



## Çanakkale İlinde Domates Lekeli Solgunluk Virüsünün Serolojik ve Biyolojik Yöntemlerle Saptanması\*

Pınar TURHAN<sup>1</sup>

Savaş KORKMAZ<sup>1</sup>

Geliş Tarihi: 27.10.2005

**Öz:** Bu çalışma, Çanakkale ilinde 2003 ve 2004 yıllarında domates üretim sezonu içinde, açık alanlarda yetiştirilen domates tarlalarında Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV)'nün varlığının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla domates ekili alanlarda bir sömürme çalışması yapılarak TSWV'ye benzer semptom gösteren bitkilerden örnekler alınmış ve ELISA ile test edilmiştir. İki yıl süresince toplam 99,2 ha alanda gözlem yapılmış ve TSWV tarafından oluşturulan semptomlara benzer semptom oluşturan bitkilerden toplam 200 örnek alınmıştır. ELISA testinde pozitif çıkan örnekler her iki yöntemi birbiriyle kıyaslamak için DTBIA yöntemi ile de testlenmiştir. Testlemeler sonucunda TSWV ile infekteli olan örnekler mekanik inokulasyon yöntemiyle indikatör bitkilere taşınmıştır. ELISA testleri sonucunda 9 örnek TSWV ile infekteli olarak bulunmuştur. ELISA testinde TSWV ile infekteli olarak bulunan örnekler DTBIA yönteminde de infekteli olarak bulunmuştur. Çalışmada DTBIA yöntemi başarıyla kullanılmış ve hastalıklı örneklerde 10X büyütme bir binoküler altında nitrosetülöz membran üzerinde tipik pembemsi-kırmızımsı renk oluşumları gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Domates, sömürme, ELISA, DTBIA, mekanik inokulasyon

### Determination of Tomato Spotted Wilt Virus Using Serological and Biological Methods in Tomatoes Grown in Çanakkale Province

**Abstract:** This study was carried out to determine the presence of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in tomatoes grown in open fields during growing seasons of 2003 and 2004 in Çanakkale Province. Therefore, a survey study was conducted in tomato fields and samples taken from the plants showing TSWV-like symptoms were tested using ELISA. During two years, total 99,2 hectare tomato fields were examined and 200 samples were taken from the plants showing the similar symptoms with TSWV. The samples showing positive response to ELISA test were also tested by DTBIA in order to compare both methods. TSWV infected-samples were used for transmission of the disease to indicator plants. According to the results of ELISA tests, 9 samples were found to be infected by TSWV. The samples found to be TSWV infected by ELISA tests were also found to be infected using DTBIA method. In this study, DTBIA method was successfully used and pink-reddish coloration on nitrocellulose membrane in infected samples was observed under binocular with 10X magnification.

**Key Words:** Tomatoe, survey, ELISA, DTBIA, mechanical inoculation

#### Giriş

Sebze, insanların dengeli beslenmesinde vitamin ve mineral kaynağı olarak önemli bir yer tutmaktadır. Türkiye, birçok önemli sebze türünün gen merkezi olması nedeniyle, ülkemizde sebzecilik sektörü tarımın önemli bir alt koludur. Ülkemizde sebze yetiştiriciliği açısından en önemli bitkilerden birisi de domatestir. Domates yetiştiriciliği, Türkiye'nin farklı iklim ve toprak yapısına sahip bütün tarımsal bölgelerine yayılmış durumdadır. Ülkemizde ekiliş, üretim ve ekonomik yönden domates, sebze yetiştiriciliği açısından ilk sıralarda yer almaktadır. 1996 yılında 7 800 000 ton olan Türkiye'deki domates üretimi 2005 yılında 9 700 000 tona ulaşmıştır (Anonim

2005a). Bu üretimin %4,6 sı Çanakkale'den karşılanmaktadır (Anonim 2005b).

Çanakkale'de domates üretimi tarlada, sofralık ve sanayilik olarak yapılmaktadır. Diğer tarım ürünlerinde olduğu gibi açık alanlarda yetiştirilen domates bitkisi birçok hastalığın etkisi altındadır. Açık alanlarda yetiştiriciliği yapılan domateslerde fungal hastalıklar ve virüs hastalıklarının önemi büyüktür. Fungal hastalıklarla kimyasal mücadele mümkün olabilirken virüs hastalıklarının henüz kimyasal mücadelesi bulunmamaktadır. Bu nedenle virüs hastalıklarının belirlenmesi ve virüs hastalıkları ile mücadele

\*Yüksek Lisans Tezinden hazırlanmış ÇOMÜ BAP tarafından desteklenmiştir.

<sup>1</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Bölümü-Çanakkale

yöntemlerinin araştırılması büyük önem kazanmaktadır.

