ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bilge KÜÇÜK

ADANA VE MERSİN İLLERİNDE DOMATES LEKELİ SOLGUNLUK VİRÜSÜ (TOMATO SPOTTED WİLT VİRUS, TSWV)' NİN DEĞİŞİK YÖNTEMLERLE SAPTANMASI

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA, 2006

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ADANA VE MERSİN İLLERİNDE DOMATES LEKELİ SOLGUNLUK VİRÜSÜ (TOMATO SPOTTED WİLT VİRUS, TSWV)' NİN DEĞİŞİK YÖNTEMLERLE SAPTANMASI

Bilge KÜÇÜK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu Tez 10/02/2006 Tarihinde Aşağıdaki Juri Üyeleri Tarafından Oybirliği ile Kabul Edilmiştir.

İmza…….....	İmza……..	İmza……
Yrd.Doç.Dr.Muharrem A.KAMBEROĞLU	Prof.Dr.Saadettin BALOĞLU	Doç.Dr.Mehmet E. GÜLDÜR
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

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

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

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

Proje No: ZF2005YL19

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ADANA VE MERSİN İLLERİNDE DOMATES LEKELİ SOLGUNLUK VİRÜSÜ (TOMATO SPOTTED WİLT VİRUS, TSWV)' NİN DEĞİŞİK YÖNTEMLERLE SAPTANMASI

Bilge KÜÇÜK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Muharrem Arap KAMBEROĞLU
Yıl: 2006, Sayfa:72

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

Bu çalışma, Adana ve Mersin illerinde yetiştirilen domates ve biberlerde zararlı Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (Tomato Spotted Wilt Virus, TSWV)'nin saflaştırılması, biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanısının yapılması amacıyla 2005-2006 yılları arasında yürütülmüştür.

Araziden toplanan virüslü olduğundan şüphelenilen bitkiler, öncelikle ELISA yöntemi ile testlenmiş ve hastalık oranı % 45.4 olarak hesaplanmıştır. TSWV ile infekteli olan örnekler kodlanarak, mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

E8, D2, M5 kodlu izolatlar ile aşılı bitkilerde 5-15 gün içerisinde simptom gözlenmiş, bununla birlikte T1 izolatı ise, 30-60 gün gibi bir sürede simptom çıkışına neden olmuştur.

SDS-PAGE'de virüse ait bir protein band gözlenmiş ve molekül ağırlığı 27 kDa olarak saptanmıştır.

TSWV, santrifüjleme yöntemi kullanılarak yarı saflaştırılmış, PEG çöktürme ve kolon kromotogrofisi yöntemleri başarılı olmamıştır.

TSWV virionları saflaştırılmış ve SDS-PAGE'de dört band, agarose jel elektroforez'de ise tek band gözlenmiştir.

TSWV ile infekteli test bitkilerinden total RNA ekstraksiyonu yapılmış ve bunlar RT-PCR yönteminde kullanılmıştır. PCR ürünleri agarose jel elektroforez ile test edilmiş ve beklenen band büyüklükleri gözlenmiştir.

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

ABSTRACT

MSc THESIS

DETECTION OF TOMATO SPOTTED WILT VIRUS (TSWV) IN ADANA AND MERSIN PROVINCES USING DIFFERENT METHODS

Bilge KÜÇÜK

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

Supervisor: Asst. Prof. Muharrem Arap
Year: 2006, Pages: 72

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

The objectives of this study are purification and biological, serological and molecular detection of TSWV in tomatos and peppers growing in Adana and Mersin provinces between 2005 and 2006.

Collected samples were firstly tested with ELISA and infection ratio was determined as 45.4%. TSWV positives were coded and used for mechanical inoculation. The symptoms were observed on E8, D2 and M5 isolates inoculated test plants in 5-15 days however, T1 inoculated ones showed in 1-2 months after TSWV inoculation.

Only one protein of TSWV was observed in SDS-PAGE and molecular weight of it was estimated as 27 kDa.

Centrifugation method was succesfully used for semi purification of TSWV. Column chromatography and PEG precipitation methods were not be successed for TSWV purification.

TSWV virions were purified and four bands were obtained in SDS-PAGE and one band in agarose gel electrophoresis.

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

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

TEŞEKKÜR

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

Çalışmalarımın her aşamasında büyük bir özveri ile bana yardımcı ve destek olan Zir. Müh. A. Filiz ÇALIŞKAN'a, laboratuar çalışmalarımdaki yardımlarından dolayı Zir. Yük. Müh. Behçet Kemal ÇAĞLAR'a, Arş. Gör. Gökmen KOÇ'a ve Arş. Gör. Mustafa KÜSEK'e teşekkür ederim.

Manevi destekleri ile her zaman yanımda olan Zir. Müh. Sencen ÜNLÜ, Zir. Müh. Özlem ULU ve Pınar YAŞAR'a teşekkür ederim.

Projemin yürütülmesinde çalışmalarıma maddi olanak sağlayan Ç.Ü. Araştırma Fonu Merkezine teşekkür ederim.

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

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER…….. IV
SİMGELER VE KISALTMALAR VI
ÇİZELGELER DİZİNİ VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ IX
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 4
3. MATERYAL VE METOD 16
3.1. Materyal 16
3.1.1. Survey Alanı ve Çalışma Materyali Hakkında Bilgiler 16
3.1.2. Mekanik İnokulasyon Çalışmalarında Kullanılan Materyal 17
3.1.3. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Materyal 18
3.1.4. Saflaştırma (Purifikasyon) Çalışmalarında Kullanılan Materyal 19
3.1.5. Virion Analizi Çalışmalarında Kullanılan Materyal 19
3.1.6. SDS-PAGE Çalışmalarında Kullanılan Materyal 19
3.1.7. Total RNA Ekstraksiyonu Çalışmalarında Kullanılan Materyal 20
3.1.8. RT-PCR Çalışmalarında Kullanılan Materyal 20
3.1.9. Agarose Gel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal 21
3.2.Metod 22
3.2.1. Bitki Örneklerinin Toplanması ve Muhafazası 22
3.2.2. İndikatör Bitkilerin Yetiştirilmesi 22
3.2.3. Mekanik İnokulasyon Yöntemi 23
3.2.4. Serolojik Çalışmalar 24
3.2.4.1.DAS-ELISA Testi 25

3.2.5. Virüsü Saflaştırma (Purifikasyon) Çalışmaları 26
3.2.5.1. PEG Çöktürme Metodu..... 26
3.2.5.2. Santrifüjleme Metodu…….....27
3.2.5.3. Kolon Kromotogtafisi Yöntemi ile Virüsün Saflaştırılması 27
3.2.5.3.1. Kromotografi Kolonunun Hazırlanması.....28
3.2.5.3.2. Kolon Kromotografi Yönteminin Uygulanması.....28
3.2.6. Virion Analizi..... 28
3.2.7. SDS-PAGE Yöntemi. 29
3.2.7.1. SDS-PAGE Jelinin Boyanması. 31
3.2.8. Total RNA Ekstraksiyonu..... 31
3.2.9. RT-PCR Çalışmaları 33
3.2.9.1. Amplifikasyon Sırasında Kullanılan Kimyasalların Optimum Konsantrasyonlarının Ayarlanması 36
3.2.10. Agarose Gel Elektroforez Çalışmaları 36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA..... 38
4.1. Survey Çalışmaları..... 38
4.2. Mekanik İnokulasyon Çalışmaları 40
4.3. ELISA Testleri..... 46
4.4. Saflaştırma (Purifikasyon) Çalışmaları 47
4.5. Virion Analizi Çalışmaları……...49
4.6. SDS-PAGE Çalışmaları 50
4.7. Total RNA Ekstraksiyon Çalışmaları 52
4.8. RT-PCR Çalışmaları 52
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER..... 55
KAYNAKLAR..... 59
ÖZ GEÇMİŞ..... 66
EKLER..... 67

SİMGELER ve KISALTMALAR

µl	Mikrolitre
APS	Ammonium persülfate
CaCV	Capsicum Chlorosis Virus
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleikasid
dATP	Deoksiadenozintrifosfat
dd	Double distile
dGTP	Deoksiguanozintrifosfat
DNA	Deoksiribonükleikasid
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Deoksitimidintrifosfat
EG	Elektroforez buffer
ELISA	Enzim-Linked Immunosorbent Assay
gr	Gram
GRSV	Groundnut Ringspot Virus
INSV	Impatients Necrotik Spot Virus
IYSV	Iris Yellow Spot Virus
kDa	Kilo dalton
Lt	Litre
M	Molar
MCA	Monoklonal Antibody
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MW	Moleküler ağırlığı
nm	Nanometre
PBNS	Peanut Bud Necrosis Virus
PBS	Potasyum fosfat-tuz tamponu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PEG	Polietilen Glikol
Pr	Primer
RNA	Ribonükleikasid
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
RT	Reverse Trancriptase
RT-PCR	Reverse Trancriptase Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS- PAGE	Sodyum Dodesyl Sulfat-Polyacrilamid Gel Elektroforezi
ss	Tek İplikli
Taq	Termo Stabil Polimeraz Enzimi
TBIA	Tissue Blot Immünoassay Yöntemi
TCSV	Tomato Chlorotic Spot Virus
Tm	Termal Melting.
TMV	Tobaco Mosaic Virus
ToMV	Tomato Mosaic Virus
TSWV	Tomato Spotted Wilt Virüs
W/V	Ağırlık/Hacim
WMSMV	Watermelon Silver Mottle Virus

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 3.1. Survey Yapılan İl, İlçe, Alan, Bitki Türü ve Testlenen Bitki Sayısı.....16
Çizelge 3.2. Mekanik İnokulasyonda Kullanılan Test bitkileri..... 18
Çizelge 3.3. Çalışmada Kullanılan Primer Çiftleri ve Sentezlenen Bölgenin Moleküler Büyüklüğü.....21
Çizelge 4.1. Farklı TSWV İzolatları ile Yapılan Mekanik İnokulasyon Çalışmalarında Test Bitkileri Üzerinde Gözlenen Simptomlar..... 41
Çizelge 5.1. TSWV'nin Tanılanmasında İzlenilen Yol..... 56

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 4.1. Biberde deformasyon simptomu 39
Şekil 4.2. Biber bitkisi yaprağında deformasyon, kıvrılma ve kloroz 39
Şekil 4.3. Domates bitkisi yaprağında TSWV simptomu 40
Şekil 4.4. Domates meyvesinde halkalı leke, deformasyon ve nekrotik alanlar ... 40
Şekil 4.5. *N. rustica* test bitkisinde deformasyon ve halkalı leke..... 43
Şekil 4.6. *N. tabacum* ’Samsun’ test bitkisinde kloroz..... 43
Şekil 4.7. *N. tabacum ‘Xanthi’* test bitkisinde deformasyon..... 43
Şekil 4.8. *N. tabacum* ‘Samsun NN’ test bitkisinde halkalı leke..... 43
Şekil 4.9. *N. tabacum ‘Xanthi nc’* test bitkisinde halkalı leke ve deformasyon .. 44
Şekil 4.10. *N. rustica* test bitkisinde halkalı leke……...44
Şekil 4.11. Domates bitkisinde yaprak deformasyonu..... 45
Şekil 4.12. Biber bitkisinde kloroz ve yaprak kıvrılması..... 45
Şekil 4.13. TSWV’nin Yarı Saf Preparasyonunun Spektrofotometre Okumasında Elde Edilen Absorbans Değerleri..... 48
Şekil 4.14. SDS-PAGE’de virion analizi çalışmaları sonucunda elde edilen protein bantları 50
Şekil 4.15. TSWV’nin SDS-PAGE’de oluşturduğu protein bantları..... 51
Şekil 4.16. TSWV ‘nin agaroz jeldeki total RNA bantları……52
Şekil 4.17. 1 ve 4 nolu primer çiftleri ile yapılan RT-PCR sonuçları…….53
Şekil 4.18. 2 ve 7 nolu primer çiftleri ile yapılan RT-PCR sonuçları ……....54

1. GİRİŞ

İnsan sağlığı ve beslenmesi açısından önemli olan vitaminler, karbonhidratlar, yağ ve protein gibi birçok organik maddeyi, bol miktarda içeren sebzeler, dünyanın birçok ülkesinde olduğu gibi ülkemizde de yoğun olarak yetiştirilmektedir. Üretimi yapılan sebzeler arasında domates ve biber ilk sırada yer almaktadır. İç piyasada taze olarak tüketilmesinin yanı sırsa gıda endüstrisinde ham madde olarak kullanılmakta, dış pazara ise taze olarak veya işlenerek ihraç edilmektedir (DİE, 1999)

Ülkemiz ekonomisinde de önemli bir yere sahip olan domates ve biber yetiştiriciliği, bu çalışmanın yürütüldüğü Adana ve Mersin illeri ile çevresinde açık alan ve örtüaltında olmak üzere yoğun bir şekilde yapılmaktadır. Adana ve çevresinde, sebze üretimi için 34.194 ha'lık alan kullanılmış ve 279 131 ton domates, 2 700 ton dolmalık biber ve 26 661 ton sivri biber üretimi yapılmıştır. Mersin ili ve çevresinde ise, iklim koşullarının daha elverişli olması ve seracılığın daha yaygın olması sebepleri ile 35.046 ha'lık alanda 567.087 ton domates, 57.410 ton dolmalık biber ve 89.094 ton sivri biber üretilmesiyle Adana'dan daha fazla verim elde edildiği bildirilmiştir (Anonymous, 2002).

Sebze üretimi yapılan alanlarda, fide döneminden hasata kadar geçen gelişme döneminde 200'den fazla bakteriyel, fungal ve viral kökenli hastalık etmeni domates ve biber bitkisine zarar vermektedir (Güldür, 1995). Bu patojenler bitkilerin yapraklarında klorotik ve nekrotik alanlar, mozayik, küçülme ve deformasyon, gövde üzerinde nekroza dönüşen yağ görünümlü alanlar, gövde içinde öz boşalması, meyvelerde çürüklük, klorotik ve nekrotik lekeler, genel olarak bitki boyunda kısalma ve sararma gibi simptomlara neden olmaktadır.

Diğer bitki türlerinde olduğu gibi domates ve biberlerde hastalığa neden olan patojenler arasında viral etmenler, bitkiden bitkiye mekanik yollardan kolaylıkla bulaşabilmeleri, vektör böcekler aracılığıyla taşınabilmeleri ve çok geniş alanlara kısa sürede yayılabilmeleri ve özellikle diğer etmenlerde olduğu gibi bunlara karşı kullanılabilecek etkili bir kimyasal mücadele yönteminin bulunmaması nedeni ile ayrı bir öneme sahiptirler. Bundan dolayı bitkilerde hastalığa neden olan viral etmenler ile mücadele edebilmek için, etmenin saptanması, tanılanması ve yayılma

yollarının ortaya konulması ve bunların sonucunda da etmene karşı alınacak kültürel önlemlerin belirlenmesi gerekmektedir.

Domates ve biber yetiştirilen alanlarda çeşitli virüslerin varlığı bildirilmiştir. Tütün mozayik virüsü (Tobacco Mosaic Virus, TMV), domates mozayik virüsü (Tomato Mosaic Virus, ToMV), hıyar mozayik virüsü (Cucumber Mosaic Virus, CMV), patates Y virüsü (Potato Virus Y, PVY), tütün etch virüsü (Tobacco Etch Virus, TEV), yonca mozayik virüsü (Alfalfa Mosaic Virus, AMV) ve domates lekeli solgunluk virüsü (Tomato Spotted Wilt Virus, TSWV), hem domates hem de biberde ekonomik kayıplara yol açarken, domates sarı yaprak kıvırcıklık virüsü (Tomato Yellow Leaf Curl Virus, TYLCV) domates yetiştirilen alanlarda, şekerpancarı tepe kıvırcıklık virüsü (Beet Curly Top Virus, BCTV), biber mild mottle virüsü (Pepper Mild Mottle Virus, PMMV), biber mottle virüsü (Pepper Mottle Virus, PMV) ise biber yetiştirilen alanlarda saptanmıştır (Jones, ve ark.1993).

Bunlar içerisinde, Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV) domates ve biberlere zarar veren ve ekonomik anlamda büyük kayıplara neden olan en önemli virüslerden bir tanesidir. TSWV, domates ve biber bitkisinden başka, karpuz, marul, bezelye, bakla, yerfıstığı ve patates gibi birçok kültür bitkisinde de zarar yapmaktadır. Ayrıca, birçok süs bitkisi ve yabancı otların da bulunduğu çok geniş bir konukçu dizisine sahiptir (Goldback ve Peters, 1994).

TSWV, Bunyaviridae familyasına dahil olup, Tospovirüs cinsine ait bir virüstür (Gnayem, 1995). Tospovirüsler, bitkilere zarar veren en yıkıcı ilk on bitki virüsleri içerisinde bulunmaktadır (German ve ark. 1992). TSWV, nükleotid dizisi ve serolojik özelliklerine göre, TSWV (type species), Impatients necrotik spot virüs (INSV), Tomato chlorotic spot virüs (TCSV), Groundnut ringspot virüs (GRSV), İris yellow spot (IYSV) ve Watermelon silver mottle virüs (WSMoV) olmak üzere altı türe ayrılmıştır (Mumford ve ark., 1996).

TSWV izometrik yapıda olup, genişligi 85 nm' dir. Virionlar, %5 nükleik asit, %70 protein, %20 lipit ve %5 karbonhidrat içermektedir. Genom yapıları tek iplikçikli lineer RNA'dan meydana gelmekte ve en büyük genom parçası 8.897 kb (L-RNA), ikinci en büyük parçası 5.4 kb (M-RNA), üçünçü en büyük parçası 2.916

kb (S-RNA)' dır. Genomik nükleik asitleri, Haan (1990) tarafından izole edilmiştir ve temel bileşiminde %16.2 G, %31.6 A, %19.3 C ve %32.9 U bazı bulunmaktadır.

