

Isparta ve Burdur İli Domates Üretim Alanlarında *Tomato chlorosis virus*'un Nested-RT-PCR Yöntemiyle Tanınması

Nevin AKDURA YEŞİLYURT Bayram ÇEVİK*

Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Isparta
*Sorumlu yazar: bayramcevik@sdu.edu.tr

Geliş tarihi: 31.08.2016, Yayına kabul tarihi: 02.01.2017

Özet: Bu çalışmada, Isparta ve Burdur illerin domates üretim alanlarında *Tomato chlorosis virus* (ToCV) varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla bu illerin yoğun domates üretimi yapılan bazı bölgelerinde arazi çalışmaları yapılarak 24 farklı üretim alanından 85 adet domates örneği toplanmıştır. Elde edilen örneklerden öncelikle total nükleik asit izolasyonu yapılmış ve daha sonra tüm örnekler tersine transkripsiyon uygulanarak (reverse transcription, RT) cDNA sentezi sentezlenmiştir. Daha önce ToCV tanısında kullanılan ısı şoku protein homolog (heat shock protein homologue, hsp70h) genine spesifik primerler kullanılarak nested-RT-PCR yöntemiyle ToCV tanınması yapılmıştır. Yapılan RT-PCR testleri sonucunda, 85 örnekten 6 tanesinin ToCV pozitif olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Isparta ve Burdur illerinde ToCV varlığını ilk kez göstermiş, ancak enfeksiyon oranının düşük (Isparta % 5,71 ve Burdur % 8,00) olduğunu ortaya koymuştur. Burdur'dan elde edilen ToCV55 numaralı izolatının hsp70h geni yeniden çoğaltılarak DNA dizisi belirlenmiştir. Bu izolatın DNA dizisi dünyanın farklı domates üretim bölgelerinden elde edilen ToCV izolatların hsp70h genleriyle karşılaştırılmış ve filogenetik analizler yapılmıştır. Yapılan dizi analizleri sonucunda, Burdur 55 ToCV izolatının diğer ToCV izolatlarıyla %93-95 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan filogenetik analizler ToCV izolatlarının hsp70h genine göre iki ana gruba ayrıldığını, ancak Burdur 55 izolatının bu iki grubun dışında kalan farklı bir izolat olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Domates, ToCV, hsp70h, nested-RT-PCR, dizi analizi, filogenetik analiz

Detection of *Tomato chlorosis virus* from Tomato Production Areas in Isparta and Burdur Provinces Using a Nested-RT-PCR Method

Abstract: In this study, *Tomato chlorosis virus* (ToCV) was investigated in tomato production areas of Isparta and Burdur provinces. For this purpose surveys were conducted in some tomato production areas of Isparta and Burdur and 82 tomato samples were collected from 24 different production areas. First, total nucleic acid was isolated and then cDNA was synthesized from all samples by reverse transcription, (RT). ToCV was then detected by nested RT-PCR method using heat shock protein homologue (hsp70h) gene-specific primes previously used for ToCV detection. RT-PCR results showed that 6 of the 82 samples were infected with ToCV. The results showed the presence of ToCV in Isparta and Burdur for the first time but the infection rates was low (5.71% in Isparta and 8.00% in Burdur). The hsp70h gene of Burdur isolate ToCV55 was re-amplified and sequenced. The sequence was compared with the hsp70h genes of isolates from different tomato production areas and phylogenetic analysis was performed among ToCV isolates. As a result of nucleotide sequence comparison Burdur 55 showed 93-95% similarity with other ToCV isolates. Phylogenetic analysis revealed that ToCV isolates were divided into two main groups according to hsp70h gene; however, Burdur 55 isolate was outside of these two groups indicating that it is different from others isolates.

Key words: Tomato, ToCV, hsp70h, nested-RT-PCR, sequence analysis, phylogenetic analysis

Giriş

Domates (*Solanum lycopersicum* L.), yıllık yaklaşık 130 milyon ton üretim ile dünyada yaygın olarak yetiştirilen, tüketilen ve ticareti yapılan ekonomik açıdan önemli tarımsal ürünlerin başında gelmektedir. Dünyanın önemli domates üreticileri

arasında yer alan ülkemiz 30.000 ha örtü altı ve açık alanda yapılan 11 milyon ton domates üretimiyle Çin, Mısır ve Hindistan'dan sonra dördüncü sırada yer almaktadır (FAO, 2009). Domates üretimi ülkemizde hemen her bölgede yapılırken, ülkemizin toplam domates üretiminin büyük bir kısmı Antalya ilinde yapılmaktadır (TÜİK, 2009). Yaz aylarında aşırı sıcaklardan dolayı Antalya'da ara verilen domates üretimi Isparta ve Burdur gibi hava sıcaklığının daha düşük olduğu yüksek yayla bölgelerinde yapılmaktadır. Domateste ekonomik kayıba yol açan çok sayıda hastalık etmenleri arasında virüs hastalıkları önemli bir yer tutmaktadır. Domates'te hastalığa yol açan farklı taksonomik gruplardan 50'den fazla virüsün olduğu rapor edilmiştir (Smith, 2012; Hansen et al., 2010). Bu virüslerin dünya domates üretim alanlarındaki yaygınlıkları ve neden oldukları ekonomik kayıplar göz önüne alındığında Domates sarı yaprak kıvrıcılık virüsü (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV), Domates lekeli solgunluk virüsü (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) dünya'da domates üretiminde öne çıkan virüsleri oluşturmaktadır (Zitter et al., 1997; Erkan ve ark., 2001; Arli-Sokmen and Sevik, 2006). Ancak, bu virüslere karşı dayanıklılık genlerinin bulunması bu genlerin son 10 yıl içerisinde ticari çeşitlere aktarımının yaygınlaşmasıyla birlikte farklı domates üretim bölgelerinde yeni virüsler ortaya çıkmaya başlamıştır. Bu virüsler arasında 2000'li yılların başlarında başta Akdeniz ülkeleri olmak üzere birçok domates üretim bölgesinde yayılmaya başlayan Domates kloroz virüsü (*Tomato chlorosis virus*, ToCV) bulunmaktadır.

Kloroz hastalığı ilk olarak 1989 yılında Florida'da domates yapraklarında özellikle yaprak damar arasında sararma belirtileri olarak ortaya çıkmıştır. Bu belirtilerin görülmesinden yaklaşık 10 yıl sonra domates yapraklarındaki kloroza Domates kloroz virüsünün (ToCV) neden olduğu tespit edilmiştir (Wisler et al., 1998). ToCV'nin ilk olarak tanılanmasından sonra dünyanın farklı domates üretim alanlarında virüsün varlığı tespit edilmeye ve yaygınlığı rapor edilmeye başlanmıştır. Virüs, 2000'li yıllarda özellikle Akdeniz ülkelerinde

yayılmaya başlamış olup, İspanya (Lozano et al., 2006), Portekiz (Louro et al., 2000), İsrail (Segev et al., 2004), Yunanistan (Dovas et al., 2002; Kataya et al., 2008), Kıbrıs (Papayiannis et al., 2005) ve Fransa'da (Jacquemonnd et al., 2009) belirlenmiştir. Ülkemizde ise ToCV ilk olarak 2007 yılında Muğla'nın Fethiye ilçesinde domates üretim seralarında tespit edilmiştir (Çevik and Erkiş, 2008). Daha sonra virüsün ülkemizin en önemli domates üretim bölgesi olan Antalya'da varlığı 2010 yılında belirlenerek virüsün tanısı konularak ilk kaydı yapılmış ve yaygınlığı belirlenmiştir (Akdura ve Çevik, 2011; Öztünç, 2010). Son yıllarda yapılan çalışmalarda virüsün Antalya'da yayılmaya devam ettiği (Sulley, 2016.) ve Adana ve Mersin illerinde de bulunduğu (Pehlivan, 2013) belirlenmiştir.