Günümüzde domates bitkisinde 30'dan fazla virüsün infeksiyon oluşturduğu bilinmektedir (Zitter, 1997) Bu virüs hastalıklarından birisi de domates lekeli solgunluk virüsü (*Tomato spotted wilt virus*=TSWV)'dür. TSWV özellikle subtropik bölgelerde yaygın bir virüstür (Mickowski 1981). TSWV, Bunyaviridae içindeki Tospovirus cinsine dahil bir türdür (Franki ve ark. 1991). Geniş bir konukçu aralığına sahip olup 69 dikotiledon bitki familyası, 15 monokotiledon bitki familyası ve pteridophyte'lerin 1 familyasına ait toplam 1090 bitki türü TSWV'ye konukçuluk etmektedir (Parrella ve ark. 2003).

TSWV, sekiz farklı thrips türü ile persistent olarak taşınmaktadır (German ve ark. 1992, Wijkamp ve ark. 1993, Antignus ve ark. 1997). Ancak bu türler içinde *Frankliniella occidentalis* tüm dünyada TSWV'nin en etkili vektörü olarak bilinmektedir (Mound 1996; Webb ve ark. 1998). Ülkemizde ise TSWV'nin yayılmasında etkili olan iki önemli vektör, *Frankliniella occidentalis* ve *Thrips tabaci* olup özellikle Ege ve Akdeniz Bölgelerinde tarla ve sera ürünlerinde hastalığın yayılmasına neden olmaktadır (Lodos 1982, Azeri 1994, Tunç ve Göçmen 1995, Tunç 1985 ).

TSWV, domates bitkisinde; genç yaprakların bronz renge dönüşmesine, yapraklarda çok küçük ve bol miktarda siyah lekeler oluşmasına, bitkide solgunluk ve cüceliğe, bitki gövdesinde siyah çizgi şeklinde lekeler, meyvelerin üzerinde yumru ve klorotik halkalı lekelerin oluşmasına, meyvelerde deformasyon ve sürgün uçlarından itibaren geriye doğru ölümlerin oluşumuna neden olarak domates meyvelerinin kalite ve veriminde azalmalara yol açmaktadır. Bu şekildeki meyve, insan beslenmesinde kullanılamaz hale gelmekte, ekonomik değerini kaybetmekte ve pazarlanması imkansızlaşmaktadır. Bu nedenle ülkemiz ve Çanakkale yöresinin önemli bir bitkisi olan domates ve bu bitkide önemli bir virüs olan TSWV'nin belirlenmesi, şu an ve ileride karşılaşılabilecek sorunların da önlenmesi açısından büyük bir önem arz etmektedir.

Hastalığa neden olan etmenlerin hızlı ve doğru bir şekilde teşhisi sağlıklı bitki sertifikasyonu için esastır (Lin ve ark. 1990). TSWV'nin saptanmasında genellikle serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Serolojik çalışmalarda enzimle işaretlenmiş antiserumların kullanımı düşük maliyet, güvenilirlik, yüksek oranda duyarlılık gibi bir çok avantajlar sağlamaktadır (Clark ve Bar-Joseph, 1984). En çok kullanılan serolojik yöntemlerden birisi ELISA yöntemidir. ELISA dışında kullanılan bir diğer serolojik

yöntem ise immunoblot yöntemidir. Bu yöntemde antijen, protein bağlanma özelliğine sahip olan nitroselüloz gibi bir membrana bağlanır ve işaretlenmiş bir örnek (probe) ile doğrudan veya dolaylı olarak muamele edilir (Lin ve ark. 1990). Son yıllarda immunoblot tekniğinin değişik bir varyasyonu olan direkt doku emdirme yöntemi (Direct Tissue Blot Immunoassay=DTBIA) olarak adlandırılan bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem, bir çok virüs hastalığı ve mikoplazma benzeri hastalıklara karşı başarı ile uygulanmıştır (Hsu ve Lawson 1991).

Bu çalışmada; 2003 ve 2004 yıllarında Çanakkale yöresinde açık alanlarda yetiştirilen domates tarlalarında bir sörvey çalışması yürütülerek virüs ve virüs-benzeri hastalıklara benzer semptom gösteren bitkilerden örnekler alınmış, bu örnekler serolojik yöntemlerden ELISA ile test edilmiştir. Pozitif çıkan örnekler DTBIA yöntemi ile de test edilerek her iki yöntem birbirleriyle kıyaslanmıştır. Ayrıca mekanik inokulasyon yöntemiyle de hastalık etmeni indikatör bitkilere taşınmıştır.