TSWV, Tysanoptera takımından *Thrips tabaci, T. setosus, T. parmi, Frankliniela occidentalis, F. shultzei, F. fusca* ve *Scirtothrips dorsalis* ile persistent olarak taşınmaktadır (Eckel ve ark., 1996; German ve ark., 1992). *F. occidentalis* (WFT, Western Flower Thrips), TSWV'nin en önemli vektörü olarak bildirilmiştir (Ullman ve ark., 1992). Thripsler virüsü bünyesine ancak larva döneminde 15 dakika beslenerek alabilmekte ve yaklaşık 4-18 gün sonra sağlıklı bitkiye taşımaktadır.

TSWV thripslerle taşınmanın yanısıra, mekanik yollarla da taşınabilmektedir. Fakat kök kaynaşması, tohum ve polen ile taşınma olmamaktadır.

TSWV, infeksiyon zamanı ve çevre koşullarına bağlı olarak değişmekle birlikte, bulaşık bitkilerde gelişme geriliği, cüceleşme, genel solgunluk, yaprak ve meyveler üzerinde halkalı lekeler, nekrotik ve klorotik lezyonlar ve genç sürgünlerde geriye doğru ölüm şeklinde simptomlara neden olmaktadır (Güldür ve ark., 1995).

TSWV' nin saptanması amacıyla yapılan önceki çalışmalarda, yoğun olarak mekanik inokulasyon yöntemi kullanılmış ve virüs *Cucumis sativus, Gomphrena globosa, Nicotiana clevelandii, N. tabacum N. glutinosa, N. rustica* ve *Petunia hybrida* gibi indikatör bitkiler üzerine taşınmıştır. Daha sonra TSWV'ye spesifik antiserumların üretilmesi ile birlikte serolojik yöntemlerden ELISA tekniği ile saptanmış ve en son olarak da günümüzde moleküler yöntemlerden PCR ve hibridizasyon teknikleri yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Mumford ve ark., 1994).

Moleküler yöntemlerle, TSWV' nin RNA' sına veya proteinine spesifik primerler veya dejenere primerler kullanılarak virüsün genom dizisi belirlenebilmiş ve böylece bir serogrubun genetik özelliklerinin ortaya çıkarılması veya farklı serogrupların arasındaki genetik farklılıkların ortaya konulması mümkün olmuştur (Mumford ve ark., 1996).

Yapılan bu çalışmada, son yıllarda ülkemiz için önemi gittikçe artan ve thripsler aracılığıyla uzak alanlara kolayca yayılarak ekonomik kayıplara sebep olan TSWV'nin biyolojik, serolojik (ELISA) ve moleküler yöntemler (RT-PCR) kullanılarak saptanması ve çalışmanın yürütüldüğü alanlarda yoğunluğunun ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV) ilk olarak, 1915 yılında Brittlebank tarafından Avusturalya'da domates bitkisi üzerinde tespit edilmiştir. Viral orjinli olduğu ise, Samuel ve ark. (1930) tarafindan ortaya konulmuştur. Son yıllarda büyük ekonomik öneme sahip olan bu virüs dünyanın bir çok bölgesinde çok sık görülmeye başlanmış, Kuzey ve Güney Amerika (ABD, Brezilya), Avrupa ve Asya kıtalarına kadar yayılmıştır (Adkins ve ark., 2005).

TSWV, birçok ülkede farklı zamanlarda ve farklı bitkiler üzerinde rapor edilmiştir. Bu nedenle bu ülkelerde TSWV için, survey, vektörler ile taşıma denemeleri, konukçu bitkilerinin ve ırklarının saptanması ile diğer virüslerle yakınlıklarının ortaya konulması gibi çalışmalar yapılmıştır.

TSWV, çok geniş konukçu dizisine sahip bir virüs olup, 50'den fazla botanik familyadan 650 farklı bitki türü üzerinde birçok ülkeden rapor edilmiştir. Bu kadar geniş bir alana yayılmasında, virüsün Tysanoptera takımından Thrips vektörü ile taşınabilmesi etkili olmuş ve bu virüs hastalığının önemini daha da artırmıştır. Bu nedenlerden dolayı bir çok ülkede kültür bitkileri, süs bitkileri ve yabancı otların yetiştirilmesi TSWV tarafından büyük oranda sınırlandırılmıştır (Goldbach ve Peters, 1994).

Çiçek Thripsi (*Frankniella occidentalis*), bölgelere göre değişmekle birlikte, TSWV'nin en önemli vektörü olarak bildirilmiştir (Ullman ve ark., 1992). Bu vektör, ilk kez 1991 yılında İsrail'de çok geniş bir konukçu dizisinde gözlenmiş ve 1992 yılında da bir fidelikte *Chrysanthemum* spp. bitkisi üzerinde TSWV infeksiyonu saptanmıştır (Gnayem, 1995).

TSWV'nin ilk olarak saptanması ve viral orjinli olduğunun ortaya konulmasından sonra, Bünyaviridae familyasına, INSV ve WSMoV'nin de aralarında bulunduğu 13 virüs dahil edilmiştir. Daha sonra bir serogrup sınıflandırma sistemi oluşturulmuş ve serolojik farklılıklar dikkate alınarak, Tospovirüs izolatları teşhis edilmiştir. TSWV, serogrup 1'in üyesi, INSV, serogrup 3'ün üyesi ve WSMoV, serogrup 4'ün üyesi olarak Tospovirüs grubuna ayrılmıştır. Daha sonra

yapılan çalışmalarda serolojik yakınlıktan başka, moleküler veriler temelinde de sınıflandırmalar yapılmıştır (EPPO 2004).

Dünyada önemli ürün kayıplarına sebep olan Tospovirüs genomlu virüs grubu ismini ilk üyesi olan TSWV'den almıştır. 1990 yılı başlarına kadar TSWV'nin bu grubun tek üyesi olduğu düşünülmüş ve sebep olan etmen TSWV olarak belirtilmiştir. Fakat, Bunyaviridae familyasının, hayvan virüslerinin büyük bir kısmını da içermesinden dolayı ve Tospovirüs genomlu infekteli bitkilerin bulunması, INSV'yi de içeren diğer benzer virüslerin karakterizasyonunun ve teşhisinin yapılmasını zorunlu hale getirmiştir. Bundan sonra yapılan çalışmalarda, birçok Tospovirüs teşhis edilerek karakterizasyonu yapılmış ve öncelikle bilinmeyen genlerin türleri teşhis etmeye çalışılmıştır (Adkins ve ark., 2005).

TSWV, en az sekiz thrips türü ile taşınmaktadır (Cho ve ark..1987). Kuzey Carolina'da TSWV' nin en önemli vektörünün *Frankliniella fusca* olduğu, *F. occidentalis*'in ise, lokal olarak önem taşıyan bir thrips olarak kaydedilmiştir (Eckel ve ark., 1996).

Jain ve ark. (1998) TSWV'nin Georgia'da yerfıstığı, domates, biber ve tütün üretimini sınırlayan en önemli hastalık etmeni olduğunu, *F. occidentalis* ve *F. fusca* ile etkin bir şekilde taşındığını ve Georgia'da meydana gelen zararın yaklaşık 100 milyon dolar olduğu bildirmişlerdir.

TSWV'nin İran'da varlığı ilk olarak 1999-2000 yıllarında, TSWV'ye spesifik polyclonal antibody (As-0526 ve As-0580, DSM2, Braunschweig, Almanya) kullanılarak DAS- ELISA yöntemi ile ortaya konulmuştur. Yapılan bu çalışmada, soya bitkisi üzerinde TSWV'nin ortaya çıkma oranı %5.4 olarak saptanmıştır (Golnaraghi, 2001). Yapılan diğer bazı çalışmalarda ise, TSWV'nin patates ve domates bitkisi üzerinde de varlığı ortaya konulmuştur (Golnaraghi, 2001; Pourrahim ve ark., 2001).

TSWV, Güney Amerika'da ise, ilk olarak 1999 yılında *Melampodium divaricatum* bitkisinde saptanmıştır. Şüpheli bitkilerden *Melampodium divaricatum* ve *Nicotiana benthamiana* bitkileri üzerine mekanik inokulasyonlar yapılması sonucunda, *M. divaricatum* bitkisinde 48–56 gün sonra tipik mozayik simptomlar, *N. benthamiana* bitkisinde ise, şiddetli klorozlar, mozayik ve solgunluk simptomları

gözlenmiştir. Bundan 14 gün sonra da bitkilerde ölüm meydana gelmiştir. Bu çalışmada *Melampodium* bitkisi üzerinde TSWV'nin varlığı ELISA testi kullanılarak da doğrulanmıştır (Holcomp ve ark., 2000).

TSWV, Lousiana (ABD)'da ilk olarak 1972'de rapor edilmiştir (Black, 1973; Greenogh ve ark., 1990). *Solanacea* familyasına dahil bitkilerde özellikle domates, biber ve tütünde çok ciddi kayıplara neden olmuştur (Bond ve ark., 1983 ; Greenogh ve ark., 1985). TSWV'nin, bitkilerde klorotik ve nekrotik halkalı lekeler, gövde nekrozu, yapraklarda deformasyon ve mozaik, meyvede azalma ve şiddetli ürün kayıplarına neden olduğu bildirilmiştir. Bu bölgede yapılan survey çalışmalarında, TSWV'nin domateste ortaya çıkma oranı, ticari ürünlerde % 60, ev bahçelerinde ise % 100 olarak saptanmıştır (Greenogh ve ark., 1985).

Wolkan ve ark. (1996) Arjantin'de, Lisianthus bitkisinin (*Eustoma grandiflora* (Raf.) Shinn) yapraklarında çok yoğun olmayan benek ve açık kahverengi lekeler ile gelişme geriliği simptomları gözlemlemişler ve mekanik inokulasyon ve ELISA testi ile TSWV' nin Lisionthus bitkisinde varlığını ilk olarak ortaya koyarak rapor etmişlerdir.

Wilson ve ark. (2000) ise, TSWV'nin varlığını ilk olarak Güney Afrika'da popüler bir bitki olan Agapanthus (*Agapanthus praecox ssp. orientalis)* bitkisi üzerinde saptamışlardır. Bitkinin yapraklarında konsantrik halka ile düzensiz klorotik lekeler ve çizgiler gözlenmiş ve bu simptomlu yapraklardan alınan örnekler kullanılarak yapılan ELISA testleri ve TSWV'nin kılıf protein genine spesifik primerler ile PCR yapılması sonucunda, TSWV'nin infeksiyonu olduğu doğrulanmıştır.

Bu çalışmalardan farklı olarak, Pappu ve ark. (1998), Georgia'da ilk defa TSWV'nin karpuz bitkisinde doğal infeksiyonunu rapor etmişlerdir. Tütün tarlasında kendiliğinden yetişen karpuz bitkisinin yapraklarında nekrotik halkalı leke ve damar nekrozları gözlenmiş ve bu bitki ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Ayrıca, TSWV'nin kılıf protein genine spesifik primerler kullanılarak RT-PCR yapılmış ve TSWV 'nin karpuz bitkisinde varlığı ortaya konulmuştur.

Momol (2000), Kuzey Florida'da, Habanero (*Capsicum chinense*) ve Tabasco (*Capsicum frutescens*) türü biber bitkilerinde çeşitli simptomlar gözlemlemiş ve

DAS- ELISA yöntemi ile TSWV' nin varlığını tespit etmiştir. Ayrıca, IC-RT-PCR uygulamasında 800 bp'lik bölge amplifiye ederek ve bu çalışma sonucunda, Florida'da TSWV'nin varlığı ilk olarak rapor etmiştir.

Güney Amerika'da yerfıstığı (*Arachis hypogea* L.)' nin TSWV ile şiddetli olarak infektelendiği ve bitkinin yapraklarında TSWV'den dolayı, klorotik benekler, klorotik çizgiler, mozaik, halkalı lekeler, konsantrik halkalar, nekrotik benekler, sararma ile genel olarak infekteli bitkilerde erken dönemde büyüme geriliği ve sonuçta ciddi büyüme kayıpları meydana geldiği bildirilmiştir (Hagan ve ark., 1990).

TSWV, Kuzey Carolina'da 1988 yılında domates ve tütün bitkileri üzerinde saptanmıştır. Önceleri yaygınlık oranı düşük iken, 6-8 yıl içerisinde ürünler arasında hızla artmaya başlamış ve tütünlerde % 30-50' ye varan kayıplar görülmüştür (Groves ve ark., 2002).

Kuzey Carolina'da iki ürünsüz sezonda yapılan çalışmalarda, altı farklı alanda, çok yıllık, iki yıllık veya tek yıllık olmak üzere 28 bitki türü kontrol edilmiş ve en fazla trips larvası, *Sonchus asper, Stelleria media, Taraxacum officinale* bitkileri üzerinde saptanmıştır (Groves ve ark., 2002). Bu çalışma sonucunda, *F. fusca* en çok görülen TSWV vektörü olarak kaydedilmiştir. Yabancı otlardan çok yıllıklar *Plantago rugelii* ve *Taraxacum officinale* de sadece lokal olarak görülürken, bir çok tek yıllık yabancı ot *Cerastium vulgatum, Sonchus asper* ve *Stelleria media* da daha geniş alana yayılmıştır. Aynı çalışmada, 1997- 2000 yılları arasında yapılan surveylerde, 18 bitki familyasından 72 bitki türünden 35'inde (% 49) DAS–ELISA ile TSWV infeksiyonu ortaya konulmuştur. En fazla infeksiyon oranı *Taraxacum officinale, Sonchus asper* ve *Cerastium vulgatum* bitkilerinde, sırasıyla %5.8, %5.1 ve %4.2 olarak kaydedilmiştir. Ayrıca, *Cardamine hirsuta, Eupatorium capillifolium, Geranium carolinianum, Gnaphalium purpureum, Linaria canadense, Molluga veritillata, Pyrrhapappus carolinianus, Raphanus raphanistrum* ve *Triodanis perfoliata* olmak üzere TSWV ile infekteli dokuz yeni konukçu bitki türü ortaya çıkarılmıştır.

Papanice ve ark. (1999), TSWV ve diğer bitki virüslerini Brindis eyaletinde (Apuli, Kuzey İtalya) tarım sistemlerinin ekonomik varlığında çok ciddi bir tehlike olarak görmüşler ve bir yıldan uzun bir süre bu virüslerin epidemiyolojisini daha iyi

anlamak için araştırmalar yapmışlardır. Beş ay içerisinde digoxigenin işaretli riboproblarla 6500 thrips ve 31 türe ait 2400'den fazla bitkiyi analiz etmişlerdir. TSWV, belirti göstermiş olan domates, biber, enginar ve hindibağ ile hiç belirti göstermeyen yabancı otlarda (*Amaranthus retroflexus* %20, *Calendula officinalis* %2.3, *Capsella bursa pastoris* %21, *Chenopodium foetidum* %4, *Convolvulus spp*. %15, *Diplotaxis erucoides* %36, *Fumaria officinalis* %3, *Malva parviflora* %7.5, *Oxalis acetosella* %3.7, *Papaver rhoeas* %15, *Portulaca oleracea* %7.6, *Ranunculus spp*. %2.5, *Senecio vulgaris* %4, *Solanum nigrum* %4, *Sonchus oleraceaus* %8, *Stellaria media* %2.8, *Trifolium spp.* %2.7, *Veronica spp*. %1.5) saptanmıştır. Ayrıca, *F. occidentalis* %30.5, *Thrips tabaci* %47 ile diğer bilinmeyen thrips türlerine ait ergin bireylerde %34 oranında, larvalarında ise, %6 oranında belirlenmiştir.

Mandal ve ark. (2001), yaptıkları çalışmada, yerfıstığı üzerine mekanik inokulasyon yöntemi ile taşınması çok zor olan TSWV'yi başarılı ve etkin şekilde taşıma imkanı sağlayacak etkili bir mekanik inokulasyon protokolü geliştirmişlerdir. Taşınmaya etkili olabilecek faktörlerin ortaya konulması amacıyla, iki antioksidant madde (sodium sulfite ve mercoptoethanol) tampon çözeltilere eklenmiş ve iki aşındırıcı madde (celite ve carborandum) varlığında, pamuk, sünger ve iğne kullanılarak mekanik inokulasyon denemeleri yapılmıştır. Bu denemelerin sonucu olarakta, sadece yaprağı delme ile 1/10, sadece yaprağı ovalama ile 7/10, delme ve ovalama birlikte iken ise 10/10 başarı gözlenmiştir. Su kullanımı ile % 11.6, tampon çözelti (0.1 M phosphate buffer, pH: 7.0) kullanımı ile % 28.3, tampon çözelti ile sodium sülfit (% 0.2' lik) kullanımında % 75, tampon çözelti ile sodium sülfit (% 0.2'lik)+ mercoptoethanol (% 0.01'lik) kullanımında ise, % 100 başarı gözlenmiştir. Ayrıca sadece carboruandum kullanımı ile % 14.1, sadece celite kullanımı ile %85.8, carboruandum ve celite birlikte kullanımında ise % 96.6 başarı sağlandığı bildirilmiştir.

TSWV, küçük RNA (S-RNA), orta RNA (M-RNA) ve büyük RNA (L-RNA) olmak üzere üç RNA segmenti içermektedir. TSWV ve diğer tospovirüslerin bu nükleik asitlerin kullanılarak tütünde bulunduğu RT-PCR yöntemi ile de ortaya konulmuştur. Nükleokapsid protein (NP) gen veya L-RNA' ya spesifik primerler

üretilmiş veya dejenere olmuş primerler kullanılarak viral genomun genişletilmiş kısımları ile bir serogruba ait tospovirüslerin ortaya çıkarılması veya farklı serogruplar için bu başlangıçlar artık mümkün olmuştur (Mumford ve ark., 1996).