Taksonomik olarak *Closteroviridae* familyası, *Crinivirus* cinsi içerisinde yer alan ToCV iki parçalı, pozitif duyarlı, tek iplikli RNA genomu içermektedir (Martelli et al., 2002). Virüs aralarında bitkiden bitkiye *Trialeurodes vaporariorum*, *T. abutilonea* ve *Bemisia tabaci* biyotip A ve B farklı beyazsinek türleriyle yarı-persistent olarak taşınmaktadır (Wisler and Duffus, 2001). Serolojik yöntemlerden enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) bitki virüslerinin tanılanmasında kullanılan en yaygın yöntem olmasına rağmen, ToCV'ye tanısında kullanılabilecek bir antikorun henüz geliştirememiş olmasından dolayı ticari bir ELISA kiti bulunmamaktadır. Virüs, serolojik yöntemlerle tanılanması yapılamadığından ToCV tanısı sadece nükleik asitlerin çoğaltımına dayalı özellikle ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) yöntemiyle yapılmaktadır (Jacquemonnd et al., 2009). Bu amaçla, virüsün farklı genom bölgelerinin çoğaltılmasını sağlayan RT-PCR yöntemi ToCV'nin etkin bir şekilde teşhisinin yapılması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. ToCV tanılamada RT-PCR yöntemi yaygın olarak kullanılmakla birlikte, hedef olarak virüs genomunun farklı gen veya genom bölgeleri kullanılmaktadır. Tanılamada kullanılan gen bölgeleri arasında ısı şoku protein homolog geni (heat shock protein homologue, hsp70h) (Navas-

Castillo et al., 2000; Dovas et al., 2002; Delatte et al., 2005; Wintermantel and Wisler, 2006; Lett et al., 2009; Hirota et al., 2010) ve kılıf protein geni (CP) (Segev et al., 2004; Hirota et al., 2010) en yaygın kullanılan gen bölgelerini oluşturmaktadır. Enfekteli bitkilerde virüs yoğunluğunun düşük olduğu, doku veya dönem gibi bazı durum veya zamanlarda RT-PCR yöntemi yetersiz kalabilmektedir. Böyle durumlarda hedeflenen gen bölgesinin büyük bir kısmına spesifik primerlerle RT-PCR yapıldıktan sonra çoğaltılan bölgenin içinde kalan bir kısma spesifik yuvalı (nested) primerler kullanılarak ikinci bir PCR, yani nested PCR yapılarak istenilen hedef çoğaltılmaktadır. ToCV'nin hsp70h geninin bir kısmının çoğaltılmasını sağlayarak virüsün tanınmasında kullanılan daha hassas bir nested-RT-PCR yöntemi geliştirilmiştir (Dovas et al., 2002). Bu yöntem ülkemiz dahil bir çok domates üretim bölgesinde ToCV'nin tanınmasında kullanılmıştır (Dovas et al., 2002; Delatte et al., 2005; Çevik and Erkiş, 2008). ToCV'nin ülkemizde varlığı ilk olarak 2008 yılında Fethiye'de belirlendiğinde, Hsp70h genine spesifik nested-RT-PCR yöntemi kullanılmıştır (Çevik and Erkiş, 2008). Daha sonra ülkemizin en önemli domates üretim bölgesi olan Antalya'da aynı yöntemle ToCV'nin tanısı yapılarak hastalığın yaygınlığı belirlenmiştir. Bu çalışmada nested-RT-PCR yöntemi kullanılarak Isparta ve Burdur illerinin bazı domates üretim bölgelerinde ToCV'nin varlığı ve yaygınlığı araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Arazi Çalışmaları ve Bitki Materyalinin Toplanması

Çalışma kapsamında 2010-2011 yılı üretim dönemlerinde Isparta ve Burdur illerinde domates yetiştiriciliğinin yapıldığı bazı bölgelerde arazi çalışmaları yapılarak, açık ve örtü altı domates üretim alanlarından kloroz ve sararma belirtileri gösteren domates yaprak örnekleri toplanmıştır. Çalışma kapsamında Isparta ilinden (Deregümü, Keçiborlu ve Gönen) ve Burdur ilinden (Askeriye, Çeltikci ve Çavdır) domates üretiminin yoğun olarak yapıldığı

üçer bölge seçilmiştir. Arazi çalışmalarında domateslerde ToCV'nin tipik yaprak klorozu ve yaprak damar arası sararma görülen domates üretim alanlarında kloroz ve yaprak damar arası sararma belirtisi gösteren bitkilerden yaprak örnekleri alınmıştır. Yapılan arazi çalışmaların kapsamı ve alınan örnek sayıları Çizelge 1'de özetlenmiştir. Çalışma kapsamındaki Isparta ve Burdur illerinden toplam 85 adet şüpheli domates bitkisinden yaprak örneği alınmıştır. Arazi çalışmaları Isparta ilinden 3 farklı bölgeden 3'ü sera 5'i açık alan olmak üzere toplam 8 farklı üretim alanını kapsamıştır. Burdur ilinde ise 3 farklı bölgeden 1'i açık alan, 15'i sera olmak üzere toplan 16 üretim alanından kloroz belirtisi gösteren domates bitkilerinden ziyaret edilen arazi ve seraları temsil edecek sayıda yaprak örneği alınmıştır.

Nükleik Asit İzolasyonu

Domates kloroz virüsü (ToCV) bir RNA virüsü olduğundan dolayı Isparta ve Burdur domates üretim alanlarından toplanan domates örneklerinden CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) yöntemiyle total nükleik asit izolasyonu yapılmıştır (Li et al., 2008). Toplanan domates örneklerinden yaprak dokusu alınarak, bir havan içerisinde sıvı azot yardımı ile iyice ezilerek, 100 mg ezilmiş doku örneği alınmış ve 2.0 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Doku örneklerine 1ml CTAB tamponu (%2 CTAB, %2 PVP-40, 10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA ve 0.2% 2-Mercaptoethanol) eklenerek, vorteks ile iyice karıştırılmıştır. Tüpler, -20 °C'de 15-20 dak. bekletilerek dondurulmuş, sonra da vorteks ile en yüksek hızda en az 1 dak. karıştırılmıştır. Karışım, 65 °C'de 15 dak. bekletildikten sonra, 4 °C soğutmalı santrifüjde 10.000 rpm hızda 5 dak. çevrilmiştir. Santrifüj yapılan örneklerden yaklaşık 650 ml sıvı kısım (süpernatant) pipet yardımıyla alınarak, 1.5 ml'lik yeni bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Daha sonra tüplere örneklerin hacmine eşit miktarda kloroform:izoamil alkol karışımı (24:1) eklenerek 4 °C'de 15.000 rpm hızda 10 dak. süreyle çevrilmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen sıvı kısımdan pipet yardımıyla 500 µl alınarak, 350 µl

