıp sekans analizi yapılarak gen bankasındaki dayanıklılık kıran TSWV izolatları ile karşılaştırılmış ve bu izolatların diğer dayanıklılık kıran izolatlar ile % 99 oranında benzer olduğu tespit edilmiştir (Margaria ve ark., 2004).

2002 yılında Avustralya'da yapılan bir dayanıklılık çalışmasında Avustralya'nın 4 farklı bölgesinden toplanmış 17 farklı TSWV izolatına karşı, domates, biber ve marul çeşitlerinin dayanıklılık düzeyleri incelenmiştir. Çalışmada biber çeşidi olarak Rialto (Hassas), Yatasto (Dayanıklı), *C. chinense*'nin dayanıklı olan 3 hattı, (C00943, PI152225, PI159236), domates çeşidi olarak Grosse Lise (Dayanıksız), Cougar, Stevens x Rodade, Tsw-10, Zodiac, Tex-019 (Dayanıklı) ve *L. chilense*'den üretilmiş SA 98 -1 ve SA 98-7 dayanıklı hatları ve marul olarak da *Lactuca virosa*'nın ACC 89 ve ACC

3350 doğal dayanıklı çeşitleri kullanılmıştır. 17 izolattan To_{TAS}-1 dc izolatu hariç diğer izolatlar Grosse Lisse domates çeşidinde ve Rialto biber çeşidinde sistemik simptom meydana getirirken, *C. chinense*'nin dayanıklı 3 hattında inokulasyon yapılan yapraklarda nekrotik lezyonlar saptanmıştır. Sekiz izolatu (An_{WA}-1, Ca_{wa}-1, Da_{WA}-1, Le_{QLD}- 1, Li_{WA}-1, PO_{WA}-1, TO_{WA}-3 ve To_{TAS}-1d) ise bu bitkilerin tamamında sistemik nekroza neden olduğu tespit edilmiştir. *C. chinense*'nin PI 159236 dayanıklı hattında nekrotik lekeli lezyonlarla birlikte, sistemik nekrotik lekeler ve tepe sürgünlerde beneklenmeler görülürken, C00943 dayanıklı hattında ise sürgünlerde nekrotik lekeli lezyonlar belirlenmiştir. Yatasto biber çeşidinde ise sistemik enfeksiyon oluşmadan sadece inokulasyon yapılan yapraklarda nekrotik lekeli lezyonlar meydana gelmiştir. Bu izolatlardan An_{WA}-1 di, An_{WA}-1eii ve Le_{QLD}- 1d izolatu dayanıklı olan 6 domates çeşidinde de inokule edilen yapraklarda nekrotik lokal lezyonlar oluşturmuş fakat sistemik enfeksiyon oluşturmamıştır. *L. virosa*'nın ACC 3350 ve ACC 89 doğal dayanıklı çeşitlerinde izolatların inokulasyonu sonucu TSWV'nin dayanıklılığı kıramadığı saptanmıştır (Thomas-Carroll ve Jones, 2002).

Cebolla-Cornejo ve ark., (2003) yaptıkları çalışmada; TSWV'ye dayanıklılık için *Capsicum* germplazmalarını taramışlardır. TSWV'nin 3 farklı izolatu (L-3565, HA-931100, T-941117), *Capsicum spp.*'nin 5 farklı çeşidine (*C. annuum*, *C. pubescens*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum*) mekanik olarak inokule edildikten sonra TSWV'ye karşı dayanıklılığı incelenmiştir. Çalışmada hassas çeşit olarak "Negral" biber çeşidi kullanılmıştır. Bu çeşitte TSWV izolatları sistemik enfeksiyon oluşturmuş ve simptomlar zamanla şiddetlenerek gövde nekrozu ile birlikte bitkinin daha çok hastalanmasına neden olmuş, denemenin sonucunda ise bitkilerin % 93.3' ü ölmüştür. *C. chinense*'nin PI-152225 dayanıklı biber hattına TSWV izolatları inokule edildikten sonra inokule edilen yapraklarda hipersensitif (aşırı hassasiyet) reaksiyon belirtisi olarak lokal lezyonlar gözlenmiş, fakat sistemik enfeksiyon oluşmamıştır. *C. annum*'un 5 ve *C. baccatumun* 3 hattında ise TSWV inokulasyon sonrası "Negral" hassas kontrol çeşidi ile aynı sonuçlar oluşurken, *C. baccatum*'un "ECU-507" ve "ECU-957" hatlarında inokulasyondan 60 gün sonra % 44.4 ve % 68.8 oranında şiddetli simptomlar ortaya çıkmıştır. *C. frutescens* hatlarında ise % 50-100 sistemik enfeksiyon meydana gelmiş ve inokule edilen yapraklarda lokal lezyonlar gözlenmiştir. *C. pubescens* türünün "ECU-365" hattı hariç, diğer 4 hattında % 60-87.5 oranında sistemik enfeksiyon gözlenmiştir. "ECU-365" hattında ise % 28.6 oranında inokule edilen yapraklarda lokal

lezyonlar tespit edilmiştir. *C. chinense*'nin "ECU-715" ve "ECU-469" hatlarında inokulasyondan 15 gün sonra % 100 sistemik enfeksiyon oluşmuştur. İnokulasyon yapılmayan yapraklarda ise şekil bozukluğu, şişkinlik ve kloroz oluşurken inokule edilen yapraklarda ise lokal lezyon oluşmuş, inokulasyondan 60 gün sonra ise bitkiler tamamen ölmüştür. Çalışma sonucunda ise TSWV'ye dayanıklılıkta en iyi sonucu *C. chinense*'nin "ECU-973" hattı göstermiş ve denemenin sonuna kadar sistemik enfeksiyon oluşmamıştır.

Biberde yapılan dayanıklılık çalışmalarında *Capsicum* spp.'nin *Tsw* dayanıklılık geni bulunduran "PI-159236", "CNPH-275" (Boiteux ve ark., 1993), "PI-15", "C00943" (Hobbs ve ark.,1994) ve "7204" (Nuez ve ark., 1994) biber hatlarında TSWV izolatlarının mekanik inokulasyonu sonucu bu hatlarda dayanıklılık geninin etkisinden dolayı hipersensitif bir reaksiyon oluştuğu ve virüsün bitkide dayanıklılığı kıramadığı saptanmıştır (Cebolla-Cornejo ve ark., 2003).

Florida Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada Florida'da *Tomato mottle virüsü*'ne karşı dayanıklılığı önceden saptanmış olan *L. chilense* (LA 1938) ve *L. esculentum*'un melezlenmesi ile üretilmiş F1BC1S6 ve Y118 (Fla 925-2) domates hatlarında TSWV dayanıklılığı araştırılmış, bu domateslere HR-1 TSWV izolatı mekanik inokulasyon yöntemi ile aşılacaktır. İnokulasyondan sonra F1BC1S6 hattının dayanıklılığı kırılırken, Y118 hattının dayanıklılığının kırılmadığı tespit edilmiştir (Canady ve ark., 2001).

2000 yılında yapılan bir çalışmada, *Sw-5* genini taşıyan dayanıklı domates bitkilerinin meyveleri üzerinde TSWV enfeksiyonunun etkileri araştırılmış, virüsü taşıyan vektör tripsin 380 adet larvası TSWV'nin TM-1 ve GB-1 izolatları ile enfekteli *D. stramonium* ve *L. esculentum* (c.v. Marmande) bitkilerinin yapraklarında 48-72 saat beslenerek virüs kazanılması sağlanmıştır. Beslenmenin ardından trips bireyleri virüsü bulaştırmaları için *Sw-5* dayanıklılık genini içeren domateslere verilmiştir. Beslenmeden 4 gün sonra meyve üzerinde halkalı lekeler geliştiği ve 8 gün sonunda simptomların daha şiddetli hale geldiği saptanmıştır. Bitkide halkalı lekelerin yanısıra yapraklarda nekrotik lezyonlar, şiddetli damar nekrozu oluşmuş ve daha sonra bu nekrozlar bitkinin uç sürgünlerinde ölümlere neden olmuştur. Bu enfeksiyonlu kısımlardan alınan dokuların ELISA ile testlenmesi sonucunda TSWV saptanırken enfeksiyonlu kısımların kenarlarından alınan dokular ise negatif sonuç vermiştir. Çalışmada kullanılan dayanıklı

bitkilerdeki TSWV oranı % 4 iken dayanıksız olan bitkilerde ise % 14 olarak tespit edilmiştir (Aramburu ve ark., 2000).

Kuzey Karolina Üniversitesi'nde yapılan bir dayanıklılık çalışmasında TSWV'nin 5 farklı izolatu *L. esculentum*, *N. glutinosa* ve *N. tabacum* bitkilerine inokule edilmiş ve simptom oluşumları gözlenmiştir. Çalışma sonucunda *L. esculentum* bitkisinde A, B ve C izolatları, *N. glutinosa* bitkisinde C ve D izolatları, *N. tabacum* bitkisinde ise B, C, ve D izolatlarının sistemik nekroza neden olduğu saptanmıştır. Yine yapılan bu çalışma ile bu izolatlardan en güçlü olan 2 izolat (A ve D) kombine edilerek dayanıklı olan *L. esculentum*, *C. annuum* ve transgenik olan *N. tabacum* bitkisine inokule edilerek dayanıklılığın kırılıp kırılmadığı araştırılmıştır. Çalışma sonucunda domates bitkisinde dayanıklılığın kırılmasında A izolatının MRNA (medium RNA)'sının, biber bitkisinde D izolatının MRNA'sının ve tütün bitkisinde de yine A izolatının MRNA'sının dayanıklılığı kırmada etkili olduğu saptanmıştır (Moyer, 2006).

Avustralya'da yapılan dayanıklılık çalışmasında domates, biber, süs bitkisi ve yabancı otlardan temin edilen 15 farklı TSWV izolatu, *Sw-5* dayanıklılık genini taşıyan *L. peruvianum*'un PI 128660R ve PI 128660S hatları ile birlikte *Tsw* dayanıklılık genini taşıyan *C. chinense*'nin PI 152225, PI 159236 ve AVRDC C00943 dayanıklı hatlarına mekanik inokulasyon yöntemi ile verildiğinde 13 izolatın sistemik enfeksiyona sebep olmayıp, sadece nekrotik lokal lezyon oluşturduğu ve dayanıklılığı kıramadığı saptanırken, iki izolatın ise 752 bitkinin 22 tanesinde sistemik reaksiyon oluşturarak dayanıklılığı kırdığı saptanmıştır. Bu bitkilerde simptomlu yapraklardan alınan örnekler ELISA ile testlendiğinde de TSWV enfeksiyonu teyid edilmiştir (Latham ve Jones, 1998).

2002 yılında Güney Avustralya-Virginia'da TSWV'nin biberdeki dayanıklılığının kırılıp kırılmadığını belirlemek için TSWV izolatları, *C. annuum*'un *Tsw* dayanıklılık genini içeren PI 152225 ve PI 159236 biber hatları ile birlikte hassas biber çeşitlerine ve *L. esculentum*'un, DRW6189, Gaudi ve Stevens olarak adlandırılan dayanıklı çeşitlerine mekanik olarak inokule edilmiştir. Bu çalışmada TSWV izolatlarının *C. annuum* hatlarında klorotik beneklenme ile birlikte sistemik reaksiyon oluşturduğu gözlenirken, hassas biber çeşitlerinde yine klorotik beneklenme ve sistemik reaksiyon tespit edilmiştir. Dayanıklı domates çeşitlerinde ise izolatların inokulasyonu ile sistemik reaksiyon oluşmadığı, hatların TSWV'ye karşı yüksek derecede dayanıklı olduğu belirlenmiştir (Sharman ve Persley, 2006).

2004 yılında İtalya'nın iki farklı bölgesinden toplanan TSWV izolatları, Sw-5 dayanıklılık genini içeren domates çeşitlerine inokule edilerek dayanıklılığın kırılıp kırılmadığı araştırılmıştır. İnokulasyon sonucunda iki izolattan birisinin dayanıklı domateslerde sistemik simptom oluşturduğu tespit edilmiş ve bu bitkilerden alınan yaprak örnekleri ELISA ile test edildiğinde TSWV saptanmıştır. Çalışmada ayrıca dayanıklılık kıran izolatın N protein geninin baz dizisinin % 99.6 oranında Bulgaristan izolatı ile benzer olduğu tespit edilmiştir. Dayanıklılık kıran bu izolat İtalya'da dayanıklılık kıran ilk TSWV izolatı olarak kayda geçmiştir (Ciuffo ve ark., 2005).

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Test Bitkileri

TSWV simptomundan şüphelenerek araziden alınan hastalıklı bitkilerin yaprak ve meyve örneklerinin, serolojik olarak DAS-ELISA yöntemi ile testlenmesinin ardından, TSWV izolatlarının konukçu reaksiyonlarının belirlenebilmesi için yapılan mekanik inokulasyon çalışmalarında, farklı familyalara ait çeşitli test bitkileri kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Bu bitkilerden *C. album* ve *Lactuca sativa* “Batavia” tohum örnekleri yurt dışından (USDA/ARS Plant Germplasm Inspection Station Building 580 BARC-East, Beltsville, MD 20705-2350, USA), *Nicotiana* spp. *C. annuum.*, *D. stramonium* ve *L. esculentum* Mill., tohum örnekleri Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji laboratuvarı tohum stoğundan, *Cucumis sativus* “Dzhezelo” (Ukrayna), *Petunia hybrida pendula* Vilm. İstanbul Tohumculuk ve *Phaseolus vulgaris* “Balkız” ise Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü’nden temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. TSWV’nin Simptomatolojik Olarak Teşhisinde Kullanılan Test Bitkileri

Botanik Adı	Türkçe Adı
<i>Petunia hybrida pendula</i> Vilm.	Petunya
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	Domates
<i>Phaseolus vulgaris</i> “Balkız”	Fasulye
<i>Capsicum annum</i>	Biber
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	Tütün
<i>N. clevelandii</i> L.	Tütün
<i>N. tabacum</i> L. “Xanthi-nc”	Tütün
<i>N.rustica</i> L.	Tütün
<i>N. benthamiana</i>	Tütün
<i>Cucumis sativus</i> “Dzhezelo”	Hıyar
<i>Chenopodium album</i> L.	Kazayağı
<i>Lactuca sativa</i> “Batavia”	Marul
<i>Datura stramonium</i>	Şeytan elması

3.1.2. Enfekteli Bitki Örnekleri

Araştırma materyalini oluşturan domates ve biber bitkilerinin meyve ve yaprak örnekleri ile tütün bitkilerinin yaprak örnekleri, Samsun ilinin Bafra, Çarşamba, Alaçam Vezirköprü ve Tekkeköy ilçelerinde yapılan survey çalışmaları sonucunda 25 köyde 42 tarladan elde edilmiştir.

3.1.3. Antiserum

Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV)'nün antiserumu yurt dışından Bioreba firmasından (BIOREBA AG Chr. Merian-Ring 7 CH-4153 Reinach BL 1 Switzerland) temin edilmiştir.

3.1.4. ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler (gr/l)

I. Fosfat Tamponu Salin (PBS) (pH=7,4)

0.13 M NaCl (8 gr), 0.014 M KH₂PO₄ (0.2 gr), 0.002 M KCl (0.2 gr), 0.08 M Na₂HPO₄.12 H₂O (2.9 gr).

Yukarıdaki kimyasallar 1 litre saf suda eritilmiş, pH'sı 0.1 M HCl ile ayarlanarak +4°C'de saklanmıştır.

II. Kaplama Tampon Çözeltisi (pH=9,6)

0.015 M Na₂CO₃ (1.59 gr), 0.035 M NaHCO₃ (2.93 gr)

Yukarıdaki kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH'sı ayarlanarak +4°C'de saklanmıştır. Ancak her kullanımda pH'sı tekrar kontrol edilmiştir.

III. Yıkama Tampon Çözeltisi (pH= 7.4)

1 litre PBS içerisine 0.5 ml Tween-20 ilave edilerek hazırlanmıştır.

IV. Ekstraksiyon Tampon Çözeltisi (pH=7.4)

1 litre yıkama tampon çözeltisi + 20 gr. (%2) Polyvinylpyrolidone 40.000 (PVP-40) + 1 gr yağsız süt tozu ilave edilerek hazırlanmıştır.

V. Konjugat Tampon Çözeltisi (pH= 7.4)

Ekstraksiyon tampon çözeltisi aynı zamanda konjugat tampon çözeltisi olarak da kullanılmıştır.

VI. Substrat Tampon Çözeltisi (pH= 9.8)

9.7 ml Diethanolamin, 80 ml saf su içerisine ilave edildikten sonra konsantre HCl ile pH 9.8'e ayarlanarak 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.5. Mekanik İnokulasyon Sırasında Kullanılan Tampon Çözeltiler

TSWV ile enfekteli yaprakların test bitkilerine inokulasyonu sırasında kullanılmak üzere % 0.1 oranında Na₂SO₃ (Sodyum sülfid) içeren 0.01 M Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) (pH= 7.0); Na₂HPO₄.12H₂O (0.358 gr/100 ml) ve NaH₂PO₄.2H₂O (0.156 gr/100 ml) kullanılarak hazırlanmıştır (Krisha-Kumar, 1993; Gracia, 1999).

3.1.6. Mikropleytlar

Çalışmada 96 çukurlu polystrene maddeden yapılmış olan ve düz tabanlı NUNC marka (Danimarka) ELISA mikropleyti kullanılmıştır.

3.1.7. PCR Çalışmalarında Kullanılan Primerler

Çalışmanın moleküler aşamasında TSWV'ye karşı dayanıklılık sağlayan Sw-5 genine spesifik primerler ile CT220 fragmentine spesifik primerler kullanılmıştır. Ayrıca RT-PCR uygulamasında TSWV'nin SRNA'sında bulunan N (kılıf protein) genine spesifik primerler kullanılmıştır. Primerler İontek (İstanbul) firması tarafından sentezlenmiştir.