Bu çalışmaların birçoğu TSWV ile infekteli tütün gibi bitki dokularından TSWV'yi saptamak ve RT-PCR'ın yararını ortaya koymak açısından faydalıdır. Tütün gibi konukçu bitki dokulardan TSWV genomunun çoğaltılması mümkün iken, yerfıstığı dokusundan aynı işlemin yapılması daha zor olmaktadır. Yerfıstığında TSWV'nin saptanması ve genomunun çoğaltılması için RT-PCR'ın kullanımı veya sonrasında uygulanacak moleküler çalışmalarda ortaya çıkabilecek zorluklara karşı birkaç adımı içeren ekstraksiyon yöntemleri kullanılanılmıştır. Yerfıstığı dokusunda güçlü inhibitör etkisi gösteren polyfenol'e karşılık olarak bu adımlara ihtiyaç duyulmuştur (Jain ve ark., 1998). Aynı araştırıcılar tarafından yapılan bir çalışmada IC-RT-PCR yöntemi optimize edilmiş ve yerfıstığında TSWV'nin saptanması ve tanılanmasında teknik sınırlamaların üstesinden gelinerek başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Ayrıca bu yöntemin diğer birçok virüsün ortaya çıkarılmasında hızlı ve güvenilir olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

Whitfield ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada, *Ranunculus asiaticus* yumrularında TSWV' nin saptanmasında kullanılan Tissue Blot Immünoassay yöntemi (TBIA) ile DAS-ELISA yöntemlerinin doğruluk ve güvenilirliklerini karşılaştırmışlardır. Araştırıcılar, TBIA yönteminin de ELISA gibi, TSWV ile infekteli bitkilerin teşhisinde ve yumrulu bitkilerin indekslenmesinde kullanılabilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

Chu ve ark. (1989) Hawaii'de TSWV' nin periodik olarak marulda şiddetli kayıplara neden olduğunu gözlemlemişler ve bazı yıllar özellikle yaz aylarında maruldaki bu kayıpların % 50-90 olduğunu tespit etmişlerdir. Yudin ve Mitchell, (1990), yaptıkları çalışmada, TSWV tarafından infekteli marullarda erken dönemde mücadele yöntemlerinin uygulanmasıyla hastalığın daha çabuk önüne geçilebileceğini savunmuşlardır. Yapılan bu çalışma sonucunda üretim alanında thrips fazlalılığının fark edilerek mücadeleye başlanması yerine, daha erken dönemde teşhisin hastalığı kontrol altına almada daha etkili olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Greenogh ve ark. (1990) Lousiana'da yaptıkları bir çalışmada, domates, biber ve tütünde plastik film malç kullanımı ile thripslerin göç etmesi ve TSWV'nin ortaya çıkma oranları arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada, bir tarlayı ve aliminyum yüzeyli plastik malç, siyah plastik malç ve malçsız alan olarak rastgele üçe ayırmışlar ve bunlar arasındaki farkı kaydetmişlerdir. Thrips göçünü ölçmek için ise, sarı yapışkan tuzak kullanmışlardır. Sonuçta aliminyum yüzeyli plastik malçlı alanda, malçsız alana göre, domateste TSWV'nin ortaya çıkma oranı %64 ve tuzaktaki thripslerin sayısı %68 oranlarında azalmıştır. Biberde ise, TSWV'nin ortaya çıkma oranı ve tuzaktaki thripslerin sayısı %60-78 azalmıştır. İkinci bir uygulamada ise, domates, biber ve tütünde TSWV'nin ortaya çıkma oranlarında %60, thrips sayısında da %33 azalma gözlenmiştir.

Csinos ve ark. (2000), TSWV'ye karşı, bir bitki aktivatörü olan actigard (acibenzolar-s-methyl)'ın ve bir insektisit olan imidacloprid aktivitesini araştırmışlardır. K326 çeşidi tütün kullanılarak yapılan denemede uygulamasız kontrol alanı, actigard, imidocloprid ve actigard ile imidocloprid'in bir arada kullanıldığı dört lokasyon alanı kurulmuştur. Uygulamalar, her iki haftada bir on yaprak ve kök örnekleri alınıp, ELISA testi ile testlenmiş ve TSWV'nin uygulamasız alanda ortaya çıkma oranının %8'den başlayarak %19, %26 ve %45 olarak gitgide arttığı belirlenmiştir. Diğer üç alanda ise, TSWV'nin ortaya çıkma oranının azaldığı saptanmıştır.

Chu ve ark. (2001), beş serogrubundaki tospovirüslerin ortaya çıkarmak için dejenere primerler kullanarak WSMV'nin genom dizilimini tamamlamaya çalışmışlar ve WSMV virüsünün L RNA'sının nükleotid dizilimini tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, Daha önce M ve SRNA'larla yapılan çalışmalarda elde edilen bulguları da kullanarak WSMV tospovivüs'ün bu parçasının tüm genom dizilimini tamamlamışlardır. Aynı araştırıcılar, bu virüsün L proteininin INSV virüsü L proteini ile %44.3, TSWV L proteini ile %46.5 aminoasit benzerliği gösterirken, PBNV L proteini ile %91.3 aminoasit benzerliği gösterdiğini bildirmişlerdir. Elde edilen sonuçlar, dejenere primer kullanımı ile RT-PCR'nin farklı serogruplardaki tospovirüsleri ortaya koymak için hızlı ve güvenilir bir metod olduğu sonucu ortaya çıkarmıştır.

Kuzey Carolina'da Tospovirüs benzeri belirti gösteren hastalıklı patates bitkilerinden kök, gövde ve yaprak örnekleri toplanmış ve bu örneklerde serolojik (immuno strips) ve moleküler (RT-PCR) yöntemler ile TSWV 'nin varlığı araştırılmıştır. Bütün belirti gösteren örneklerden, RT-PCR ve serolojik yöntemlere ilaveten *Nicotiana benthamiana* test bitkisi üzerine mekanik inokulasyonlar da yapılmıştır. Böylece, TSWV'nin *N. benthamiana* bitkisinin dokularında varlığı, seroloji, RT-PCR ve nükleocapsid protein gen (N) dizilim analizleriyle doğrulanmıştır. Ayrıca, Kuzey Carolina'da elde edilen izolatlar ve Georgia'da domates, biber ve yerfıstığından elde edilen 11 izolat ile Kuzey Carolina'da patateste saptanan üç TSWV izolatı, N proteini yönünden karşılaştırılmıştır. Bunlara ilaveten, Kuzey Carolina'da TSWV'nin bir patates izolatı, vektör ile taşıma denemelerinde kullanılmış ve virüs, tütün thripsi (*Frankliniella fusca*) ile patatese taşınmıştır. Fakat, infekteli tohum yumrularından yaprak veya gövdeden aktif gelişen patates sürgünlerine doğrudan taşınmadığı gözlenmiştir (Abad ve ark., 2005).

Colariccio ve ark. (2005), Brezilya'da Sao Paulo State, Sumare ve Campinas alanlarında, hidroponik ürünlerden *Lettuce cv. veronica* üzerinde virüs benzeri belirtiler gözlemlemiş ve bu şüpheli marul örneklerini kullanılarak elektron mikroskobu, biyolojik, serolojik ve moleküler çalışmalar yapmışlardır. Saptanan örneklerden, marulun da içinde bulunduğu konukçu bitkilere yapılan mekanik inokulasyonlar sonucunda bu bitkiler üzerinde benzer virüs simptomları meydana gelmiştir. Bunun yanı sıra, *Gompherena globosa* test bitkisinde oluşan lokal lezyon ve sistemik mozayik simptomlarda bazı farklılıklar gözlenmiştir. Yapılan bu çalışmada, Tomato Clorotic Spot Virus'ün iki izolatı DAS-ELISA ve RT-PCR ile tespit edilmiş ve gen bankasındaki TCSV dizilimi ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği ortaya konulmuştur. Bu çalışma Brezilya'da ticari hidroponik marul ürünlerinde bir Tospovirüsten dolayı kayıplara ilişkin ilk bilgi olarak rapor edilmiştir. TSWV'nin besleyici solüsyon vasıtasıyla yayıldığının rapor edildiği bu çalışmada araştırıcılar hidroponik ürünler üzerinde Tospovirüslerin yayılmasını daha iyi anlamak için daha ileri epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu bildirmişlerdir.

Antignus ve ark. (1997), İsrail'de, açık alanlarda ve ticari seralarda yetiştirilen süs bitkileri ile sebzelerde TSWV infeksiyonuna benzeyen belirtiler gözlemlemişlerdir. Gözlemler sonucunda, 1992-1996 yılları arasında simptomlu bitkilerden örnekler toplanmış ve ELISA testi ile beş familyadan 19 tür arasında infekteli olanlar bulunmuş, altı yabancı ot türünde de doğal infeksiyon rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışmada, virüs teşhisi ve konukçu dizisi seroloji ve elektron mikroskobi ile karakterize edilmiştir. Farklı kaynaklardan sağlanan antiserumların kullanımı ile bu izolatlar arasındaki serolojik akrabalık ortaya konulmuştur. Ayrıca, nükleokapsid genin analizinin dizilimi ile TSWV'nin İsrail izolatının tospovirüs serogrup1'in bir üyesi (Br-01 ırk) olduğu saptanmıştır. Araştırıcılar, virüs infeksiyonlu süs bitkisi ve sezelerden toplanan tohumlarda virüs taşınmasının olmadığını ve İsrail'de TSWV'nin varlığının ortaya konulmasının sebze endüstrisinde ve süs bitkilerinde potansiyel bir tehdit olarak görüldüğünü bildirmişlerdir.

Winter ve ark. (2005) İran'da domates yetişitirilen alanlarda, TSWV surveyleri boyunca domates meyveleri üzerinde açık sarı halkalı lekeler gözlemlemişlerdir. Araştırıcılar, mekanik taşınma çalışmaları sonucunda, bu etmenin bir Tospovirüs izolatı olduğunu belirlemişler ve elektron mikroskobu çalışmalarında tipik Tospovirüs vironları görülmesine rağmen, bilinen Tospovirüsler için kullanılan antibodi ile bu izolat ELISA'da negatif sonuç alındığını bildirmişlerdir. Daha sonra yapılan moleküler analizler, bu virüsün INYS ile yakın akrabalık gösteren Tomato Varamin Virus olarak adlandırılan farklı bir tospovirüs olduğunu ortaya çıkarmıştır. Aynı araştırıcılar, bu virüsün çoğunlukla domateste bulunmasına karşılık bir çok süs bitkisi ve yabancı ot türünde de saptandığını, aynı zamanda TSWV ile karışık infeksiyonda olduğunu da bildirilmişlerdir.

Cordoba-Selles ve ark. (2005), İspanya'da yaptıkları bir çalışmada, bu güne kadar soğan yetiştirilen alanlarda TSWV, OYDV, LYSV olarak adlandırılan önemli üç virüs hastalığı saptamışlardır. Bu çalışmada, soğan bitkileri üzerinde virüs benzeri simptomlar gözlemiş ve bu bitkilerin kısa bir süre sonra ölmesi üzerine, hastalığın teşhisi için OYDV, LYSV, CMV, IYSV ve TSWV'ye karşı spesifik poliklonal antibadiler kullanılarak DAS-ELISA testi uygulanmıştır. ELISA testlerinde infekteli

soğanlar IYSV'ye karşı pozitif değer verirken, diğerleri negatif sonuç vermiştir. Araştırıcılar, IYSV infekteli örneklerin nükleokapsid geninden (IYSV1S ve IYSV1A primerleri kullanılarak) RT-PCR yapmış ve bu PCR ürünleri ticari kit kullanılarak saflaştırdıktan sonra nükleik asit dizilimlerini analiz etmişlerdir. Gen bankasında yapılan karşılaştırma sonucunda, %97 oranında benzerlik gözlenmiş ve bu virüs İspanya'da ilk olarak rapor edilmiştir. Aynı araştırıcılar, bu Tospovirüsün *Thrips tabaci* tarafından propagatif şekilde taşındığını, fakat bu thripsin her ne kadar İspanya'da büyük bir populasyona sahip olsa da Akdeniz iklimi etkisinde INSV'nin taşınmasında etkisinin bilinmediğini bildirmişlerdir.

Adam ve ark. (1994), TSWV'nin tipik belirtilerini gösteren *Anemone coronaria* bitkisinin yaprak öz suyu preparasyonlarında, elektron mikroskobu çalışmalarında bir çok tospovirüs benzeri partiküllerin varlığına rastlamalarına rağmen, TSWV'nin N proteinine spesifik monoklonal antibodi kullanılarak TAS ELISA testi uyguladıklarında negatif sonuç almışlardır. Araştırıcılar virüsü, *Nicotiana clevelandii* test bitkisine mekanik olarak aşılamış ve elektron mikroskobu da dahil olmak üzere poliklonal ve monoklonal antibodiler ile daha fazla araştırma yapmaya çalışmışlardır. INSV'ye karşı N spesifik MCA ve TSWV glikoproteinine spesifik MCA ile yapılan TAS ELISA testlerinden pozitif sonuç almışlardır. Antibadilerin karışımı kullanılarak yaptıkları Western Blot Immuno Assay yönteminde iki virüsün varlığını infekteli bitkilerden alınan extraktlarda saptamışlardır. *Nicotiana cilevelandii* yaprak dokusundan alınan çok ince kısımların elektron mikroscobunda incelenmesi sonucunda, 80-100 nm büyüklüğünde partiküller gözlenmiş, bu sitopatolojik oluşumların, infekteli hücrelerde nadir olarak virüs partikülü oluşturan veya oluşturmayan diğer INSV izolatlarından önemli derecede farklı olduğu düşünülmüştür. Araştırıcılar, bu yeni izolatın, INSV'nin tam bir formu yada virüslerin M RNA segmentlerinin değişimi ile TSWV ve INSV 'nin karışık bir enfeksiyonundan ortaya çıkan recombinant bir izolatı simgeliyor olabileceği sonuçlarını ortaya çıkarmışlardır.

Hücresel proteinler ve bunların virüsle olan ilişkileri, böceklerle taşınan birçok virüsün hücrelere girişine aracılık etmektedir. Elektron mikroskobu çalışmalarında elde edilen sonuçlar, virüsün vektör tarafından alınmasına bir

reseptörün aracılık yaptığını göstermektedir ve buna ilaveten, TSWV'nin membran glikoproteinlerinin (GP1 ve GP2) virüse bağlı protein gibi görev aldığı belirlenmiştir. Tospovirüslerin, *F. occidentalis*'i de içeren birkaç thrips türü tarafından taşınan üyeleri bulunmaktadır. *F. occidentalis*'in hücresel reseptörlerin kaynağı olup olmadığı ve TSWV'de viral bağlı protein gibi davranan GP'lerin varsayılan rolü, jel ve immonolabelling çalışmaları ile araştırılmıştır. Bir TSWV izolatı yada TSWV-GPs thrips proteinleri kullanıldığı zaman, TSWV- GPs 'de monoklonal antibodiler ile 50-kDa bölgesinde tek band elde edilmiştir. TSWV'nin küçük RNA'ları tarafından şifrelenen yapısal olmayan antibodiler ile yada TSWV N proteinleri ve vektör olmayan böceklerdeki proteinler blotlarda araştırıldığında bu band gözlenmemiştir. Thrips larvalarının midelerindeki plazmaya karşı anti-idiotype antibodiler ile western blot işleminde gözlenen 50 kDa ağırlıktaki tek band kullanılarak özellikle GP1 yada GP2'ye karşı monoklonal antibodyler hazırlanmıştır. Bu sonuçlar, thripslerdeki potansiyel hücresel reseptörlerin tanımlanmasında yardımcı olmuş ve TSWV'de virüse bağlı protein gibi davranan GP'lerin varsayılan rolünü desteklemektedir (Bandla ve ark., 1997).

Willis ve ark. (2005), yaptıkları bir çalışmada, TSWV glikoproteini GN'nin virüsün alınmasına engel olması ve TSWV'nin thripsler tarafından taşınması konularını araştırmışlardır. Araştırıcılar, GN ve GC glikoprotein örtülerinin thrips infeksiyonu için önemli iken, bitkinin infeksiyonu için gerekli olmadığını saptamışlardır. Aynı araştırıcılar, GN 'nin TSWV elde edilmesinde rol oynadığı hipotezini doğrulamak amacı ile yaptıkları çalışmada, GN proteinin rekombinant formunu (GN-S) elde etmişler ve saflaştırılmışlardır. GN-S, diğer viral proteinlerin yokluğunda GN'nin fonksiyonunun incelenmesini sağlamıştır. GN-S TSWV'nin bağlanmasında veya ağız epitel hücrelerine girmesinde önemli olan, thrips midesine moleküllerin bağlanıp bağlamadığını saptamak için GN-S'nin virüs alınması ve taşınmasını engelleme kabiliyeti araştırılmıştır. Virüs alımının engellenmesi immunolebelling tarafından, taşınmanın engellenmesi ise, *Datura stramonium* yaprak disklerine bireysel böcek taşınması ile denenmiştir. Taşınmanın engellenmesi deneyinde thripslerin beslenmesi ile % 56'sının TSWV içerdiği, % 6'sının ise TSWV ve GN-S kombinasyonunun bir arada bulundurduğu tespit edilmiştir. Thripslerin hem

TSWV ve GN-S ile beslenmesi sadece TSWV ile beslenmesi ile kıyaslandığında midelerinde daha az TSWV birikimi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca TSWV'nin taşınması TSWV infekteli bitkilerle beslenmeden önce thripslerin GN-S ile beslenmesi TSWV'nin taşınmasını önemli derecede azaltmıştır. Virüs davranışında ve GN-S'deki taşınmama, GN-S' nin virüs alınmasını engelleyen real-time qRT-PCR tarafından ölçüldüğü gibi virüslerin ortaya çıkarılabilen miktarını içermediği belirlenmiştir. Sonuç olarak elde edilen bulgular GN'nin, thrips ağız epitel hücreleri ile TSWV reseptörleri arasında bağlı bir viral ligand gibi görev aldığını göstermiştir.

