



MAKÜ FEBED
ISSN Online: 1309-2243
<http://dergipark.ulakbim.gov.tr/makufebed>

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 8(1): 34-39 (2017)
The Journal of Graduate School of Natural and Applied Sciences of Mehmet Akif Ersoy University 8(1):34-39 (2017)

Araştırma Makalesi / Research Paper

Isparta ve Burdur İlleri Üretim Alanlarında Yetiştirilen Domateslerde Domates Lekeli Solgunluk Virüsü'nün Tanılanması

Handan ÇULAL KILIÇ^{1*}, Levent ISPARTA¹, Nejla YARDIMCI¹, Kader DOĞAN¹

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Isparta

Geliş Tarihi (Received): 01.11.2016, Kabul Tarihi (Accepted): 02.03.2017

✉ Sorumlu Yazar (Corresponding author)*: handankilic@sdu.edu.tr

☎ +90 246 2114861 📠 +90 246 2114885

ÖZ

Isparta ve Burdur illeri domates üretim alanlarında 2014 yılında sörvey çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu sörveyler sırasında domates üretim alanlarından 78 yaprak örneği toplanmış ve bu örnekler ticari poliklonal antiserumlar kullanılarak DAS-ELISA yöntemi ile Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (*Tomato Spotted Wilt Virus*, TSWV) için test edilmiştir. DAS-ELISA testi sonucunda örneklerin hepsi TSWV bakımından negatif bulunmuştur. Daha sonra bu örneklerden RT-PCR (Test Transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi kullanılarak TSWV'e ait RdRp genleri çoğaltılarak 78 örnekten 15 tanesinin enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma TSWV'nün teşhisinde RT-PCR yönteminin DAS-ELISA yönteminden daha hassas olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Domates, *Domates lekeli solgunluk virüsü*, RT-PCR

Diagnosis of *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) in Tomatoes Grown Areas in Isparta and Burdur Provinces, Turkey

ABSTRACT

Surveys were carried out in tomato growing areas in Isparta and Burdur provinces in 2014. A total of 78 leaf samples were collected from tomato fields in Isparta and Burdur provinces and tested for the presence of Tomato spotted wilt virus by DAS-ELISA using a commercial polyclonal antibody. As a result of DAS-ELISA, all samples were found to be negative for TSWV. Then these samples were tested for presence TSWV by RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) method amplifying the RdRp genes and it was determined that 15 of 78 samples were infected with TSWV. The results that RT-PCR method was found to be more sensitive than DAS-ELISA for identification of TSWV.

Keywords: Tomato, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), RT-PCR.

GİRİŞ

Dünya nüfusu arttıkça, gıda maddelerine olan gereksinim de artmaktadır. Sebze tarımı kültür bitkileri arasında çok önemli bir yere sahiptir. İnsanların vazgeçilmez bitkisel besinleri olan sebzeler çok önemli vitaminleri, çeşitli mineral ve antioksidant maddeleri içermektedir.

Bu türlerin başında domates gelmektedir. Domates, tüm dünyada ve ülkemizde taze olarak tüketilebildiği gibi; salça, sos, ketçap olarak da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Sönmez ve Ellialtıoğlu, 2014). Domates, *Solanaceae* familyasının *Lycopersicon* cinsi içinde yer alır ve içinde bulunduğumuz iklim kuşağında mey-

veleri yenen tek yıllık bir kültür bitkisi olarak tanımlanabilir.

Çok sayıda tür içeren bu cins içerisinde bulunan *Lycopersicon esculentum* Mill. kültür domatesi olarak yetiştirilmektedir. Domatesin anavatanı Orta ve Güney Amerika olup, kültür bitkisi olarak kullanımı Peru kıyılarında başlamıştır (Günay, 1992). Ancak 2005 yılında Peralta ve ark. (2005)'nin Kuzey Peru bölgesinde yaptığı bir araştırmada *Solanacea* familyasına ait bazı yeni yabancı domates türlerinin de bulunmasıyla yapılan farklı sınıflandırmada domates *Solanum lycopersicum* olarak isimlendirilmiş ve diğer türler de farklı isimler almışlardır. Domates, anavatanı olan Peru, Bolivya ve Ekvator'dan 16. yüzyılda Avrupa'ya getirilmiştir. Daha sonra Anadolu'ya getirilen domates, yaygın olarak yetiştirilmekte ve tüketilmekte olan bir sebze durumuna gelmiştir (Yazgan ve Fidan, 1996).

Dünyada toplam 4, 3 milyon hektar alanda domates üretimi yapılmaktadır. Türkiye, domates üretiminin % 7,02'sini üreterek dünya domates üretiminde Çin (% 30,90), Hindistan (% 10,82) ve ABD (% 8,16)'nden sonra dördüncü sırada yer almaktadır (Anonim, 2014). Ülkemizde 2015 yılı TUIK verilerine göre 1.257.000 dekar alanda 8.170.000 ton domates üretimi yapılmaktadır.