Çizelge 3.2. Sw-5 geninin Tespitinde Kullanılan Primerler ve Baz Dizileri

Primerler	Baz Dizini
Sw-5b-LRR: (Forward Primer)	TCTTATATTGTGGAGTTTTTGTCG
Sw-5b-LRR-R (ReversePrimer)	TCACCCTATCAAATCCAAC
ZUP641A:	AAGCCGAATTATCTGTCAAC,
ZUP642A:	G TTCCTGACCATTACAAAAGTAC

Çizelge 3.3. TSWV'nin Nükleokapsid Protein Genini Tespitinde Kullanılan Primerler

Primerler	Baz Dizini
TSWV (Forward primer)	CTCTTGATGCAAAGTCTGTGA;
TSWV (Reverse primer)	TCTCAAAGCTATCAACTGAAGCAATAA

3.2. Yöntemler

3.2.1. Survey Çalışmaları

Survey çalışmaları, Samsun İl Tarım Müdürlüğü 2007 yılı verilerine göre Samsun ilinde toplam domates, biber ve tütün yetiştiriciliğinin % 95'inin yer aldığı Bafra, Çarşamba, Tekkeköy, Vezirköprü ve Alaçam ilçelerinde gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.4, 3.5 ve 3.6). İlçe Tarım Müdürlüğü verilerinden faydalanarak bu ilçelere bağlı 25 köyden (Şekil 3.1) 414 örnek toplanmıştır. Örnekleme, arazide çaprazlama (X) gidilerek ve TSWV simptom belirtisi olan bitkilerin sürgün uçlarından 4-5 yaprak kopararak yapılmıştır. Örneklemede alan büyüklüğüne bağlı olarak farklı sayıda örnekler alınmıştır (Sikora ve ark., 1998) (Çizelge 3.7).

3.2.2. Bitki Örneklerinin ELISA Yöntemi ile Test Edilmesi

Domates, biber ve tütün örnekleri virüsün varlığını tespit etmek için serolojik bir test olan DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-ELISA) yöntemi ile Clark ve Adams (1977)'a göre testlenmiştir. Antiserumun temin edildiği firmanın kullanım önerisine göre 1:1000 oranında sulandırılan antiserum, pleytin her kuyucuğuna 100 µl olacak şekilde koyulup, 30°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra yıkama tampon çözeltisi ile pleyt 3'er dakika ara ile 3 kez yıkanmıştır. Enfekteli bitkilerin yaprakları ekstraksiyon tampon çözeltisinde 1:10 oranında sulandırılarak homojenize edilmiş ve ELISA mikroyaletinin her kuyucuğuna 100 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Pleytler 1 gece (16 saat) +4°C'de bekletildikten sonra yıkama tampon çözeltisi ile 4 defa yıkanmıştır. Alkalın fosfotaz enzimi ile işaretli TSWV spesifik IgG (Konjugat), konjugat tampon çözeltisi ile 1/1000 oranına göre sulandırıldıktan sonra mikroyalet çukurlarına 100 µl ilave edilmiştir. Konjugat inkubasyonu 30°C 'de 5 saat yapılmıştır. Bu işlemin ardından mikroyalet tekrar yıkama tampon çözeltisi ile 3'er dakika arayla 4 kez yıkanmıştır. Daha sonra p-nitrofenil fosfat (Sigma), substrat tampon çözeltisinde 1 mg/ml konsantrasyonda sulandırıldıktan sonra pleyt çukuruna ilave edilmiştir. Mikroyaletler oda sıcaklığında 30-120 dk karanlık ortamda substrat inkubasyonuna bırakılmıştır. Ayrıca yapılan testlemelerin her birinde biri sağlıklı diğeri TSWV ile enfekteli 2 bitki, 1:10 oranında örnek tampon çözeltisi ile ekstrakte edildikten sonra negatif ve pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar, ELISA mikroyalet

okuyucusunda (Tecan Spectra II) 405 nm dalga boyunda absorbanans değerlerinin alınmasıyla elde edilmiştir. Sağlıklı örneklerin 2 katı ve üzerinde değer veren örnekler pozitif kabul edilmiştir (Clark ve Adams, 1977; Cebolla-Cornejo ve ark., 2003).

Çizelge 3.4 Samsun İli Domates Ekim, Üretim ve Verim Miktarları (2007)

İLÇELER	EKİLEN ALAN (da)	ÜRETİM (ton)	VERİM (kg/da)
BAFRA	15000	75000	10000
ÇARŞAMBA	20500	123000	6000
ALAÇAM	1200	3600	6000
MERKEZ	1000	2000	2000
ASARCIK	21	31	1500
HAVZA	300	540	1800
VEZİRKÖPRÜ	2050	4100	4000
ONDOKUZ MAYIS	210	1050	5000
TERME	4000	20000	5000
TEKKEKÖY	3000	9000	3000
KAVAK	500	450	900
LADİK	210	420	2000
SALIPAZARI	50	100	2000
TOPLAM	48041	239291	49200

Çizelge 3.5. Samsun İli Tütün Ekim, Üretim ve Verim Miktarları (2007)

İLÇELER	EKİLEN ALAN (da)	ÜRETİM (ton)	VERİM (kg/da)
BAFRA	50000	5000	100
ALAÇAM	9000	900	100
MERKEZ	5000	350	70
TEKKEKÖY	2500	250	100
VEZİRKÖPRÜ	2000	200	100
ONDOKUZ MAYIS	3500	350	100
TOPLAM	72000	7050	570

Çizelge 3.6. Samsun İli Biber Ekim, Üretim ve Verim Miktarları (2007)

İLÇELER	EKİLEN ALAN (da)	ÜRETİM (ton)	VERİM (kg/da)
BAFRA	24500	72250	8000
ÇARŞAMBA	36500	106900	5800
ALAÇAM	520	1090	6000
TEKKEKÖY	1800	2460	2700
VEZİRKÖPRÜ	450	540	2400
ASARCIK	20	16	1600
MERKEZ	300	300	2000
TERME	5000	11250	4500
ONDOKUZMAYIS	190	390	6000
KAVAK	200	200	1000
LADİK	100	100	2000
SALIPAZARI	80	80	2000
HAVZA	75	73	1900
TOPLAM	69735	195649	45900

Çizelge 3.7. Örneklerin Alındığı İlçe, Köyler, Alındığı Alanların Büyüklükleri ve Örnek Sayıları

İlçe	Köy Adı	Alan Sayısı	Alan Büyüklüğü	Tütün	Domates	Biber
ÇARŞAMBA	Güzpınar	2	1da	-	4	10
	Sarıcalı	2	4da	-	2	4
	Saraçlı	2	3da	-	4	12
	Çelikli	2	1da	-	1	3
Toplam						40
BAFRA	Çetinkaya	2	8da	9	10	-
	Gümüşyaprak	2	8da	13	8	2
	Ortadurak	2	6da	16	-	-
	Kuşçular	3	6da	-	8	21
	Karpuzlu	2	10da	-	-	16
	Ağıllar	2	5da	-	-	21
	Karıncaç	2	8da	-	-	16
	Karaburç	1	6da	-	-	14
	Gökçesu	2	15da	18	4	-
	Örencik	2	11da	22	4	2
	Dedeli	2	6da	13	4	-
Türbe	2	4da	-	-	18	
Toplam						239
VEZİRKÖPRÜ	Aydoğdu	2	5da	12	-	-
	Tekkekıran	2	4da	5	-	-
	Çekalan	2	10da	14	-	-
Toplam						31
TEKKEKÖY	Aşağıçinik	3	31da	24	6	10
	Büyükü	2	21da	22	6	3
Toplam						71
ALAÇAM	Yukarıelma	1	5da	7	-	-
	Etyemez	2	6da	7	4	1
	Bedeş	1	4da	10	-	-
	Karlı	1	4da	4	-	-
Toplam						33
Genel Toplam						414

3.2.3. Test Bitkilerinin Yetiştirilmesi

Virüslerin mekanik olarak taşınmalarında kullanılan test bitkilerinin tohumları, içerisinde torf ve kum karışımı bulunan plastik kaplara ekilmiştir. Bu çalışmanın bir bölümü Bitki Koruma Bölümü'ne ait serada, bir bölümü ise iklim odasında yürütülmüştür. Fideler 4-5 yapraklı döneme geldiğinde (Şekil 3.2 ve 3.3) şaşırtılarak, 20-25°C sıcaklık ve % 70 neme ayarlı iklim odasında muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2. Mekanik inokulasyon için yetiştirilen test bitkilerine ait fideler



Şekil 3.3. Mekanik inokulasyon döneminde domates (sol) ve hıyar (sağ) bitkileri

3.2.4. TSWV'nin Test Bitkilerine Mekanik Olarak Taşınması

Survey çalışmaları sırasında TSWV ile bulaşık olduğu şüpheli olan örnekler, simptom tipi, alındığı yer ve örnek numarası yazıldıktan sonra polyetilen torbalara konulup, uygun şartlarda laboratuvara getirilmiş ve fotoğrafları çekildikten sonra -18°C 'deki derin dondurucuda saklanmıştır. Bu örnekler, TSWV enfeksiyonu bakımından ELISA yöntemi kullanılarak test edilmiş ve pozitif sonuç verenler iklim odasında yetiştirilen test bitkilerine mekanik olarak inokule edilmiştir. Bu işlem için enfekteli bitki örnekleri 121°C 'de 20 dk steril edilmiş havan ve havan eli kullanılarak % 0.1 oranında Na_2SO_3 (Sodyum Sülfite) içeren 0.01 M Sodyum Fosfat Tampon Çözeltisi (pH= 7.0) (Cho ve ark., 1987; Krishna-Kumar ve ark., 1993; Gracia ve ark., 1999) yardımıyla (1 gr yaprak/2 ml tampon çözelti) buz kutusu üzerinde homojenize edilmiştir (Cho ve ark., 2006). Elde edilen bitki özsuğu, dokuda yara açmak için üzerlerine 500 meşlik alimünyum oksit (AlO_3) (karborandum tozu) serpilen test bitkilerinin yapraklarına sürülerek inokule edilmiştir (Şekil 3.4). İnokule edilen bitkiler musluk suyu altında yıkandıktan sonra 25°C sıcaklıkta % 70 nem ve 16/8 saat (ışık/karanlık) aydınlatma koşullarına sahip kontrollü iklim odasında muhafaza edilmiştir (Şekil 3.5). Test bitkilerinin reaksiyonları günlük olarak 3-4 hafta süreyle gözlenmiş ve oluşan simptomlar kaydedilerek fotoğrafları çekilmiştir.



Şekil 3.4. TSWV'nin *N. rustica* bitkisine mekanik inokulasyonu



Şekil 3.5. TSWV ile inokule edilmiş tütün bitkilerinin görünümü

3. 2. 5. TSWV İzolatlarının Elde Edilmesi ve Çoğaltımı

2008 yılında araziden alınan domates, biber ve tütün örnekleri, Yöntem 3.2.2'deki gibi DAS-ELISA yöntemi ile test edildikten sonra TSWV ile enfekteli örnekler belirlenmiştir. Bu örneklerin diğer virüsler ile karışık olarak enfekteli olma ihtimaline karşı TSWV izolatlarının biyolojik ayırımına çalışılmıştır. Bu amaçla *N.rustica*, *N. glutinosa*, ve *P. hybridae* test bitkileri kullanılmıştır. İki tekerrürlü olarak gerçekleştirilen ilk inokulasyondan sonra oluşan nekrotik lokal lezyonlar bistüri yardımıyla kesilip çıkarılarak, aynı test bitkilerine 2. inokulasyonda kullanılmıştır. Her inokulasyondan 1-3 hafta sonra inokule edilen bitkiler ELISA ile test edilerek TSWV enfeksiyonunun varlığı teyit edilmiştir. Bu şekilde tek bir lokal lezyondan elde edilen TSWV izolatları 4 tekerrür olarak hem lokal lezyon, hem de çoğaltım konukçusu olarak kullanılan *N. rustica* bitkilerine aşılantılmışlardır. Bu bitkilerde muhafaza edilen ve farklı konukçulardan (domates, biber, tütün) elde edilen TSWV izolatları (Ba-Ağ-Bi: Biber izolatı; Ba-Gü-Do: Domates izolatı; Al-Ka-Tü: Tütün izolatı) daha sonradan dayanıklı ve hassas domates çeşitlerine inokulasyonda kullanılmıştır.

3.2.6. Dayanıklı ve Hassas Domates Çeşitlerine TSWV İzolatlarının İnokulasyonu

3.2.5’de belirtilen TSWV izolatları, 2-3 yapraklı dönemdeki Logero RZ F1, Swanson F1, Esin F1, Petek F1 dayanıklı domates çeşitlerine ve hassas domates çeşidine (Falcon) 3 tekrerrür olacak şekilde Yöntem 3.2.4’deki belirtildiği şekilde inokule edilmiş ve simptom gelişimi için 3-4 hafta süreyle izlenmeye bırakılmıştır. İnokulasyondan 20 gün sonra bu bitkiler Yöntem 3.2.2.’de açıklandığı şekilde DAS-ELISA ile test edilmiştir.

3.2.7. Dayanıklı ve Hassas Domates Çeşitlerinden DNA Ekstraksiyonu

Çalışmanın başlangıcında DNA ekstraksiyon metodunun optimize edilmesi için 2 farklı dönemdeki (21 günlük ve 30 günlük), TSWV’ye dayanıklı Logure RZ F1 bitkileri kullanılmıştır. Domates bitkisinden DNA izolasyonu için 2 ayrı ekstraksiyon yöntemi (havanda ve mikrosantrifüj tüpünde) uygulanmıştır. Domates yapraklarından DNA ekstraksiyonu için Edwards ve ark. (1991)’nın yöntemi modifiye edilmiştir. Domates yapraklarından 0.1-0.2 gr olacak şekilde 0.5 cm’lik diskler alınarak steril havan ve mikrosantrifüj tüpünde sıvı nitrojen yardımıyla toz haline gelinceye kadar ezilmiştir. Daha sonra bu örneklerin üzerine 400 µl (200 mM Tris-HCl pH: 7.5, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS) ekstraksiyon çözeltisi ilave edilerek vorteks yardımıyla karıştırılmış ve 13.000 rpm’de 2 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst kısımda oluşan sıvı (süpernatant) alınarak yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılıp, bu tüpün içerisine 300 µl fenol:kloroform:isoamil alkol (25:24:1) karışımı ilave edilmiş ve 2-5 dk 13.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından üstte kalan sıvı faz alınarak tekrar yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 1 hacim isopropanol ilave edildikten sonra 2-5 dk süre ile 13.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Daha sonra sıvı kısım atılmış ve oluşan pelet % 70’lik etil alkol ile bir kez daha santrifüj edilmiştir. Tüplerin oda sıcaklığında iyice kuruması sağlandıktan sonra pelet, 50 µl TE (10 mM Trsi-HCl, 1 mM EDTA, pH: 8.0) çözeltisi ilave edilerek çözülmüş ve elde edilen DNA örnekleri PCR çalışmasında kullanılıncaya kadar -18°C’de saklanmıştır. Bu ön çalışmadan sonra uygulanan PCR çalışması ve jel elektroforez yönteminin ardından havanda ekstraksiyon yöntemi ve 30 günlük domates bitkileri kullanıldığında daha iyi sonuçlar alınmıştır. Bu sonuçlara göre diğer dayanıklı domates çeşitlerinden DNA izolasyonunda havan kullanılarak ekstraksiyona devam edilmiştir.

Bu çalışmada Logure RZ F1, Swanson F1, Esin F1, Petek F1 (TSWV'ye dayanıklı), kontrol olarak da Falcon (hassas) ve Anatolia (hassas) domates çeşitlerinde TSWV'ye dayanıklılık geni "Sw-5" in varlığı bu gene spesifik primer ile PCR yöntemi uygulanarak teyit edilmek istenmiştir. Her ne kadar Logero RZ F1, Swanson F1, Esin F1 ve Petek F1'in temin edildiği firmaların kataloglarında TSWV'ye dayanıklı olduğu bildirilmiş olmasına rağmen, bu çalışmada Sw-5 geninin söz konusu çeşitlerde varlığının bilimsel olarak ortaya konulması ve ondan sonra bu çeşitlerin TSWV izolatları ile inokulasyon çalışmalarında kullanılmasının doğru olacağı düşünülmüştür.

3. 2. 8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Domatesin 9. kromozomunda bulunan Sw-5 lokusunun, TSWV' nin birçok izolatına (Cho ve ark., 1996; Rosello ve ark., 1996) ve Tospovirus cinsindeki iki diğer virüse (*Groundnut ring spot virus* ve *Tomato chlorotic spot virus*) (Boiteux ve Giordano, 1993) karşı dayanıklılıkta etkili olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada PCR yöntemi, dayanıklı olduğu bildirilen domates çeşitlerindeki Sw-5 dayanıklılık geninin belirlenmesi için kullanılmıştır. Domates çeşitlerinden Yöntem 3.2.8'de belirtildiği şekilde elde edilen genomik DNA'lar ve Sw-5 genine spesifik Sw-5b-LRR-F ve Sw-5b-LRR-R primerleri (Çizelge 3.2) (Garland ve ark., 2005) ile reaksiyon oluşturulmuştur. Domatesin genomunda bulunan ve Sw-5 genine link konumda olan CT220 fragmentine spesifik primerler [CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) primerleri, ZUP641 ve ZUP642] (Çizelge 3.2) ise PCR yönteminin doğrulanması ve hatalı negatif sonuçların kontrolü için kullanılmıştır (Garland ve ark., 2005). PCR koşulları aşağıda olduğu gibidir.