izopropanol içeren yeni bir 1.5 ml santrifüj tüpüne eklenmiştir. Elde edilen karışım 4 °C'de 15000 rpm hızda 10 dak. santrifüj yapıldıktan sonra, sıvı kısım dökülerek pellet 1 ml % 70'lik etil alkol ile yıkanarak 4 °C 15000 rpm hızda 5 dak. süreyle çevrilmiştir. Son olarak sıvı kısım dökülerek tüpler oda sıcaklığında 10-15 dak. kurutulduktan sonra 100 µl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0 solüsyonu içerisinde çözdürülerek total nükleik asit elde edilmiştir. Elde edilen total nükleik asitler RT-PCR'da kullanılmaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Primer Tasarımı

Kloroz belirtisi gösteren domates örneklerinde ToCV tanısında kullanılmak üzere virüsün hsp70h genine spesifik 4 adet primer kullanılmıştır. Primer hsp70h geninin korunmuş bölgelerine daha önce tasarlanmış, ToCV tanılamada kullanılmış ve primer dizileri daha önce rapor edilmiştir (Davos et al., 2002). Daha önceki dizilere göre BC36 5'-GG(G/T)TT(A/G)GA(G/T)TT(C/T)GGTACTAC-3', BC37 5'-CC(G/T)CCACAAA(A/G)TCGTA-3', BC405'-GGTTTGGATTTTGGTACTACTAGT-3' ve BC41 5'-AAACTGCCTGCATAAAGTCTC-3' 4 adet primerin sentezi ticari firmadan (Iontek) hizmet alımı yapıyla alınmıştır.

ToCV HSP70 Genlerinin Nested PCR ile Çoğaltılması

Örneklerden izole edilen RNA'dan 5 µl, 1 µl random heksamer primer, 6 µl su karıştırılarak 65°C'de 5 dak. PCR'da denature edilmiş ve sonra 5 dak. buzda bekletilmiştir. Aynı bir tüpte 4 µl 5X Reaksiyon tamponu (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 1 µl RNase inhibitör, 2 µl 10 mM dNTPs, 1 µl reverse transkriptaz eklenerek, bu karışım PCR denatürasyonu yapılan örneğe ilave edilmiştir. Örnekler 25 °C'de 5 dak, 42 °C'de 60 dak., 70 °C'de 5 dak. ve 4°C'de sürekli kalacak şekilde ters transkripsiyon (reverse transcription, RT) yapılarak random primer ile tamamlayıcı DNA (Complementary DNA; cDNA) sentezlenmiştir. RT sonucunda cDNA'lar ToCV hsp70h geninin korunmuş bölgelerine spesifik primer dizimleri ve Taq DNA

polimeraz enzimi kullanılarak yaklaşık 587 baz çiftlik kısmı çoğaltmak için PCR yapılmıştır. PCR için; 2.5 µl 10X PCR tampon solüsyonu (100 mM Tris-HCl (pH 8.8), 500 mM KCl, 0.8 % Nonidet (octyl phenoxypolyethoxyethanol) P40), 1.5 µl 2.5 mM MgCl₂, 0.5 µl 10 mM dNTPs, 4 µl 20 pmol primer BC36F 2 µl 20 pmol Primer BC37R, 0.25 µl Taq DNA Polimeraz ve 11.75 µl su ilave edilerek karışım hazırlanmıştır. Etiketlenen her bir PCR tüpü, karışımdan 22.5 µl ve DNA'dan 2.5 µl ilave edilerek PCR makinesine yerleştirilmiştir. PCR makinesi önce 95 °C'de 3 dak. bekletilmiş, daha sonra 95°C'de 30 saniye, 43 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dak. süreyle 40 döngüyü tamamladıktan sonra 72 °C'de 5 dak. bekletilmiş ve 4 °C'de sürekli kalacak şekilde programlanarak ToCV hsp70h geninin 587 baz çiftlik kısmının çoğaltılması yapılmıştır. İkinci aşama olan Nested PCR için de 2.5 µl 10X PCR tampon solüsyonu (100 mM Tris-HCl (pH 8.8), 500 mM KCl, 0.8 % Nonidet (octyl phenoxypolyethoxyethanol) P40), 1.5 µl 2.5 mM MgCl₂, 0.5 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl 20 pmol primer BC40F, 0.5 µl 20 pmol primer BC41 R 0.25 µl Taq DNA Polimeraz ve 18.25 µl su ilave edilerek karışım hazırlanmıştır. Etiketlenen her bir PCR tüpü, karışımdan 24 µl ve DNA'dan 1 µl ilave edilerek PCR makinesine yerleştirilmiştir. PCR makinesi önce 95°C'de 3 dak. bekletilmiş, daha sonra 95 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 30 saniye süreyle 40 döngüyü tamamladıktan sonra, 72 °C'de 5 dak. bekletilip, 4 °C'de sürekli kalacak şekilde programlanarak ToCV hsp70 geninin 463 baz çiftlik kısmının çoğaltılması yapılmıştır. Elde edilen yeni PCR ürünleri ve 100 bp plus DNA büyüklük markörü % 1'lik agaroz jelde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp ethidyum bromür ile boyandıktan sonra MiniBus Pro (NDR, İsrail) görüntüleme cihazında ultraviyole ışık altında görüntülenmişlerdir.

hsp70h Geninin Dizilenmesi, Dizi Karşılaştırması ve Filogenetik Analizleri

Çalışmada domates üretim alanlarından elde edilen ve nested-RT-PCR sonucunda hsp70h genine ait 463 bp bandının en yoğun olarak çoğaltıldığı bir izolat seçilmiştir.

Seçilen izolatin hsp70h geni nested-RT-PCR yöntemiyle yukarıda belirtildiği gibi yeniden çoğaltılmıştır. Yeniden çoğaltılan hsp70h geni Qiagen PCR saflaştırma kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak, üretici firmanın önerileri doğrultusunda saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PCR ürünleri doğrudan dizileme yöntemiyle çift yönlü olarak dizilerek, hsp70h geninin DNA dizisi elde edilmiştir. ToCV izolatinın elde edilen hsp70h genine ait nükleotid dizileri Align X programında çoklu dizi karşılaştırma yapılarak, öncelikle Fethiye izolatıyla benzerlik oranları yüzde olarak belirlenmiştir. Daha sonra gen bankasında DNA ve protein veri tabanlarında araştırma yapılarak dünyanın farklı domates üretim bölgelerinden elde edilen ToCV izolatlarının hsp70h genlerine ait nükleotid ve amino asit dizilimleri elde edilmiştir. Bu diziler Burdur ili domates üretim alanlarından elde edilen Burdur55 izolatların hsp70h genlerine ait nükleotid dizileriyle Align X programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Burdur ToCV izolatlarının dünya izolatlarıyla benzerlik oranları yüzde olarak belirlenmiştir. Burdur 55 ToCV izolatıyla dünyanın diğer domates üretim bölgelerinden elde edilen ToCV izolatların gen bankasında alınan ve Align X programında çoklu nükleotid dizi karşılaştırmaları yapılan ve hsp70h genine ait çoklu karşılaştırma dosyaları Clustal X programına aktarılarak filogenetik analizler yapılmıştır. Filogenetik analiz verilerine Kiamura iki parametre algoritması

uygulanarak neighbor-joining yöntemiyle ToCV izolatlarının filogenetik soy ağacı oluşturulmuştur. Oluşturulan soy ağacının doğruluğunu istatistiksel olarak belirlemek amacıyla 100 tekerrürlü bootstrap analizi yapılmıştır. Son olarak oluşturulan soy ağaçları TreeView soy ağacı görüntüleme programı kullanılarak görüntülenmiştir (Page, 1996).