## Materyal ve Yöntem

**Sörvey çalışması:** Sörvey çalışması, 2003 ve 2004 yıllarında domates üretim sezonu içinde (Haziran-Ekim) Çanakkale Merkez, Biga, Lapseki, Ezine, Bayramiç, Eceabat, Ayvacık ilçelerinde açık alanda domates tarımı yapılan tarlalarda yürütülmüştür. Çanakkale yöresinde 2003 yılında 628 da, 2004 yılında 364 da olmak üzere toplam 992 da domates ekili alanda sörvey çalışması yapılmıştır. Sörvey çalışmasında gözlem yapılan tarlalarda domates bitkilerinde, genç yaprakların bronz renge dönüşmesi, yapraklarda çok küçük ve bol miktarda siyah lekeler oluşması, bitkide solgunluk ve cücelik, sürgün uçlarından itibaren geriye doğru ölümlerin oluşumu ve meyvelerinin üzerinde yumru ve klorotik halkalı lekelerin oluşması gibi belirtilere bakılarak örnekleme yapılmıştır. Örnekleme süresince özellikle yeni infeksiyonların ya da karışık infeksiyonların olabileceği düşünülerek yukarıdaki belirtilen özelliklerden bir ya da birkaçını gösteren bitkiler yanında diğer farklı tipte virüs ya da virüs benzeri semptom gösteren bitkilerden de örnekler alınmıştır. Örnek alınan tarlalarda üretilen domates çeşitleri de not edilmiştir. İki yıl süresince 24 farklı çeşide ait (Tokat, Yakup, Baghera, Mono, F1-186, Briks, RFT-4413, Olga, F1-1274, Yerli domates, Dovalaj, Simitha, Super Red-8354, F-52, Joker, Tetramed, Bahar, Beril, F1-7314, Deniz, Alida, Polaris, Vega, Porsuk) toplam 200 bitkiden örnek alınmış ve bu örnekler buz kabında saklanarak laboratuara getirilmiştir. Toplanan örnekler

ELISA ile test edilmiştir. ELISA testinde pozitif çıkan örnekler diğer bir serolojik yöntem olan DTBIA yöntemiyle de test edilmiştir. Yine ELISA testinde pozitif çıkan örnekler mekanik inokulasyon yöntemiyle otsu bitkilere inokule edilerek hastalığa özgü belirtiler belirlenmiştir.

**ELISA testi:** ELISA ve DTBIA testlerinde poliklonal ticari kitler (Loewe Biochemica, Germany) kullanılmıştır. ELISA, Clark ve Adams (1977)'in belirttiği yöntemle göre yapılmıştır. Yöntemin uygulanmasında önce plate virüse spesifik antipadi ile kaplanmış, ikinci adımda örnekler ilave edilmiştir. Üçüncü adımda konjugat ilave edilmiş ve son adımda ise substrat eklenerek 405 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda sonuçlar değerlendirilmiştir. Antipadi ve konjugat firmanın önerileri doğrultusunda 1:500 oranında sulandırılarak, örnekler ise örnek tampon çözeltisi içerisinde 1:10 oranında sulandırılarak kullanılmıştır. Test sonucunda 405 nm dalga boyunda yapılan okumada sağlıklı örneklerin iki katı veya üzerinde oluşan değerler pozitif olarak değerlendirilmiştir. Test için bitki örnekleri olarak yaprak, yaprak sapı ve meyve sapı kullanılmıştır.

**DTBIA testi:** DTBIA yöntemi Whitfield ve ark. (2003)'ünün belirttiği yöntemle göre yapılmıştır. Direkt doku boyama yönteminin uygulanmasında ilk olarak teşhiste kullanılacak olan nitroşelüloz membran (Bio-Rad, Kaliforniya, A.B.D.) 1 cm<sup>2</sup>'lik alanlara bölünmüş ve bölünen her kare harflendirilmiştir (Şekil 1-a). Daha sonra araziden toplanan örnekler için yaprak ve meyve sapları keskin bir bisturi yardımıyla enine bir şekilde kesilmiş ve kesilen yüzey membran üzerindeki karelere ayrılan kısımlara hafifçe bastırılmıştır (Şekil 1-b). Bir sonraki adımda blotlanan membran %1'lik BSA (Bovine Serum Albumin) ile muamele edilerek oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra membran 2 saat oda sıcaklığında antijene spesifik, antipadi ile inkübe edilmiş ve yıkanmıştır. Membran streptavidin-alkaline-phosphatase konjugat ile 2 saat inkübe edilmiş ve tekrar yıkanmıştır.

En son adımda ise substrat (BCIP/NBT) ilave edilerek 30 dakika inkübe edilmiştir ve 0.001 M EDTA veya su ile yıkanarak reaksiyon durdurulmuştur. Sonuçlar fotoğraflama yöntemi kullanılarak binokülerde 10X büyütmeyle gözle görülebilecek şekilde renk oluşumlarına göre değerlendirilmiştir.