PCR reaksiyonu: 5 µl 5XPCR Buffer (Promega), 0.25 µl Primer Sw-F (100 nM), 0.25 µl Primer Sw-R (100 nM), 0.25 µl ZUP 641A (100 nM), 0.25 µl ZUP 642A (100 nM), 3.5 µl dNTP (10 mM), 6 µl MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl (0.1 Unit) *Taq* polimeraz enzimi (Promega), 2 µl DNA (50 ng) PCR tüpüne konularak 10 µl H₂O ile toplam hacim 25 µl'ye tamamlanmıştır.

PCR sıcaklık değerleri; 94°C'de 3 dk (denaturasyon), 35 döngü olacak şekilde 94°C'de 30 sn, 56°C'de 30 sn ve 72°C'de 1 dk olarak uygulanmıştır. En son olarak reaksiyon 72°C'de 1 dk tutularak sonlandırılmıştır.

3.2.9. Agaroz Jelin Hazırlanması

PCR sonrası oluşan DNA fragmentlerinin analizi için % 1'lik agaroz jel kullanılmıştır. 0.5 gr Agaroz (Merck, Almanya) 50 ml'lik 1x TBE tampon çözeltisi (45mM Tris, 45mM Borik asit, 1mM EDTA) içerisinde karıştırılarak mikro dalga fırın içinde erimesi sağlanmıştır. Karışım ılıdıktan sonra içerisine 2.5 µl (10 mg/ml) ethidium bromür ilave edilmiş ve jel yatay elektroforez tabağına dökülmüştür. Jelin tamamen katılaşması sağlandıktan sonra içerisinde 1x TBE tampon çözeltisi bulunan elektroforez cihazının tankına yerleştirilmiştir. PCR tüpleri içerisindeki DNA örneklerinden 10 µl alınarak 2 µl yükleme tamponu (% 0.25 bromophenol blue, %0.25 xylene cyanaol, % 30 glycerol ve 50 mM EDTA) ile karıştırılarak jeldeki hücelere yerleştirilmiştir. İlk hücreye bantların moleküler büyüklüğünü belirlemek için 7 µl markör (1 kb DNA Ladder; Promega) konulduktan sonra, diğer hücelere örnekler yerleştirilmiş cihaz 90 V'a ayarlanarak 1 saat koşturulmuştur. Görüntüleme cihazında (Jel DOC, 2000, BIORAD) jelde oluşan DNA bantlarının fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.10. Dayanıklı Çeşitlerden RNA Ekstraksiyonu

Domates bitkilerinden RNA ekstraksiyonu Verwoerd ve ark. (1989)'nın önerdiği şekilde uygulanmıştır. Buna göre steril havan ve havaneli yardımıyla örnekler sıvı nitrojen içerisinde toz haline gelinceye kadar ezilmiştir. 2 ml'lik ependorf tüpler içine alınan örneklerin üzerine 80°C'de ısıtılmış 250 µl fenol ve 250 µl RNA ekstraksiyon çözeltisi [0.1M LiCl, 100 mM Tris-HCl pH=8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS (1:1)] ilave edilerek vorteks yardımıyla 30 sn karıştırılmıştır. Bu karışımın üzerine 250 µl chloroform-isoamylalcohol (24:1) ilave edilerek tekrar 30 sn vortekslenmiştir. Bu işlemin ardından 5dk 13.000 rpm'de santrifüj edilerek 2 ayrı faz oluşumu sağlanmıştır. Üstte oluşan süpernatant kısım alınıp, temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Alınan süpernatant kadar üzerine 4M LiCl ilave edilmiş ve 1 gece + 4°C'de bekletilmiştir. Bu işlemin ardından 5 dk 13.000 rpm'de tekrar santrifüj edilip içindeki süpernatant dökülerek, oluşan pelet içine çözünmeyi sağlamak için 200 µl H₂O ilave edilmiştir. Daha sonra 20 µl 3 M NaOAc (pH: 5.2) ve 400 µl etanol ilave edilmiş ve 5 dk 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra 500 µl % 70 etanol ilave edilip tekrar 5 dk 13.000 rpm'de santrifüj sonrası tüpteki pelet kurumaya bırakılmıştır. Elde edilen RNA'lar RT-PCR çalışmalarında kullanılıncaya kadar - 18°C'de saklanmıştır.

3.2.11. RT-PCR Yöntemi İle TSWV'nin Nükleokapsid Protein (N) Geninin Amplifikasyonu

TSWV izolatları ile inokule edilmiş olan domates bitkilerinde TSWV enfeksiyonunun varlığının araştırılması için RT-PCR yöntemi uygulanmıştır. RT-PCR çalışmasında TSWV SRNA'da bulunan N (nükleokapsid protein) genine spesifik primerler kullanılmıştır (Çizelge 3.3). PCR koşulları aşağıdaki gibi uygulanmıştır.

RT-PCR reaksiyonu; 2 µl 5XPCR Buffer, 0.4 µl (400 µM) dNTP, 1 µl (0.6 µM) reverse primer, 1 µl (0.6 µM) forward primer, 0.4 µl Taq DNA polimeraz ve reverse transkriptaz enzimleri karışımı (unit / µl), 0.4 µl toplam RNA ve 4.8 µl RNase enzimi içermeyen H₂O PCR tüpüne konularak toplam hacim 10 µl'ye tamamlanmıştır.

RT-PCR döngü değerleri; 50°C'de 30 dk (reverse transkripsiyon), 95°C'de 15 dk (ilk denaturasyon), 40 döngü olacak şekilde 94°C'de 30 sn (denatürasyon), 47.7°C: 30 sn (primerlerin sarmallara yapışması), 72°C'de 30 sn (uzama), ve 72°C'de 5dk (son inkübasyon süresi) olarak uygulanmıştır.

4. BULGULAR

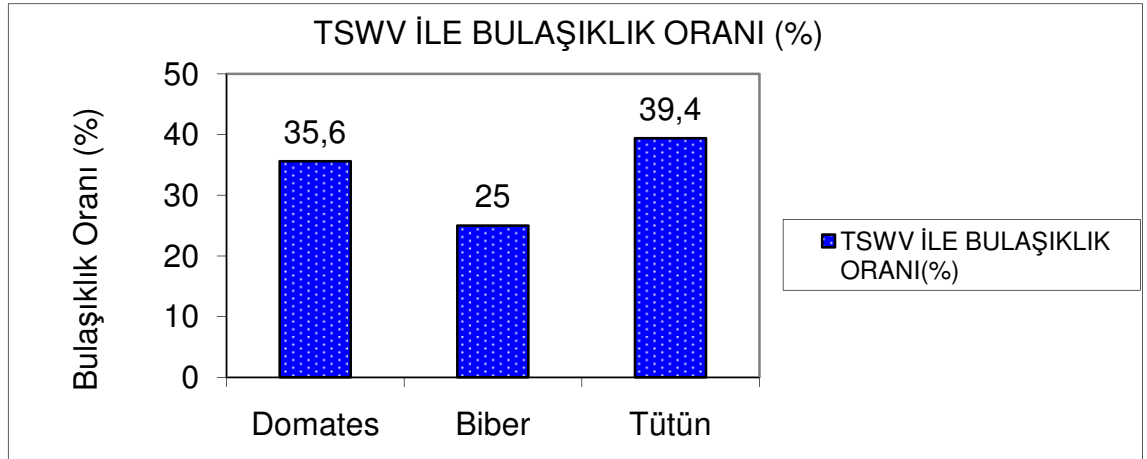
4.1. Survey Çalışmasında Alınan Örneklerin ELISA Sonuçları

Samsun ilinde domates, biber ve tütün alanlarından toplanan 414 adet örneğin DAS-ELISA yöntemi ile test edilmesi sonucunda, 28 (% 6.8) örneğin *Domates lekeli solgunluk virüsü* (TSWV) ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Bulaşıklık oranı ilçelere göre; Alaçam'da % 21.2, Vezirköprü'de % 9.6, Çarşamba'da % 7.5, Bafra'da % 6.3 iken, Tekkeköy ilçesinden alınan bitki örneklerinin hiç birinde TSWV tespit edilmemiştir (Çizelge 4.1.)

Çizelge 4. 1. Toplanan Örneklerin İlçelere Göre TSWV İle Bulaşıklık Oranları

İlçe Adı	Örnek Alınan Köy Sayısı	Tarla sayısı	Test Edilen Örnek Sayısı	TSWV (%)
BAFRA	12	24	239	15 (% 6.3)
ÇARŞAMBA	4	5	40	3 (% 7.5)
ALAÇAM	4	5	33	7 (% 21.2)
VEZİRKÖPRÜ	3	6	31	3 (% 9.6)
TEKKEKÖY	2	5	71	0 (% 0)
TOPLAM	25	45	414	28 (% 6.8)

ELISA sonuçları test edilen bitki türlerine göre incelendiğinde test edilen tütün örneklerinin % 39.4'ü, domates örneklerinin % 35.6'sı, biber örneklerinin % 25'i TSWV ile enfekteli olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1). Ayrıca, araziden alınan ve enfekteli olarak belirlenen biber, domates ve tütün yapraklarında karakteristik TSWV belirtileri gözlemlenmiştir (Şekil 4.2 ve 4.3).



Şekil 4.1. Örnekleme yapılan bitki türlerine göre TSWV'nin bulaşıklık oranları



Şekil 4.2. Araziden alınan TSWV ile enfekteli örnekler. Biber yaprağında klorotik halkalı lekeler, ilerleyen dönemde leke merkezi nekrotik (A), domates yaprağında bronz renkli lekelenme (B).



Şekil 4.3. TSWV ile bulaşık tütün yaprağında nekrotik lekeler

4.2. TSWV İzolatlarının Test Bitkilerinde Oluşturduğu Simptomlar

Samsun ilinin 5 farklı ilçesi (Bafra, Çarşamba, Vezirköprü, Alaçam ve Tekkeköy)'den alınan domates, biber ve tütün bitkilerine ait yaprak ve meyve örnekleri, ELISA ile test edildikten sonra izolatların konukçu çevresine göre biyolojik ayırım çalışmalarında kullanılmıştır. Test bitkilerinin reaksiyonları ve konukçu çevrelerinin belirlenmesi amacıyla TSWV izolatları bir dizi test bitkisine Yöntem 3.2.4'de belirtildiği şekilde inokule edilmiştir. İnokulasyondan 1-3 hafta sonra test bitkilerinde gözlenen simptomlar kaydedilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. TSWV İzolatlarının Test Bitkilerinde Oluşturduğu Simptomlar

TÜR ADI	TÜRKÇE ADI	TSWV İZOLATLARI					
		AL-KA-Tü (1)		BA-AĞ-Bİ (1)		BA-GÜ-Do (1)	
		Lo	Sy	Lo	Sy	Lo	Sy
<i>Lactuca sativa cv. Batavia</i>	Marul	-	-	-	-	-	-
<i>Cucumis sativus “Dzhezelo”.</i>	Hıyar	KL	NL	KL	B	-	-
<i>Phaseolus vulgaris “Balkız”.</i>	Fasulye	-	-	-	-	-	-
<i>Lycopersicon esculentum Mill.</i>	Domates	-	Mo, B	NL	Mo, B	-	Mo, B
<i>N.clevelandii L.</i>	Tütün	*	*	NL	NL	*	*
<i>N.glutinosa L.</i>	Tütün	NL	NL	NL	Mo, D	NL	D
<i>N.rustica L.</i>	Tütün	NL, KHL	NL, D	NL, KHL	NL, D	NL, KHL	NL, D
<i>N.tabacum cv.”Xanthi-nc”</i>	Tütün	NL	NL, NHL	NHL	NHL	*	*
<i>N. benthamiana L.</i>	Tütün	KL	K, D	KL	K, D	-	K,D
<i>Petunia hybridae pendula L.</i>	Petunya	NL	NL	NL	NL	NL	NL
<i>Datura stramonium</i>	Şeytan Elması	*	*	KL	Mo, NL	*	*
<i>Capsicum annum spp.</i>	Biber	KL	Mo, NL	KL	KHL	KL	KHL
<i>Chenopodium album</i>	Kaz ayağı	NL	NL	NL	NL	NL	NL

Lo, Lokal; Sy, Sistemik, B: Bodurluk, D: Şekil bozukluğu, KL: Klorotik Lekeler; K: Kloroz, KHL: Klorotik Halkalı Lekeler, NL: Nekrotik leke, NHL: Nekrotik Halkalı Lekeler, Mo: Mozayik, --, Simptom yok; *, Test edilmedi.

C. sativus “Dzhezelo” çeşidinde Al-Ka-Tü (1) izolatu inokulasyondan 1 hafta sonra inokule edilen yapraklarda klorotik lokal lezyonlar oluşturmuş (Şekil 4.4.A), sistemik olarak yapraklarda etrafı klorotik alanla çevrili nekrotik lekeler (Şekil 4.4.B) ve bodurluk meydana getirmiştir. Sistemik enfeksiyon aynı zamanda ELISA testi ile doğrulanmıştır. Ba-Ağ-Bi (1) izolatu da aynı şekilde hıyar bitkisinin inokule edilen yapraklarında klorotik lekeler ve bodurlaşmaya neden olmuştur. Ba-Gü-Do (1) izolatu ise 2 tekerrürlü olarak yapılan inokulasyonlarda gerek inokule edilen gerekse edilmeyen yapraklarda hiçbir semptom oluşturmamıştır (Çizelge 4.2). ELISA ile bu bitkilerin test edilmesi sonucunda, Al-Ka-Tü (1) izolatu ve Ba-Ağ-Bi (1) izolatu pozitif, Ba-Gü-Do (1) izolatu ise negatif sonuç vermiştir.

N. clevelandii bitkisinde ise Ba-Ağ-Bi (1) izolatu inokulasyondan 12 gün sonra inokule edilen yapraklarda, daha sonra ise üst yapraklarda nekrotik lekeler neden olmuştur (Şekil 4.5). Bu türe ait ekilen tohumların büyük bir kısmının çimlenmemesi sebebiyle diğer 2 izolat için bu bitki testlenememiştir.

C. album bitkisinde Al-Ka-Tü (1), Ba-Ağ-Bi (1) ve Ba-Gü-Do (1) izolatlarının tamamı aynı reaksiyonu vermiştir. İnokule edilen yapraklarda (Şekil 4.6) 2 hafta içinde, daha sonra da üst yapraklarda sistemik nekrotik lekeler oluşturmuştur (Şekil 4.7).

N. rustica bitkisinde izolatların hepsi inokule edilen yapraklarda nekrotik ve/veya klorotik halkalı lekeler meydana getirirken (Şekil 4.8.A), hastalığın ilerleyen aşamalarında üst yapraklarda hem klorotik hem de nekrotik lekeler (Şekil 4.8.B) ve şekil bozuklukları oluşturmuştur.

N. tabacum “*Xanthi-nc*” bitkisinde ise Al-Ka-Tü (1) izolatu inokulasyondan 10 gün sonra lokal nekrotik lekeler neden olurken, üst yapraklara da taşınarak nekrotik lekeler ve/veya halkalı lekeler meydana getirmiştir. Ba-Ağ-Bi (1) izolatu ise inokule edilen yapraklarda 2 hafta sonra nekrotik halkalı leke (Şekil 4.9.A) meydana getirirken, virüs üst yapraklara taşınarak nekrotik lekeler ve/veya halkalı lekeler (Şekil 4.9.B) oluşturmuştur. Ayrıca, izolat geç dönemde üst yapraklarda çok hafif seyreden mozaik belirtisi göstermiştir. Ba-Gü-Do (1) izolatu ise bu bitki için testlenememiştir.

N. glutinosa bitkisinde ise 3 izolatın oluşturduğu semptomlar belirgin olarak farklı elde edilmiştir. Al-Ka-Tü (1) izolatu hem sistemik hem de inokule edilen yapraklarda çok yoğun olmak üzere nekrotik lekeler oluşturmuştur (Şekil 4.10). Ba-Ağ-Bi (1) izolatu ise inokule edilen yaprakta çok az sayıda nekrotik leke, üst yapraklarda hafif mozaik ve şekil bozukluğu meydana getirmiştir (Şekil 4.11). Ba-Gü-Do (1)

izolatı, *N. glutinosa*'nın inokule edilen yaprağında az sayıda nekrotik leke, üst yapraklarda ise şiddetli şekil bozukluğu oluşturmuştur (Şekil 4.11). Elde edilen sonuçlar bitkilere yapılan ELISA testi ile paralellik göstermiş, test edilen bütün bitkilerde TSWV enfeksiyonu belirlenmiştir.

Lycopersicum esculentum'un "Falcon" çeşidinde sadece Ba-Ağ-Bi (1) izolatu inokule edilen yaprakta nekrotik leke oluşumuna, bütün izolatlar ise sistemik olarak mozayik, klorotik leke ve bodurlaşmaya (Şekil 4.12.A) sebep olmuştur.