Isparta ilinde 2015 yılı TÜİK verilerine göre 12047 dekar alanda sofralık domates yetiştirilmekte ve 52.192 ton domates üretimi yapılmaktadır. Aynı yıl itibari ile 3593 dekar alanda 13.984 salçalık domates üretimi gerçekleştirilmiştir. Burdur ilinde ise; 13681 dekar alanda 101.687 ton sofralık, 1107 dekar alanda 3475 ton salçalık domates üretilmektedir (Anonim, 2015).

Domates üretiminin yapıldığı alanlarda fide döneminden hasata kadar geçen dönemde çok sayıda fungal, bakteriyel ve viral hastalıklar çok ciddi kayıplara neden olmaktadır. Domates üretim alanlarında görülen en önemli viral hastalıklar ise; *Cucumber mosaic virus* (Hıyar mozayik virüsü); *Tomato mosaic virus* (Domates mozayik virüsü); *Potato Y Virus* (Patates Y Virüsü); *Potato X Virus* (Patates X Virüsü); *Tomato yellow leaf curl virus* (Domates sarı yaprak kıvrıcılık virüsü); *Tomato ring spot virus* (Domates halkalı leke virüsü) ve *Tomato spotted wilt virus* (Domates lekeli solgunluk virüsü)'dür (Valizadeh ve ark., 2011). Domates üretim alanlarında görülen en önemli ve tahripkar olan virüslerden biri *Tomato spotted wilt virus* 'dür. Yüz familyaya ait 1090 bitki türünü enfekte etmekte ve ekonomik anlamda ciddi kayıplara neden olmaktadır (Hanssen ve ark., 2010; Salem ve ark., 2012).

Domates lekeli solgunluk virüsünün yaptığı enfeksiyonlar sonucunda bitkisel ürünlerde % 42- % 100 arasında

kayıpların ortaya çıktığı bildirilmektedir (Rosello ve ark., 1996).

Domates lekeli solgunluk virüsü ilk olarak 1915 yılında Avusturalya'da ülkemizde ise; 1969'da Mersin'de tespit edilmiştir (Cho ve ark., 1986; Tekinel ve ark., 1969). Bu virüs *Bunyaviridae* familyasının *Tospovirus* cinsine aittir.

Yaklaşık 80-110 nm çapında küresel partiküllere sahip olan TSWV partikülü %5 nükleik asit (RNA), %70 protein, %20 lipid ve %5 karbonhidrat içermektedir (Adkins, 2000).

Virüs mekaniksel olarak ve 9 thrips türü ile taşınmaktadır. Bu türler arasında, soğan thripsi (*Thrips tabaci* Lindeman) ve batı çiçek thripsi (*Frankliniella occidentalis* Pergande) en önemlileri ve en yaygın olanlarıdır (Mau ve Martin, 2002).

Ülkemizin farklı bölgelerinde TSWV'nin varlığı ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Fidan, 1993; Azeri, 1994; Fidan, 1995; Güldür ve ark., 1995; Yılmaz ve ark., 1995; Güldür, 1997; Arlı-Sökmen ve Sevik, 2006; Turhan ve Korkmaz, 2006; Şevik ve Arlı-Sökmen, 2007; Özdemir ve ark., 2009; Yardımcı ve Çulal-Kılıç, 2009).

Isparta ilinde 2008-2009 yılları arasında domates üretim alınan yaprak örneklerinde DAS-ELISA yöntemi kullanılarak yapılan virüs tanılama çalışmaları sonucunda, TSWV'nün varlığı rapor edilmiştir (Yardımcı ve Çulal-Kılıç, 2009).

Bu araştırma ile Isparta ve Burdur ili domates üretim alanlarında sorun olan TSWV'nün tanılama çalışmaları kapsamında, DAS-ELISA yöntemiyle incelemeler yapılan ancak virüs belirlenmeyen domates örneklerinde hassas ve duyarlı bir yöntem olan RT-PCR yöntemi ile virüsün tanınması gerçekleştirilmiştir. Çalışma, Burdur ili domateslerinde TSWV'nün tanınması bakımından ilk olma özelliği taşımaktadır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Yapılan çalışmanın ana materyalini; DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yönteminde negatif çıkan toplam 78 domates yaprak örneği (Isparta'dan 44 örnek + Burdur'dan 34 örnek) oluşturmuştur. Örnekler 2014 yılı Haziran-Eylül aylarında domates üretim alanlarından alınmıştır.

Örnekleme yaprak deformasyonu, yapraklarda kıvrıklaşma, damarlarda çekilme, yaprak renginde açılmalar, yaprakta nekroz oluşumları, mozaik belirtisi, bitkide bodurluk semptomu gösteren bitkilerden yapılmıştır. Alınan örnekler polietilen torbalar içinde etiketlenerek

buz kutusu içerisinde laboratuvara getirilmiş ve gerekli testler yapılınca kadar derin dondurucuda (-20°C) muhafaza edilmiştir.