**Mekanik inokulasyon:** Mekanik inokulasyon çalışmalarında indikatör bitki olarak hastalığa duyarlı olan tütün (*Nicotiana tobacum* 'Xanthi' ve *Nicotiana tobacum* L. 'Samsun'), börülce (*Vigna sinensis* L.) ve fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkileri kullanılmıştır. Tohumlar 1:1 oranında torf+toprak içeren saksılara ekilmiş ve çıkış yaptıktan sonra şaşırtılmıştır. İndikatör

bitkiler 2-4 yapraklı olduklarında mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılmıştır. İndikatör bitkilerin yapraklarında önce yara oluşumunu sağlamak amacıyla karborandum tozu serpiştirilmiş daha sonrada bitki özsuğu bir pamuk yardımıyla bitkilere inokule edilmiştir. İnokulasyon çalışmalarında bitki özsuğlarını elde etmek için 0,1 M, pH=7,4 olan fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır (Antignus ve ark. 1997). İnokulasyonun sonunda otsu bitkiler çeşme suyu ile yıkanmıştır. İnokulasyon yapılan bitkiler 4-6 hafta süreyle periyodik olarak gözlenmiş ve bu gözlemler sonucunda oluşan belirtiler not edilmiştir. Ayrıca infekteli bitkiler ile sağlıklı bitkiler arasındaki farkları görsel olarak kıyaslamak amacıyla bu bitkiler fotoğraflandırılmıştır.