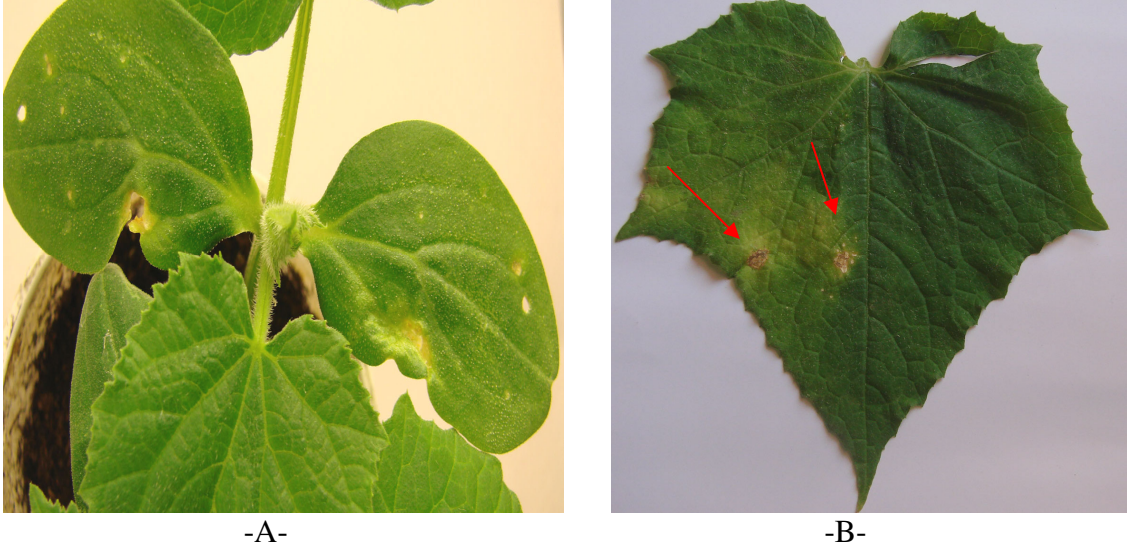
C. annum bitkisinde Al-Ka-Tü (1) izolatu inokulasyondan 5 gün sonra klorotik lekeler, üst yapraklarda ise mozayik ve nekrotik lekeler meydana getirmiştir. Ba-Ağ-Bi (1) ve Ba-Gü-Do (1) izolatları ise daha benzer olarak bitkide inokule edilen yapraklarda klorotik leke, sistemik olarak ise klorotik halkalı lekeler oluşturmuştur (Şekil 4.12.B).

N. benthamiana'da ise inokulasyondan 10 gün sonra Al-Ka-Tü (1) izolatu ile Ba-Ağ-Bi (1) izolatu inokule edilen yapraklarda hafif klorotik lekeler oluştururken (Şekil 4.13.A), üst yapraklarda ise kloroz ve şiddetli yaprak deformasyonu (Şekil 4.13.B) meydana getirmiştir. Ba-Gü-Do (1) izolatu ise inokule edilen yapraklarda belirti oluşturmadan, sistemik olarak kloroz ve şekil bozukluğu şeklinde symptom sergilemiştir.

D. stramonium'da ise yine tohum yetersizliği sebebiyle sadece Ba-Ağ-Bi (1) izolatu testlenmiş ve inokulasyondan 7 gün sonra inokule edilen yapraklarda önce renk açılması başlamış ve sonra üst yapraklarda yaprak deformasyonu, mozayik ve nekrotik lezyonlar oluşmuştur (Şekil 4.14). Sonuçlar ELISA testi ile de doğrulanmıştır.

P. hybridae'da bütün izolatlar, 4 gün sonra inokule edilen yaprakta çok sayıda nekrotik lezyon oluşturmuştur. Daha sonradan sistemik reaksiyon oluşmuştur (Şekil 4.15). Sonuçlar ELISA ile de test edilerek TSWV' nin varlığı bu bitkide 3 izolat için de tespit edilmiştir.

TSWV izolatlarının hiçbirisi inokule edilen *L. sativa* "Batavia" çeşidine ait bitkilerde ve *P. vulgaris* "Balkız" bitkisinde symptom göstermemiştir. Bu sonuçlar en az iki defa tekrarlanarak ELISA (negatif sonuç) ile doğrulanmıştır.



Şekil 4.4. *C.sativus* bitkisinin inokule edilen (A) yaprağında ve üst yaprağında (B) Al- Ka-Tü (1) izolatının oluşturduğu belirtiler



Şekil 4.5. *N. clevelandii* bitkisinde Ba-Ağ-Bi (1) izolatının neden olduğu nekrotik lekeler



Şekil 4.6. *C.album* bitkisinde TSWV izolatlarının inokule edilen yapraklarda oluşturduğu nekrotik lekeler [soldan sağa Ba-Gü-Do (1), Ba-Ağ-Bi (1), Al-Ka-Tü (1)].



Şekil 4.7. *C. album* bitkisinde Al-Ka-Tü (1) izolatının oluşturduğu sistemik nekrotik lekeler



-A-



-B-

Şekil 4.8. *N. rustica* bitkisinde Ba-Ağ-Bi (1) izolatının oluşturduğu sistemik nekrotik lekelenmeler (A) ve Al-Ka-Tü (1) izolatının inokule yaprakta neden olduğu klorotik halkalı lekeler (B).



-A-



-B-

Şekil 4.9. *N. tabacum* "Xanthi-nc"de Ba-Ağ-Bi (1) izolatının inokule edilen yaprakta oluşturduğu nekrotik halkalı leke (A) ve sistemik nekrotik lekeler (B)



Şekil 4.10. *N. glutinosa*'da Al- Ka-Tü (1) izolatının oluşturduğu nekrotik lekeler



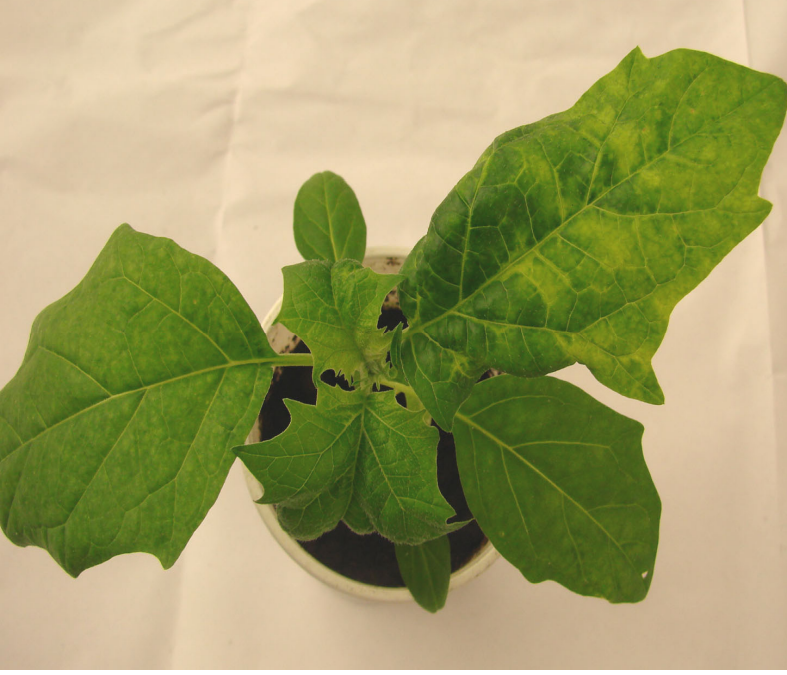
Şekil 4.11. *N. glutinosa*'da soldan sağa Ba-Gü-Do (1), Ba-Ağ-Bi (1) ve Al-Ka-Tü (1) izolatlarının oluşturduğu belirtiler



Şekil 4.12. A) *L. esculentum*'da Ba-Ağ-Bi (1) izolatının neden olduğu bodurluk (sol) ve sağlıklı bitki (sağ) , B) *C. annum*'da Ba-Gü-Do (1) izolatının oluşturduğu klorotik halkalı lekeler



Şekil 4.13. *N. benthamiana* bitkisinde Al-Ka-Tü (1) izolatının oluşturduğu belirtiler. İnokule edilen yaprakta oluşturduğu klorotik leke (A) ve üst yapraklardaki kloroz ve şiddetli yaprak deformasyonu (B)



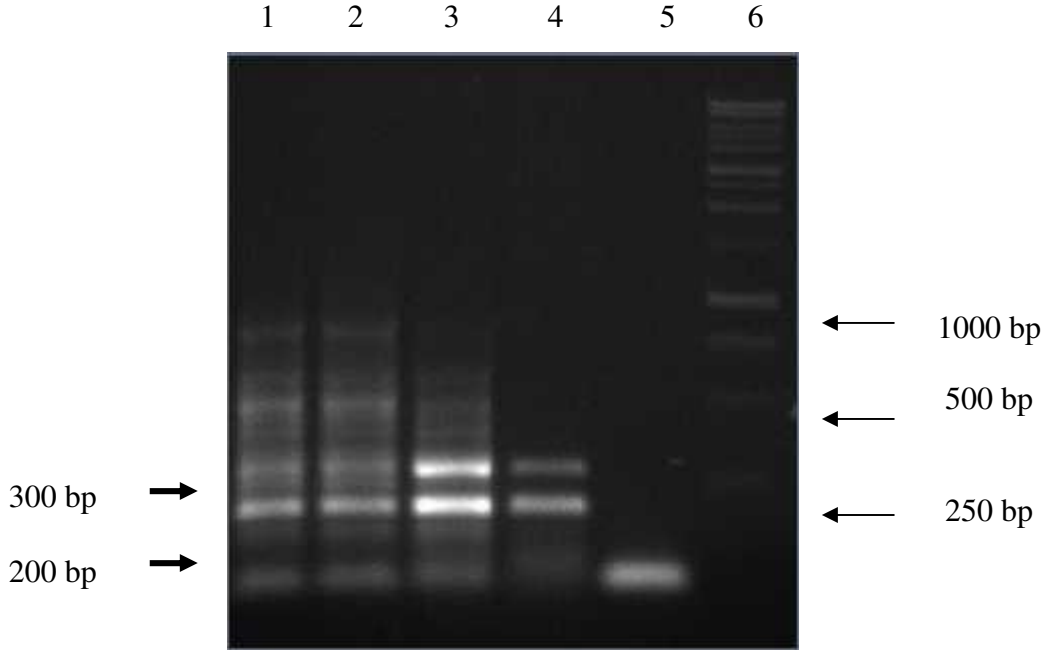
Şekil 4.14. *Datura stramonium* bitkisinde Ba-Ağ-Bi (1) izolatının oluşturduğu mozayik ve yaprak deformasyonu.



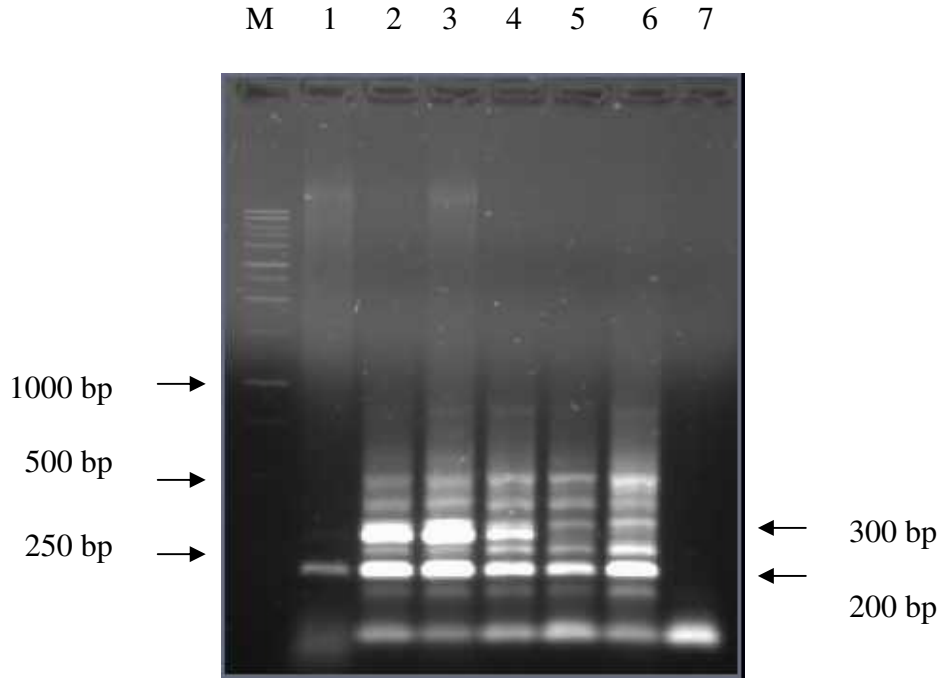
Şekil 4.15. Al-Ka-Tü (1) izolatının *P. hybridae*'da oluşturduğu nekrotik lezyonlar

4.3. Dayanıklı Domates Çeşitlerinde *Sw-5* Dayanıklılık Geninin Tespiti

Dayanıklı ve hassas domates çeşitlerinden Yöntem 3.2.7’de belirtildiği şekilde genomik DNA’lar izole edilmiştir. Öncelikle 21 ve 30 günlük dayanıklı Logure RZ F1 domates çeşidinin yapraklarından DNA izolasyonu yapılmıştır. Yapraklar 2 farklı yöntemle (havanda ve mikosantrifüj tüpü içinde) ezilmiştir. Elde edilen DNA ürünleri Yöntem 3.2.8’de açıklandığı şekilde PCR çalışmasında kullanılmıştır. Elektroforez sonrası PCR ürünlerinin jel görüntüleme cihazında incelenmesi sonucunda 300 bp (baz çifti)’lik *Sw-5b-LRR* fragmentine ve 200 bp’lik CT 220 fragmentine ait bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.16). Bu ön çalışmada, havan kullanılarak yapılan DNA izolasyonunda PCR sonrası daha net bantlar elde edilmiş olduğu için daha sonraki DNA izolasyonları havan yöntemiyle yapılmıştır. Daha sonra TSWV’ye dayanıklı Logure RZ F1, Swanson F1, Esin F1, Petek F1 çeşitleri ile TSWV’ye hassas Anatolia ve Falcon çeşitlerinden elde edilen DNA ürünlerinin *Sw-5b-LRR* ve CT 220 primerleri ile PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Dayanıklı çeşitlerin tamamında *Sw-5b* (300bp) ve CT 220 (200 bp) fragmentleri, hassas çeşitlerde ise sadece CT 220 fragmenti elde edilmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.16. Logure RZ F1 dayanıklı çeşidine ait bitkilerde *Sw-5* geninin ve CT-220 fragmentinin PCR ile amplifikasyonu. 200 bp’lik CT-220 fragmenti ve 300 bp’lik *Sw-5b-LRR* fragmentine ait bantlar. 1: mikrosantrifüj tüpü/21 günlük bitki; 2: mikrosantrifüj tüpü/30 günlük bitki; 3: havan/21 günlük bitki; 4: havan/30 günlük bitki; 5: negatif kontrol (DNA içermeyen); 6: 1 kb Ladder.



Şekil 4.17. Dayanıklı ve hassas domates çeşitlerinde *Sw-5* geninin ve CT-220 fragmentinin amplifikasyonu. M: 1 kb Ladder; 1: Logure RZ F1; 2: Swanson F1; 3: Esin F1; 4: Petek F1; 5: Falcon; 6: Anatolia çeşitlerine ait DNA örnekleri ile elde edilen PCR ürünleri; 7: Negatif kontrol.

4. 4. TSWV İzolatlarının Dayanıklı ve Hassas Domates Çeşitlerinde Oluşturduğu Simptomlar

DNA Ekstraksiyonu ve PCR çalışmaları sonucu *Sw-5* dayanıklılık genini içerdiği tespit edilen Esin F1, Logure RZ F1, Swanson F1 ve Petek F1 domates çeşitlerine ait bitkilere her izolat [Al-Ka-Tü (1), Ba-Ağ-Bi (1), Ba-Gü-Do (1)] ayrı ayrı 3 tekerrürlü olarak inokule edilmiştir. İzolatların inokule edilmesinin ardından günlük olarak bitkilerde simptom oluşup oluşmadığı izlenmiştir. İnokulasyondan 12 gün sonra Al-Ka-Tü (1) izolatı Logure RZ F1'in 1. tekerrüründe, Esin F1 ve Petek F1'in tüm tekerrürlerinde, Swanson F1'in 1. ve 2. tekerrür bitkilerinde hipersensitif reaksiyon sonucu inokule edilen yapraklarda nekrotik lekeler oluşturmuştur. Bunların dışındaki diğer bitkilerde inokule edilen yapraklarda herhangi bir belirtiyeye sebep olmamıştır. Bu izolat, Esin F1'e ait bitkilerin 2. tekerrüründe inokulasyondan 30 gün sonra sistemik mozayik meydana getirmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. İzolatların Dayanıklı Domates Çeşitlerinde Oluşturduğu Simptomlar

DOMATES ÇEŞİTLERİ	TSWV İZOLATLARI											
	Al-Ka-Tü (1)				Ba-Ağ-Bi (1)				Ba-Gü-Do (1)			
	L	Elisa	S	Elisa	L	Elisa	S	Elisa	L	Elisa	S	Elisa
Logure RZ F1 (1)	N	-	-	-	N	+	-	-	N	+	M	+
Logure Rz F1 (2)	-	-	-	-	N	+	-	-	-	-	-	-
Logure Rz F1 (3)	-	-	-	-	N	+	-	-	-	+	-	-
Logure RZ F1 (Sağlıklı)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esin F1 (1)	N	-	-	-	N	+	-	-	-	-	-	-
Esin F1 (2)	N	-	M	+	N	+	-	-	-	+	-	-
Esin F1 (3)	N	-	-	-	N	+	-	-	-	-	-	-
Esin F1 (Sağlıklı)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Swanson F1 (1)	N	-	-	-	N	+	-	-	-	-	-	-
Swanson F1 (2)	N	-	-	-	N	+	-	-	N	+	-	-
Swanson F1 (3)	-	-	-	-	N	+	-	-	-	-	-	-
Swanson (Sağlıklı)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Petek F1 (1)	N	-	-	-	N	+	-	-	-	-	-	-
Petek F1 (2)	N	-	-	-	N	+	-	-	N	+	-	+
Petek F1 (3)	N	-	-	-	N	+	-	-	-	+	-	-
Petek F1 (Sağlıklı)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ve ELISA Sonuçları

(M: Mozayik, N: Nekrotik leke, L: Lokal Enfeksiyon, S: Sistemik Enfeksiyon)

Ba-Ağ-Bi (1) izolatı, dayanıklı çeşitlerin tüm tekerrürlerinde inokule edilen yapraklarda nekrotik leke oluşturmuş (Şekil 4.18-21) ve sistemik olarak hiçbir belirti göstermemiştir (Çizelge 4.3).