Bulgular ve Tartışma

Arazi Çalışmaları

Çalışma kapsamında Isparta ve Burdur illerinde domates üretimi yapılan açık ve örtü altı alanlarda arazi çalışmaları yapılarak, domateslerde ToCV'nin tipik yaprak klorozu ve yaprak damar arası sararma görülen domates üretim alanları belirlenmiştir. Bu belirtilerin bulunduğu açık ve örtü altı üretim alanlarında yetiştirilen ve bitkilerden belirti gösterenler seçilerek yaprak örnekleri alınmıştır. Yapılan arazi çalışmaları Çizelge 1 de özetlenmiştir. Çizelge 1 incelendiğinde yapılan arazi çalışmaları sonucunda, Isparta ilinden 3 farklı bölgeden 3 ü sera 5 i açık alan olmak üzere toplam 8 farklı üretim alanından 35 adet domates örneği ve Burdur ilinin 3 farklı bölgesinden 1'i açık alan 15'i sera olmak üzere toplan 16 adet üretim alanından 50 farklı domates örneği olmak üzere her iki ilden toplam 85 adet şüpheli domates örneği alınmıştır.

Çizelge 1. Isparta ve Burdur illerinde yapılan arazi çalışmalarının ve nested-RT-PCR yöntemiyle yapılan ToCV tanılama çalışmalarının özeti

Table 1. Summary of surveys conducted in Isparta and Burdur provinces and ToCV detection by nested-RT-PCR method

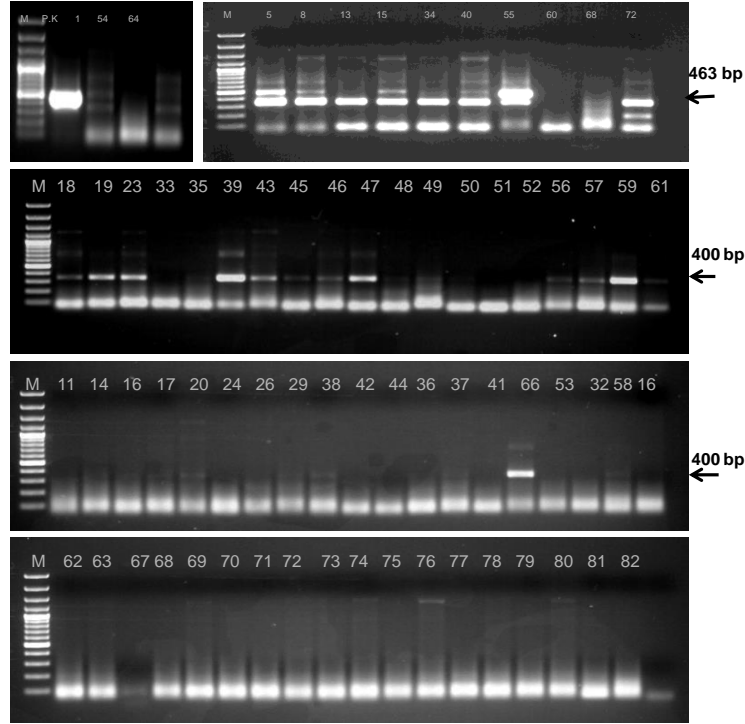
Sürvey Alanı <i>Survey Area</i>	Sera Sayısı <i>Number of Green-houses</i>	Açık Alan Sayısı <i>Number of open field</i>	Toplam Alan sayısı <i>Total number of area</i>	Toplanan Örnek sayısı <i>Number of Samples collected</i>	Testlenen Örnek Sayısı <i>Number of sample tested</i>	Pozitif Örnek sayısı <i>Number of Positive samples</i>	% Enfeksiyon Oranı <i>% infection rate</i>
Isparta	3	5	8	35	35	2	5,71
Deregümü	3	0	3	14	14	2	14,28
Keçiborlu	0	3	3	11	11	0	0,00
Gönen	0	2	2	7	7	0	0,00
Burdur	15	1	16	50	50	4	8,00
Askeriye	3	0	3	12	12	0	0,00
Çeltikci	4	1	5	15	15	1	6,66
Çavdır	8	0	8	23	23	3	13,04
Toplam/Total	18	6	24	85	85	6	7,05

Nested-RT-PCR Yöntemiyle ToCV'nin Tanılanması

Isparta ve Burdur illerinden alınan domates örneklerinden total nükleik asit izolasyonu yapıldıktan sonra iki aşamalı RT-PCR yöntemiyle alınan örneklerde ToCV varlığını belirlenmiştir. Testlemelerde daha önce ToCV tanısında kullanılan ve düşük virüs yoğunluğunun düşük olduğu örneklerde bile ToCV varlığının belirlenmesinde kullanılan ve RT-PCR'dan daha hassas bir yöntem olduğu belirlenen nested-RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. RT-PCR testlemelerinde daha önce Fethiye'de tespit edilen ToCV izolatıyla enfekteli örnek bir domates örneği pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Yapılan nested-RT-PCR sonucunda pozitif kontrol örneğinden hsp70h geninin 463 bp büyüklüğünde bir kısmı çoğaltılmıştır. Kullanılan pozitif kontrolden elde edilen sonuç nested-RT-PCR yönteminin ToCV tanılanması amacıyla doğru bir şekilde uygulandığını ve yöntemin çalıştığını göstermiştir (Şekil 1). Nested-RT-PCR sonucunda Isparta ve Burdur ili domates üretim alanlarından toplanan 85 örneğin toplam 6 örnekten 463 bp büyüklüğünde ToCV hsp70h genine spesifik bir bant çoğaltılmıştır (Şekil 1). Isparta ve Burdur ilinin farklı bölgelerinden alınan örneklerin nested-RT-PCR sonuçları Çizelge 1'de özetlenmiştir. Her iki ilden toplanan 85 domates örneğinin 6 tanesinin ToCV ile enfekteli olduğu ve ortalama enfeksiyon oranının % 7.05 olduğu belirlenmiştir. Nested-RT-PCR sonuçları illere göre değerlendirildiğinde Isparta ilinden alına 35 örnekten 2 tanesi enfekteki bulunmuş ve enfeksiyon oranı % 5.71 belirlenirken, Burdur ilinden alınan 50 örneğin 4 tanesi ToCV ile enfekteli bulunmuş ve enfeksiyon oranı % 8.00 olarak belirlenmiştir (Çizelge