TSWV, ülkemizde ilk olarak tütün bitkisinde; Çanakkale'yi takiben Balıkesir, Manisa Uşak ve Samsun illerinde, daha sonra ise, domates bitkisi üzerinde; İzmir ve Manisa illeri (Azeri, 1981; 1994) ile Çukurova'da (Güldür ve ark., 1995) saptanmıştır.

Bu virüs hastalığının önceleri sadece domates bitkisinde bulunduğu düşünülmüş, fakat 1997-1998 yılları süresince, İçel'in Kazanlı bölgesinde biber bitkisinde de ortaya çıkarılmıştır ve bu bölgede, *Franciniella occidentalis* ve *Thrips tabaci* vektörleri ile taşındığı bildirilmiştir (Yurtmen ve ark., 1998).

Arlı-Sökmen ve ark. (2005) Samsun ve çevresinde yaptıkları çalışmada, biber bitkisi ve Amaranthaceae familyasına dahil *Amarantus refloflexus* ile Malvacea familyasına dahil *Hibiscus trionum* bitkileri üzerinde TSWV infeksiyonunun varlığını ELISA testi kullanarak saptamışlardır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Survey Alanı ve Çalışma Materyali Hakkında Bilgiler

Survey çıkışları, bu çalışmanın yapıldığı alanlarda TSWV'nin bulaşıklık oranının ortaya konulması ve TSWV'nin saptanması için kullanılacak farklı yöntemlerde gerekli şüpheli bitki örneklerinin toplanması amacıyla yapılmıştır.

Bu amaçla yapılan survey çalışmalarında, Adana iline bağlı Tuzla ilçesinde ve Mersin iline bağlı Kazanlı ve Erdemli ilçelerinde örtüaltı ve açıkta sebze üretiminin yapıldığı alanlar gezilmiş ve TSWV ile infekteli olduğundan şüphelenilen domates ve biber bitkilerinden alınan bitki dokuları çalışmalarda kullanılmıştır. (Çizelge 3.1.)

Çizelge 3.1. Survey yapılan il, ilçe, alan, bitki türü ve testlenen bitki sayısı

İl	İlçe	Suvey Alanı	Bitki Türü	Testlenen Bitki Sayısı
İçel	Kazanlı	Sera 1	Biber	15
		Sera 2	Biber	15
		Sera 3	Biber	15
		Sera 4	Biber	15
		Sera 5	Biber	15
		Sera 6	Domates	15
		Sera 7	Domates	15
		Sera 8	Domates	15
	Erdemli	Açık alan	Domates	15
		Açık alan	Biber	15
		Açık alan	Domates	15
		Açık alan	Domates	15
		Açık alan	Biber	15
		Açık alan	Biber	15
Adana	Tuzla	Açık alan	Biber	10

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

3.1.2. Mekanik İnokulasyon Çalışmalarında Kullanılan Materyal

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

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

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

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

Çizelge 3.2. Mekanik İnokulasyon Çalışmalarında Kullanılan Test Bitkileri

Türkçe Adı	Latince Adı
Biber	*Capsicum annuum*
Domates	*Lycopersicon esculentum*
Tütün Türleri	*Nicotiana rustica*
	Nicotiana glutinosa L.
	Nicotiana tabacum L.''*Xanthi*''
	Nicotiana tabacum L.''*Xanthi nc*''
	Nicotiana tabacum L. ''*Samsun*''
	Nicotiana tabacum L.''*Samsun* NN''
Hanım düğmesi	*Gomphena globosa*
Akkaz Ayağı	*Chenopodiun quınoa* Wild.
	C. amaranticolor Costa & Reyn

3.1.3. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Materyal

Yapılan ELISA testlerinde, TSWV ile infekteli olduğundan şüphelenilen domates ve biber bitkileri ile mekanik inokulasyon yöntemi ile inokule edilen indikatör bitkilerden alınan bitki dokuları materyal olarak kullanılmıştır. Ayrıca virüsü saflaştırma işleminin farklı aşamalarında toplanan kısımlarda, ELISA yöntemi ile testlenmiştir.

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

3.1.4. Saflaştırma (Purifikasyon) Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Virüs saflaştırma çalışmalarında, TSWV ile infekteli olduğu ELISA testiyle saptanan arazi örneklerinden alınan dokular ve bu bitkilerin taze yaprakları kullanılarak yapılan mekanik inokulasyon yöntemi ile virüsün bulaştırıldığı indikatör bitkilerden alınan bitki dokuları kullanılmıştır.

Saflaştırma işlemi sırasında; havan ve havan eli, tampon çözeltiler, santrifüj tüpleri, ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları, Beckman J-21C model santrifüj ile JA-20 ve JA-21 numaralı başlıkları kullanılmıştır.

3.1.5. Virion Analizi Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Virion analizi çalışmalarında, mekanik inokulasyon yöntemi ile TSWV izolatlarının bulaştırıldığı indikatör bitkiler materyal olarak kullanılmıştır.

Yöntemin uygulanması sırasında, havan ve havan eli, tampon çözeltiler, santrifüjler, santrifüj tüpleri, otomatik pipet ve pipet uçları, SDS-PAGE ve agarose jel elektroforez için gerekli malzemeler kullanılmıştır.

3.1.6. SDS-PAGE Çalışmalarında Kullanılan Materyal

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis) çalışmalarında, ELISA testleri sonucunda, TSWV ile bulaşık olduğu saptanan arazi örnekleri, mekanik inokulasyon yöntemi ile virüsün bulaştırıldığı otsu indikatör bitkilerden alınan taze sürgün ve yapraklardan hazırlanan ham ekstraktlar ve virüs arıtma işleminde elde edilen yarı saf preparasyonlar çalışma materyalini oluşturmuştur.

SDS-PAGE işlemi BIORAD marka vertikal mini jel elektroforez düzeneği, BIORAD marka güç kaynağı, ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları, havan ve havan eli, protein marker (Fermentas) örneklerin ve jellerin hazırlanması ile jellerin boyanması için hazırlanan tampon çözelti ve solüsyonlar (Ek 2-3-4) de materyal olarak kullanılmıştır.

3.1.7. Total RNA Ekstraksiyonu Çalışmalarında Kullanılan Materyal

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

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

Total RNA ekstraksiyonu çalışmalarında kullanılan solüsyonlar Ek 5'de yer almaktadır.

3.1.8. RT-PCR Çalışmalarında Kullanılan Materyal

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

RT-PCR işlemi, Moloney Murine Leukaemia Virus'den oluşan reverse transcriptase (MMLV-RT, 200U/µl, Fermentas, EP0441) enzimi ve reverse transcriptase reaksiyon tampon çözeltisi, Taq polymerase enzimi (Termostabil DNA polymerase enzyme, 5U/µl, Fermentas, EP0401) ve reaksiyon tampon çözeltisi, dNTP set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 25 mM, Promega), $MgCI_2$, $MgCI_2$ buffer, RNAse inhibitör (40U/µl Fermentas, EO0311), Bench Top 1 kb DNA Ladder marker (Promega), çeşitli tampon çözeltiler, saf su, pipet ve steril pipet uçları, PCR tüpleri ve Çizelge 3.2'de verilen TSWV'ye spesifik primerler (10mM) kullanılarak yapılmıştır.

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

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

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

Primer Çiftleri	Dizi	Moleküler Büyüklüğü (bp)
L1TSWVR **L2TSWVF**	AATTGCCTTGCAACCAATTC ATCAGTCGAAATGGTCGGCA	276
S1INSVF **S2INSVR**	AAATCAATAGTAGCATTA CTTCCTCAAGAATAGGCA	602
H1R **H2F**	ACAGAAAGGTTAGCACTGAA ACAGAGGACTCCACTCCCGG	700
CP5-Bam **CP3-Pst**	ACAACTTTTAGGATCCTCATGTCTAAGGTT AACCTGCAGCTGCTTTCAAGCAAGTTC	780
BR035 **PDH006**	GAATATATGACACCATTG CCCAGAGCAATCAGTGCA	514

3.1.9. Agarose Gel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal

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

Agarose gel elektroforez işleminde, agarose, tampon çözeltiler, BIORAD marka Mini Sub. DNA Cell Elektroforez cihazı ve güç kaynağı, UVP Ultraviolet Transilluminator marka UV ışık kaynağı, polaraid film ve Polaraid GelCam marka fotograf makinesinden yararlanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Survey Çalışmaları, Bitki Örneklerinin Toplanması ve Muhafazası

Çalışmanın yürütüldüğü yörelerde TSWV'nin bulaşıklık oranının ortaya konulması ve toplanan örneklerde TSWV varlığının farklı yöntemlerle saptanması amacıyla yapılan survey çalışmaları, Adana iline bağlı Tuzla ilçesi ile Mersin iline bağlı Kazanlı ve Erdemli ilçelerinde örtüaltı ve açık alanda domates ve biber üretimi yapılan alanlarda gerçekleştirilmiştir.

Survey çalışmaları 2005-2006 yılları arasında ilkbahar ve sonbahar aylarında yapılmıştır.

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

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

3.2.2. İndikatör Bitkilerin Yetiştirilmesi

Mekanik inokulasyon çalışmalarında, Çizelge 3.1'de verilen indikatör bitkileri kullanılmış ve bu bitkilerin tohumları, Ç.Ü.Z.F. Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

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

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

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

Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarı'na ait klima odasında yetiştirilen bitkiler, zararlı-hastalık ve simptom gelişimi için araştırma boyunca periyodik olarak her gün kontrol edilmişlerdir. Bitkilerin sağlıklı büyümeleri için gerekli makro ve mikro besin elementleri sulama suyuna ilave edilerek bitkilere verilmiş ve hastalık ve zararlılara karşı gerektiğinde pestisit uygulamaları yapılmıştır (Anonymous, 1990).

3.2.3. Mekanik İnokulasyon Yöntemi

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

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

Kullanılan indikatör bitkiler aşağıda verilen simptomlar için gözlenmiştir.

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

Lycopersicon esculentum; Klorotik lokal lezyon, nekrotik lokal lezyon, damar açılması, deformasyon, yaprak kırışıklığı, geriye doğru ölüm, mozaik.

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

Capsicum annuum; Klorotik lokal lezyon, nekrotik lokal lezyon, halkalı leke, damar açılması, deformasyon, yaprak kırışıklığı, geriye doğru ölüm, mozaik

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

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

3.2.4. Serolojik Çalışmalar

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

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

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

3.2.4.1. DAS-ELISA Testi

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.2.5. Virüs Saflaştırma (Purifikasyon) Çalışmaları

Virüsü saflaştırma çalışmaları; mekanik inokulasyon yöntemiyle TSWV'nin bulaştırıldığı indikatör bitkilerden alınan yapraklar kullanılarak yapıldığı gibi, doğrudan araziden getirilen ve TSWV ile bulaşık olduğu ELISA testlerinde saptanan domates ve biber bitkilerinden alınan yapraklar kullanılarak da yapılmıştır.

Yarı purifikasyon çalışmalarında, PEG çöktürme ve Düşük ve Yüksek Devir Santrifüjleme yöntemleri, tam purifikasyon için ise, Kolon Kromotografi yöntemi kullanılmıştır.

3.2.5.1. PEG Çöktürme Metodu

Bu yöntem, Bar-Joseph ve ark. (1985), Gonsalves ve ark. (1978) ve Kamberoğlu (2000)'in önerdiği prosedüre göre modifiye edilerek kullanılmıştır.

Çalışmada izlenilen basamaklar:

a. İnfekteli test bitkilerinin yaprakları, 1: 5 (w: v) oranında 0.02M Na_2SO_3, 0.01M DIECA ve 0.01M EDTA içeren 0.01M Tris- HCl buffer (pH, 8.0) ile havanda ekstrakte edilerek tülbentten geçirilmiştir.

b. Sıvı kısım 7.000 rpm'de 10 dak. Beckman JA 20 rotor kullanılarak santrifüj edilmiş ve pellet atılmıştır.

c. Sıvı kısım üzerine %5'i kadar %10'luk Triton X-100 ilave edilmiş ve 60 dak. +4 ^{0}C karıştırılmıştır.

d. Daha sonra %6 oranında PEG (8000) ve 0.125 M NaCl ilave edilerek 180 dak. +4 ^{0}C 'de karıştırılmıştır.

e. Karışım, 10.000 rpm'de 20 dak. santrifüj edilmiş ve pellet üzerine 0.02 M Na_2SO_3 içeren 50 ml 0.1M Tris-HCl (pH, 8.0) tampon çözelti eklenerek çözülmüştür.

3.2.5.2. Santrifüjleme Metodu

Bu yöntem, Adam ve ark. (1975)'in önerdiği şekilde modifiye edilerek kullanılmış ve aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir.

a. İnfekteli bitki materyali 1:6 (w:v) oranında 0.1M Na_2SO_3 içeren 0.1 M fosfat tampon çözelti (pH, 7.0) içerisinde ekstrakte edilmiş ve 20 dak. homojenize edildikten sonra tülbentten geçirilmiştir.

b. Ekstrakt, 1.000 rpm'de 5 dak. santrifüj edilmiş ve üst sıvı alınmıştır.

c. Süpernatant 17.000 rpm'de 20 dak. santrifüj yapıldıktan sonra pellet alınmış ve üzerine 0.1M Na_2SO_3 içeren 0.01 M fosfat tampon çözelti (pH, 7.0) konularak resüspense edilmiştir.

d. 1.000 rpm'de 5 dak. santrifüj edilerek sıvı kısım alınmış ve 17.000 rpm'de santrifüj edilerek pellet alınmıştır.

e. Pellet 8 ml 0.1M Na_2SO_3 içeren 0.01 M fosfat tampon çözelti (pH, 7.0) içerisinde sulandırılmış ve bir gece bekletilmiştir.

f. Bunun 4 ml'si yarı purifiye olarak ayrılmış, diğer yarısı aynı tampon çözelti kullanılarak 25 ml'ye tamamlandıktan sonra üzerine %5 oranında PEG (8000) ve 0.125 M NaCl eklenmiştir.

g. Süspansiyon, 3 saat karıştırıldıktan sonra, 10.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiş ve pellet alınarak aynı tampon çözeltide çözülmüştür.

Elde edilen yarı purifye virüs preaparatı 1: 10 oranında sulandırılarak, spektrofotometrede 200-400 nm dalga boyları aralığında absorbans değerleri okunmuştur.

3.2.5.3. Kolon Kromotografisi Yöntemi ile Virüsün Saflaştırılması

Yarı purifikasyon işleminden sonra elde edilen preparasyonlar TSWV'nin tam saflaştırılması amacıyla Kolon kromotografisi yönteminde kullanılmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda aşağıdaki yollar izlenmiştir.

3.2.5.3.1. Kromotografi Kolonunun Hazırlanması

1.5 x 50 cm ebatlarındaki cam kolonun ağzı akış hızını kontrol etmek amacıyla küçük bir pamuk parçasıyla tıkantıktan sonra %20 'lik etil alkol içinde süspanse edilmiş ve S-300 kolon meteryalinden (SEPHACRYL S-300-HR) 20 ml alınarak yavaş yavaş cam kolona verilmiştir.

Hava kabarcığı kalmamamsı için bir süre S-300 'ün kolonda kendine kendine sıkışması beklenmiştir.

Yapılan kolona , içinde bulunduğu sıvı henüz bitmeden 0.20 M NaCl, 0.1 M Na –azide ve 0.1 M MgCl içeren 0.05 M Na Fosfat (pH:7.5) buffer tampon çözeltisi kolona ilave edilmiş ve kolon yıkanmıştır.

3.2.5.3.2. Kolon Kromotografi Yönteminin Uygulanması

Kolona örnek yüklenmeden önce kolon meteryalinin üzerinde bulunan tampon çözelti bir pipet yardımıyla alındıktan sonra elde edilmiş yarı saf virüs preparasyonunun 2 ml 'si pipet yardımı ile S-300 kolon üzerine yerleştirilmiş sonra fraksiyonlar toplanmaya başlanmıştır.

Örneğin tamamı kolonunu içerisine geçtikten sonra 0.05 M Na- Fosfat tampon çözeltisi kolona verilmiş ve ardından kolondan çıkan franksiyonlar ELISA testine tabi tutulmuştur.

3.2.6. Virion Analizi

Virion analizi çalışmaları, TSWV izolatlarına ait virionların analiz edilmesi ve aralarında farklılığın var olup olmadığının ortaya konulması amacıyla, Alvarado ve ark. (1995) tarafından bildirilen prosedüre uygun olarak aşağıda belirtildiği gibi yürütülmüştür.

a. 1 gram taze doku, bir havan içerisinde 2 ml soğuk 0.2M'lık sodyum sitrat tampon çözelti (pH, 6.5) ve 4 µl 2-mercaptoethanol varlığında ezilmiş ve ekstrakt tülbentten geçirilmiştir.

b. Sıvı kısım üzerine 1.5 ml kloroform eklenmiş ve 10.000 rpm'de 30 sn. Santrifüj edildikten sonra sıvı kısım alınmış ve üzerine eşit miktarda %14'lük PEG konulmuştur.

c. Gece boyu inkübe edilen karışım 5.000 rpm'de 30 dak. santrifüj edilmiş ve pellet alınarak 1 ml %5 sukroz içeren 5mM EDTA (pH, 7.0) tampon çözeltide çözülmüştür.

d. Daha sonra tekrar 5.000 rpm'de 30 dak. santrifüj yapılmış ve sıvı kısım alınarak buzdolabında 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Elde edilen preparasyonlar SDS-PAGE ve agarose gel elektroforez yöntemleri kullanılarak kontrol edilmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.7. SDS-PAGE Yöntemi

Direkt olarak araziden alınan örneklerden ve virüsün bulaştırıldığı otsu indikatör bitkilerden alınan taze yapraklardan hazırlanan ham ekstraktlar ile virüs arılaştırma işleminde elde edilen yarı saf preparasyonlardan TSWV'nin kılıf proteinlerinin karakterize edilmesi (kılıf protein bantlarının sayısının ve molekül ağırlıklarının saptanması) amacıyla yapılan SDS-PAGE yöntemi, Laemmli (1970)'ye göre aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

Ayrıca, virion analizi çalışmaları sonucu da SDS-PAGE yöntemi kullanılarak kontrol edilmiştir.