Ba-Gü-Do (1) izolatu Logure RZ F1'in 1. tekerrürü, Swanson F1 ve Petek F1 bitkilerinin 2. tekerrürlerinde inokule edilen yaprakta nekrotik leke oluşturmuştur. Bu izolat, Logure RZ F1'in 1. tekerrürü ve Petek F1'in 2. tekerrüründe *Sw-5* geninin etkisini kırarak sistemik olarak bitkiyi enfekte etmiş ve mozayik belirtisi (Şekil 4.22) oluşturmuştur (Çizelge 4.3).

Bütün çeşitlerin su ile inokule edilen kontrol bitkilerinde hem inokule edilen hem de sistemik yapraklarda hiçbir belirti oluşmamıştır.



Şekil 4.18. Ba-Ağ-Bi (1) izolatının Swanson F1 bitkisinin inokule edilen yaprağındaki nekrotik lekeler



Şekil 4.19. Ba-Ağ-Bi (1) izolatının Petek F1 bitkisinin inokule edilen yaprağındaki nekrotik lekeler



Şekil 4.20. Ba-Ağ-Bi (1) izolatının Esin F1 bitkisinin inokule edilen yaprağındaki nekrotik lekeler



Şekil 4.21. Ba-Ağ-Bi (1) izolatının Logure RZ F 1 bitkisinin inokule edilen yaprağındaki nekrotik lekeler

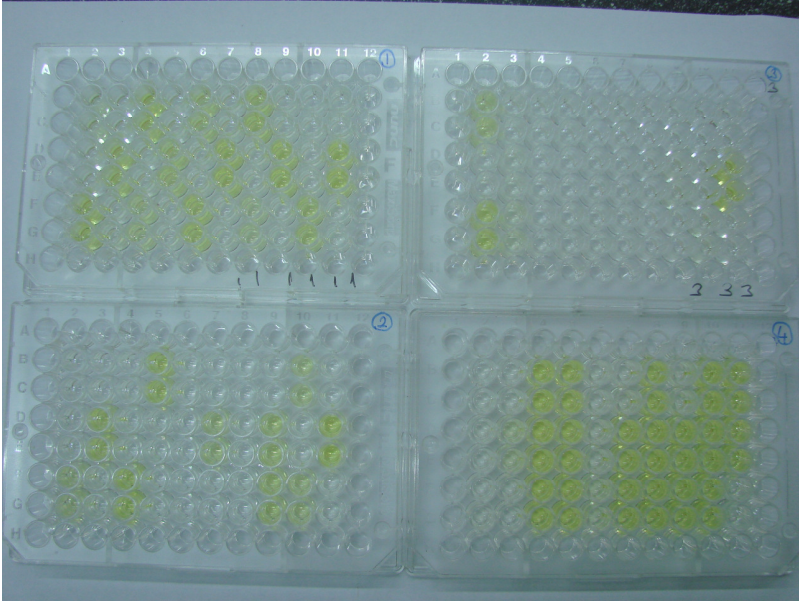


Şekil 4.22. Ba-Gü-Do (1) izolatının Logure RZ F1 1. tekerrür bitkisinin üst yapraklarında oluşturduğu mozayik simptomsu

4.5. Dayanıklı Domates Çeşitlerinde TSWV Enfeksiyonunun ELISA Testi ile Araştırılması

Üç ayrı TSWV izolatu ile inokule edilen dayanıklı (Logure RZ F1, Esin F1, Petek F1 ve Swanson F1) ve hassas (Falcon) domates çeşitlerine ait bitkiler, inokulasyondan 25 gün sonra ELISA ile test edilmiştir (Şekil 4.23). Toplam 90 örnek [İnokule edilen yapraklar için 45 test = 5 çeşit (hassas dahil) x 3 tekrür x 3 izolat; sistemik yapraklar için 45 test = 5 çeşit (hassas dahil) x 3 tekrür x 3 izolat] TSWV'ye spesifik antiserum kullanılarak test edilmiştir.

Al-Ka-Tü (1) izolatu, Esin F1 2. tekrür bitkisinin inokule edilen yapraklarında hipersensitif reaksiyon (HR) sonucu nekrotik leke oluşturmuş, ancak bu yapraklar ELISA testinde negatif sonuç vermiştir (Çizelge 4.3). İlginç bir şekilde bu bitkinin üst yaprakları ELISA ile test edildiği zaman sistemik semptom sergilememiş olmasına rağmen, ELISA'da pozitif sonuç vermiştir (A_{405} : 0.498, Negatif Kontrol: 0.195). ELISA testinden bir hafta sonra ise bu bitkinin üst yapraklarında mozayik semptomu gözlenmiştir. Ba-Ağ-Bi (1) izolatu, dayanıklı domates çeşitlerine ait bitkilerin TSWV ile inokule edildikten sonra nekrotik leke oluşturan yapraklarında ELISA'da pozitif, üst yapraklarında ise negatif sonuç vermiştir (Çizelge 4.3). Böylelikle, dayanıklılığın bu bitkilerde Ba-Ağ-Bi (1) izolatu karşı kırılmadığı tespit edilmiştir. Ba-Gü-Do (1) izolatu Petek F1 2. tekrür bitkisinde inokule edilen yaprakta nekrotik leke oluşturmuş ve ELISA testinde pozitif sonuç vermiştir. Bu bitkide aynı zamanda ilgi çekici bir sonuç olarak sistemik semptom oluşmamasına rağmen test edilen üst yapraklar ELISA testi sonucunda pozitif olarak değerlendirilmiştir (A_{405} : 0.770, Negatif Kontrol: 0.098). Aynı izolat Petek F1 3. tekrür bitkisinde inokule edilen yapraklarda nekrotik leke oluşturmaksızın ELISA'da pozitif sonuç vermiştir. Üst yapraklar ise ELISA'da negatif bulunmuştur. Bu izolat, Swanson F1 2. tekrür bitkisi ELISA ile test edildiğinde pozitif olarak değerlendirilmiş, bu sonuç oluşan nekrotik lekelerle paralellik göstermiştir. Esin F1 2. tekrür bitkisi ve Logure RZ F1'in 3. tekrüründe inokule edilen yapraklar fenotipik olarak negatif olmasına karşın ELISA'da pozitif sonuç vermiştir (Çizelge 4.3). Bu izolat ile dayanıklılığın kırılmasına yönelik diğer bir sonuç Logure RZ F1 1.tekrür bitkisiyle elde edilmiştir. Bu bitkide gerek inokule edilen yapraklar, gerekse üst yapraklar ELISA ile test edildiğinde pozitif sonuç vermiştir (A_{405} : 1.344, Negatif Kontrol: 0.098). Bu durum fenotipik gözlemlerle paralellik göstermiştir (Şekil 4. 22).

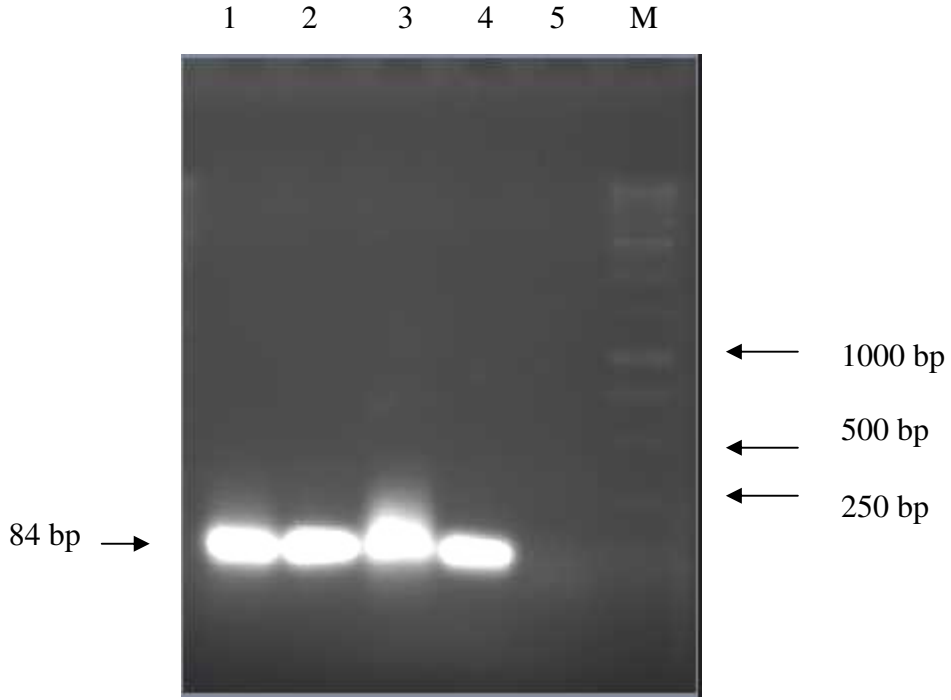


Şekil 4. 23. Dayanıklı ve hassas domates çeşitlerine ait ELISA sonuçları. (Sarı renkli alanlar pozitif).

4.6. RT-PCR Yöntemi İle Domates Çeşitlerinde TSWV'nin

Nükleokapsid Protein (N) Geninin Belirlenmesi

ELISA ve semptomatolojik gözlem sonuçlarına göre Sw-5 dayanıklılık genini içeren domates çeşitlerinde, 2 TSWV izolatının [Ba-Gü-Do (1) ve Al-Ka-Tü (1)] dayanıklılığı kırdığı tespit edilmiştir. Bu sonuçların RT-PCR yöntemi ile doğrulanmasına çalışılmıştır. Bu amaçla enfekteli ve sağlıklı domates bitkilerinin yapraklarından Yöntem 3. 2. 10'da belirtildiği şekilde toplam RNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA ürünleri ve TSWV'nin nükleokapsid protein genine spesifik primerler kullanılarak Yöntem 3. 2. 11'de açıklandığı şekilde N geni, RT-PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Daha sonra PCR ürünleri % 1'lik agaroz jelde 90 V'da yürütülmüştür. Jel görüntüleme cihazında analiz edilen örneklerde [Ba-Gü-Do (1) izolatu için Petek F1 ve Logure RZ F1; Al-Ka-Tü (1) izolatu için Esin F1] 84 bp moleküler büyüklüğünde DNA fragmentleri elde edilmiştir (Şekil 4. 24).



Şekil 4.24. Dayanıklı domateslerden izole edilen toplam RNA'lar kullanılarak RT- PCR yöntemi ile TSWV Kapsid Protein Geninin Çoğaltılması. M: 1 Kb ladder, 1: Esin F1 (2), 2: Logure Rz F1 (1), 3: Petek F1 (2), 4: Pozitif kontrol, 5: Negatif Kontrol (RNA içermeyen kontrol)

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, Samsun ilinde TSWV'nin farklı kültür bitkilerindeki bulaşıklık durumu ve TSWV izolatlarına karşı dayanıklı olduğu bilinen bazı ticari domates çeşitlerinin reaksiyonları belirlenmeye çalışılmıştır. Böylelikle Samsun ilinde domates, biber ve tütün alanlarında enfeksiyon oluşturan TSWV izolatlarının domatesteki dayanıklılık geni "Sw-5"nin etkisini kırıp kıramadığı araştırılmak istenmiştir. Samsun ilinde domates, biber ve tütün yetiştirilen alanların % 95'inin bulunduğu Bafra, Çarşamba, Tekkeköy ve Vezirköprü ilçelerinden toplanan 414 bitki örneğinin DAS-ELISA yöntemi ile test edilmesi sonucunda 28 örneğin (% 6.8) TSWV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. TSWV enfeksiyonunun ilçelere göre incelenmesi durumunda en fazla bulaşıklığın Alaçam (% 21.2) ilçesinde olduğu ve bunu sırasıyla Vezirköprü (% 9.6), Çarşamba (% 7.5) ve Bafra (% 6.3) ilçelerinin izlediği belirlenmiştir. Bu çalışmada Tekkeköy ilçesinde ise TSWV ile enfekteli bitkiye rastlanmamıştır.

DAS-ELISA, virüs hastalıklarının tespitinde en çok kullanılan ve en hızlı sonuç veren serolojik teşhis yöntemidir. Arlı-Sökmen ve ark. (2005), Samsun ilinde biber alanlarında 1998 ve 1999 yıllarında yapılan sürveylerde, DAS-ELISA yöntemi ile TSWV'nin varlığını saptamışlar, toplanan örneklerdeki enfeksiyon oranının 1998 yılında % 2.2, 1999 yılında ise % 9.2 olarak tespit etmişlerdir. Şevik (2007) tarafından yine bölgede yapılan başka bir çalışmada, domateste TSWV bulaşıklık oranının 2002 yılında % 14.57, 2003 yılında ise % 18.11 olduğu tespit edilmiştir. Samsun'da ilçelere göre bulaşıklık oranı incelendiğinde en yüksek bulaşıklık Tekkeköy ilçesinde (% 22.85), sırasıyla Çarşamba (% 21) ve Merkez ilçede (% 21) tespit edilirken, en az bulaşıklığın ise Terme ilçesinde (% 4.28) olduğu belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada TSWV'nin domateste % 42.1 oranında ürün kaybına ve % 95.5 oranında birinci sınıf pazarlanabilir değer kaybına neden olduğu saptanmıştır.

Bu sonuçlara benzer sonuçlar yurt dışındaki araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da tespit edilmiştir. Gitaitis ve ark. (1998) tarafından 1996 yılında Macaristan'da tütün alanlarında şiddetli TSWV salgını gözlenmiş ve yapılan incelemede, tütünlerde % 5-15 oranında virüs yoğunluğu saptanmıştır.

Gracia ve ark. (1999) tarafından 1994 yılında Arjantin’de yapılan bir çalışmada domates ve biber alanlarından alınan bitki örnekleri DAS-ELISA ile testlenmiş ve örneklerde % 32.7 oranında TSWV tespit edilmiştir.

Bu çalışmada araziden alınan bitki örneklerinde yapılan DAS-ELISA testinin sonuçlarına göre TSWV’nin yoğunluğu bitkiden bitkiye farklılık göstermiştir. Bu sonuçlara göre TSWV ile bulaşıklık oranı en yüksek tütün bitkisinde (% 39.4) daha sonra domateste (% 35.6) ve biberde (% 25) tespit edilmiştir.

Bozdoğan (2009), Antalya ili Merkez, Serik ve Kumluca ilçelerinde yaptığı çalışmada 193 domates, 345 biber ve 58 marul olmak üzere toplam 596 bitki örneğini ELISA ile test etmiş ve domates örneklerinin 156 (% 80.83)’sının, biber örneklerinin 316 (% 91.6)’sının ve marul örneklerinin ise 54 (% 93.1)’ünün olmak üzere 526 bitkinin TSWV ile enfekteli olduğunu saptamıştır.

Mekanik inokulasyon yöntemi virüsün çoğaltılmasında ve teşhisinde kullanılan yardımcı bir yöntemdir. Bu tez çalışmasında, araziden alınan örneklerin DAS-ELISA yöntemi ile test edilmesinin ardından TSWV-pozitif olan örneklerden bitki türüne göre absorbans değerleri yüksek olan 3 izolat seçilmiş ve mekanik inokulasyon çalışmasında kullanılmıştır. Bu 3 farklı izolat, Bafra ilçesinden biber izolatı Ba-Ağ-Bi (1), Alaçam ilçesinden tütün izolatı Al-Ka-Tü (1) ve Bafra ilçesinden domates izolatı Ba-Gü-Do (1) olarak adlandırılmıştır. Seçilen bu izolatların konukçu çevresine göre farklılıklarını belirleyebilmek ve bölgedeki TSWV izolatlarının biyolojik ayrımını yapılabilmesi için mekanik inokulasyon yöntemi kullanılmıştır.

TSWV’nin biyolojik olarak ayrımını sağlamak amacıyla kullanılan test bitkilerinde oluşan simptomlara ait sonuçlar, hem yurt dışında, hem de Türkiye’de yapılan çalışmalarla genelde paralellik göstermiştir. Ancak bazı test bitkilerinde farklı sonuçlar gözlenmiştir. Chatzivassiliou ve ark. (2000) tarafından Yunanistan’da yapılan çalışmada, farklı konukçulardan toplanan izolatlar alındıkları bitkilere göre kodlanmış ve test bitkilerine inokule edilmiştir. Bu inokulasyon sonucunda domates bitkisinden alınan TSWV izolatı *C. quinoa* bitkisinde nekrotik lezyon oluştururken, *C. sativus*, *P. vulgaris* bitkilerinde ise hiçbir belirti oluşturmamıştır. *N. rustica* ve *L. esculentum* bitkisinde izolatlar inokule edilen yaprakta belirti meydana getirmeyen, üst yapraklarda ise mozayik simptomuna sebep olmuştur. *N. benthamiana*, *N. glutinosa*, *P. hybrida* ve *Capsicum* spp. test bitkilerinde ise inokule edilen yapraklarda nekrotik lezyon görülürken sistemik olarak ise kloroz ve klorotik halkalar tespit edilmiştir. *N.*

clevelandii bitkisinde ise inokule edilen yapraklarda nekrotik lezyon tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan tütün izolatu ise yine aynı domates izolatu gibi *C. quinoa*'da sadece inokule edilen yaprakta nekrotik lekeler oluşturuken, *C. sativus* ve *P. vulgaris* bitkilerinde hiçbir belirti oluşturmamış, *L. esculentum*, *N. clevelandii*, *N. glutinosa* test bitkilerinde ise sistemik mozayik tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında da Chatzivassiliou ve ark. (2000)'nin sonuçlarına benzer olarak domates izolatu Ba-Gü-Do (1), *C. sativus*'da gerek inokule edilen yaprakta, gerekse inokule edilmeyen üst yapraklarda hiçbir simptom oluşturmamış ve ELISA'da da negatif sonuç vermiştir. Farklı olarak tütün izolatu Al-Ka-Tü (1), *C. sativus* bitkisinde hem lokal, hem de sistemik simptom meydana getirmiştir. Bu simptomlar da ELISA ile doğrulanmıştır. Bu tez çalışmasında kullanılan 3 izolat yine farklı olarak *C. album* bitkisinde inokule edilen yapraklardan sistemik olarak yayılarak sadece inokule edilmiş yapraklarda değil üst yapraklarda da nekrotik lekeler oluşturmuştur (Şekil 4.7).