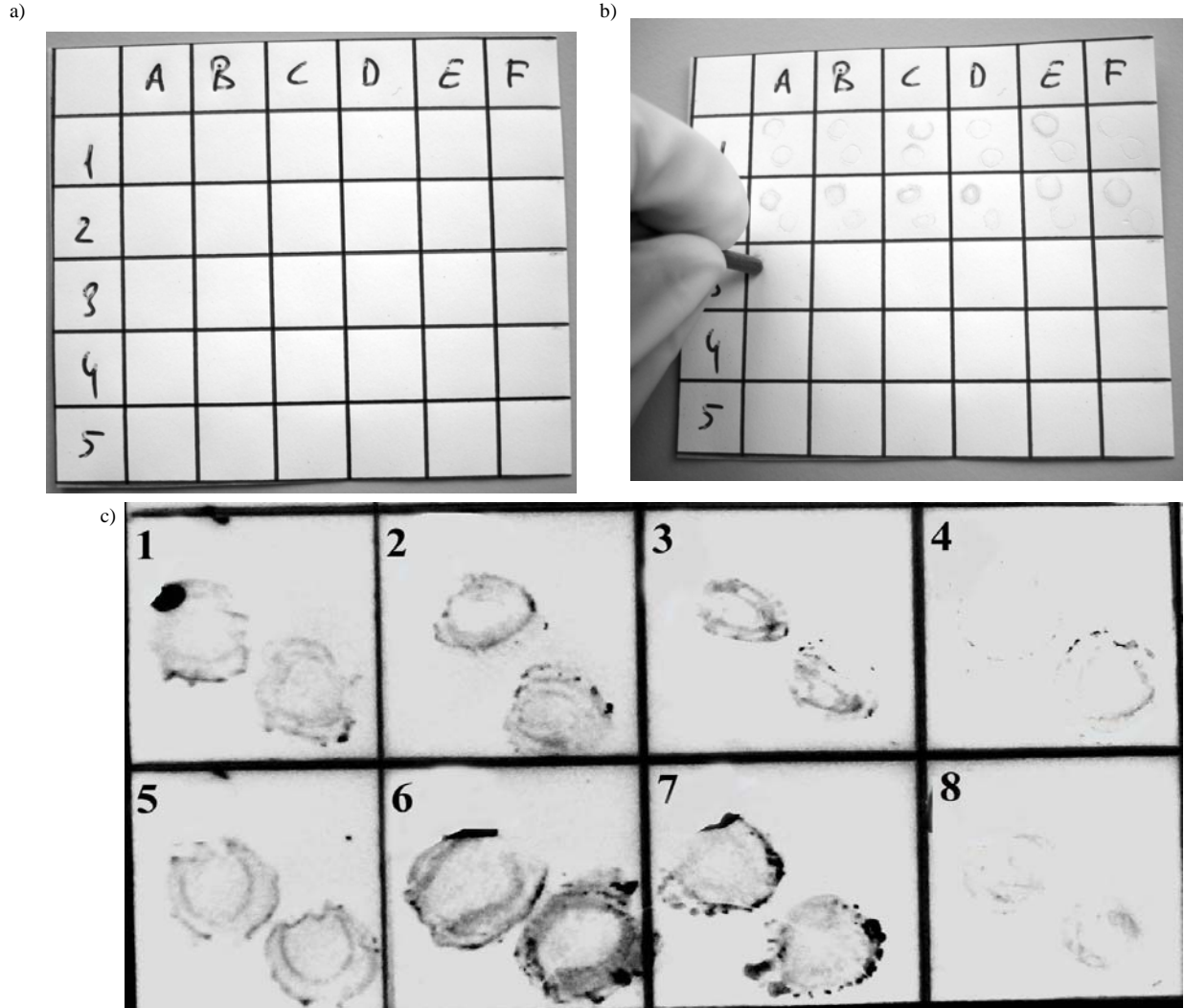
## Bulgular

### TSWV enfeksiyonunun ELISA ile belirlenmesi:

Çalışma süresince tarla koşullarında yetiştirilen domateslerde genellikle TSWV hastalığına özgü damarlarda renk açılması, yapraklarda kıvrıcılık, nekrotik lekeler, meyve üzerinde renk değişikliği, bodurlaşma, halkalı leke oluşumu gibi belirtiler gözlenmiştir. Bu belirtiler ortaya çıkmasına rağmen bazen de diğer fungal hastalık etmenleriyle birlikte karışık olarak görülmüştür. Çanakkale yöresinde domates tarımının tarla koşullarında açık alanlarda yer domatesçiliği şeklinde yapıyor olması ve sırk ile üretimin az olması domates üretiminde özellikle fungal hastalıkların (küllenme, mildiyö, yaprak yanıklığı, kurşuni küf vb.) önemli bir sorun oluşturmasına neden olmuştur. Bu nedenle fungal hastalıkların yoğunluğu virüs ve virüs-benzeri hastalıkların görsel olarak teşhisini zorlaştırmıştır. Çalışma süresince tipik olarak domates lekeli solgunluk virüsün özelliklerini gösteren bitkilere rastlanılmamış ve örneklemeler daha çok virüs ve virüs-benzeri hastalıklara özgü belirtiler gösteren bitkilerden alınmıştır.

İki yıl süresince örneklemeye yapılan toplam 200 bitki ELISA yöntemiyle test edilmiş ve toplam 9 bitki Domates lekeli solgunluk virüsü ile infekteli olarak bulunmuştur. ELISA testinde pozitif reaksiyon gösteren örnekler substrat eklendikten sonra olarak sarı renk oluşturmuş ve 405 nm dalga boyunda yapılan okumada sağlıklı örneklerin iki katı veya üzerinde bir değer oluşturmuştur.

ELISA testinde pozitif çıkan örnekler çoğunlukla Umurbey Beldesinde (Lapseki) bulunmuş, çeşit olarak da Beril (73124) ve RFT-4413 çeşitlerinde saptanmıştır. Ayrıca, yerli domates çeşidine ait bir örnek TSWV ile enfekteli olarak tespit edilmiştir (Çizelge 1).



Şekil 1. DTBIA yönteminin yapılışı ve sonuçların değerlendirilmesi. a) Eşit alanlara bölünmüş nitroselüloz membran, b) Membran üzerine doku örneklerinin blotlanması (emdirilmesi), c) 10x büyütme bir binoküler altında sonuçların değerlendirilmesi; 1,2,3 ve 5,6,7 nolu örnekler infekteli, 4 ve 8 nolu örnekler sağlıklı.

Çizelge 1. Serolojik ve biyolojik testler sonucu infekteli çıkan örneklerin çeşit bazında dağılımı ve elde edildiği mevki

Örnek No	Çeşit	Mevki	ELISA	DTBIA	Mekanik inokulasyon
1	Beril (73124)	Umurbey	+	+	+
2	Yerli Domates (Köy Popülasyonu)	Kemiklialan	+	+	+
3	Beril (73124)	Umurbey	+	+	+
4	Beril (73124)	Umurbey	+	+	+
5	Beril (73124)	Umurbey	+	+	+
6	RFT-4413	Umurbey	+	+	+
7	RFT-4413	Umurbey	+	+	+
8	RFT-4413	Umurbey	+	+	+
9	RFT-4413	Umurbey	+	+	+

**DTBIA:** ELISA'da test edilen ve hastalıklı olarak belirlenen toplam 9 örnek aynı zamanda DTBIA yöntemi ile de test edilmiş ve hastalıklı olarak belirlenmiştir. Blotlanan örnekler, 10X büyütme bir binoküler altında yapılan gözlemlerde bitki dokusunun nitroselüloz membran ile temas ettiği yüzeylerde özellikle iletim demetlerinde pembemsi-kırmızımsı bir renk oluşturmuştur. Sağlıklı bitki örneklerinde ise herhangi bir renk oluşumu meydana gelmemiştir (Şekil 1-c). Optimum koşullar uygulandığında yalnızca bastırılan doku bölgesinde renk oluşumu meydana gelmiş, diğer kısımlar ise beyaz kalmıştır. Ancak antibadi ve konjugat konsantrasyonu artırıldığında ve substrat uygulama süresi önerilenin üzerinde olduğunda sağlıklı örneklerde de hafif bir renk oluşumu gözlenmiştir. Renk oluşumuna ayrıca dokuların hafif ya da şiddetli bir şekilde bastırılmasının da etkili olduğu saptanmıştır.