1). Alınan örneklerin tamamında kloroz belirtisi bulunmasına rağmen sadece 6 örnekte ToCV bulunması ToCV dışında domates enfeksiyöz kloroz virüsü (*Tomato infectious chlorosis virus*, TICV) gibi başka virüslerle enfekteli olabileceğini veya daha büyük olasılıkla demir ve özellikle mangan gibi besin eksikliklerinin de kloroza yol açmış olabileceği düşünülmektedir. ToCV belirtilerinin besin eksikliği ve yaşlanma belirtilerine benzediği daha önce rapor edilmiştir (Wisler et al., 1998; EPPO, 2013). Daha önce yapılan çalışmalarda da klorozlu örneklerin sadece bir kısmında ToCV olduğu tespit edilmiş olup besin eksikliği var olduğu düşünülen bazı örneklerde de ToCV tespit edilmiştir (Wisler et al., 1998; EPPO, 2013). Bu nedenle ToCV varlığının tüm kloroz gösteren bitkilerde test edilmesi gerekmektedir.

Virüsün bitkideki yoğunluğu bitki gelişme dönemine, iklim koşullarına veya enfeksiyon aşamasına göre değişebilmektedir. Bu nedenle virüs belirtilerinin veya yoğunluğunun az olduğu durum, dönemlerde, doku ve örneklerde daha hassas bir yöntem olan nested RT-PCR kullanımı önerilmektedir (Dovas et al., 2002). Virüslerin tanımlanmasında kılıf protein geni en çok kullanılan hedef olmamasına rağmen, sadece bu virüs familyasına özgü olan ve yüksek oranda korunmuş diziye sahip olan Hsp70 geni hedefleyen nested-RT-PCR yöntemi kullanılarak virüsün tanılanması yapılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda hsp70h genini hedefleyen RT-PCR yöntemleri başarıyla kullanılmış (Navas-Castillo et al., 2000; Dovas et al., 2002; Papayiannis et al., 2005) olup bu çalışmada da hsp70h geninin ToCV tanısında CP genine alternatif olabileceği gösterilmiştir.



Şekil 1. Isparta ve Burdur illeri domates üretim alanlarından toplanan örnekte ToCV tespiti amacıyla kullanılan nested-RT-PCR sonuçlarını gösteren jel fotoğrafları. M: 100 bp DNA büyüklük markörü P.K. : Pozitif kontrol

Figure 1. Gel photograph showing detection of ToCV by nested-RT-PCR from samples collected from tomato production areas of Isparta and Burdur provinces. M: 100 bp DNA marker P.K. : Positive control

hsp70h Gen Dizileme ve Dizi Analizleri

Burdur il'inde domates üretiminin yapıldığı farklı alanlardan ToCV şüpheli olarak toplanan örneklerden nested-RT-PCR yöntemiyle hsp70h geninin çoğaltılmıştır. Çoğaltılan hsp70h gen bölgesi tekrar çoğaltılarak, saflaştırılmış ve Dizilimi belirlenmiştir. Öncelikle Burdur 55 ToCV izolatından elde edilen dizi Fethiye EU069363 izolatı ile karşılaştırılarak bunların benzer hsp70h dizilerine sahip olduğu belirlenmiştir. Daha sonra gen bankası veri tabanından elde edilen ve dünyanın farklı bölgelerinden elde edilen 20 ToCV izolatı hsp70h gen dizileri incelenmiş ve ortak olan 439 bp nükleotid dizilerinin

karşılaştırılması yapılmıştır. Burdur 55 ToCV izolatı ile dünyada bulunan 20 farklı ToCV izolatı arasındaki nükleotid dizi benzerlik oranları Çizelge 2'de gösterilmiştir. Çizelge 2 incelendiğinde, Burdur 55 ToCV izolatının dünya izolatları ile % 93-95 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Burdur 55 ToCV izolatı ve 20 dünya izolatı arasındaki hsp70h geninin 439 baz çiftlik nükleotid dizilimlerinin çoklu karşılaştırılması Şekil 2'de verilmiştir. Şekil 2'ye göre dizi karşılaştırılması incelendiğinde, farklılıklarının önemli bir kısmının dizileme yapılan bölgenin 3' ve 5' ucunda olduğu tespit edilmiştir.

	AF215817 İspanya	AF215818 İspanya	AF233435 İspanya	DQ136146 İspanya	FJ360853 Küba	AJ968394 Reunion	AJ968395 Reunion	AJ968396 Reunion	EU069363 Fethiye,	Burdur, Türkiye	EU284744 Yunanistan	HQ879844 Georgia, ABD	HQ879847 Georgia, ABD	FJ609652 Meksika	FJ609654 Meksika	FJ609653 Meksika	AY903448 Florida, ABD	HQ879845 Georgia, ABD	HQ879846 Georgia, ABD	NC007341 Florida, ABD
AB513442 Japonya	98	98	99	98	98	98	98	98	99	95	100	100	100	99	99	99	100	100	100	100
AF215817 İspanya		100	100	100	98	98	98	98	98	94	98	98	98	97	97	97	98	98	98	98
AF215818 İspanya			100	100	98	98	98	98	98	94	98	98	98	97	97	97	98	98	98	98
AF233435 İspanya				100	99	98	98	98	98	94	98	98	98	98	98	97	98	98	98	98
DQ136146 İspanya					98	98	98	98	98	94	98	98	98	97	97	97	98	98	98	98
FJ360853 Küba						98	98	97	98	94	98	98	98	97	97	97	98	98	98	98
AJ968394 Reunion							100	100	98	94	98	98	98	97	97	97	98	98	98	98
AJ968395 Reunion								100	97	93	98	98	98	97	97	97	98	98	98	98
AJ968396 Reunion									97	93	98	98	98	97	97	97	98	98	98	98
EU069363 Fethiye										95	99	99	99	98	98	98	99	99	99	99
Burdur, Türkiye											95	95	95	94	94	94	95	95	95	95
EU284744 Yunanistan												99	99	99	99	99	99	99	99	99
HQ879844 Georgia, ABD													100	99	99	99	100	100	100	100
HQ879847 Georgia, ABD														99	99	99	100	100	100	100
FJ609652 Meksika															100	100	99	99	99	99
FJ609654 Meksika																100	99	99	99	99
FJ609653 Meksika																	99	99	99	99
AY903448 Florida, ABD																		100	100	100
HQ879845 Georgia, ABD																			100	100
HQ879846 Georgia, ABD																				100

Çizelge 2. Burdur 55 ToCV izolatının hsp70h geninin dünyanın farklı domates üretim bölgelerinden elde edilen ve Gen bankası veritabanlarında bulunan ToCV izolatlarının hsp70h genleriyle benzerlik oranları

Table 2. Nucleotide sequence identity of the hsp70h gene of Burdur 55 ToCV isolate with other isolates from different tomato production region of the world obtained from the GenBank database.