SDS-PAGE yönteminin uygulanması:

a. Toplam 5 ml alt jel (1.6ml H_2O, 2.0 ml % 30 luk Acrylamide , 1.3ml Tris (1.5 M, pH.8.8), 0.05 ml SDS % 10, 0.05 ml) hazırlandıktan sonra karıştırılarak homojenize edilmiştir.

b. Daha sonra üzerine % 10'luk Ammonium persülfate (APS) ve 0.002 ml TEMED ilave edilmiş ve tekrar karıştırılmıştır. Bu karışım elektroforez plakaları arasına boşaltılmış ve üzerine 1ml n-butanol konularak 45 dakika polimerize olması için bekletilmiştir.

c. Toplam 2 ml üst jel (1.4 ml H_2O, 0.33 ml % 30 luk Acrylamide, 0.25 ml Tris 1.0 M pH 6.8, 0.02 ml SDS %10) hazırlanmış ve iyice karışması sağlanmıştır.

d. Daha sonra karışıma 0.02 ml % 10'luk Ammonium persulfate (APS), 0.002 ml TEMED ilave edilerek karıştırılmıştır.

e. Alt jelin üzerindeki n-butanol filitre edilerek alınmış ve elektroforez tarağı cam plakalar arasına yerleştirilmiştir.

f. Hazırlanan üst jel, tarağın kenarından pipet yardımıyla hava kabarcığı olmayacak şekilde boşaltılarak 45 dakika polimerizasyona bırakılmıştır.

g. Süre sonunda tarak jel içerisinden dikkatlice alınmış ve oluşan çukurların içi distile su ile yıkanmıştır.

h. Elektroforez plakaları elektroforez tankına yerleştirilmiş, alt ve üst havuzlar running tampon (3g Tris-Base, 14.4g Glycine, 1g SDS/ lt) ile doldurulmuştur.

Jelin hazırlanmasından sonra ise, çalışmada kullanılan örneklerin hazırlanması için aşağıdaki yollar izlenmiştir:

Örnek tampon içerisinde 1:5 oranında ezilerek elde edilen bitki özsuyundan 15 µl alınarak, 0.5 ml'lik ependorf tüpüne konulmuş ve üzerine 15 µl yükleme tamponu ilave edilmiştir. Bu karışım kaynamakta olan (100 °C) su banyosunda 5 dk. bekletilmiş ve daha sonra masa tipi bir santrifüjde 11.000 rpm'de 8 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra hazırlanan örnekler buz üzerine alınmış ve daha sonra jele yüklenmiştir.

Örneklerin yüklenmesinden sonra işlem aşağıdaki şekilde devam etmiştir.

i. Plakalara Bromofenolblue boyası üst jeli geçene dek 80 V akım verilmiştir. Örnekler üst jeli geçtikten sonra da akım 100V'a yükseltilmiş ve boya jelin sonundan çıkana kadar koşum devam etmiştir.

j. Koşum sonunda jel cam plakalar arasından alınarak boyama solüsyonunda boyanmıştır. Daha sonra destain solüsyonu içerisinde bekletilerek jeldeki boya uzaklaştırılmıştır.

k. Değerlendirmeler, jel üzerinde oluşan virüs proteinine ait bandların molekül ağırlıkları, markerların molekül ağırlıkları ile karşılaştırılarak yapılmıştır.

3.2.7.1. SDS-PAGE Jelinin Boyanması

SDS-PAGE jelinin boyanması işlemi aşağıda belirtilen sıraya göre yapılmıştır.

a-Plakalar arasından alınan jel 45 dakika fixing solüsyonu (Ek.4) içerisinde 40 ºC' de 30 dak. inkubatörde tutulmuş ve desitain solüsyonu ile 2 kere yıkanmıştır.

b-Jel desitain solüsyonu içerisinde 40 ºC de 30 dakika inkubatörde tutularak %10'luk Asetik asit ile yıkanmıştır.

c- Sonra oda sıcaklığında %10 luk asetik asit içerisinde 15 dakika bekletilmiştir.

d- Jel asetik asitte (%10 luk) 40 ºC' de 15 dakika inkubatörde tutularak aynı konsantrasyondaki asetik asitte oda sıcaklığında 1 gece bekletilmiştir.

e-Jel üzerindeki fazla boya %10 luk asetik asit ile yıkanarak giderilmiştir.

f-Distile su ile yıkanan jel %1 lik gliserol ile 40 ^{0}C de 15 dak. inkubatöre tutulmuş ve Whatman 3 mm kağıdı ile kurutulmuştur.

3.2.8. Total RNA Ekstraksiyonu

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

Total RNA ekstraksiyonu yönteminde izlenen basamaklar:

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

b. Bitki özsuyundan 1ml alınarak eppendorf tüpleri içerisine yerleştirilmiş ve örnekler 3 dakika 4.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

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

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

h. Elde edilen süpernatant ikiye bölünmüş ve 500 µl'si yeni hazırlanmış eppendorf tüplerine konarak -70 ^{0}C de saklanmıştır.

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

ı. Daha sonra tüplere 50µl sodium asetate (3M) ilave edilmiş ve örnekler tekrar karıştırılarak -70 ºC'de bir gece bekletilmiştir.

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

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

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

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

Daha sonra Agaroz Jel Elektroforez çalışmasıyla total RNA'ların varlığı kontrol edilmiştir.

3.2.9. RT- PCR Çalışmaları

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

DNA molekülündeki dizisi bilinen iki bölge arasındaki spesifik DNA parçasını çoğaltmak amacıyla, çok az miktarda mRNA'dan cDNA'lar oluşturarak bitki patojenleri'nin nükleik asit dizileri belirlenebilmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Nükleik asit materyali RNA olan bir hedef çoğaltılmak isteniyorsa, önce RNA'dan Reverse Transcriptase (RT) enzimi ile cDNA'lar elde edilir ve daha sonra bu DNA'lar PCR işlemiyle çoğaltılır (RT-PCR).

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

RT- PCR yöntemi, Jain ve ark. (1998); Pappu ve ark. (1993)'e göre yapılmıştır. İki aşamadan oluşan işlemin birinci aşamasında; RT (Reverse transcription) işlemi ile cDNA'lar elde edilmiş, ikinci aşamada ise, bu cDNA'lar kullanılarak PCR yapılmıştır.

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

Bu PCR tüplerine, 16.6 µl saf su, 5 µl RT tampon çözeltisi (250 mM Tris-HC1 (pH 8.3), 250 mM KC1, 20 mM $MgC1_2$, 50 mM DTT), 1 µl dNTP (2 mM), 0.3 µl RNAse ve 0.1 µl RT enzimi ilave edilerek, 42 °C' de 60 dakika inkübe edilmiş ve işlem sonunda cDNA'lar elde edilmiştir.

PCR aşamasında ise, ayrı bir PCR tüpüne, yukarıdaki işlemde elde edilen cDNA'dan 1 µl konulmuş, üzerine 16.8 µl saf su, 2.5 µl 10X PCR tampon çözeltisi (100 mM Tris- HC1 (pH 8.8), 500 mM KC1, % 0.8 Nonidet P40), 1.5 µl MgCl2, 1 µl dNTP (2 mM), 0.2 µl Taq DNA polymerase, 1 µl forward primer ve 1 µl reverse primer ilave edilmiştir. Daha sonra tüpler;

94 °C'de 2 dakika	1 döngü
94 °C'de 30 saniye	
52 °C'de 30 saniye	35 döngü
72 °C'de 2 dakika	
72 °C'de 10 dakika	1 döngü

olacak şekilde ayarlanmış termocycler'a yerleştirilerek PCR aşaması tamamlanmıştır.

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

a. 37 °C'de 1 saat; Amplifikasyonu yapılacak olan PDV'nin RNA'sından komplementer DNA (cDNA) elde etmek amacıyla kullanılmıştır. 37 °C MMLV reverse transcriptase enziminin çalışma sıcaklığıdır.

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

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

d. 52 °C'de 30 sn. ; Kullanılan primerlerdeki G, C, A ve T baz miktarları göz önünde bulundurularak Tm=(G+C)x4+(A+T)x2 formülü (Tm=melting temperature=erime ısısı) ile ayarlanmıştır ve bu sıcaklıktan 5 °C aşağısı kullanılmıştır. Bu programdaki sıcaklık seviyesi; primerlerin, çoğaltılması hedeflenen nükleik asitte bulunan ve primerlere spesifik yerlere bağlanması için gerekli olan sıcaklıktır.

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

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

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

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

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

cDNA .....1 µl

2X PCR Master Mix.……....12.5µl

Primer1.....1 µl

Primer2.....1 µl

dH_2O.....9.5 µl

3.2.9.1. Amplifikasyon Sırasında Kullanılan Kimyasalların Optimum Konsantrasyonlarının Ayarlanması

TSWV için kullanılan primerler farklı pmol konsantrasyonlarında purifiye edilmişlerdir. Amplifikasyon sırasında kulanılmak amacıyla L1TSWVR 10/**50.3** L2TSWVF 10/**68** oranında, S1INSVF 10**60**, S2INSVR 10**50**, H1R 10**58**, H2F 10**53**, CP5-Bam 10**49**, CP3-Pst 10**47**, BR60 10**25**, BR65 10**56**, BR035 10**65**, PDH006 10\70 (Pr/**H_2O**) oranında ddH_2O ile sulandırılarak 10 pmol'e ayarlanmıştır.

3.2.10. Agarose Gel Elektroforez Çalışmaları

RT-PCR işlemleri sonunda, TSWV'nin çoğaltılan nükleik asit materyali ile virion analizi çalışmalarında elde edilen preparasyonlar, bromofenol blue ile boyanıp % l'lik agaroz jel elektroforez yöntemine tabi tutulmuştur.

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

360 mg agaroz 30 ml lxTAE tampon çözeltisi (4.84 gr Tris, 2 ml 0.5 M Na_2EDTA, 1.142 ml Glucial Asetic Acid/1 lt) içerisine konularak, agaroz eriyinceye kadar mikrodalga fırında ısıtılmış ve son hacim tekrar 30 ml'ye ayarlanmıştır.

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

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

Örnekler, 15 µl örnek ve 4 µl 6x loading buffer olacak şekilde hazırlandıktan sonra jeldeki kuyulara dikkatli bir şekilde yüklenmiştir. İlk kuyuya marker (l µl marker, l µl loading buffer, 4 µl saf su) konulmuştur.

Loading buffer içindeki turuncu renk (Orange G) jelin sonuna gelene kadar elektroforez tankına 40 V elektrik akımı verilmiştir.

Jel, elektroforez işlemi sonunda, oda sıcaklığında 10 dk. 30 µl ethidium bromid/ 100 ml saf su (l0 mg/ml saf su) çözeltisinde çalkalanarak boyanmış ve daha sonra fazla ethidium bromidi uzaklaştırmak için 5 dk. saf su içerisinde tutulmuştur.

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

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Survey Çalışmaları

Çalışmanın yürütüldüğü yörelerde TSWV'nin bulaşıklık oranının ortaya konulması ve toplanan örneklerde TSWV varlığının farklı yöntemlerle saptanması amacıyla, Adana iline bağlı Tuzla ilçesi ile Mersin iline bağlı Kazanlı ve Erdemli ilçelerinde örtüaltı ve açıkta domates ve biber üretimi yapılan toplam 15 alanda survey çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Surveylerde gezilen alanlar ve toplanan örnek sayıları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Buna göre, İçel iline bağlı Kazanlı ilçesinde, 5 biber ve 3 domates olmak üzere 8 sera alanı gezilmiş, ve 75 biber bitkisi ile 45 domates bitkisinden örnekleme yapılmıştır. Aynı ile bağlı Erdemli ilçesinde, açıkta yetiştiricilik yapılan 3 biber ve 3 de domates alanı gezilmiş ve 45 biber, 45 de domates örneği toplanmıştır. Adana iline bağlı Tuzla ilçesinde ise, açıkta yetiştiricilik yapılan biber alanından 10 biber örneği alınmıştır.

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

Simptomatolojik gözlemlerle virüsün kesin tanısı mümkün olmadığından, bu çalışmada, İçel ve Adana illerine bağlı ilçelerde, toplam 8 sera ve 7 açık alanda yapılan örneklemelerde alınan 90 domates ile 130 biber olmak üzere toplam 220 örnek ELISA testi ile testlenmiştir.

ELISA testleri sonucunda, TSWV ile infekteli olduğu saptanan örneklerden dört tanesi kodlanarak, mekanik inokulasyon, RT-PCR, SDS-PAGE, virüs saflaştırma ve virion analizi çalışmalarında kullanılmıştır.

Bu çalışmada, Tuzla ilçesinden alınan izolat T1 ve Erdemli ilçesinden alınan izolat E8 ve Kazanlı ilçesinden alınan izolatlar M5 ve D2 şeklinde kodlanmıştır.

Şekil 4.1. Biberde deformasyon simptomu

Şekil 4.2. Biber bitkisi yaprağında kıvrılma ve deformasyonlar

Şekil 4.3. Domates bitkisi yaprağında TSWV simptomu

Şekil 4.4. Domates meyvesi üzerinde halkalı leke ve deformasyon

4.2. Mekanik İnokulasyon Çalışmaları

Yapılan ELISA testleri sonucunda, TSWV ile bulaşık olduğu saptanan, yaprak ve meyve simptomları gösteren T1, E8, M5 ve D2 kodlu izolatlar kullanılarak, Çizelge 3.1.'de verilen indikatör bitkileri üzerine yapılan mekanik inokulasyonlar sonucunda Çizelge 4.2'de verilen sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı TSWV izolatları ile Yapılan Mekanik İnokulasyon Çalışmalarında Test Bitkileri Üzerinde Gözlenen Simptomlar

Test Bitkileri	**M5 İzolatı**	**D2 İzolatı**	**E8 İzolatı**	**T1 İzolatı**
Capsicum annuum	HL, D, K	HL , K	HL, GÖ	HL, K
Lycopersicum esculentum	D, K, GÖ	D, K	D, K, GÖ	D, K
Gompherana globosa	-	-	K	-
Chenopodiun quinoa	-	-	-	-
C. amaranticolor	-	-	-	-
Nicotiana glutinosa L.	K, B	-	K, GÖ, B	-
N. tabacum L.*''Xanthi'*	YK, D, B, K	YK, D, B, K	YK, D, B, K	YK, D, B, K
N .tabacum L.*''Xanthi nc''*	YK, D, B, K, HL	YK, D, B, K, HL	YK, D, B, K, HL	YK, D, B, K, HL
N. tabacum''samsun nn''	YK, D, B, K	YK, D, B, K	YK, D, B, K	YK, D, B, K, HL
N. tabacum ''samsun''	YK, D, B, K	YK, D, B, K	YK, D, B, K	YK, D, B, K
N. rustica	YK, D, B, K, HL	YK, D, B, K, HL	YK, D, B, K, HL	YK, D, B, K, HL

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

Farklı dönemlerde tekrarlanan mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan TSWV izolatları, *Chenopodium amaranticolor* ve *C. quinoa* bitkileri üzerinde herhangi bir simptom oluşturmamış, buna karşılık diğer indikatör bitkilerde benzer veya farklı simptomlara neden olmuştur. Sadece E8 izolatı *Gompherana globosa* bitkisinin yapraklarında renk açılması, klorotik ve lokal lezyonlar şeklinde simptomlara neden olurken diğer üç izolat herhangi bir simptom vermemiştir.

Mekanik inokulasyonlar sonrası indikatör bitkilerin muhafaza edildiği sıcaklığın (22-24 °C) simptom çıkış süresi üzerinde etkili olduğu gözlenmiş, buna karşılık simptom şekli ve şiddetinde farklılık saptanmamıştır.

M5 izolatı indikatör bitkiler üzerinde aşılama tarihinden 7- 13 gün sonra, D2 izolatı 14- 20 gün sonra, T1 izolatı 30- 60 gün sonra simptomlara neden olurken, E8 izolatı ile aşılı bitkilerde 4- 7 gün gibi kısa bir süre aralığı içerisinde simptom çıkışı gözlenmiştir.

Mekanik inokulasyon çalışmalarında, *N. rustica* indikatör bitkisi kullanılan izolatların tamamına en kısa sürede, en yoğun ve TSWV'nin en karakteristik simptomlarını vermiştir.

TSWV'nin bu dört izolatı içerisinde indikatör bitkilerde bir hafta gibi kısa bir sürede içerisinde simptom göstermeye başlayan E8 izolatı domates bitkisinden elde edilmiş olup, simptom oluşturmasından kısa bir süre sonra test bitkilerinin ölümüne neden olduğu ve bu izolatın aşılandığı test bitkilerinde görülen simptomların diğer test bitkilerinde görülen simptomlara oranla çok daha şiddetli ortaya çıktığı gözlenmiştir. Diğer M5, D2 ve T1 izolatları ise, biber bitkisinden alınmış ve E8 izolatına göre daha ılımlı oldukları gözlenmiştir.

İzolatların hepsi, *C. annum* bitkisi yapraklarında halkalı lekelere neden olurken, diğerlerinden farklı olarak M5 izolatı yapraklarda deformasyon, E8 izolatı da geriye ölüm simptomuna neden olmuştur. Ayrıca üç izolat kloroza neden olurken E8 izolatı ile inokule edilen bitkilerde kloroz gözlenmemiştir.