Şevik (2007), tarafından yapılan çalışmada, TSWV domates izolatu'nun bulaştırıldığı test bitkilerinde oluşan simptomlar ile bu çalışmadaki sonuçlar paralellik göstermiştir. *C. amaranticolor* bitkisine TSWV'nin domates izolatu'nun inokule edilmesi sonucunda nekrotik lekeler elde edilmiştir. Yapılan çalışmada test bitkisi olarak kullanılan *L. sativa*'da ise domates izolatlarının inokule edilmesi sonucunda hiçbir simptom elde edilememiş, diğer taraftan tütün bitkilerine yapılan inokulasyon sonucu mozayik ve nekrotik lezyonlar oluşmuştur.

Antignus ve ark. (1997), İsrail'de TSWV izolatlarının konukçu bitkideki reaksiyonlarını tespit etmek amacıyla yaptıkları çalışmada, TSWV izolatlarını test bitkilerine inokule etmişler ve bu inokulasyon sonucunda *C. quinoa*'da inokule edilen yapraklarda simptom oluşurken, sistemik olarak virüsün taşınmadığını belirlemişlerdir. *D. stramonium*, *L. esculentum*, *N. benthamiana* bitkilerinde sistemik olarak mozayik, inokule edilmiş yapraklarda ise lokal lezyon tespit etmişlerdir. *N. glutinosa*, *N. rustica* ve *P. hybridae* test bitkilerinde ise inokule edilen yapraklarda lokal lezyon saptamışlardır.

Sharman ve Persley (2006) tarafından, 2002 yılında Avustralya'nın güneyinde Virginia bölgesinde yapılan çalışmada elde edilen TSWV izolatları *N. benthamiana*'da ve *P. hybridae*'de sistemik olarak taşınarak mozayik oluşturmuş ve *N. glutinosa*'da ve *D. stramonium*'da ise nekrotik lokal lezyonla birlikte mozayik ve yaprakta şekil bozukluğu meydana getirmiştir.

Cho ve ark. (2009) tarafından Kore’de yapılan bir çalışma ile domates ve kırmızı biberden alınan izolatlar, konukçu bitkilere inokule edilerek test bitkilerinde oluşturduğu belirtiler teşhis edilmiştir. Domates izolatının *C. quinoa*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *N. tabacum* “Xanthi-nc” ve *C. sativus* ve *L. esculentum* bitkilerinde inokule edilen yapraklarda nekrotik ve klorotik lekeler oluşturduğu saptanırken, sistemik olarak ise nekrotik halkalı lekeler meydana getirdiği belirlenmiştir. Biber izolatının ise *C. quinoa*, *D. stramonium*, *N. rustica* test bitkilerinde inokule edilen yapraklarda nekrotik lekeler oluştururken, sistemik olarak şekil bozukluğu ve nekrotik lekelere sebep olduğu tespit edilmiştir.

TSWV, *in vitro* koşullarda stabil olmayan bir virüs olduğu için mekanik inokulasyon işleminde başarı oranı düşüktür. Bu çalışmada Cho ve ark. (2006)’nın önerdiği şekilde mekanik inokulasyon yöntemi +4°C’de uygulandığında ve kullanılan inokulum kaynağı 1/2 oranında (1 gr yaprak/2 mililitre tampon çözelti) sulandırıldığında inokulasyondan daha iyi sonuçlar alınmış ve hemen hemen her inokulasyon sonrasında sonuçların pozitif olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu tez çalışmasında mekanik inokulasyon uygulanan bitkiler inokulasyon işleminden 1 gece önce ve inokulasyondan hemen sonra 1 gece karanlıkta bekletildiğinde, inokulasyon işleminden daha iyi sonuçlar alındığı belirlenmiştir.

Domates, biber ve tütün izolatları mekanik inokulasyon yöntemi ile test bitkilerine inokule edildiğinde Ba-Ağ-Bi (1) izolatının domates ve tütün izolatlarına göre *L. sativa* “Batavia” ve *P. vulgaris* ”Balkız” bitkileri hariç diğer tüm test bitkilerinde simptom meydana getirdiği tespit edilmiştir. Bu durum izolatların DAS-ELISA testi sonuçlarındaki absorban değerleri ile paralellik göstermiştir. Araziden toplanan izolatları ELISA testi uygulandığında, Ba-Ağ-Bi (1) izolatının en yüksek absorban değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Yine aynı şekilde *N. glutinosa* bitkisinde Ba-Ağ-Bi (1) izolatu sistemik olarak mozayik oluştururken, diğer 2 izolatta ise mozayik tespit edilmemiştir. Ancak domates izolatında [Ba-Gü-Do (1)] toplu iğne başı büyüklüğünde sistemik nekrotik leke ve deformasyon, tütün izolatında [Al-Ka-Tü (1)] ise sistemik olarak daha iri nekrotik leke oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.11). Test bitkilerindeki farklılıklara ilave olarak, dayanıklı domates çeşitlerinde de farklı reaksiyonlar elde edilmiştir. Özellikle Ba-Ağ-Bi (1) izolatu dayanıklı çeşitlerin hepsinde inokule edilen yapraklarda HR (hipersensitif reaksiyon) sonucu nekrotik lokal lekeler oluşturmuştur (Şekil 4.18-4.21). Bu sonuçlar, Ba-Ağ-Bi (1) izolatının, tütün ve domates

izolatlarından farklı genetik karakterde olabileceğine işaret etmektedir. İzolatlar arasında biyolojik olarak farklılıklar tespit edilmiş olmasına karşın kesin bulgulara moleküler çalışmalar ile ulaşılabilir. TSWV izolatlarının kapsid protein (N) geninin baz dizi (sekans) analizi yapılırsa, bu konuda daha net sonuçlara ulaşılabilir.

TSWV'nin birçok konukçu bitkisi olması ve yayılmasında vektör tripsin büyük rol oynaması sebebiyle virüs kısa sürede salgın hale gelmektedir. Gerek yurt içinde, gerekse yurt dışında yapılan çalışmalar, vektör tripsin TSWV'nin yayılmasındaki önemini göstermektedir. Lavinia ve ark. (1996) tarafından İspanya'da domates, biber ve marul alanlarında yapılan çalışmada TSWV'nin üretimi önemli derecede sınırladığı tespit edilirken, hastalığın hızlı bir şekilde yayılmasında vektör *F. occidentalis*'in büyük rolü olduğu ve bitkilerde salgın oluşturduğu tespit edilmiştir. Gera ve ark. (2008) tarafından 1994-1998 yıllarında İsrail'de seralarda ve açık alanlarda yapılan sürveylerde TSWV'li bitkilerin olduğu ve hastalığın *F. occidentalis* tarafından yayıldığı tespit edilmiştir. Şevik, (2007) tarafından yapılan çalışmada, Samsun ilinde TSWV enfeksiyonunun belirlendiği alanlarda trips türü olarak *F. intonsa* ve *T. tabaci* tespit edilmiştir. Ayrıca bölgemizde 2009 yılında Çarşamba ilçesinde biber serasından alınan örnekler üzerinde *F. occidentalis* tespit edilmiştir (Sözlü görüşme, İ. Akça, 2009).

TSWV ile mücadelede tripsle etkili bir mücadelenin önemlidir. Ancak vektör tripse karşı yapılan uygulamalarda kimyasalların kullanımı trips popülasyonunun azalmasında çok etkili değildir. Diğer yöntemlerle virüsün kontrolü zor olduğu için TSWV ile mücadelede en etkili yöntemin dayanıklı çeşit kullanımı olduğu bildirilmektedir (Kang ve ark., 2005). Ancak son yıllarda gerek Samsun ilinden, gerekse domates üretiminde önemli olan Tokat ilinden gelen şikayetler ve test edilen örneklerde TSWV'ye oldukça sık rastlanması üzerine bu çalışmada dayanıklı domates çeşitlerinde TSWV'nin enfeksiyon oluşturup oluşturmadığı, Samsun ilinde TSWV'nin dayanıklılık kıran varyantlarının bulunup bulunmadığı araştırılmak istenmiştir. Bu amaçla, çeşit kataloglarında TSWV'ye dayanıklı olduğu belirtilen Logure RZ F1, Esin F1, Swanson F1 ve Petek F1 domates bitkilerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve PCR uygulaması ile *Sw-5b* genine spesifik fragment elde edilmiştir. Böylece bu çeşitlerin dayanıklı olduğu teyit edilmiştir.

Aramburu ve Marti (2003) tarafından, 2002 yılında İspanya'da Bodar olarak adlandırılan domates çeşidinden DNA ekstraksiyonu yapılmış ve PCR ile *Sw-5* geninin karakteristik bandı elde edilmiştir. Bu bant dayanıklı domates çeşidi Stevens'deki *Sw-5*

dayanıklılık geni ile karşılaştırılarak bu domates çeşidinin dayanıklılığı kesinleştirilmiştir. Dayanıklılığı ispatlanan bu domates çeşidine TSWV izolatları bulaştırıldığı bitkilerin % 30'unda TSWV'nin tipik belirtileri gözlenmiştir. Yapılan ELISA uygulaması ile enfekteli domates bitkilerinde TSWV'nin varlığı saptanmıştır.

Dayanıklı domates bitkilerinde *Sw-5* geninin etkisiyle virüsün giriş yaptığı yerden hızla yayılmasının engellenmesi için bu bitkiler TSWV'ye karşı hipersensitif savunma tepkisi (HR) oluşturmakta ve bunun sonucunda yapraklar üzerinde lokal lezyonlar meydana gelmektedir (Aramburu ve Rodriguez, 1999). Bu tez çalışmasında kullanılan 3 izolattın [Ba-Ağ-Bi (1), Al-Ka-Tü (1) ve Ba-Gü-Do (1)] dayanıklı çeşitlerin inokule edilen yapraklarında oluşturduğu nekrotik lekeler HR sonucu oluşmuş olan lekelerdir. Ba-Ağ-Bi (1) izolatu, inokule edilen dayanıklı çeşitlerin bütün tekrürlerinde nekrotik leke oluşturmuştur (Çizelge 4.3, Şekil 4.18-4.21).

Dayanıklı domates çeşitlerinde elde edilen belirtiler dayanıklılığın kırılması konusunda kesin bilgi veremeyeceği için hem inokule edilen yapraklar hem de üst yapraklar serolojik olarak ELISA ile test edilmiştir. Yapılan ELISA uygulaması ile Ba-Ağ-Bi (1) izolatu ile inokule edilen tüm domates çeşitlerinde inokule edilen yapraklarda TSWV enfeksiyonu tespit edilmiş ancak virüsün sistemik olarak üst yapraklara taşınmadığı saptanmıştır. Bu izolat ile elde edilen sonuç ilginç bulunmuştur. Çünkü Ba-Ağ-Bi (1) izolattının gerek örneklerdeki yüksek absorban değeri, gerekse kullanılan tüm test bitkilerinde belirtil oluşturması sebebiyle diğer 2 izolata göre daha virulent olabileceği düşünülmüştür. Fakat bu izolat sürpriz bir şekilde dayanıklı domates çeşitlerinin hiçbirisinde dayanıklılığı kıramamıştır.

Ba-Gü-Do (1) izolatu ise Logure RZ F1, Swanson F1 ve Petek F1 çeşitlerinin sadece birer tekrüründe HR oluşumuna sebep olmuştur. Dayanıklılığı 2 bitkide (Logure RZ F1 ve Petek F1) kırarak (Çizelge 4.3), en fazla sistemik enfeksiyona Ba-Gü-Do (1) izolatu neden olmuştur. Ancak bu izolat nekrotik leke oluşturduğu halde iki bitkide daha sonra dayanıklılığın kırılmasına sebep olmuştur. Al-Ka-Tü (1) izolatu ise sadece Esin F1 dayanıklı çeşidinde tek bir bitkide sistemik olarak taşınmayı başarmış, diğer 3 domates çeşidine dair hiçbir bitkide dayanıklılığı kıramamıştır. Hassas çeşit olarak kullanılan *L. esculentum* "Falcon" çeşidinde ise tüm TSWV izolatları hem inokule edilmiş yapraklarda, hem de üst yapraklarda ELISA ile belirlenmiştir.

Latham ve Jones (1998), Sw-5 dayanıklılık genini içeren *L. peruvianum*'un PI-128660R ve PI-128660S dayanıklı domates hatlarında 15 farklı TSWV izolatu ile yaptıkları dayanıklılık çalışmasında sadece 2 izolatu 752 bitkinin 22 tanesinde sistemik reaksiyon oluşturduğunu, diğeri 13 izolatu ise sadece inokule edilen yapraklarda nekrotik lekeler oluşturduğı ve dayanıklılığı kıramadığını belirlemişlerdir.

TSWV'ye karşı yüksek dayanıklılık gösteren *L. peruvianum*'a ait domates hatlarının (PI-126935, PI-126944, CIAPAN-16, PE-18 ve CIAPAN-17), 2 farklı TSWV izolatu ile inokule edilmesi sonucunda, PI-126935 ve PI-126944 hatlarında yüksek dayanıklılık tespit edilirken, CIAPAN-16, CIAPAN-17 hatlarında % 6.25 oranında dayanıklılığın kırıldığı belirlenmiştir (Rosello ve ark., 1999).

Thomas-Carroll ve Jones (2002), 17 farklı TSWV izolatu dayanıklı olan, Cougar, StevensxRodade, Tsw-10, Zodiac, Tex-019 domates çeşitlerine ve *L. chilense*'den üretilmiş SA-98-1, SA98-7 dayanıklı domates hatlarına inokule ettiği zaman tüm domates hatlarının sadece lokal olarak nekrotik lezyonlar oluşturduğunu ve dayanıklılığın kırılmadığını saptamışlardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile Samsun ilinde domates, biber ve tütün yetiştirilen alanlarda TSWV'nin varlığı biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak tespit edilmiştir. ELISA testi sonucunda tütün, biber ve domates örneklerinin % 6.8 oranında TSWV ile bulaşık olduğu saptanmıştır. TSWV bulaşıklık oranının ilçelere göre incelenmesi durumunda en fazla bulaşıklığın Alaçam (% 21.2) ilçesinde olduğu ve bunu sırasıyla Vezirköprü (% 9.6), Çarşamba (% 7.5) ve Bafra (% 6.3), ilçelerinin izlediği belirlenirken, Tekkeköy ilçesinde ise TSWV ile enfekteli bitki örneği bulunmadığı tespit edilmiştir.

Domates gerek sofralık, gereksede taze olarak tüketilebilen önemli bir sebze türü olup bölgemizde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bölgede geçimini bu üründen sağlayan üreticilerin TSWV'den şikâyetlerinin her geçen gün daha çok artması sebebiyle bölgede etkin bir kontrol yöntemi zorunlu hale gelmiştir. TSWV'nin kontrolünde trisplerle yapılan mücadele yeterince etkili olamadığı için bölgedeki üreticilere dayanıklı çeşit kullanımı önerilebilir. Ancak bu çalışma, TSWV'ye dayanıklılık için *Sw-5* geni dışında başka dayanıklılık kaynaklarının bulunmasına ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir. Bu çalışma, TSWV dayanıklılığının kırılması konusunda Türkiye'de yapılan ilk çalışma olması sebebiyle ayrıca bir öneme sahiptir. Bu çalışmada 4 farklı dayanıklı domates çeşidine TSWV'nin tütün, biber ve domates izolatları verilerek dayanıklılığın 2 izolat tarafından [Ba-Gü-Do (1) ve Al-Ka-Tü (1)] kırıldığı belirlenmiştir.

Bu tezde sınırlı sayıda izolat ile çalışılmış olmasına rağmen, TSWV izolatları arasında biyolojik farklılıkların olduğu ve buna bağlı olarak da dayanıklı çeşitlerin bu izolatlara değişik şekilde reaksiyon verebildiği ve *Sw-5* geninin etkisinin kırılabileceği gösterilmiştir. Ancak gelecekte bu konuda Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilecek olan TSWV izolatları ile daha detaylı moleküler çalışmaların yapılmasına gereksinim vardır.