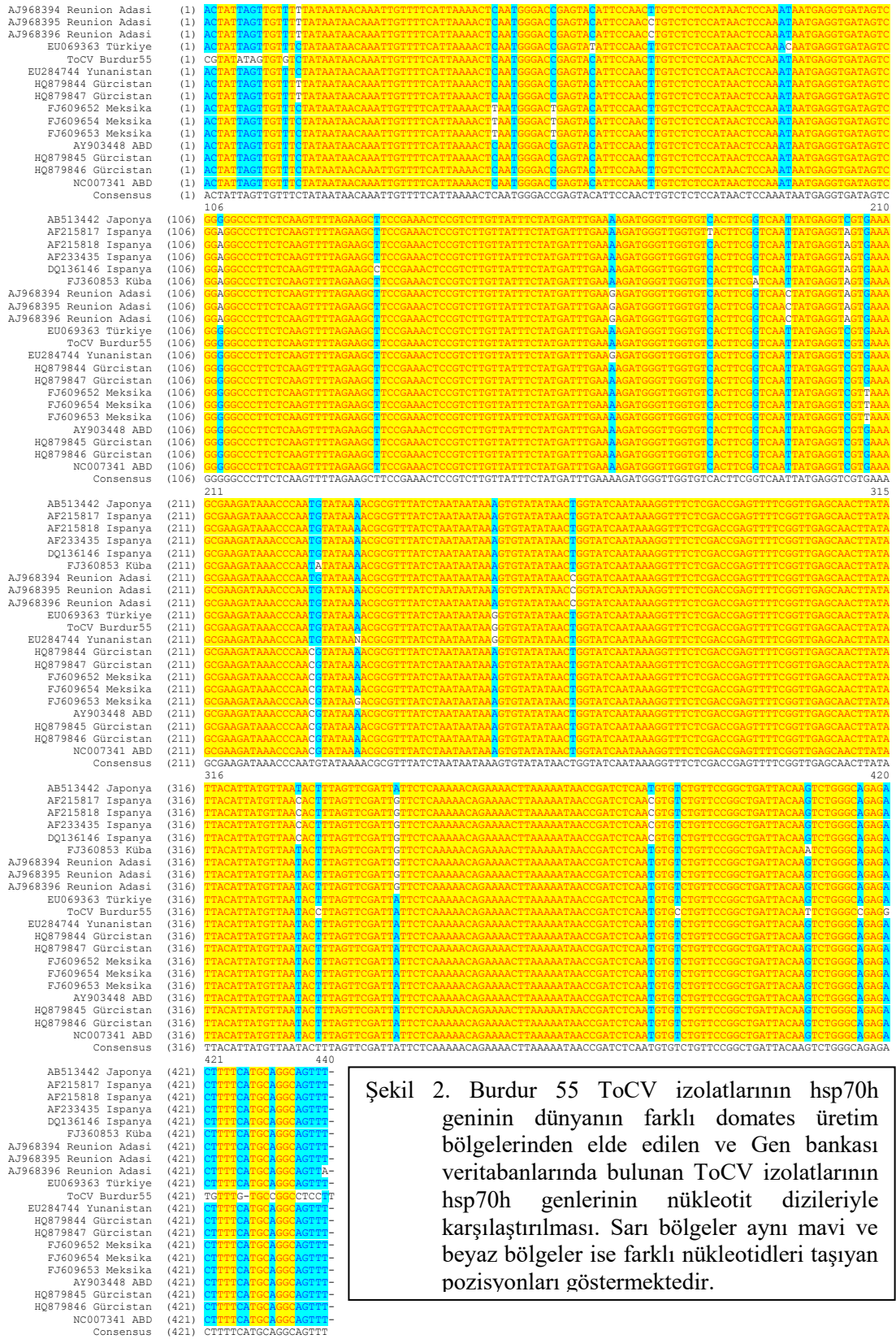
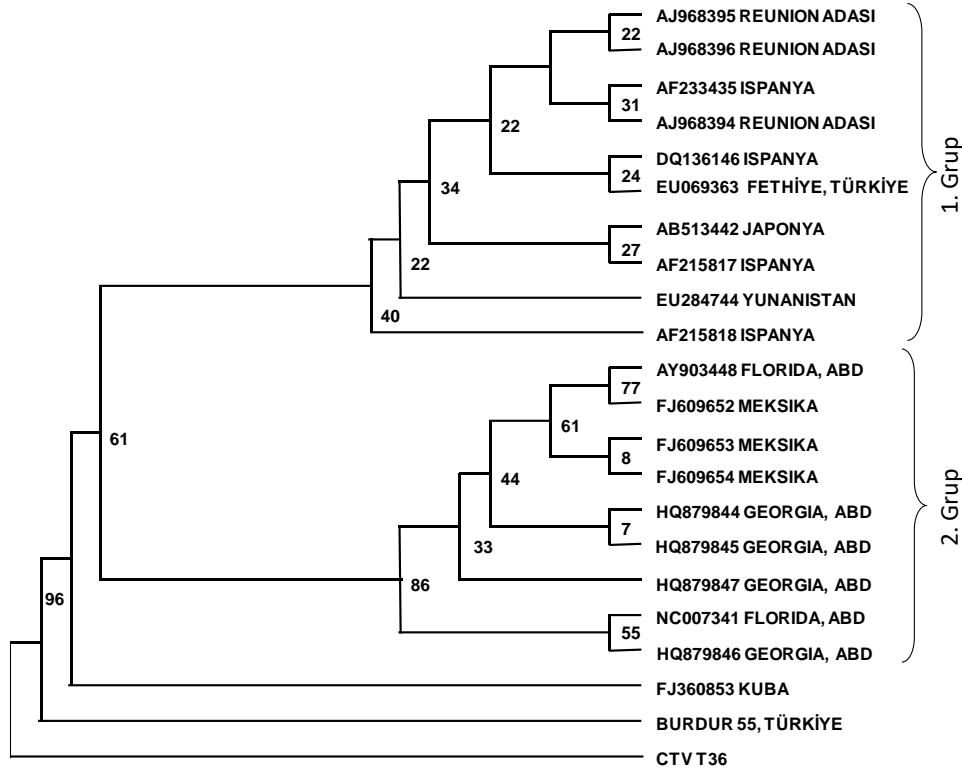


Figure 2. Nucleotide sequence comparison of the hsp70h gene of Burdur55 ToCV isolate with other isolates from different tomato production regions of the world obtained from the GenBank database. Yellow regions show the same nucleotides blue and white regions shows the different nucleotides.

Gen bankası veri tabanlarından elde edilen 20 farklı ToCV izolatının hsp70h genlerine ve Burdur 55 ToCV izolatına ait 439 bp nükleotid dizisiyle yapılan filogenetik analizleri sonucunda bire bir aynı soy ağacı elde edilmiştir. Farklı ToCV izolatlarının filogenetik ilişkisini belirlemek

amacıyla oluşturulan filogenetik soy ağacı Şekil 3'de verilmiştir. Filogenetik analizler ToCV izolatlarının hsp70h genlerine göre iki ana gruba ayrıldığını ve ToCV Burdur ve Küba izolatlarının bu iki ana grubun dışında kaldığını göstermiştir.