Lycopersicon esculantum üzerinde, TSWV izolatlarının hepsi yapraklarda deformasyon ve kloroz şeklinde simptomlara neden olurken, M5 ve E8 izolatları bunlara ilaveten geriye ölüm simptomuna da neden olmuştur.

M5 ve E8 izolatları ile inokule edilen *N. glutinosa* bitkilerinde, kloroz ve bodurluk simptomları gözlenirken, E8 izolatı ayrıca bu bitkilerde geriye ölüme neden olmuştur. D2 ve T1 izolatları ise simptom çıkışına neden olmamıştır.

TSWV'nin M5, D2 ve E8 izolatları ile inokule edilmiş, *N. tabacum* ''Xanthii'', *N. tabacum* ''Samsun'' ve *N. tabacum* ''Samsun NN'' indikatör bitkilerinin yapraklarında kıvrılma, deformasyon ve kloroz ile bitkide bodurluk simptomları oluştururken, *N. tabacum* ''Xanthi nc'' ve *N. rustica* yapraklarında bu

simptomlara ilaveten halkalı lekeler meydana gelmiştir. T1 izolatı ile yapılan mekanik inokulasyonlar sonucunda da benzer simptomlar elde edilmiş, fakat bu izolat diğerlerinden farklı olarak ilerleyen zamanlarda, *N. tabacum* ‘’Samsun NN’’ bitkisinin yapraklarında da halkalı lekeler ortaya çıkmasına neden olmuştur.

Şekil 4.5. *N. rustica*‘da deformasyon ve halkalı lekeler

Şekil 4.6. *N.tabacum*‘’Samsun’’da klorotik ve nekrotik lekeler

Şekil 4.7. *N. tabacum* ‘’Xanthii’’ de klorotik ve nekrotik lekeler

Şekil 4.8. *N. tabacum* ‘’Samsun NN’’ de halkalı lekeler

Şekil 4.9. N. *tabacum* ‘’xanthii nc’’de halkalı lekeler ve deformasyon

Şekil 4.10. *N. rustica*‘da halkalı lekeler

Şekil 4.11. Domates bitkisinde yaprak deformasyonu

Şekil 4.12. Biber bitkisinde kloroz , yaprak kıvrılması

4.3. ELISA Testleri

Yapılan ELISA testlerinde, arazi çıkışlarında simptomatolojik olarak, TSWV ile infekteli olduğundan şüphelenilen 90 domates ve 130 biberden oluşan toplam 220 bitki örneği testlenmiştir. Testlenen domates örneklerinden 31 tanesi (%34.4), biber örneklerinden ise, 69 tanesi (%30) olmak üzere toplam 100 bitki (%45.4) TSWV ile infekteli bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Survey yapılan alanlar, bitki türü, testlenen ve infekteli bulunan bitki sayıları ile hastalık oranı

İl	İlçe	Suvey Alanı	Bitki Türü	Testlenen Bitki Sayısı	İnfekteli Bitki Sayısı	Hastalık Oranı (%)
İçel	Kazanlı	Sera 1	Biber	15	5	33.3
		Sera 2	Biber	15	7	46.6
		Sera 3	Biber	15	7	46.6
		Sera 4	Biber	15	12	80.0
		Sera 5	Biber	15	12	80.0
		Sera 6	Domates	15	8	53.3
		Sera 7	Domates	15	3	20.0
		Sera 8	Domates	15	2	13.3
	Erdemli	Açık alan	Biber	15	5	33.3
		Açık alan	Biber	15	8	53.3
		Açık alan	Biber	15	9	60.0
		Açık alan	Domates	15	11	73.3
		Açık alan	Domates	15	4	26.6
		Açık alan	Domates	15	3	20.0
Adana	Tuzla	Açık alan	Biber	10	4	26.6

Çizelge 4.2.'ye göre, İçel iline bağlı Kazanlı ilçesinde örtüaltı yetiştiriciliği yapılan biberlerde infeksiyon oranı, %33.3- 80.0 arasında olup, domateslerde bu oran %13.3- 53.3 arasında değişmektedir. Erdemli ilçesinde ise, açıkta biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda infeksiyon oranı %33.3- 60.0 arasında, domates alanlarında ise, %20- 73.3 arasında saptanmıştır.

Adana iline bağlı Tuzla ilçesinde ise, açık alanda biber yetiştirilen alanda infeksiyon oranının %26.6 olduğu bulunmuştur. Elde edilen bu sonuç, TSWV'nin bu ilçede varolduğunu ilk olarak ortaya koymaktadır.

Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan indikatör bitkilerin ELISA yöntemi ile testlenmesi sonucunda, belirti gösteren bitkilerde TSWV infeksiyonu saptanmıştır. Belirti vermeyen indikatör bitkiler de (*Chenopodium amaranticolor* ve *C. quinoa*), herhangi bir latent infeksiyonun bulunma olasılığı dikkate alınarak testlenmiş, fakat bu bitkilerde TSWV infeksiyonu belirlenmemiştir. Böylece, mekanik inokulasyon çalışmalarında elde edilen sonuçlar, ELISA testleri ile doğrulanmıştır.

Ayrıca, TSWV ile infekteli arazi örneklerinden ve mekanik inokulasyon çalışmalarında inokule edilen indikatör bitkilerden alınan tohumlardan ELISA testleri yapılmıştır. Bu çalışmada, arazi örneklerinden alınan biber ve domates tohumlarında TSWV infeksiyonu saptanırken, indikatör bitkilerin tohumlarında rastlanmamıştır.

Bunlara ilaveten, TSWV'nin saflaştırılması amacıyla kullanılan yöntemlerin farklı aşamalarında alınan preparasyonlarda virüs varlığının saptanması amacıyla ELISA testi ile testlenmiş ve bir sonraki aşamada, özellikle santrifüj hızı ve süresinde yapılacak değişiklikler ile preparasyonlarda virüsün varlığı daha net olarak ortaya konulmuştur.

4.4. Saflaştırma (Purifikasyon) Çalışmaları

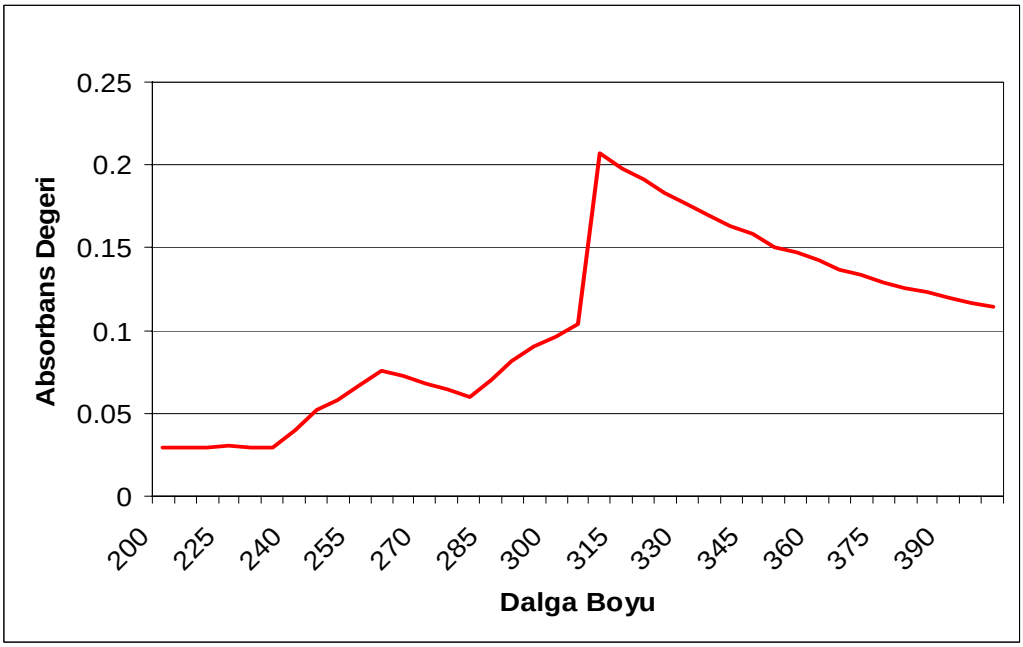
TSWV ile infekteli olduğu saptanan arazi örneklerinden (M5, D2, T1 ve E8 izolatları) ve TSWV inokule edilen *N. rustica* indikatör bitkilerinden alınan taze sürgün ve yapraklar kullanılarak virüs saflaştırma çalışmaları yapılmıştır.

Bu çalışmada, yarı saf virüs preparasyonunun elde edilmesi amacıyla, PEG çöktürme ve santrifüjleme yöntemleri, tam saflaştırılmış virüs preparasyonu için de kolon kromatografisi yöntemi kullanılmıştır.

TSWV'nin yarı saflaştırılması için PEG çöktürmesi yönteminin kullanılması uygun olmamıştır. Bu yöntemde izlenen aşamaların herbirinde virüsün önemli bir miktarının kaybolduğu, preparasyonların ELISA ile testlenmesi sonucunda görülmüştür. Farklı aşamalarda uygulanan santrifüjleme hızı ve süresinde değişiklikler yapılmış, fakat olumlu bir sonuç edilememiştir. Arıca, ekstraksiyon ve

elde edilen pelletin sulandırma aşamalarında farklı tampon çözeltiler kullanılması, bun ların pH'sı ve konsantrasyonunda değişikler yapılması, inhibitör engelleyici maddelerin (Sodyum sülfit, mercaptoethanol) ve deterjanların (Triton X-100) ilave edilmesi de elde edilen sonucu etkilememiştir.

Farklı santrifüj hızları (1000- 17 000 rpm arasında) kullanılarak yapılan saflaştırma yöntemi ile virüs yarı saf olarak edilebilmiştir. Bu preparatın spektrofotometrede 200-400 nm dalga boyları arasında absorbans okumaları sonucunda elde edilen grafik, preparasyon içinde çok fazla bitki kontaminasyonu olduğunu göstermiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. TSWV'nin Yarı Saf Preparasyonunun Spektrofotometre Okumasında Elde Edilen Absorbans Değerleri

Yarı saf virüs preparatının 1: 10 sulandırması yapıldıktan sonra, 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan absorbans değerleri ise, sırasıyla 0.076 ve 0.060 olarak alınmış, 260/ 280 oranı 1.2 olarak hesaplanmıştır. ELISA testinde okumasında ise, negatif kontrol 0.114 değerini verirken, yarı saf virüs preparatından 2.220 değeri alınmıştır.

Yarı saf virüs preparatının biraz daha temizlenebilmesi ve bir adım daha ilerliyebilmek amacıyla, bu yöntemin ardından PEG çöktürme yöntemi

kullanıldığında, virüs kaybedilmemiş, fakat bu adımın saflaştırma işlemine herhangi bir katkısı da olmamıştır.

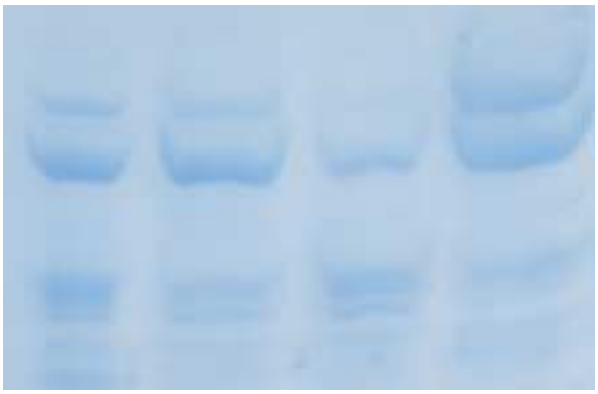
Yarı saf TSWV'nin tam olarak saflaştırılabilmesi için gerekli ultrasantrifüj imkanının bulunmaması nedeniyle, bu işleme kolon kromatografisi yöntemi kullanılarak devam edilmiştir. Fakat bu aşamada virüs kaybedilmiştir. Öncelikle saflaştırma işleminde kullanılan bitki dokusunun ve gerekli kolon materyalinin kısıtlı miktarda olmasından dolayı, bu yöntemin bu virüs için modifiye edilmesi imkanı olmamıştır.

4.5. Virion Analizi Çalışmaları

TSWV izolatlarına ait virionlar arasında elektriksel alanda fark olup olmadığının ortaya konulması amacıyla, infekteli *N. rustica* bitkilerinden alınan taze dokular kullanılarak virion analizi çalışmaları yapılmış ve elde edilen preparasyonlar, SDS-PAGE ve agarose jel elektroforez yöntemleri ile kontrol edilmiştir.

Yapılan agarose jel elektroforez işleminde, TSWV izolatlarına (M5, D2, T1 ve E8) ait virionların varlığı gözlenmiş ve aralarında herhangi bir fark bulunmamıştır. Gözlenen bandların görüntülenebilecek kadar çok net olmaması ve etrafında çok fazla sürüklenme olmasından dolayı, jelin görüntülenmesi mümkün olmamıştır.

Ayrıca hazırlanan preparasyonlar, SDS-PAGE işlemine tabi tutulmuş ve TSWV izolatlarının virionlarına ait bandlar jel üzerinde gözlenmiştir (Şekil 4.14).



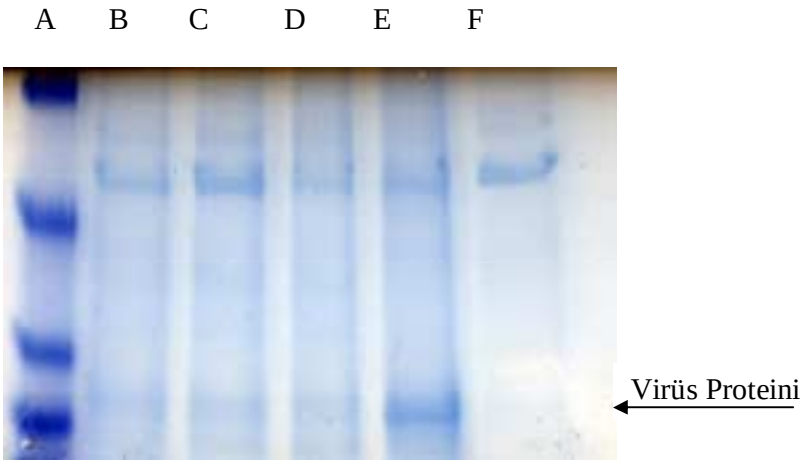
Şekil 4.14. TSWV Virionlarının SDS-PAGE de Elde Edilen Bandları

Virion analizi çalışmalarında, TSWV izolatları ile infekteli indikatör bitkilerin yanında, negatif kontrol olarak sağlıklı bitkilerde kullanılmıştır. TSWV ile infekteli bitkilerden yapılan çalışmalarda, SDS-PAGE'de 4 band gözlenmiş, fakat sağlıklı bitkilerden elde edilen pareparasyonlarda virüse ait herhangi bir band gözlenmemiştir.

4.6. SDS-PAGE Çalışmaları

TSWV izolatlarına ait proteinlerin molekül ağırlıklarının saptanması amacıyla, infekteli *N. rustica* indikatör bitkilerinden elde edilen ham ekstraktlar ve virüs saflaştırma işlemleri sonunda elde edilen yarı saf virüs preparasyonları SDS-PAGE yöntemine tabi tutulmuştur.

Bu işlem sonunda, jel üzerinde sadece TSWV izolatları ile bulaşık örneklerde bulunan ve 27 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu hesaplanan bir band gözlenmiştir (Şekil 4.15). Bu band negatif kontrol olarak kullanılan örneklerde bulunmamıştır.



Şekil 4.15. TSWV'nin SDS-PAGE'de Oluşturduğu Protein Bandları
A. Protein Marker, B-E. TSWV İzolatları, F;Sağlıklı

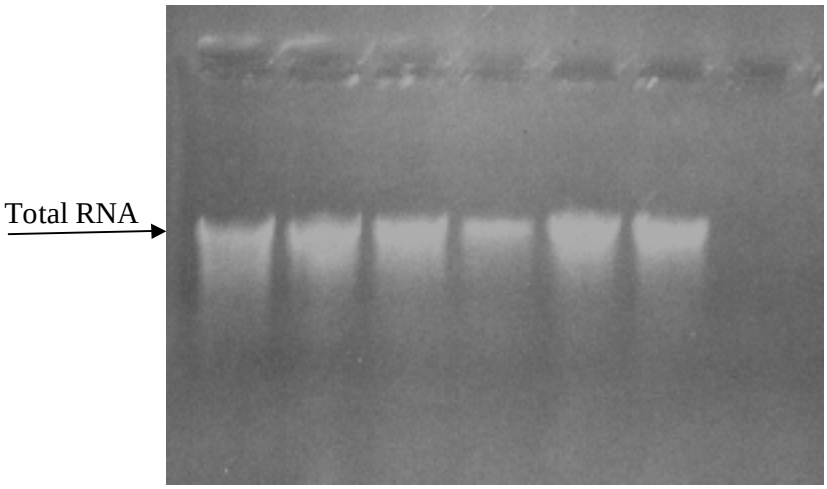
Mohamed ve ark. (1973) ve Tas ve ark. (1977), bu virüse ait 4 protein bulunduğunu, bunların en büyüğünün 120 kDa L proteini, ikincisinin 78 kDa G1 membran glikoproteini, üçüncüsü 58 kDa G2 membran glikoproteini ve en sonuncusunun ise, 27 kDa N proteini olduğunu bildirmişlerdir.

Bu virüse ait 4 protein bulunmasına rağmen, bu çalışmada TSWV'nin tek bandı elde edilebilmiştir. Virüsün daha büyük moleküler ağırlığa sahip protein bandları yapılan bu çalışmada elde edilememiştir. Yapılan tekrarlamalarda da aynı sonuç alınmıştır. Bitki bünyesinde bu proteinlerin miktarı, santrifüj aşamalarında meydana gelen kayıplar ve elektroforez koşullarından dolayı bu sonucun elde edildiği düşünülmüştür.