Bu sonuçlara göre Samsun ilinde TSWV'nin dayanıklılık kıran varyantları tespit edilmiştir. Bütün izolatlar Swanson F1 çeşidinde sistemik reaksiyon oluşturmamış, yani bu çeşitte dayanıklılığı kıramamıştır. Bu çeşide ait daha fazla sayıda bitkiyle TSWV izolatlarının yeniden denenmesi yerinde bir yaklaşım olacaktır. Bu detaylı çalışma sonucunda Swanson F1 çeşidinde dayanıklılığının kırılmaması söz konusu olursa bölge

üreticilerine TSWV'ye dayanıklı çeşit olarak Swanson F1 önerilebilir. Böylece virüsün zarar oranı azaltılarak hem bölge hem de ülke ekonomisine katkı sağlanabilir. Ayrıca elde edilen bu TSWV izolatları gelecekte farklı domates genotiplerinde yeni dayanıklılık kaynaklarının araştırılması için kullanılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Abak, K., Daşgan, H.Y., Sarı, N., 2000.** Güneydoğu Anadolu Bölgesinde domates yetiştiriciliği. TÜBİTAK, TARP Yayınları, Adana. S: 25.
- Adkins, S., 2000.** Tomato spotted wilt virus-positive steps towards negative success. *Molecular Plant Pathology*, 1(3),151-157.
- Akça, İ., 2009.** Sözlü görüşme, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Samsun, iakca@omu.edu.tr
- Antignus, Y., Lapidot, M., Ganaim, N., Cohen, J., Lachman, O., Pearlsman, M., Raccah, B., Gera, A., 1997.** Biological and molecular characterization of *Tomato spotted wilt virus* in İsrail. *Phytoparasitica*, 25 (4), 319-330.
- Aramburu, J., Rodriguez, M., 1999.** Evaluation of commercial *Lycopersicon esculentum* hybrids for resistance to *tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV) in Spain. *J. Hort. Sci. Biotechnol.*, 74, 743-747.
- Aramburu, J., Rodriguez, M., Arino, J., 2000.** Effect of Tomato spotted wilt virus (TSWV) infection on the fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants of cultivars carrying the *Sw-5* gene. *J. Phytopathol.*, 148: 569-574.
- Aramburu, J., Marti, M., 2003.** The occurrence in north-east Spain of a variant of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the *Sw-5* gene. *Plant Pathol.*, 52, 407-407.
- Arlı-Sökmen, M., Mennan, H.,Şevik, M. A., Ecevit, O., 2005.** Occurrence of viruses in field- grown pepper crops and some of their reservoir weed hosts in Samsun, Turkey. *Phytoparasitica*, 33 (4), 347-358.
- Avila, Y., Stavisky, J., Hague, S., Funderburk, J., Reitz, S., Momol, T., 2006.** Evaluation of *Frankliniella bispinosa* (Thysanoptera: Thripidae) as a vector of the *Tomato spotted wilt virus* in pepper. *Florida Entomologist*, 89 (2), 204- 207.
- Azeri, T., 1994.** Detection of *Tomato spotted wilt virus* in tobacco and tomato cultivars by ELISA. *J. Turkish Phytopathol.*, 23 (1), 37-46.
- Ben Moussa, A., Makni, M., Marrackhi, M., 2008.** Identification of the principal viruses infecting tomato crops in Tunisia. *Eppo Bulletin*, 30 (2), 293-296.

- Boiteux, L.S., Giordano L de B., 1993.** Genetics basis of resistance against two Tospovirus species in tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Euphytica*, 71, 151-154.
- Boiteux, L.S., Nagata, T., Dutra., W.P., Fonseca, M.E.N., 1993.** Sources of resistance to *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) in cultivated and wild species of *Capsicum*. *Euphytica*, 67, 89-94.
- Boiteux, L.S., de Avila, A.C., 1994.** Inheritance of a resistance specific to *tomato spotted wilt tospovirus* in *Capsicum chinense* "PI-159236". *Euphytica*, 75, 139-142.
- Boiteux, L.S. 1995.** Allelic relationships between genes for resistance to *tomato spotted wilt tospovirus* in *Capsicum chinense*. *Theoretical and Applied Genetics*, 90, 146-149.
- Bozdoğan, V., 2009.** Antalya İlinde Domates, Biber ve Marul Yetiştirilen Alanlarda Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (*Tomato Spotted Wilt Virus*)'ünün Saptanması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana, 65s.
- Canady, M.A., Stevens, M.R., Borineao M.S., Scott, J.W., 2001.** *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) resistance in tomato derived from *Lycopersicon chilense* Dun. LA 1938. *Euphytica*, 117, 19-25.
- Cebolla-Cornejo, By J., Soler, S., Gomar, B., Soria, M.D., Nuez, F., 2003.** Screening *Capsicum* germplasm for resistance to *tomato spotted wilt virus* (TSWV). *Ann. Appl. Biol.*, 143, 143-152.
- Chapman, E. J., Hilson, P., German, T.L., 2003.** Association of L protein and in vitro *Tomato spotted wilt virus* RNA-dependent RNA-polymerase activity. *Intervirology*, 46: 177-181.
- Chatzivassiliou, E. K., Nagata, T., Katis, N.I., Peters, D., 1999.** Transmission of *Tomato.spotted wilt virus* by *Thrips tabaci* populations originating from leek. *Plant Pathology*, 48, 700-706.
- Chatzivassiliou, E. K., Weeks, R., Morris, J., Wood, K.R., Barker, I., Katis, N.I., 2000.** Tomato spotted wilt virus (TSWV) in Greece: its incidence following the expansion of *Franklinella occidentalis* and characterisation of isolates collected from various hosts. *Ann. Appl. Biol.*, 137, 127-134.

- Chatzivassiliou, E. K., Boubourakas, I., Drossos, E., Eleftherohorinos, I., Jenser, G., Peters, D., Katis, N.I., 2001.** Weeds in greenhouses and tobacco fields are differentially infected by Tomato spotted wilt virus and infested by its vector species. *Plant Disease*, 85, 40-46.
- Chatzivassiliou, E.K, Peters, D., Katis, N.I., 2007.** The role of weeds in the spread of TSWV by thrips *tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) in Tobacco Crops. *J. Phytopathology*, 10, 1434-1439.
- Cho, J.J., Mau, R. F. L., Gonsalves, D., Mitchell, W.C., 1986.** Reservoir weed hosts of *Tomato spotted wilt virus*. *Plant Disease*, 70, 1014-1017.
- Cho, J.J., Mitchell, W.C., Mau, R.F.L., Sakimura, K., 1987.** Epidemiology of *Tomato spotted wilt virus* disease on crisphead lettuce in Hawaii. *Plant Disease*, 71, 505-508.
- Cho, J.J., Mau, R.F.L., German, T.L., Hartmann, R.W., Yudin, L.S., Gonsalves, D., Provvidenti, R., 1989.** A Multidisciplinary approach to management of *Tomato spotted wilt virus* in Hawaii. *Plant Disease*, 73, 375-383.
- Cho, J.J., Custer, D.M., Brommonschenkel, S.H., Tanksley, S.D., 1996.** Conventional breeding: host-plant resistance and use of molecular markers to develop resistance to *tomato spot wilt virus* in vegetables. *Acta Hortic*, 431, 367-378.
- Cho, J.J., Kim, D.S., Kim, H.R., Chung, B.N., Ryu, K.H., 2006.** Convenient nucleic acid detection for *Tomato spotted wilt virus*; Virion captured / RT-PCR (VC/RT-PCR). *Res. Plant Dis.*, 12, 139-143.
- Cho, J.D., Kim, J.S., Choi, G.S., Chung, B.N., 2009.** Biological Characteristics and Nucleotide Relationships in Korean *Tomato spotted wilt virus* isolates. *Plant Pathology. J.*, 25 (1), 26-37.
- Ciuffo, M., Finetti- Sialer, M.M., Gallitelli, D., Turina, M., 2005.** First report in Italy of a resistance breaking strain of *Tomato Spotted Wilt Virus* infecting tomato cultivars carrying the Sw-5 resistance gene. *Plant Pathology*, 54 (4), 564.
- Clark, By M.F., ve Adams, A.N., 1977.** Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34, 475-483.

- Csinos, A.S., Pappu, H.R., McPherson, R.M., Stephenson, M.G., 2001.** Management of *Tomato spotted wilt virus* in flue-cured tobacco with acibenzolor S methyl and imidacloprid. *Plant Disease*, 85, 292-296.
- Culbreath, A.K., Csinos, A.S., Bertrand, P.F., Demski, J.W., 1991.** *Tomato spotted wilt virus* epidemic in flue-cured tobacco in Georgia. *Plant Disease*, 75, 483-485.
- Culbreath, A.K., Todd, J.W., Brown, S.L., Baldwin, J.A., Pappu, H.R., 1999.** A genetic and agricultural “package” approach for management of *Tomato spotted wilt virus* in peanut. *Biological and Cultural Tests for Control of Plant Disease*, 14, 1-8.
- Çota, E., Merkuri, J., 2005.** Introduction of *Frankliniella occidentalis* and occurrence of *Tomato spotted wilt tospovirus* in Albania. *EPPO Bulletin*, 34, 421-422.
- De Borbon, C.M., Gracia, O., Piccolo, R., 2006.** Relationships between Tospovirus incidence and thrips populations on tomato in Mendoza, Argentin. *J. Phytopathology*, 154, 93-99.
- De Haan, P., Ultzen, T., Prins, M., Gielen, J., Goldbach, R., Van Grinsven, M., 1996.** Transgenic tomato hybrids resistant to *tomato spotted wilt virus* infection. *Acta Hortic.* 431, 417-426.
- Demirsoy, A., 1990.** *Yaşamın temel kuralları Omurgasızlar/Böcekler Entomoloji* (CiltII/KısımII), 2. baskı, s:524-526, Ankara.
- Diez, M.J., Nuez, F., Jorda, C., Juarez, M., Ortega., A., 1993.** Búsqueda de fuentes de resistencial virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*) para la mejora del tomate y del pimiento. *Actas de Horticultura*, 10, 1286-1291.
- Edwardson, J. R., Christie, R.G., 1986.** *Tomato spotted wilt virus*. In: (eds), *Viruses Infecting Forage Legumes* University of Florida, Gainesville, FL., 3, 563-580.
- Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C., 1991.** A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Acids research*, 19 (6), 1349.
- FAO, 2007.** <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (24.06.2009)
- Fidan, Ü., 1995.** Virus disease of vegetables in Greenhouses in İzmir and Muğla. *J. Turkish Phytopathology*, 24 (1), 7-14.

- Finetti Sailer, M.M., Lanave, C., Padula, M., Vovlas, C., Gallitelli, D., 2002.** Occurrence of two distinct *Tomato spotted wilt virus* subgroups in southern Italy. *Journal of Plant Pathology*, 84 (3), 145-152.
- Garland, S., Sharman, M., Persley D., McGreath, D., 2005.** The development of an improved PCR-based marker system for Sw-5 an important TSWV resistance gene of tomato *Australian Journal of Agricultural Research*, 56 (3), 285-289.
- Gera, A., Kritzman, A., Cohen, Raccah, B., Antignus., 2008.** Tospoviruses infecting vegetable crops in Israel. *Eppo Bulletin*, 30(2), 289-292.
- German, T.L., Ullman, D.E., Moyer, J.W., 1992.** Tospovirus: Diagnosis, Molecular Biology, Phylogeny and Vector Relationships. *Ann. Rev. Phytopathology*, 30, 315-348.
- Gitaitis, R.D., Dowler, C.C., Chalfant, R.B., 1998.** Epidemiology of *Tomato spotted wilt virus* in pepper and tomato in Southern Georgia. *Plant Disease*, 82, 752-756.
- Goldbach, R.W., Peters, D., 1994.** Possible causes of the emergence of Tospoviruses diseases. *Seminars in Virology*, 5, 113-120.
- Golnaraghi, A.R., 2001.** First Report of *Tomato Spotted Wilt Virus* on Soybean in Iran. *Plant Disease*, 85 (12), 1290.
- Gracia, O., de Borbon, C.M., Granvel de Millan, N., Cuesta, G.V., 1999.** Occurrence of different Tospovirus in vegetable crops in Argentina. *Journal of Phytopathology*, 147, 223-227.
- Griep, R. A., Prins, M., van Twisk, C., Keller, J.H.G., Kerschbaumer, R.J., Kormelink, R., Golbach, R.W., Schots, A., 2000.** Application of Phage display in selecting *Tomato spotted wilt virus* –Specific single –Chain antibodies (scFvs) for sensitive diagnosis in ELISA. *Phytopathology*, 90, 183-190.
- Groves, R.L., Walgenbach, J.F., Moyer, J.W., Kennedy, G.G., 2002.** The role of weeds hosts and tobacco thrips, *Frankliniella fusca*, in the epidemiology of *Tomato spotted wilt virus*. *Plant Disease*, 86, 573-582.
- Güldür, M.E., Marchoux, G., Yürütmen, M., Yılmaz, M.A., 1995.** Mersin ve çevresinde yetiştirilen domateslerde zararlı yeni bir virüs: *Tomato spotted wilt virus*. *Türkiye VII. Fitopatoloji Kongresi*, 26-29 Eylül, Adana, s: 303-305.
- Günay, A., 1992.** Özel sebze yetiştiriciliği, Cilt IV. A.Ü. Yayınları s:103.
- Hatalo, I. Z., Kiss, E.F., 2008.** Control of *F. occidentalis* and TSWV in capsicum crops in Hungary. *EPPO Bulletin*, 29 (1-2), 63-67.

- Herrero, S., Culbreath, A.K., Csinos, A.S., Pappu, H.R., Ruffhy, R.B., Daub, M.E., 2000.** Nucleocapsid gene-mediated transgenic resistance provides protection against *Tomato spotted wilt virus* epidemics in the field. *Phytopathology*, 90, 139-147.
- Hobbs, H.A., Black, L.L., Johnson, R.R., Valverde, V.A., 1994.** Differences in reactions among *tomato spotted wilt virus* isolates to three resistant *Capsicum chinense* lines. *Plant Disease*, 78, 1220.
- Hoffmann, K., Geske, S.M., Moyer, J.W., 1998.** Pathogenesis of *Tomato spotted wilt virus* in peanut plants dually infected with Peanut mottle virus. *Plant Disease*, 82, 610-614.
- Holcomb, G.E., Valverde, R.A., 2000.** First Report of *Oidium* spp. Powdery Mildew and *Tomato Spotted Wilt Virus* on *Melampodium divaricatum*. *Plant Disease*, 84:1152.
- Holguin Pena, R.J., Rueda Puente, E.O., 2007.** Detection of *Tomato Spotted Wilt Virus* in Tomato in the Baja California Peninsula of Mexico. *Plant Disease*, 91 (12), 1682.
- Hristova, D., Karadjova, O., Yankulova, M., Heinze, C., Adam, G., 2001.** A survey of Tospoviruses in Bulgaria. *Journal of Phytopathology*, 149, 745-749.
- Inoue-Nagata, A.K., Kormelink, R., Nagata, T., Kitajima, E.W., Goldbach, R., Petters, D., 1997.** Effects of temperature and host on the generation of *Tomato spotted wilt virus* defective interfering RNAs. *Phytopathology*, 87, 1168-1173.
- Jain, R.K., Pappu, S.S., Culbreath, H.R., Tood, J.W., 1998.** Molecular Diagnosis of *Tomato Spotted Wilt Virus* Infection of Peanut and Other Field and Greenhouse Crops *Plant Disease*, 82, 900-904.
- Johnson, R.R., Black, L.L., Hobs, H.A., Valverde, R.A., Story, R.N., Bond, W.P., 1995.** Association of *Frankliniella fusca* and three winter weeds with *Tomato spotted wilt virus* in Louisiana. *Plant Disease*, 79, 572-576.
- John, M., Para, L., Hoffmann, K., Radvanski, E.R., Livingstone, K.D., Grube, R.J., Aftergoot, E., Lapidot, M., Moyer, J., 2000.** Genetic mapping of the Tsw locus for resistance to the *tospovirus tomato spotted wilt virus* in *Capsicum* spp. And its relationship to the Sw-5 gene for resistance to the same pathogen in tomato. *Molecular Plant –Microbe Interactions*, 13, 673-682.

- Kang, B. C., Yeam, I., Jahn, M.M., 2005.** Genetics of plant virus resistance. *Annu.Rev. Phytopathol*, 43, 581-621.
- Katis, N., Avgelis, A., 1991.** *Tomato spotted wilt virus*: New threat for tomato and pepper crops in Northern Greece. Proceedings of the 15 th Scientific Meeting of the Greek Society of Horticulture, 69.
- Kormelink, R, de Haan, P., Meurs, C., Peters D., Goldbach, R., 1992.** The nucleotide sequence of the M RNA segment og tomato spotted wilt virus , a bunyavirus withtwo ambisense RNA segments. *J. Gen. Virol.* 73, 2795-2804.
- Kormelink, R., 2005.** Tomato spotted wilt virus AAB Descriptions of Plant Viruses, No: 412.
- Krishna-Kumar, N.K., Ullman, D.E., Cho, J.J., 1993.** Evaluation of *lycopersicon* germplasm for *Tomato spotted wilt tospovirus* resistance by mechanical and Thrips transmission. *Plant Disease*, 77, 938-941.
- Küçük, B., 2006.** Adana ve Mersin illerinde Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (*Tomato Spotted Wilt Virus*)’ünün değişik yöntemlerle saptanması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 72 S.
- Latham, L. J., Jones, R.A.C., 1998.** Selection of resistance breaking strains of *Tomato Spotted Wilt Tospovirus*. *Ann.Appl. Biol.*, 133, 385- 408.
- Lavina, A., Aramburu, J., Moriones, E., 1996.** Occurence of *Tomato spotted wilt virus* in field-grown *tomato spotted wilt virus* and cucumber mosaic viruses and associated weeds in northeastern Spain. *Plant Pathology*, 45, 837-842.
- Lima, G.S. de A., Lau D., Picoli, E. A. De T., Assuncao, I.P., Brommonschenkel, S.H., Otoni, W.C., 2002.** Eggplant reaction four tospovirus species. *Summa phytopathologica*, 28 (3), 242-247.
- Mandal, B., Pappu, H.R., Culbreath, A.K., Holbrook, C.C., Garbet, D.W., Tood, J.W., 2002.** Differential Response of Selected Peanut (*Arachishypogea*) Genotypes to Mechanical İnoculation by TSWV. *Plant Disease*, 86, 939-944.
- Marchoux, G., Gebre, K., Villevieille, M., 1991.** Detection of Tomato spotted wilt virus and transmission by *Frankliniella occidentalis* in France. *Plant Pathology*, 40, 347-351.