**Test bitkilerinde oluşan belirtiler:** İnokulasyon çalışmalarında ELISA ve DTBIA yönteminde pozitif sonuç veren 9 örnek inokule edilen bitkilerin yapraklarında inokulasyondan 3-4 hafta sonra simptom oluşmaya başlamışlardır. İndikatör bitkilerden tütünde yaprak damarlarında sararma (Şekil 2), yapraklarda sararma ve sararmayı takiben solma ve kuruma belirtileri gibi sistemik belirtiler gözlenmiştir (Şekil 3). Fasulye ve börülçede ise belirtiler daha hafif şiddette ortaya çıkmıştır. Bu bitkilerde yaprak damarlarında hafif sararma görülmüştür. Solgunluk ve kuruma belirtileri ise görülmemiştir. Ayrıca fasulyede bazen ilk inokule edilen yapraklarda hafif klorotik lekeler oluşmuştur. Kontrol bitkilerinde ise her hangi bir simptome rastlanılmamıştır. Çalışmada kullanılan her üç indikatör bitki hastalığa duyarlı olmasına rağmen en belirgin belirtiler bütün bitkisinde gözlenmiştir.

### Tartışma

Bu çalışmada TSWV domates bitkilerinde hem ELISA hem DTBIA ve hem de biyolojik indeksleme yoluyla Çanakkale yöresinde tespit edilmiştir. Ancak enfeksiyon oranı düşük olarak bulunmuştur (% 4,5). Ülkemizde daha önce yapılan çalışmalarda hastalık etmeninin varlığı belirlenmiştir. Tekinel ve ark. (1969), Mersin bölgesinde ekonomik bakımından önemli olan biber, patlıcan, marul ve fasulyede virüs hastalıklarının simptomolojik olarak teşhislerini yapmışlar ve marulda TSWV'yi belirlemişlerdir. Azeri (1994), yaptığı bir çalışmada TSWV'yi, ELISA testleri ve indeksleme yolu ile tütün ve domates bitkilerinde tespit etmiştir. Çalışma sonucunda İzmir ve Manisa yöresinde etmenin tohumla taşındığını saptamış ve hastalıkla mücadelede virüsten arı tohum kullanılmasını, tohum yatağında ve tarlada erken thrips teşhisi ile popülasyonun belirli bir

düzeyde tutulması gerektiğini belirtmiştir. Güldür ve ark. (1995), Adana-Mersin karayolu üzerinde açık alanda ekili 13 domates tarlasından TSWV simptom belirtisi gösteren bitkilerden örnekler toplamışlardır. Bu örneklerin, mekanik olarak otsu bitkilere inokulasyonu ve serolojik testler sonucunda, Çeşmeli ve Kazanlı'dan alınan örneklerin TSWV ile bulaşık olduğunu saptamışlardır. Arlı-Sökmen ve ark. (2005), Samsun ilinde 1998 ve 1999 yıllarında biberde yapmış oldukları bir çalışmada TSWV'nin varlığını belirlemişlerdir. Ayrıca *Hibiscus trionum* bitkisinin TSWV için yeni bir konukçu olduğunu saptamışlardır.

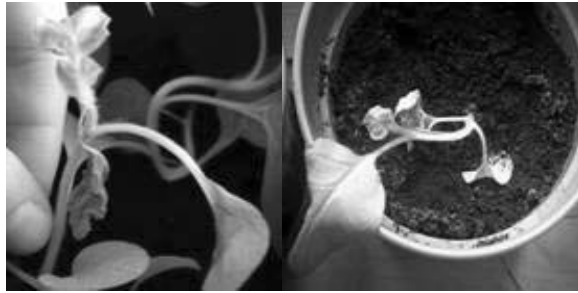
Daha önce Ülkemizde yapılan çalışmalar ile bu çalışmada elde edilen bulgular arasında bir paralellik bulunmaktadır. Hastalık etmeni domates üretimi yapılan bölgelerimizde mevcuttur. Ancak enfeksiyon oranı farklılık göstermektedir. Bu durum olasılıkla vektörlerle ilişkilidir. Ayrıca ekolojik faktörlerde etki etmektedir. Çizelge 1'de görüldüğü gibi bu çalışmada TSWV Umurbey beldesindeki domates alanlarından alınan örneklerde tespit edilmiştir. Diğer alanlarda ise bulunamamıştır. Umurbey Beldesi Lapseki ilçesine bağlı olup Çanakkale ye 20 km uzaklıkta polikültür tarım yapılan bir yöredir. Özellikle de meyvecilik ve sebzeçilik yoğun olarak yapılmaktadır. Ayrıca denize yakın olup yazın sıcaklık ve nem çok yüksek olmaktadır. Hastalığın bu bölgede görülmesi olasılıkla bu bölgede polikültür tarım yapılmasından ve thrips türlerine besin kaynağı olabilecek bitki sayısının fazla olmasından kaynaklanabilir.