4.7. Total RNA Ekstraksiyon Çalışmaları

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

Yapılan koşum işlemi sonunda, ethidium bromid ile boyanan jel üzerinde hastalıklı bitkilerden elde edilen total RNA'lar gözlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. TSWV'nin Agaroz Jeldeki Total RNA Bandları

4.8. RT-PCR Çalışmaları

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

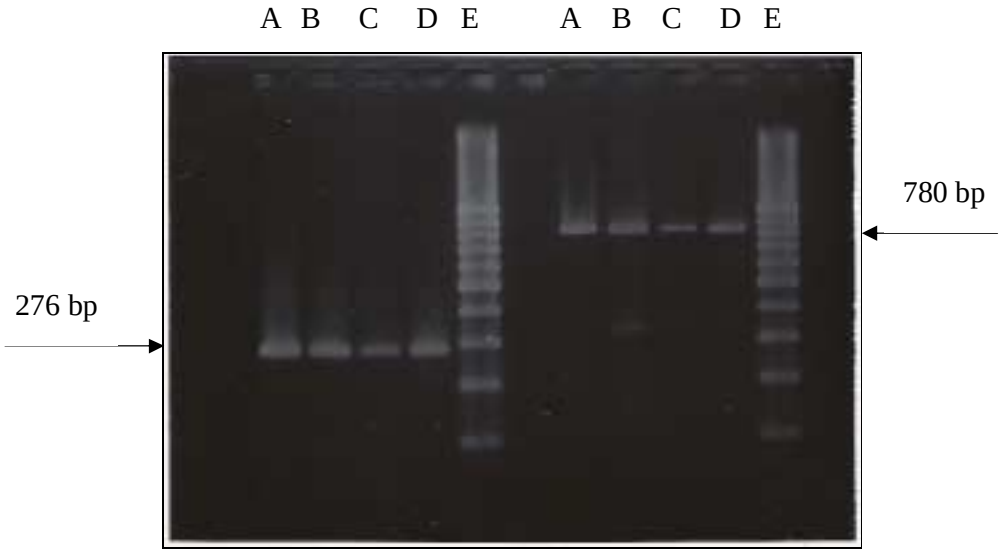
Bu amaçla ticari olarak sentezlettirilen,

1. L1TSWVR-L2TSWVF kodlu primer çifti 276 bp'lik
2. S1INSVF-S2INSVR kodlu primer çifti 602 bp'lik
3. H1R-H2F primer çifti 700 bp'lik
4. CP5-Bam-CP3-Pst primer çifti 780 bp'li

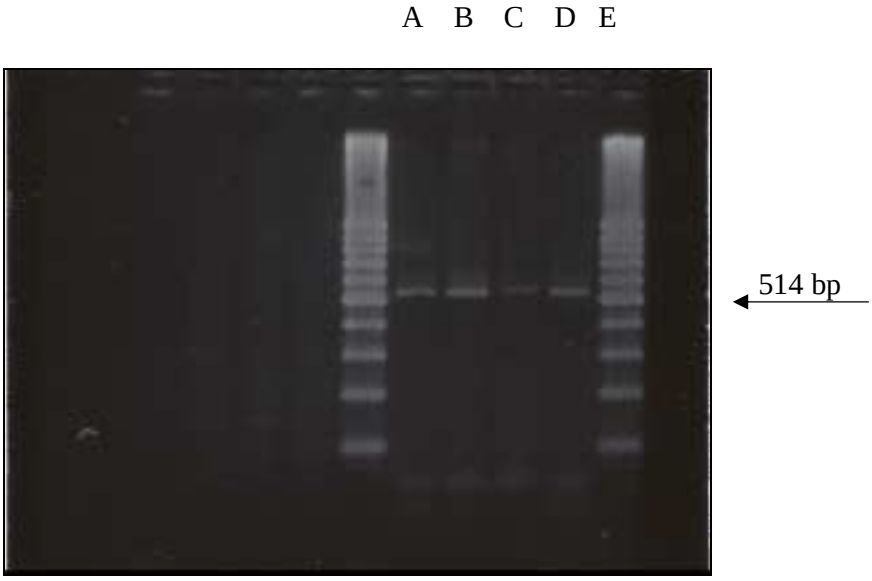
5. BR035-PDH006 primer çifti 514 bp'lik mesafeleri çoğaltılmak amacıyla kullanılmış ve beklenen band büyüklükleri elde edilmiştir.

Bu primerlerden 1ve 4 nolu primer çiftleri, TSWV'ye spesifik, ve 5 nolu primer çiftleri Tospovirüslere spesifik, 2 nolu primer çifti INSV'ye spesifik ve 3 nolu primer çifti WSMoV'ye spesifiktir.

Mekanik inokulasyon yöntemi ile TSWV bulaştırılan indikatör bitkilerden elde edilen total RNA'lar kullanılarak yapılan RT-PCR işlemlerinin sonucunda testlenen örnekler, 1, 4, 5 nolu primer çiftleri ile beklenen büyüklüğe sahip bandlar vermiş olup, 2 ve 3 nolu primer çiftleri ile yapılan RT-PCR işleminde herhangi bir band gözlenmemiştir (Şekil 4.17, 18).



Şekil 4.17. 1 ve 4 nolu primer çiftleri ile yapılan RT-PCR sonuçları
A; M5, B; E8, C; D2, D; T1



Şekil 4.18. 7 nolu primer çiftleri ile yapılan RT-PCR sonuçları
A; M5, B; E8, C; D2, D; T1

RT-PCR işleminde elde edilen bu sonuçlar, çalışmada kullanılan domates ve biber bitkilerinden elde edilen M5, D2, E8 ve T1 kodlu izolatların TSWV olduğunu ve aşılanan indikatör bitkilerin yapraklarında saptanan deformasyon, halkalı lekeler, kıvrılma, kloroz, bitkilerde bodurluk ve geriye ölüm simptomlarının TSWV infeksiyonu sonucu meydana geldiğini, buna karşılık çalışılan örneklerde INSV veya WSMoV infeksiyonu bulunmadığı göstermektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, Eiras ve ark. (2001) tarafından bildirilen sonuçlar ile uyum içerisindedir. Araştırıcılar, saflaştırılmış viral RNA'ları ve BR035-PDH006 primer çiftini kullanarak yaptıkları RT-PCR işleminde tospovirüs varlığını saptamışlar ve 514 bp'lik band gözlemişlerdir.

Ayrıca, Adkins ve ark. (2004), L1TSWVR- L2TSWVF, S1INSVF-S2INSVR ve H1R-H2F primer çiftlerini kullanarak yaptıkları RT-PCR çalışmalarının sonuçları ile bu çalışmada elde edilen sonuçlar arasında bir paralellik vardır. Araştırıcılar, yukarıda isimleri verilen primerleri kullanılarak tospovirüsleri saptamışlar ve sırasıyla, 276 bp, 602 bp ve 700 bp'lik bandlar elde etmişlerdir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

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

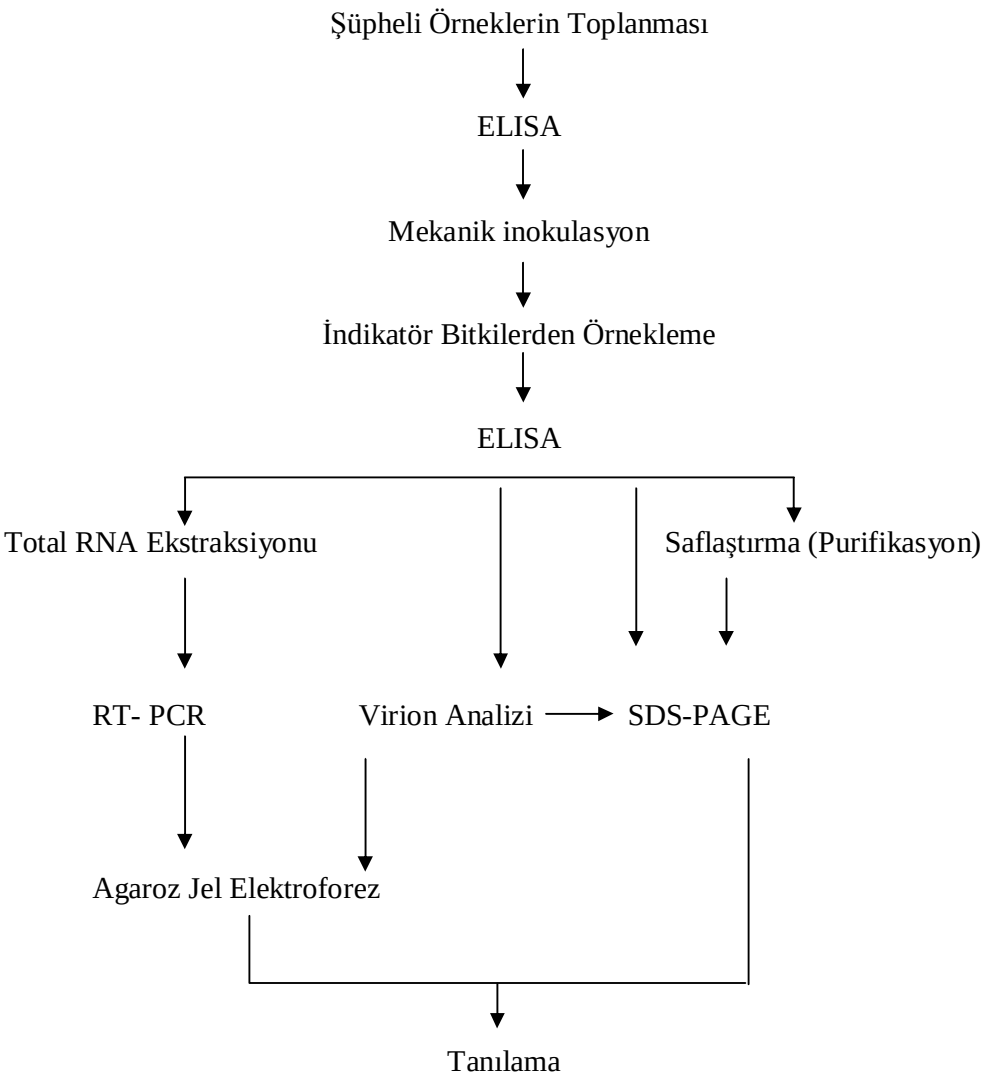
Sebzelere zarar veren virüs hastalıkları içerisinde en önemlilerinden biri TSWV'dir. Bu virüs hastalığının ülkemiz sebze yetiştiriciliği açısından önemi son yıllarda gittikçe artmaktadır. Vektörü olan thripsler aracılığıyla etkili bir şekilde çok geniş alanlara kolayca taşınabilmesi ve çok geniş konukçu dizisine sahip olması bu hastalık etmeninin önemini daha da arttırmaktadır.

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

Bu çalışma, TSWV'nin Adana ve Mersin illeri ile çevresinde survey yapılan domates ve biber yetiştirilen alanlarda, yaygınlık oranının belirlenmesi, biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak saptanması ve tanılanması amacıyla yapılmıştır.

TSWV'nin saptanması ve tanılanmasında izlenen yollar, Çizelge 5.1.' de verilmiştir.

Çizelge 5.1. TSWV'nin Tanılanmasında İzlenilen Yollar



Bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.

1. Yapılan surveylerde, 130 biber ve 90 domates bitkisinden olmak üzere toplam 220 bitki örneği toplanmış ve ELISA testine tabi tutulmuştur. Testlenen örneklerden 31 domates (%34.4) ve 69 biber (%30) bitkisinde TSWV saptanmıştır. Toplanan domates ve biber örneklerinde hastalık oranı % 45.4 olarak hesaplanmıştır.

2. TSWV ile bulaşık örneklerden her ilçeyi temsil edecek şekilde 4 tanesi (Tuzla ilçesinden alınan T1, Erdemli ilçesinden alınan E8, Kazanlı ilçesinden alınanlar M5 ve D2 olarak kodlanmış) şeçilmiş ve izolat olarak kabul edilerek, mekanik inokulasyon, SDS-PAGE, virion analizi ve RT- PCR çalışmalarında kullanılmıştır.

3. Mekanik inokulasyon çalışmalarında;

Bütün izolatlar, *Nicotiana rustica* test bitkisinin yapraklarında deformasyon ve halkalı leke simptomuna neden olmuştur. Diğer test bitkilerine göre en kısa sürede simptom bu bitki üzerinde gözlenmiştir.

Sadece E5 izolatı, *Gomphena globosa* test bitkisi yapraklarında renk açılması, klorotik ve lokal lezyonlar şeklinde simptom göstermiş, diğer izolatlar herhangi bir belirtiye sebep olmamıştır.

İzolatlar, *Nicotiana tabacum* ‘Xanthi’, *N. tabacum* ‘Xanthi nc’, *N. tabacum* ’Samsun’ ve *N. tabacum* ‘Samsun NN’ test bitkilerinin yapraklarında kıvrılma, deformasyon, kloroz, gelişme geriliği ve halkalı leke simptomlarına neden olmuştur.

M5 ve E8 izolatları, *N. glutinosa* test bitkisi yapraklarında kloroz, gelişme geriliğine ve ölüm simptomlarına neden olurken, D2 ve T1 izolatları ile infekteli *N. glutinosa* test bitkisinde herhangi bir simptom gözlenmemiştir.

Bu çalışmada kullanılan bütün izolatlar, *Lycopersicon esculentum* ve *Capsicum annum* test bitkileri üzerinde benzer simptomlara neden olurken, *Chenopodium amaranticolor* ve *C. quinoa* bitkileri üzerinde herhangi bir simptom oluşmamıştır.

E8, D2, M5 kodlu izolatları ile aşılı bitkilerde 5-15 gün içerisinde simptom gözlenmiş, bununla birlikte T1 izolatı ise, 30-60 gün gibi bir sürede simptom çıkışına neden olmuştur.

4. TSWV'nin kılıf proteininin molekül ağırlığını saptamak amacıyla yapılan SDS PAGE yöntemi ile virüsün proteinin molekül ağırlığı 27 kDa olarak hesaplanmıştır.

5. TSWV'nin yarı ve tam saflaştırılması amacıyla kullanılan PEG çöktürme yöntemi ve kolon kromatografisi yöntemleri başarılı olmamıştır. Santrüfüjleme yöntemi kullanılarak virüs yarı purifiye edilebilmiş ve elde edilen preparasyonun spektrofotometrede okunan 260 ve 280 değerlerinin oranı 1.20 olarak hesaplanmıştır.

6. Virion analizi çalışmalarında, TSWV izolatları arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir. Hazırlanan preparatlardan yapılan SDS PAGE işleminde bütün izolatlarda 4 band gözlenmiştir.

7. TSWV izolatlarına ait total RNA'lar elde edilmiş ve agaroz jel elektroforez de görüntülenmiştir. Bu preparasyonlar, RT-PCR ile testlenmiş ve beklenen büyüklüklerde bandlar elde edilmiştir. Böylece, bu çalışma ile son yıllarda yapılan birçok çalışmada rutin olarak kullanılan moleküler bir yöntem, bölgemizde de TSWV infeksiyonunu saptamak için başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

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

Bundan sonra TSWV'nin karakterize edilmesi ve ırklarının ortaya konularak aralarındaki farklılıkların saptanması gerekmektedir. Ayrıca, bu virüsün vektörü olan thripslere karşı pratikte kullanılabilecek uygulamalar da ortaya konulmalıdır. Böylece, kimyasal mücadelesi yapılamayan ve çok etkili bir vektör böceğe sahip olan TSWV'nin baskı altına alınması söz konusu olacaktır.

KAYNAKLAR

ABAD, J.A., MOYER, J.W., KENNEDY, G.G., HOLMES, G.A., and CUBETA, M.A., 2005. Tomato Spotted Wilt Virus on Potato in Eastern North Carolina. Am J of Potato Res 82:255-261.

ADAM, G., LASEMANN, D.E., 1994. Identification and Characterization of a New Tospovirüs Isolate From *Anemone coronaria l.* by TAS-ELISA and Electron Microscopy.

ADAM, G., ROGERRO, P., MALAVASİ, F., MİLNE, R.G. and PAPA, G., 1995. Approach to a General Tospovirus Assay Using Antibodies to Natively Purified Tomato Spotted Wilt Virus G Proteins. Bulletin Eppo- Oepp 25:247-257.

ADKINS, S., ZITTER, T., and MOMOL, T., 2005. Institute Of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Published October 2005. Tospoviruses (Family Bunyaviridae, Genus Tospovirus).

ADKİNS, S., ZİTTER, T., and MOMOL T., 2005. Tospoviruses (Family Bunyaviridae, Genus Tospovirus). Fact Sheet PP-212, One of a Series of The Plant Patology Department , Florida Cooparative Extension Services Institute of Food And Agricultural Sciences, University of Florida.

ANONYMOUS, 2002 . Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı. Bitki Koruma El Kitabı. No: 352 İzmir.

ANONYMOUS, 2002 . Tarımsal Yapı ve Üretim. T.C. Başbakanlık DİE Ankara.

ANTIGNUS, Y., LAPIDOT, M., GNAIM, N., COHEN, J., LACHMAN, O., PEARLSMAN, M., RACCAH, B., and GERA, A., 1997. Biological and Molecular Characterization of Tomato Spotted Wilt Virus in Israil. Phytoparasitica,25:4.

ARLI-SÖKMEN, M., MENNAN, H., ŞEVİK, M. A., and O. ECEVİT, 2005. Occurrence of viruses in field-grown pepper crops and some of their reservoir weed hosts in Samsun, Turkey. Phytoparasitica 33: 347-358.

ASTRUC, N., MARCOS, J.F., MACQUARİE, G., CANDRESSE, G.T. and VİCENT, P., 1996. Studies on the Diagnosis of Hop Stunt Viroid in Fruit

Trees: İdentification of New Host and Application of a Nucleic Acid Extraction Procedure Based on Non-Organik Solvents. *European Journal of Plant Pathology*, 102, 837-846.