- Margaria, P., Ciuffo, M., Turina, M., 2004.** Resistance breaking strain of TSWV *Tospovirus*, (Bunyaviridae) on resistant pepper cultivars in Almeria Spain. *Plant Pathology*, 53, 795.
- Maris, P., 2004.** Evaluation of thrips resistance in pepper to control *Tomato spotted wilt virus* infection. Thesis Wageningen University, 90-8504-002-7.
- Matsura, S., Hoshino, S., Hayashi, H., Kohguchi, T., Hagiwara, K., Omura, T., 2002.** Effects of latent infection of stock plants and abundance of Thrips on the occurrence of *Tomato spotted wilt virus* in Chrysanthemum Fields. *J. Gen. Plant Pathol.*, 68, 99-102.
- Mau, R.F.L., Martin, J.L., 2002.** *Frankliniella occidentalis* (Pergande) Western Flower Trips. www.Extentohawai.edu/kbase/crop/type/f-occid.html
- Mau, R.F.L., Martin, J.L., 2007.** Thrips *tabaci* (Lindeman) www.extentohawai.edu/kbase/crop/type/t_tabaci.html
- McPherson, R.M., Beshear, R.J., Culbreath, A.K., 1992.** Seasonal abundance of thrips (Thysanoptera: Thripidae and Tubulifera) in Georgia flue-cured tobacco and impact of management practices on the incidence of TSWV. *Journal of Entomological Science*, 27, 257-268.
- Mertelik, J., Mokra, V., 1998.** *Tomato spotted wilt virus* in ornamental plants, vegetables and weeds in the Czech Republic. *Acta Virologica*, 42, 347-351.
- Momol, M.T., 2000.** First Report of TSWV Habanero and Tabasco Peppers in Florida. *Plant Disease*, 84 (10), 1154.
- Momol, M.T., Funderburk, J.E., Olson, S., Stavisky, J., 2002.** Management of TSWV on tomatoes with UV-reflective mulch and acibenzolor-S-methyl. Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the VII. International Symposium on Thysanoptera. Reggio Calabria, Italy, 111-116.
- Momol, M.T., Olson, S., Funderburk, J.E., Stavisky, J., Morois, J.J., 2004.** Integrated Management of *Tomato spotted wilt virus* on tomatoes. *Plant Disease*, 88, 882-890.
- Moreno, A., Blas, De C., Biurrun, R., Nebreda, M., Palacios, I., Duque, M., Fereres, A., 2003.** The incidence and distribution of viruses infecting lettuce, cultivated Brassica and associated natural vegetation in Spain. *Annals of Applied Biology*, 144, 339-346.

- Mound, L.A., 2001.** So many thrips – so few tospoviruses. Thrips and Tospoviruses : Proceedings of the VII. International Symposium on Thysanoptera. Reggio Calabria, Italy, 15-18.
- Moyer, W.J., 2006.** Genetics and Adaptation of TSWV to Single Gene Resistance. North Carolina State University, 21. Annual Tomato Diseases Workshop Nov. 9-10, MHREC.
- Mumford, R.A., Barker, I., Wood, K.R., 1996.** The Biology of Tospoviruses. Ann. Appl. Biology, 128, 159-183.
- Murphy, F.A., Fauquet, G.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 of Taxonomy of viruses. Archives of virology, Supplement 10. New York: Springer-Verlag, Wien. 586.
- Murphy, G., Ferguson, G., Shipp, L., 2004.** Biology of thrips in greenhouse crops. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Canada. Factsheet, 1-9.
- Nagata, T., Almedia, A.C.L., De Resende, R.O., De Avila, A.C., 2002.** The transmission specificity and efficiency of tospoviruses: Marullo R., Mound, L.A., (eds), Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the VII. International Symposium on Thysanoptera. Canberra, Australian National Insect Collection, 45-46.
- Nuez, F., Diez, M.J., Rosello, S., Lacasa, A., Jorda, C., Martin, M., Costa, J., 1994.** Genetic resistance to TSWV (*tomato spotted wilt virus*) in *Capsicum* spp. *Capsicum Newsletter*, 13, 86-87.
- Ochoa, M.D.L., Zavaleta-Mejia, E., Johansen, N.R.M., Herrera, G.A., Cardenas, S.E., 1996.** Effect of using certified virus- free cuttings, mulching and floating row covers on chrysanthemum production and incidence of Tospovirus. *International Journal of Pest Management*, 42, 161-164.
- Ohnishi, J., Knight, L.M., Hosokawa, D., Fujisawa, I., Tsuda, S., 2001.** Replication of *Tomato spotted wilt virus* after ingestion by adult thrips setosus is restricted to midgut epithelial cells. *Phytopathology*, 91, 1149-1155.
- Okuda, M., Hanada, K., 2001.** RT-PCR for detecting five distinct Tospovirus species using degenerate primers and ds RNA template. *Journal of Virological Methods*, 96, 149-156.

- Özcan, S., 2001.** Bitki Biyoteknolojisi Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları II, Virüslere Dayanıklı Bitki Yetiştirilmesi (Editörler: Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M.) (S. 456).
- Özdemir, S., Erilmez, S., Kaçan, K., 2007.** Türkiye'nin Denizli İlinde Bazı Yabancı otlar ve Domates Ürünü Üzerinde TSWV'nin Ortaya Çıkışı. ISHS Acta Horticulturae 808: II. International Symposium on Tomato Diseases (8- 12 Ekim, 2007).
- Öztürk, P., 2007.** Doğu Akdeniz Bölgesinde Yetiştirilen Yerfıstıklarında Zararlı Virüs Hastalıklarının Saptanması ve Tanılanması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, Adana, 54 s.
- Pappu, S.S., Bhat, A.I., Pappu, H.R., Deom, C.M., Culbreath, A.K., 2000.** Phylogenetic studies of tospoviruses (Family: Bunyaviridae) based on intergenic region sequences of small and medium genomic RNAs. Archives of Virology, 145, 1035-1045.
- Peters, S.D., 2004.** Tospoviruses a threat to intensive agriculture in the tropics. In: Loebenstein G, Thottapilly G (eds), virus and virus- like diseases of major crops in developing countries. Dordrecht, Netherlands, 719-742.
- Polston, J.E., Anderson, P.K., 1997.** The emergence of whitefly-transmitted Geminiviruses in tomato in the western Hemisphere. Plant Disease, 81, 1358-1369.
- Prins, M.M., Goldbach, R., 1998.** The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. Trends in microbiology, 6, 31-35.
- Rautapoa, J., 2008.** Eradication of *Frankliniella occidentalis* and *tomato spotted wilt virus* in Finland a case study on casts and benefits. EPPO Bulletin, 22 (3), 545-550.
- Riley, D., 2004.** Thrips and tomato spotted wilt management in tomato a cost effective IPM program. Georgia IPM. On-line [http:// www.gaipm.org/vegetable/thripstswv.html](http://www.gaipm.org/vegetable/thripstswv.html).
- Roditakis N.E., 1991.** First record of *Frankliniella occidentalis* in Greece. Entomologia Hellenica, 9, 77-79.
- Roggero.P., Pennazia., S., Masenga, V., Tavella, L., 2002.** Resistance to tospoviruses in pepper. Thrips and tospoviruses: Proceedings of the 7 th. International

Symposium on Thysanoptera (CD-ROM). ANIC, Canberra pp. 105-110 (2-7 July 2001). Italy..

- Roja, E., Aramburu, J., Moriones, E., 1997.** Comparative host reactions and *Frankliniella occidentalis* transmission of different isolates of tomato spotted wilt tospovirus from Spain. *Plant Pathology*, 46, 407-415.
- Rosello, S., Diez, M.J., Nuez, F., 1996.** Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop.I. The *Tomato spotted wilt virus*-a review.*Scienta Horticulturae*, 67, 117-150.
- Rosello, S., Diez, M.J., Jorda, C., Nuez, F., 1997.** Utilization of *Capsicum* sp. Resistance to TSWV in pepper breeding. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 16, 87-90.
- Rosello S., Diez, M.J., Nuez, F., 1998.** Genetics of *tomato spotted wilt virus* resistance coming from *Lycopersicon peruvianum*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 104, 499-509.
- Rosello, S., Soler., S., Diez, M.J., Rambla., J.L., Richarte, C., Nuez, F., 1999.** New sources for high resistance of tomato to the *tomato spotted wilt virus* from *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Breeding*, 118, 425-429.
- Ryals, J.A., Nevenschwander, U.H., Willits, M.G., Malina, A., Steiner, H.Y., Hunt, D., 1996.** "Systemic Acquired Resistance". *Plant Cell*, 8, 1809-1819.
- Sadof, C. S., Cloyd, R.A., 1993.** Ornamental insects: Western Flower Thrips. E-110, Purdue University Cooperative Extension Service. 1-4.
- Salomone, A., Masenge, V., Minuto, G., Parodi, C., Roggero, P., 2003.** First report of *Tomato spotted wilt virus* (Tospovirus, Bunyaviridae) infecting *Euphorbia eritrea* and *Asclepias curassavica* in Liguria, Italy. *Plant pathology* , 52, 806.
- Sherwood, J., 2005.** The university of Georgia (College of Agricultural Enviromental Sciences) Tospoviruses in Solanecaea and other crops in The coastal plain of Georgia. Research Report Number 704, December.
- Sharman, M., Persley, D.M. 2006.** Field isolates of *Tomato spotted wilt virus* overcoming resistance in capsicum in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 35, 123-128.
- Sikora, E. J., Gudauskas, R.T., Murphy, J.F., Porch, D.W., Andrianifahanana, M., Zehnder, G.W., Bauske, E.M., Kemble, J.M., Lester, D.F., 1998.** A multivirus epidemic of tomatoes in Alabama. *Plant Disease*, 82, 117-120.

- Snippe, M., Borst, J.W., Goldbach, R., Kormelink, R., 2007.** *Tomato spotted wilt virus* Gc and N proteins interact in vivo. *Virology*, 357, 115-123.
- Soler, S., Diez, M.J., Nuez, F., 1998.** Effect of temperature regime and growth stage interaction on pattern of virus presence in TSWV-resistant accessions of *Capsicum chinense*. *Plant Disease*, 82, 1199-1204.
- Stevens, M. R., Scott, S.J., Gergerich, R.C., 1992.** Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica*, 59, 9-17.
- Stevens, M., Scott, R., Gergerich, S.J., 1994.** Evaluation of seven *Lycopersicon* species for resistance to *tomato spotted wilt virus* (TSWV). *Euphytica*, 80, 79-84.
- Stevens, M. R., Lamb, E.M., Rhoads, D.D., 1995.** Mapping the SW-5 locus for *tomato spotted wilt virus* resistance in tomatoes using RAPD and RFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 90, 451-456.
- Stumpf, C.F., Kennedy, G.G., 2005.** Effects of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) isolates, host plants, and temperature on survival, size and development time of *Frankliniella fusca*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 114, 215-225.
- Şevik, M.A., 2007.** *Domates Lekeli Solgunluk Virüsü* (TSWV)'nün Samsun ilinde Domates Üretim Alanlarındaki Yayılım Durumunun ve Bazı Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Ondokuzmayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, Samsun, 100s.
- Takeda, A. K. Sugiyama, Nagano, H., 2002.** Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of tomato spotted wilt virus. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters*, 532, 75-79.
- Tekinel, N., Dolar, M.S., Sağsöz, S., Salcan, Y., 1969.** Mersin bölgesinde ekonomik bakımdan önemli bazı sebzelerin virüsleri üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 9(1), 37-49.
- Tekinel, N., 1973.** Adana, Antalya, Hatay ve İçel illerinde domates virüs hastalıklarının yayılım alanlarının ve oranlarının tespiti üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 13(3), 107-141.
- Tescari, E., Alessandro, M.D., Vieri, L., 2004.** Laser: A new insect control agent containing spinosad, a mix of two natural metabolites, active against the main pests of strawberry and small fruits. *Acta Horticulture*, 649, 265-272.

- Thomas-Carroll, B. M. L., Jones, R.A.C., 2002.** Selection, biological properties and fitness of resistance-breaking strains of *Tomato spotted wilt virus* in pepper. Crop Improvement Institute, Department of Agriculture, Locked Bag No. 4, Bentley Delivery Centre Western Australia 6983. Ann. App. Biol., 142, 235-243.
- Thompson, G. J., van Zijl, J.J.B., 1996.** Control of *tomato spotted wilt virus* in tomatoes in South Africa Acta Hort, 431, 379- 384.
- Todd, J.W., Culbreath, A.K., Rogers, D., Demski, J.W., 1994.** Contra indications of insecticide use relative to vector control for spotted wilt disease in peanut. Proc. Am. Peanut Res. Educ. Soc., 26, 42.
- Todd, J.W., Culbreath, A.K., Gorbet, D.W., Shokes, F.M., Brown, S.L., Pappu, H.R., 2002.** www.bspp.org.uk/icpp98/3-1/22html.
- Tör, M., 1998.** Bitkilerde moleküler konukçu-patojen ilişkilerindeki son gelişmeler. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Antalya, Türkiye. Tr. J. of Biology, 22, 271-285.
- Tsompana, M., Abad, J., Prugganan, M., Moyer, J.W., 2005.** The molecular population genetics of the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) genome. Molecular Ecology, 14, 53-66.
- Turhan, P., Korkmaz, S., 2006.** Tarım Bilimleri Dergisi, 12 (2), 130-136.
- Uhrig, J.F., Soellick, T.R., Minke, C.J., Philipp, C., Kellmann, J.W., Schreier, P.H., 1999.** Homotypic intercation and multimerization of nucleocapsid protein of Tomato spotted wilt tospovirus: Identification and characterization of two interacting domains. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 96, 55-60.
- Ullman, D.E., Cho, J.J., Mau, R.F.L., Westcot, D.M., Custer, D.M., 1992.** A midgut barrier to tomato spotted wilt virus acquisition by adult western flower thrips. Phytopathology, 82, 1333-1342.
- Ullman, D.E., Sherwood, J.L., German, T.L., 1997.** Thrips as vectors of plant pathogens. Thrips as Crop Pests (ed by T. Lewis), 539-565.
- Ullman, D.E., Meideros, R., Campell, L.R., Whitfield, A.E., Sherwood, J.L., 2002.** Thrips as vectors of Tospoviruses In: Advances in Botanical Research (ed. Plumb R), 113-140.
- Uygun, N., 2006.** Sebze Zararlıları. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders kitapları. No:213., 200 S.

- Van Zijl, J.J. B., Bosch, S.E., Coetzee, C.P.J., 1986.** Breeding tomatoes for processing in South Africa. *Acta Hortic*, 194, 69-74.
- Vaira A.M., Roggero, P., Luisoni, E., Masenga, V., Milne, R.G., Lisa, V., 1993.** Characterization of two tospoviruses in Italy; *tomato spotted wilt* and *impatiensnecrotic spot*. *Plant pathology*, 42, 530- 42.
- Verwoerd T.C., Dekker, B.M.M., Hoekema, A., 1989.** A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic acids research* , 7 (6), 2362.
- Vural, H., Eşiyok, D., Duman, İ., 2000.** *Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme)*. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir. s: 365.
- Wangai, A.W., Mandal, B., Pappu, H.R., Kilonzo, S., 2001.** Outbreak of *Tomato Spotted Wilt Virus* in Tomato in Kenya. *Plant Disease*, 85, 1123.
- Whitfield, A.E., Ullman, D.E., German, T.L., 2005.** Tospovirus-Thrips Interactions. *Ann.Review of Phytopathology*, 43, 459-494.
- Wijkamp, I., Peters, D., 1993.** Determination of the median latent period of two tospoviruses in *Frankliniella occidentalis* using a novel leaf disk assay. *Phytopathology*, 83, 986-991.
- Williams, L.V., Lambartini, P.M.L., Shahara, K., Biderbost, B.E., 2001.** Occurrence and geographical distribution of tomato crops in Argentina. *Plant Disease*, 85, 1227-1229.
- Wilson, C.R., 1998.** Incidence of weed reservoirs and vectors of Tomato spotted wilt tospovirus on southern Tasmanian lettuce farms. *Plant Pathology*, 47, 171-176.
- Yılmaz, M.A., Baloğlu, S., Özaslan, M., Güldür, M.E., 1995.** GAP bölgesinde kültür bitkilerinden belirlenen virüsler. GAP Bölgesi Bitki Koruma Sorunları ve Çözüm Önerileri Sempozyumu, Şanlıurfa, Türkiye, 241-250.
- Yoneyema, S., 1980.** Occurence of spotted wilt disease in pepper (in Japanese). *Crop Prot.*, 34, 151-154.
- Yudin, L. S., Cho, J.J., Mitchell, W.C., 1986.** Host range of western flower thrips , *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), with special reference to *Leucaena glauca*. *Environ. Entom.*, 15, 1292-1295.
- Zitter, T.A., Daughtrey, M.L., Sanderson, J.P., 1989.** *Vegetable Crops: Tomato spotted wilt virus*, Fact Sheet, 735.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Havva YILDIRIM

Doğum Yeri: Samsun

Doğum Tarihi: 01.09.1980

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu:

-1994-1997 Ondokuzmayıs Lisesi

-1999-2001 Ondokuzmayıs Üniversitesi Bafra Meslek Yüksekokulu

-2002-2005 Ondokuzmayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi

-2005-.....Ondokuzmayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü / Ziraat

Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

Çalıştığı Kurum/ Kurumlar ve Yıl: -

İletişim Bilgileri: ozlemyildirim55@mynet.com