Çeşit bazında pozitif çıkan örnekler bakıldığında çoğunlukla iki çeşitte (Beril ve RFT-4413) TSWV bulunmuştur. Ancak bu sonuçlar bu çeşitlerin hastalık etmenine daha duyarlı olduğuna ilişkin bir bulgu oluşturmamaktadır. Zira Umurbey yöresinde bu çeşitler daha yaygın olarak kullanılmakta ve hastalığın bu çeşitlerde ortaya çıkma olasılığı da daha yüksek olmaktadır. Ayrıca bu zamana kadar yapılan çalışmalarda çeşit bazında duyarlılık ya da dayanıklılık yönünden bir çalışma da yapılmamıştır. Diğer yandan Çanakkale yöresinde çeşit bazında bir seçicilik yoktur ve üreticiler her yıl aynı çeşitleri kullanmamaktadır. Bu çalışmada ELISA sonuçları ile DTBIA sonuçları birbirini destekler niteliktedir. ELISA'da pozitif çıkan sonuçlar DTBIA testinde de pozitif çıkmıştır. Bu çalışma ile Ülkemizde ilk defa TSWV, DTBIA yöntemiyle test edilmiş ve yöntem başarıyla uygulanmıştır.

ELISA virüs hastalıklarının tanısında kullanılan en yaygın yöntemlerden birisidir. DTBIA ilk olarak 1990'lı yılların başlarında geliştirilmiş olup bu zamana kadar başta Cucumovirüs, Luteovirüs, Potyvirus, Potyvirus cinslerine bağlı virüslerin ve fitoplazmaların teşhisinde kullanılmıştır (Hsu ve Lawson 1991).



Şekil 2. Mekanik inokulasyon yapılan tütün bitkisinde yaprak damarlarında sararmalar.



Şekil 3. Mekanik inokulasyon yapılan tütün bitkisinde solgunluk, kuruma ve bitkinin ölümü

Horvath ve ark. (2001), Macaristan'da patates bitkisinde yapraklarda sararma, kıvrıkcılaşma, bodurlaşma ve nekrotik belirtiler gösteren ve şiddetli ürün kayıplarına yol açan TSWV'yi DAS-ELISA ve mekanik inokulasyon yöntemleriyle tespit etmişler ve enfeksiyonun büyük olasılıkla civarda bulunan tütün bitkilerinden *Thrips tabaci* tarafından patates bitkilerine taşındığını vurgulamışlardır.

Whitfield ve ark. (2003), yaptıkları bir çalışmada *Ranunculus asiaticus* yumrularından ve diğer süs bitkilerinden TSWV'yi teşhis etmek için tissue blot tekniğini kullanmışlardır. Tekniğin doğruluğunu ve güvenilirliğini belirlemek için aynı zamanda DAS-ELISA yöntemini de birlikte uygulamışlardır. Yumruların farklı bölgelerinden ve farklı büyüklüklerde alınan parçalardan yapılan çalışmalar sonucunda en iyi sonuçların orta kısımlardan elde edilen örneklerden alındığını ve küçük örneklerin büyük örneklerden daha iyi sonuç verdiğini saptamışlardır. Araştırmacılar tissue blot tekniğinin sertifikasyon işlemlerinde ve yumrulu bitkilerin indekslenmesi çalışmalarında TSWV'yi teşhis etmede başarıyla kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

## Sonuç

Bu çalışmada DTBIA yöntemi TSWV'nin teşhisinde başarıyla kullanılmıştır. Bu yöntemde ELISA

testinde olduğu gibi ekstrasyona gerek yoktur ve hatta örneklemeye arazi koşullarında bile yapılabilmektedir. Örneklemeye yapılan nitroselüloz membran bir bölgeden başka bir bölgeye hatta bir ülkeden başka bir ülkeye gönderilebilir. Canlı dokuya gereksinim duyulmadığı için olası hastalık ya da zararlı riski ortadan kaldırılmış olur.

DTBIA klasik DAS-ELISA ile kıyaslandığında birçok avantajlara sahiptir. Kolay bir yöntemdir ve sonuçlar kısa sürede alınır. Örnek hazırlamaya gerek yoktur. Test tüpleri, havan ya da havan eli, ELISA okuyucusu gibi alet ve ekipmanlara gerek duymaz. Hatta blotlanan örnekler oda sıcaklığında veya +4 °C'de uzun süre tutulabilir ve daha sonra testleme yapılabilir. Diğer yandan bu yöntemin en önemli dezavantajı sonuçların sayısal olarak değerlendirilememesidir. DTBIA ve ELISA her iki yöntemde çoklu örneklerde rutin teşhislerde başarıyla uygulanmaktadır. Ancak virüs yoğunluğunun belirlenmesinde, sayısal değerlere gereksinim duyulduğunda ELISA yöntemi kullanılması gerekmektedir.