AZERİ, T., 1981. Preminary Report of Tomato Spotted Wilt Virüs and İts Epidemy on Tobacco in the Çanakkale Region of Turkey. J Turkish Phytopathology, 10(2-3):79-87.

AZERİ, T., 1994. Detection of Tomato Spotted Wilt Virüs in Tabacco and Tomato Cultivars by Enzyme Linked Imminosorbent Assay. J. Turkish Phytopathology, 23(1):37-46.

BANDLA, M.D., CAMPBELL, L. R., ULLMAN, D.E., AND SHERWOOD, J. L. 1988. Interaction of Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) Glycoproteins With a Thrips Midgut Protein , a Potential Cellular Receptor for TSWV. Phytopathology, 88:98-104.

BARBA, M. and RICCIONI, L., 1993. Improvement of Diognostic Methods to Detect Plum Pox Virus in Apricot Plants. Agriculture, 139- 141.

BAR-JOSEPH, M., GUMPF, D. J., DODDS, J.A., ROSNER, A., AND GINZBERG, I., 1985. A Simple Prufication Method for Cıtrus Tristeza Virus and Estimation of its Genome Size. Phytopathology 75:195-198.

BOND, W.P., WIHITAM, H.K., and BLACK, L.L., 1983. Indigeneus Weeds as Reservoirs of Tomato Spotted Wilt in Louisiana.(Abstr.). Phytopathology, 73:499.

CHO, J.J., MİTCHEL, W.C., MAU, R.F. L., and SAKİMURA, 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., YUDİN, L.S., GONSALVES, D., and PROUVİDENTİ, R., 1989. A Multidisciplinary Approach to Management of Tomato Spotted Wilt Virus. in Hawaii. Plant Disease, 73:375-383.

CHU, F.H., CHAO, C.H., CHUNG, M.H. CHEN, C.C., and YEH,S.D., 2001.Completion of The Genome Sequence of Watermelon Silver Mottle

Virus and Utilization of Degenerate Primers for Detecting Tospoviruses in Five Serogrups. Phytopatholog, 91:361-368

CLARK, M.F., and ADAMS, A.N., 1997. Charecteristics of The Microplate Method of Enzyme Linked İmmunosorbent Assay for Detection of Plant Viruses. J. Gen. Virol., 34,475-483.

COLARICCIO, A., EIRAS, M., CHAVES, A.L.R., HARAKAVA, R., CHAGAS, C.M., 2005 In Sao Paulo, SP, Brazil. Instituto Biologico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252:04014-002.

CÓRDOBA-SELLÉS, C., MARTÍNEZ-PRİEGO, L., MUŃOZ-GÓMEZ, R., and JORDÁ-GUTİÉRREZ, 2005. Iris yellow spot virus: A New Onion Disease in Spain. Plant Dis. 89: 1243.

CSINOS, A.S., MARTİNEZ-OCHOA, N., and STEPHENSON, M.G., 2000. Tomato Spotted Wilt Virus Severity İnfluenced by Acibenzolar-S-Methyl, İmidacloprid and Age of Tobacco Transplants. Department of Plant Pathology and Crop And Soil Sciences, University of Georgia, Tifton, GA 31794. Publication No. P-2004-0008-NCA.

DİE; DEVLET İSTATİSTİK ENSTİTÜSÜ, 1999. Tarımsal Yapılar ve Üretim DİE, T.C. Başbakanlık İstatistik Matbaası, Ankara.

ECKEL, C.S., CHO, K., WALGENBACH, J.F., KENNEDY, G.G., and MOYER, J. W., 1996. Variation in Thrips Species Composition in Field Crops and İmplications for Tomato Spotted Wilt Epidemiology in North Carolina.Entomol.exp, 78:19-29.

EIRAS, M., RENATO, R.O., MISSIAGGIA' A.A. DE AVİLA, A.C. 2001. RT-PCR and Dot Blot Hybridization Methods for a Universal Detection of Tospoviruses. Fitopatologia Brasileira 26:170-175.

GALLİTELLİ, D., and MİNAFRA, A., 1994. Electroforesis. Course on Plant Virus Diagnosis, 15-30 October 1994. Adana-Turkey. Page: 89-99.

GERMAN, T.L., ULLMAN, D.E. and MOYER, J.W., (1992). Tospoviruses :Diagnosis, Molecular Biology, Phylogeny and Vector Relationships. Ann. Rev. Phytopathol. 30:315-348.

GİBBS, A.J., 1983. Tomato Spotted Wilt Virus. Viruses of Plants, 1312-1316.

GNAYEM, N., 1995 Epidemiological and Biological Aspects of Tomato Spotted Wilt Virus-TSWV. M. Sc. Thesis Submitted to the Faculty of Agriculture of Hebrew University of Jeruselam, Rehavot, Israel.

GOLDBACKH, R., and PETERS, D.,1994. Possible Causes of the Emergence of Tospovirus Diseases. Seminers in Virology, 3:113-120.

GOLNARAGHİ, A.R., 2001. First Report of Tomato Spotted Wilt Virus on Soybean in Iran. Plant Disease, 85 (12): 1290.

GONSALVES, D., PURCİFULL, D. E., and GARNSEY, S.M., 1978. Purification and Serology of Citrus Tristeza Virus. Phytapathology ,68:553-559.

GREENOGH, D.R., BLACK, L.L., and BOND, W.P., 1990.Aluminum-Surfaced Mulch an Approach to the Control of Tomato Spotted Wilt Virus in Solanaceous Crops. Plant Disease, 74:805-808.

GREENOGH, D.R., BLACK, L.L., STORY, R.N., NEWSON, L.D., and BOND, W.P., 1985.Occurance of *Frankliniella Occidentalis* in Lousiana:A Possible Cause for The İncreased İncidence of Tomato Spotted Wilt Virus(Abstr.). Phytapathology, 75:1362.

GROVES, R.L., WALGENBACH, J.F., MOYER, J.W., and KENNEDY, G.G., 2002. The Role of Weed Hosts and Tabacco Thrips,*Frankliniella fusca* , in the Epidemiology of Tomato Spotted Wilt Virus. Plant Disease, 86:573-582.

GÜLDÜR, M.E., 1995. Güneydoğu Anadolu Projesi (GAP) Alanına Giren Şanlıurfa, Diyarbakır, ve Mardin İllerinde Yetiştirilen Domateslerde Zararlı Virüsler. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Ana Bilim Dalı. Doktora Tezi ADANA.120 s.

GÜLDÜR, M.E., MARCHOUKS, M.G.M., YURTMEN, E., and YILMAZ, M.A., 1995. Mersin ve Çevresinde Yetiştirilen Domateslerde Zararlı Yeni Bir Virüs Tomato Spotted Wilt Virus. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi,26-29 Eylül 1995, Adana.Bildiriler,303-306.

HAAN, P. de,WAGEMAKERS, L., PETERS, D. And GOLDENBACH, R. (1990). J.Gen. Virl. 71: 1001

HAGAN, A.K., WEEKS, J.R., FRENCH, J.C., GUDAUSKAS, R.T., MULLEN, J. M., GAZAWAY, W. S., and SHELBY, R., 1990. Tomato Spotted Wilt Virus in Peanut in Alabama. Plant Disease, 74:615.

HELGUERA, P.R., DOCAMPO, D.M., NOME, S.F. and DUCASSE, D.A., 2002. Enhanced Detection of Prune Dwarf Virus in Peach Leaves by İmmunocapture- Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction with Nested Polymerase Chain Reaction (IC-RT-PCR Nested PCR). J. Phytopathology 150, 94-96. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin.

HOLCOMB, G.E., and VALVERDE, R.A., 2000. First Report of Oidium sp. Powdery Mildew and Tomato Spotted Wilt Virus on *Melampodium divaricatum*. Plant Disease, 84:1152.

JAİN, R.K., S.S., PAPPU, H.R., CULBREATH, A.K., and TOOD, J.W., 1998. Molecular Diagnosis of Tomato Spotted Wilt Tospovirus Infection of Peanut and Other Field and Greenhouse Crops. Plant Disease, 82:900-904.

JONES, J.P., JONES, J.B., STALL, R.E. and ZİTTER T.A., (1993).Cammon Names of Plant Diseases.

KAMBEROĞLU, M.A.,2000. Turunçgil Tristeza Virüs (CTV) Irklarına Spesifik Monoklonal Antibody'lerin Üretilmesi ve CTV Irklarının Tanılanmasında Kulanılması. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Adana.

LAEMELLİ, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During Assembly of the Head of Bacteriofage T4. Nature 227: 680-685.

MOHAMED, N.A., RANDLES, J.W. and FRANCKİ, R.I.B., 1973. Virology 56: 12.

MOMOL, M.T., 2000. First Report of Tomato Spotted Wilt Virus in Habanero and Tabasco Peppers in Florida. Plant Disease, 84(10):1154

MONDAL, B., PAPPU, H.R.,and CULBREATH, A.K., 2001. Factors Affecting Mechanical Transmission of Tomato Spotted Wilt Virus to Peanut (*Arachis hypogea)*. Plant Disease, 85:1259-1263

MUMFORD, R.A., BARKER, I., and WOOD, K.R., 1996. The Biology of the Tospoviruses. Ann. Appl. Biol, 128:159-183.

MUMFORD, R.A., BARKER, I., and WOOD, K.R.,1994. The Detection of Tomato Spotted Wilt Virus Using The Polymerase Chain Reaction. J. Virol. Methods, 46:303-311.

PAPANİCE, M., LASORELLA, V., FNETTİ SİALER, M.M., Dİ GERONİMO, A., SUMERANO, P., Dİ FRANCO, A.,GUARİO, A., VOVLAS, C., and GALİTELLİ, D., 1999. Occurence of Tomato Spotted Wilt Virus in Plants and Thrips Collected in Apulia (Southern Italy).

PAPPU, S.S., PAPPU, H.R., GİTAİTİS, R.D., and GAY, J.D., 1998. First Report of Tomato Spotted Wilt Tospovirus infection of Watermelon in Georgia. Plant Disease, 82:351.

POURRAHİM, R.,. FARZADFAR, Sh., MOİNİ, A.A., and SHAHRAEEN, N., 2001. First Report of Tomato Spotted Wilt Virus on Potatoes in İran. Plant Disease, 85: 442.

RODRİGUEZ-ALVARADO, G., KURATH, G., and DODDS, J.A. 1995. Heterogeneity in Pepper Isolates of Cucumber Mosaic Virus. Plant. Dis. 79:450-455.

SAMUEL, G., BALD, J.G. and PİTTMAN, H.A. (1930).Bull. Coun Scient. İnd. Res. Melbourne 44, 65 pp..

TAS, P.W.L., BOERİAN, M.L. and PETERS, D., 1977. J. gen. Virol. 36: 267.

ULLMAN, D.E., Cho, J.J., MAU, R.F.L., WESTCOT, D.M., and CUSTER, D.M., 1992. A midgut barrier to Tomato Spotted Wilt Virus acguistion by adult western flower thrips. Phytopathology, 82:1333-1342.

WHİTFİELD, A.E., CAMPBELL, R., SHERWOOD, J.L., and ULLMAN D.E., 2003. Tissue Blot Immunoassay for Dedection of Tomato Spotted Wilt Virus in *Ranunculus asiaticus* and other Ornamentals. Plant Disease, 87:618-622.

WILLIS, D.K., WHITFIELD, A.E., KUMAR, K.K., ULMAN, D.E., ROTENBERG, D., and GERMAN, T.L., 2005. Tomato Spotted Wilt Virus Glycoprotein Gn Inhibits Virus Acquiaition and Transmission by Thrips American Society for Virology Meeting. P.111.

WİLSON, C.R., WİLSON, A.J, and PETEHYBRİDGE, 2000. First Report of Tomato Spotted Wilt Virus in Common Agapanthus. Plant Disease, 84:491

WİNTER, S., SHAHRAEEN, N., KOERBLER, M., LESEMANN, D.E., 2005. Characterisation of Tomato Fruit Yellow Ring Virus: A New Tospovirus Species İnfecting Tomato in İran. New Disease Reports, Vol: 11.

WOLCAN, S., RONCO, L., DAL BO, E., LORİ, G., and ALİPPİ, H., 1996. Disease on *Lisianthus* in Argentina. Plant Disease, 80:223.

YUDİN, L.S., TABASHNİK, B.E., CHO, JOURNALJOURNAL, and MİTCHELL, W.C., 1990. Disease Prediction and Economic Models for Managing Tomato Spotted Wilt Virüs Disease in Lettuce. Plant Disease, 74:211-216.

YURTMEN, M., GÜLDÜR, M.E., and YILMAZ, M.A., 1998. Tomato Spotted Wilt Virus on Pepper in İçel Province of Turkey. Ninth Conference of the I. SH.S Vegetable Virus Working Group, Recent Advance in Vegetable Virus Research, 22-27 August 1998, Torino, Italy, p 91-92.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Adıyaman'ın Gölbaşı ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Adana'nın Ceyhan ilçesinde tamamladım. 2004 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünden Ziraat Mühendisi olarak mezun oldum. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim dalına kaydoldum. 2004 yılında başlayan yüksek lisans öğrenimimi, 2005-2006 yılları arasında yapmış olduğum tez çalışmasının sona ermesi ile tamamlamış bulunmaktayım.

EKLER

Ek 1.

ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

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

8.0 gr	NaCl
0.2 gr	KH_2PO_4
2.9 gr	$Na_2HPO_4.12H_2O$ veya
	2.3 gr $Na_2HPO_4.7H_2O$
	1.44. gr Na_2HPO_4. $2H_2O$
	1.15 gr Na_2HPO_4 (anhdrous)
0.2 gr KCl	
0.2 gr NaN_3	

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH sı 0.1 N NaOH veya 0.1 N HCl ile ayarlanmış ve 4 ^{0}C de saklanmıştır.

2. Coating buffer pH 9.6 (Kaplama tampon çözeltisi)

1.59 gr Na_2CO_3

2.93 gr $NaHCO_3$

0.2 gr NaN_3

Yukarıda miktarı verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH sı ayarlanmış ve 4 ^{0}C de saklanmıştır.

3. Washing Buffer (Yıkama tampon çözeltisi)

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

4. Sample Extraction Buffer (Örnek tampon çözeltisi)

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

5. Enzyme Conjugate Buffer (Konjugat tampon çözeltisi)

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

6. Substrat Buffer pH 9.8 (Substrat tampon çözeltisi)

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

Ek 2 .

SDS- PAGE Elektroforez Çalışmasında Kullanılan Solüsyonlar

1. **% 30 luk ACRYLAMİDE:**

   30 gr acrlyamide 60 ml su içerisinde çözülmüş ve 100ml ye tamamlanmıştır.

2. **% 10 luk SDS:**

   10 gr sodium dodecyl sülfate 80 ml distile su içerisinde çözülmüş ve volum 100 ml ye tamamlanmıştır.

3. **1.5 M TRIS, pH 8.8 :**

   18.17 gr Tris 70 ml distile su içerisinde çözülmüş, pH % 37 lik HCI ile 8.7 ye ayarlanmış ve volum 100 ml ye tamamlanmıştır.

5. **1 M Tris, pH 6.8 :**

   12.11 gr tris 70 ml distile su içerisinde çözülmüş, %37 lik HCI ile pH 6.8 e ayarlanmış ve volum 100 ml ye tamamlanmıştır.

6. **Runnig buffer pH 8.3 (5X):**

   15 gr Tris , 72 gr Glycine 800 ml distile su içerisinde çözdükten sonra 5gr SDS ilave edilmiş ve volum 1000 ml ye tamamlanmıştır.

7. **% 10 luk Ammonium Persulfate:**

   100 mg Ammonium Persulfate 1 ml distile su içerisinde çözülmüştür.

Ek 3.

Viral Proteinlerin Molekül Ağırlığını Saptamak İçin % 12 Alt Jelin (Seperating gel) Hazırlanması İçin Kullanılan Miktarlar

Distile su	1.6 ml
%30 Acrylamid mix	2.0 ml
1.5 M Tris, pH 8.8	1.3 ml
%10 SDS	0.05 ml
%10 APS	0.05 ml
TEMED	0.002 ml
Toplam hacim	**5.00 ml**

Viral Proteinlerin Molekül Ağırlığını Saptamak İçin % 5 Üst Jelin (Stacking gel) Hazırlanması İçin Kullanılan Miktarlar

Distile su	1.4 ml
%30 Acrylamid mix	0.33 ml
1.5 M Tris, pH 8.8	0.25 ml
%10 SDS	0.02 ml
%10 APS	0.02 ml
TEMED	0.002 ml
Toplam hacim	**2.000ml**

Ek.4

SDS-PAGE Jelin Boyanmasında Kullanılan Solüsyonlar

Fixing Solusyonu

Asetik asit	% 10
Methanol	% 45
Distile H_2O	% 45

Staining Solüsyonu

Coomassie brilliant blue	% 0.2
Methanol	% 40
Asetik asit	% 10
Distile H_2O	% 50

Desitaining Solüsyonu

Methanol	% 25
Asetik asit	% 7.5
Distile H_2O	% 67.5

Ek. 5

Total RNA Analizlerinde Kullanılan Solüsyonlar

Ekstraksiyon bufferı (100mM Tris-HCI pH.8.0, 50mM EDTA pH. 7.0, 500 NaCI, 10mM 2. mercapto-ethanol (1/1000))

Tris-HCI	2.4228 gr
ADTA	3.7224 gr
NaCI	5.844 gr

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

% 20 Sodium Dodecyl Sülfate (SDS)

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

Potasium asetate (CH_3COOK) (5M)

49.075 gr potasium asetate 60 ml su içerisinde çözülmüş ve volum 100 ml ye tamamlanmıştır**.**

Sodium asetate CH_3COONa(3M)

40.824 gr sodium asetate 60 ml su içerisinde çözülmüş ve volum 100 ml ye tamamlanmıştır**.**

% 70 lik Ethanol

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