Şekil 3. Burdur 55 ToCV izolatlarının hsp70h genlerinin dünyanın farklı domates üretim bölgelerinden elde edilen ve hsp70h gen dizilimi gen bankası veritabanından alınan diğer ToCV izolatlarıyla karşılaştırılması sonucunda TreeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı.

Figure 3. Phylogenetic tree constructed by TreeView program using multiple sequence alignment of the hsp70h gene of Burdur 55 ToCV isolates with hsp70h gene of ToCV isolates from different tomato production region of the world obtained from the GenBank databases.

Birinci grupta, İspanya, Yunanistan, Fethiye-Türkiye gibi Akdeniz ülkeleri yanında Japonya, Reunion Adasından elde edilen 10 izolat yer almıştır. Reunion Adasının Fransa'ya bağlı olduğu düşünülünce birinci grubun Akdeniz ülkeleri izolatlarından oluştuğu ortaya çıkmıştır. İkinci grup ise sadece ABD ve Meksika izolatlarından oluşmakta olup, bu grubun Kuzey Amerika izolatlarından meydana geldiği ve filogenetik olarak birbirleriyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ülkemizin ilk

izolatı olan Fethiye izolatı, İspanya ve Reunion Adası izolatlarıyla ile benzerlik göstermiştir. Burdur 55 ToCV izolatı hsp70h geninin dizilimi ile Küba FJ360853 izolatı birbirinden farklı olmakla birlikte filogenetik olarak birbirlerine daha yakın izolatlar olarak belirlenmişlerdir. ToCV izolatlarının hsp70h genlerinin farklılıklarının ve filogenetik analizlerinin daha doğru sonuç vermesi açısından CTV T36 izolatı dış grup olarak eklenmiştir. Oluşturulan soy ağacı dalları 7-96 arasında

değişen bootstrap değerleriyle desteklenmekte olup, değerlendirmelerin tesadüf olmayıp soy ağacındaki dallardan çoğunun istatistiksel açıdan desteklendiğini göstermiştir. Gen bankası veri tabanında ülkemizden sadece Fethiye izolatinin hsp70h geninin dizilimi için bulunmaktadır ve karşılaştırmalarda bu izolattan yararlanılmıştır. Gen bankasından elde edilen fazla sayıda izolatin dizilimi ile oluşturulan soy ağacında değerlendirme yapılmaya çalışılmıştır. Burdur 55 ToCV izolatinin nükleotid dizilimi soy ağacını oluşturan diğer izolatların nükleotid dizilimleri ile çok yakın benzerlik göstermekle birlikte, Burdur ToCV izolatinin diğer izolatlardan farklı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3). ToCV son yıllarda dünyanın farklı domates üretim yerlerinde belirlenmesine rağmen ToCV izolatlarının filogenetik analizleri ve genetik ilişkilerinin belirlenmesine yönelik az sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların bazılarında izolatların genetik ilişkileri CP genleri kullanılarak yapılırken (Gharsallah et al., 2015) bir kısım izolatin moleküler karakterizasyonunda ise hsp70h (Albuquerque ve ark. 2013) genleri kullanılmıştır. hsp70h genleri kullanılarak daha önce Brezilya'da yapılan bir çalışmada ToCV izolatlarının bu çalışmada olduğu gibi coğrafik orijinlerine göre gruplandığı belirlenmiştir (Albuquerque et al., 2013). Bu çalışmada ve daha önceki çalışmalarda alınan sonuçlar hsp70h geniyle yapılan filogenetik çalışmalarda genel olarak ToCV izolatları arasında benzer bir gruplama meydana geldiğini göstermiştir. Bu sonuçlara göre hsp70h geninin ToCV izolatların genetik farklılıklarını ortaya çıkartılmasında ve izolatlar arasındaki genetik ilişkilerinin belirlenmesinde kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Sonuç

Bu çalışma Isparta ve Burdur illerindeki domates üretim alanlarında yapılmış olup, Akdeniz Bölgesinin en önemli yazlık domates üretim bölgesinde ToCV varlığı ilk kez belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, ToCV'nin Isparta ve Burdur illerinde bulunduğu, ancak enfeksiyon oranının %

10'un altında olduğu ortaya konmuştur. Her iki ilde de virüs bulunmakla birlikte, enfeksiyon oranının düşük olması hastalığın bölgede henüz yayılmadığını ve belirli alanlarda sınırlı sayıda bitkide bulunduğunu göstermiştir. Bunun en önemli nedeni, Isparta ve Burdur illerinin iklim koşullarından dolayı virüsün taşıyıcı vektörleri olan beyazsinek yoğunluğunun bölgede düşük olmasına bağlanabilir. Kışlık ve daha yoğun üretimin yapıldığı Antalya ilinde ToCV enfeksiyon oranının daha yüksek olduğu bilinmektedir (Akdura ve Çevik, 2011; Öztünç ve Çevik, 2016). Her iki bölgede benzer çeşitlere, benzer üretim teknikleri kullanılarak farklı mevsimlerde üretim yapıldığı göz önüne alındığında vektör popülasyonunun ToCV'nin yaygınlığında önemli olduğu ortaya çıkmaktadır. Daha önce Fransa'da yapılan bir çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiş ve ülkenin coğrafik olarak birbirine yakın iki farklı bölgesinde virüs enfeksiyon oranının farklı olduğu bildirilmiştir (Jacquemon et al., 2009).

Ayrıca yapılan Burdur 55 ToCV izolatıyla yapılan dizileme sonucunda elde edilen nükleotit ve aminoasit dizi karşılaştırmaları ve filogenetik analizlerle bu izolatin hsp70h genine göre kısmi moleküler karakterizasyonu da yapılmıştır. Yapılan dizileme ve dizi karşılaştırma Burdur 55 ToCV izolatu hsp70h genleri arasındaki genetik farklılıkların dünyanın farklı bölgelerinden izolatların aynı gen bölgeleriyle benzerlik gösterdiği ve yüksek oranda korunduğunu ortaya koymuştur. Ancak Burdur 55 ToCV izolatinin Küba ToCV izolatıyla birlikte diğer ToCV izolatlarında filogenetik olarak farklı olduğu ve oluşan iki farklı filogenetik grubun dışında kaldığı belirlenmiştir. Bu farklılığı daha önce ülkemizin farklı bir üretim bölgesi olan Fethiye izolatıyla göstermiş olması Burdur izolatinin farklı bir izolat olabileceğini işaret etmektedir. Ancak yapılan dizi karşılaştırmalarında genetik farklılıkların belirli bölgelere özellikle dizilenen gen kısmının başında ve sonunda yer alması bu farklılıkların doğrudan PCR ürünlerinin dizilemesinden de kaynaklanabileceğini ima etmektedir. Bu durumun daha net anlaşılması için Burdur

55 ToCV izolatının hsp70h gen bölgesinin klonlanarak dizilenmesi ve farklı gen bölgelerinin dizilemesi yapılarak, tüm gen ve hatta tüm genom düzeyinde karakterizasyonunun yapılması gerekmektedir.