## Kaynaklar

- Anonim 2005a. <http://faostat.fao.org/faostat/form>
- Anonim 2005b. <http://www.canakkale-tarim.gov.tr/>
- Antignus, Y., M. Lapidot, N. Ganaim, J. Cohen, O. Lachman, M. Perlman, B. Raacah and A. Gera. 1997. Biological and molecular characterization of tomato spotted wilt virus in Israel. *Phytoparasitica* 25 : 319-330.
- Arli-Sökmen, M., H. Mennan, M. A. Sevik and O. Ecevit. 2005. Occurrence of viruses in field-grown pepper crops and some of their reservoir weed hosts in Samsun, Turkey. *Phytoparasitica* 33:347-358.
- Azeri, T. 1994. Detection of tomato spotted wilt virus in tobacco and tomato cultivars by Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *J.Turk Phytopath.*, 23: 37-46.
- Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate methods of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. *I. Gen. Virol.* 34: 475-438.
- Clark, M. F. and M. Bar-Joseph. 1984. Enzyme Immunosorbent Assays. In *Plant Virology*, In: K. Maromorosch and H. Koprowski (eds.). *Methods in Virology Vol.VIII.* pp.51-85. Academic Pres. Inc., FL, USA.
- Francki, R. I. B., C. M. Fauquet, D. L. Knudson and F. Brown. 1991. Classification and Nomenclature of Viruses. In: *Fifth Report of The International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp.1-450 Arch. Virol. (Suppl. 2.)

- German, T. L., D. E. Ullman and J. W. Moyer. 1992. Tosporviruses: Diagnosis, molecular biology, phylogeny and vector relationships. *Annu. Rev. Phytopath.*, 30: 315-348.
- Güldür, M. E., G. Marchoux, M. Yürtmen ve M. A. Yılmaz. 1995. Mersin ve çevresinde yetiştirilen domateslerde zararlı yeni bir virüs: Tomato Spotted Wilt Virus. Türkiye VII. Fitopatoloji Kongres. Bildirileri: 303-305. 26-29 Eylül 1995, Adana.
- Horvath J., R. Gaborjanyi, G. Kazinczi and P. Takacs. 2001. Natural occurrence of Tomato Spotted Wilt Tospovirus (TSWV) on potato in Hungary, *Novenytermeles* 50: 545-548.
- Hsu, H. T. and R. H. Lawson. 1991. Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in *Impatiens*. *Plant Dis.*, 75: 292-295.
- Lin, N. S., Y. H. Hsu. and H. T. Hsu. 1990. Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80: 824-828.
- Lodos, N. 1982. Türkiye Entomolojisi, Genel Uygulamalı ve Faunistik, Cilt II., Ege Üniv. Ziraat Fak. Yayınları: 429, Ders Kitabı: 542, İzmir.
- Mickowski, J. 1981. Principales Maladies a Virus Sur Le Tabac. VIII. Intern Plant Protec. Conference, pp.45-49. Ohrid. Yugoslavia.
- Mound, L. 1996. The Tysanopteran vector species of Tospoviruses. *Acta Horticulturae*. 431:298-307.
- Parrella, G., P. Gognalons, K. Gebre-Selassie, C. Vovlas and G. Marchoux. 2003. An update of the host range of tomato spotted wilt virus. *J. Plant Path.*, 85(4): 227-264.
- Tekineli, N., M. S. Dolar, S. Sağsöz ve Y. Salcan. 1969. Mersin bölgesinde ekonomik bakımdan önemli bazı sebzelerin virüsleri üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 9:37-49.
- Tunç, İ. 1985. On some Thysanoptera from the Middle Black Sea region of Turkey. *Türk. Bitki Koruma Der.* 9:217-224.
- Tunç, İ. ve H. Göçmen. 1995. Antalya'da bulunan iki sera zararlısı *Polyphagotar latus* (Banks) (Acarina, Tarsonemidae) ve *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera, Thripidae) üzerine notlar. *Türk. Entomol. Der.* 19:101-109.
- Webb, S., J. Tsai and F. Mitchel. 1998. Bionomics of *Frankliniella bispinosa* and its transmission of tomato spotted wilt virus. In: The Fourth International Symposium on Tospovirus and Thrips in Floral and Vegetable Crops, pp.67-68, Wageningen, The Netherlands.
- Whitfield, A. E., L. R. Campbell and J. L. Sherwood. 2003. Tissue blot immunoassay for detection of tomato spotted wilt virus in *Ranunculus asiaticus* and other ornamentals, *Plant Dis.*, 87: 618-622.
- Wijkamp, I., J. Van Lent, R. Kormelink, R. Goldbach and D. Peters. 1993. Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *J. Gen. Virol.*, 74: 341-349.
- Zitter, T. A. 1997. Diseases caused by viruses, pp. 31-42. J. B. Jones, J. P. Jones, R. E. Stall, T. A. Zitter, (eds.) *Compendium of Tomato Diseases*, APS Pres, Minnesota, USA

---

**İletişim adresi:**

Pınar TURHAN  
 Çanakkale Üniversitesi Ziraat Fakültesi  
 Bitki Koruma Bölümü-Çanakkale