Kaynaklar

- Akdura, N. ve Cevik, B. 2011. Batı Akdeniz Bölgesi Domates Üretim Alanlarında Domates Kloroz Virüsü (Tomato chlorosis virus, ToCV)'nün Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu. IV. Ulusal Bitki Koruma Kongresi, 28-30 Haziran, Kahramanmaraş, sayfa 400.
- Albuquerque, L.C., Villanueva, F., Resende, R.O., Navas-Castillo, J., Barbosa, J.C., & Inoue-Nagata, A.K. 2013. Molecular characterization reveals Brazilian Tomato chlorosis virus to be closely related to a Greek isolate. *Tropical Plant Pathology*, 38(4):332-336.
- Arli-Sokmen, M. and Sevik M.A. 2006. Viruses infecting field-grown tomatoes in Samsun province, Turkey. *Archives Phytopathology and Plant Protection*, 39 (4): 283-288.
- Çevik, B. and Erkiş, G. 2008. First Report of Tomato chlorosis virus in Turkey. *Plant Pathology*, 57 (4): 767.
- Delatte, H., Naze, F., Cottineau, J.S., Lefeuvre, P., Hostachy, B., Reynaud, B. and Lett, J.M. 2005. Occurrence of Tomato chlorosis virus in Réunion Island. *Plant Pathology*, 55: 289.
- Dovas, C.I., Katis, N.I. and Avgelis, A.V. 2002. Multiplex Detection of Criniviruses Associated With Epidemics of A Yellowing Disease of Tomato in Greece. *Plant Diseases*, 86 (12): 1345-1349.
- Erkan, S., Gümüş, M., Türküsay, H. ve Duman, İ. 2001. Sanayi Domates Çeşitlerinin Bazı Viral ve Bakteriyel Hastalık Etmenlerine Karşı Davranışlarının Belirlenmesi. XI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, tarih, şehir, 198-204.
- EPPO, 2013. Tomato chlorosis virus and Tomato infectious chlorosis virus. Diagnostic protocol PM 7/118(1). EPPO Bulletin 43: 462-470.
- FAO, 2009. <http://www.fao.org> (erişim tarihi: 20.01.2010).
- Gharsallah, C., Halima, A. B., Fakhfakh, H., & Gorsane, F. (2015). Insights into the genetic diversity and the phylogenetic analysis of Tunisian isolates of Tomato chlorosis virus. *Phytoparasitica*, 43(1): 87-96.
- Hanssen, I.M., Lapidot, M. and Thomma, B.P. 2010. Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular plant-microbe interactions*, 23 (5): 539-548.
- Hirota, T., Natsuaki, T., Murai, T., Nishigawa, H., Niibori, K., diğer yazarlarda eklenmeli 2010. Yellowing disease of tomato caused by; Tomato chlorosis virus newly recognized in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 76: 168-171.
- Jacquemond, M., Verdin, E., Dalmon, A., Guilbaud, L. and Gognalons, P. 2009. Serological and molecular detection of Tomato chlorosis virus and tomato infectious chlorosis virus in tomato. *Plant Pathology*, 58 (2): 210-220.
- Kataya, A.R.A., Stavridou, E., Farhan, K. and Livieratos, I.C. 2008. Nucleotide sequence analysis and detection of a Greek isolate of Tomato chlorosis virus. *Plant Pathology*, 57: 819-824.
- Lett, J.M., Hoareau, M., Reynaud, B., Saison, A., Hostachy, B., Lobin, K., and Benimadhu, S.P. 2009. First Report of Tomato chlorosis virus in tomato on Mauritius Island. *Plant Dis.* 9:111.
- Li, R., Mock, R., Huang, Q., Abad, J., Hartung, J. diğer yazarlar eklenmeli 2008. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *Journal of Virological Methods*, 154: 48-55.
- Louro, D., Accotto, G.P. and Vaira, A.M. 2000. Occurrence and diagnosis of tomato chlorosis virus in Portugal. *European Journal of Plant Pathology*, 106 (6): 589-592.
- Lozano, G., Moriones, E. and Navas-Castillo, J. 2006. Complete nucleotide sequence of the RNA2 of the

- crinivirus tomato chlorosis virus. Archives of Virology, 151 (3): 581-587.
- Martelli, G.P., Agranovsky, A.A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R.H., Dolja, V.V., Falk, B.W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A.V., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H.J., Wisler, G.C. and Yoshikawa, N. 2002. The family Closteroviridae revised. Archives of Virology, 147: 2039–2044.
- Navas-Castillo, J., Camero, R., Bueno, M. and Moriones, E. 2000. Severe yellowing outbreaks in tomato in Spain associated with infections of Tomato chlorosis virus. Plant Diseases, 84: 835–837.
- Öztünç, H. 2010. Antalya ilinde Domates Yetiştiriciliği Yapılan Seralarda Domates Kloroz Virüsünün Moleküler Yöntemlerle Tanılanması. Lisans bitirme tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 27 sayfa, Isparta.
- Öztünç, H. ve Çevik, B. 2016. İlave edilmeli
- Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences 12: 357-358.
- Papayiannis, L.C., Ioannou, N., Dovas, C.I., Maliogka, V.I. and Katis, N.I. 2005. First report of Tomato chlorosis virus (ToCV) on tomato crops in Cyprus. Plant Pathology, 55: 567.
- Pehlivan, D. 2013. Adana ve Mersin İllerinde Domates Kloroz Virüsü (Tomato chlorosis crinivirus, ToCV)'nün Saptanması ve Moleküler Karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. 65 Sayfa. Adana
- Segev, L., Polston, J.E. and Lapidot, M. 2004. First report of Tomato chlorosis virus in Israel. Plant Diseases, 88: 160.
- Smith, K.M. 2012. A textbook of plant virus diseases. Elsevier, Şehir, Ülke.
- Sulley, S. 2016. Tomato chlorosis virus (ToCV) izolatlarının örtü protein gen bölgesinin moleküler olarak belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi Ankara. 86 sayfa.
- TÜİK, 2009. <http://www.tuik.gov.tr> (erişim tarihi: 20.01.2010).
- Wintermantel, W.M., Polston, J.E., Escudero, J. and Paoli, E.R. 2001. First report of Tomato chlorosis virus in Puerto Rico. Plant Diseases, 85: 228.
- Wintermantel, W.M. and Wisler, G.C. 2006. Vector specificity, host range, and genetic diversity of Tomato chlorosis virus. Plant Diseases, 90: 814-819.
- Wisler, G.C., Li, R.H., Liu, H.Y., Lowry, D.S. and Duffus, J.E. 1998. Tomato Chlorosis Virus., A New Whitefly-Transmitted, Phloem-Limited, Bipartite Closterovirus of Tomato The American Phytopathological Society, 88 (5): 402-409.
- Wisler, G.C. and Duffus, J.E. 2001. Transmission properties of whitefly-borne criniviruses and their impact on virus epidemiology. In: Harris KF, Smith OP, Duffus JE (eds), Virus-insect-plant interactions. Academic Press, San Diego, pp. 293–308.
- Zitter, T.A., Stall, R.E. and Jones, J.P., 1997. Diseases caused by viruses. J. B. Jones, eds.) Compendium of Tomato Diseases, APS Pres, Minnesota, USA. pp. 31-42.