Total RNA izolasyonu:

Bitkiden toplam RNA'lar RNA Ekstraksiyon kiti (Takara) protokolüne göre izole edilmiştir.

Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction: RT-PCR):

RT-PCR çalışmalarında TSWV'ne spesifik primer çiftleri ile RdRp geninin yaklaşık 276 bp'lik bir kısmı çoğaltılmıştır.

Bu primer çifti;

F-5-AATTGCCTTGCAACCAATTC-3;
R-5-ATCAGTCGAAATGGTTCGGCA-3 (Mumford et al., 1996; Shoushtari et al., 2013; Perez et al., 2014)' a göre sentezletirilmiştir.

RT-PCR çalışmaları tek aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. (Primescript One step RT-PCR kit ;Takara Bio Inc)

Tek bir reaksiyon karışımında;

1µl RNA

1'er µl virüs spesifik primer çifti (her biri 20µM),

25 µl 2x1 step buffer (Reaksiyon buffer, dNTP mix)

2 µl 1x step enzim mix (Reverstranscriptase, Taq Polimeraz, Rnase inhibitör) ile hazırlanmıştır.

Amplifikasyon için PCR cihazı (Techne-TC-5000);

50 °C'de 30 dakika
94 °C'de 2 dakika

94 °C'de 30 saniye
54 °C'de 30 saniye
72 °C'de 30 saniye

72 °C'de 1 dakika
4 °C'de ∞ olacak şekilde programlanmıştır.

RT-PCR ürünleri, reaksiyondan sonra %1 agaroz jelde ve TBE tampon solüsyonunda 100 V'da 1 saat elektroforetik ayırma tabi tutulmuştur. Daha sonra fotoğrafları

çekilmiştir. Markır olarak 100 bp DNA ladder kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak; laboratuvarında daha önceki çalışmalarda DAS-ELISA'da pozitif çıkan domates yaprak örnekleri kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise; sağlıklı domates bitkisi yaprakları kullanılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Sürveyler sırasında bitkilerde yaygın olarak yaprak deformasyonu, yapraklarda kıvrırcıklaşma, damarlarda çekilme, yaprak renginde açılmalar, yaprakta nekroz oluşumları, mozayik belirtisi, bitkide bodurluk şeklinde belirtileri görülmüştür (Şekil 1, 2).



Şekil 1. Yapraklarda şiddetli nekroz görüntüsü



Şekil 2. Meyvelerde deformasyon ve halkalı lekeler

Yapılan moleküler çalışmada; 78 örnekten 15 adedinin TSWV ile enfekteli olduğu ortaya konulmuştur. Ülkemizin farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda da bitkilerde TSWV enfeksiyonu belirlenmiştir (Şevik, 2007; Küçük ve Kameroğlu, 2008; Kaya ve ark., 2009; Yardımcı ve Çulal-Kılıç, 2009).

RT-PCR çalışmalarında Isparta merkezden alınan 10 örnek, Eğirdir'den alınan 2 ve Burdur-Söğüt'ten alınan 3 örnekten (Toplam 15 örnek) 276 bp büyüklüğünde bant elde edilmiştir (Tablo 1, Şekil 3).

Tablo 1. Örnek alınan yer, alınan örnek sayısı, RT-PCR sonucunda TSWV ile enfekteli örnek sayısı

| ÖRNEK ALINAN YER | ALINAN ÖRNEK SAYISI | TSWV ile ENFEKTELİ ÖRNEK SAYISI |
|------------------|---------------------|---------------------------------|
| Isparta Merkez | 15 | 10 |
| Atabey | 12 | 0 |
| Eğirdir | 17 | 2 |
| Burdur - Söğüt | 34 | 3 |
| Toplam | 78 | 15 |

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar önceden literatürde yer alan ve bu konuda çalışan araştırmacıların (Mumford ve ark., 1996; Shoushtari ve ark., 2013; Perez ve ark., 2014) TSWV için tasarladıkları primer çiftleri kullanılarak yaptıkları çalışmalar ile uygunluk göstermiştir. Aynı araştırmacılar da moleküler çalışmalarda 276 bp büyüklüğünde bant elde etmişlerdir. Negatif kontrolde ise herhangi bir bant gözlenmemiştir.

DAS-ELISA testi sonucunda TSWV bakımından negatif sonuç veren 78 örneğin, moleküler çalışmalar sonucunda 15 adedinin TSWV ile efekte olduğunun ortaya konması PCR yöntemlerinin DAS-ELISA yöntemine göre daha duyarlı olduğunu ve doğru sonuçlar verdiğini göstermiştir.

Çalışma sonuçları TSWV'nün tanınmasında RT-PCR yönteminin başarıyla kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

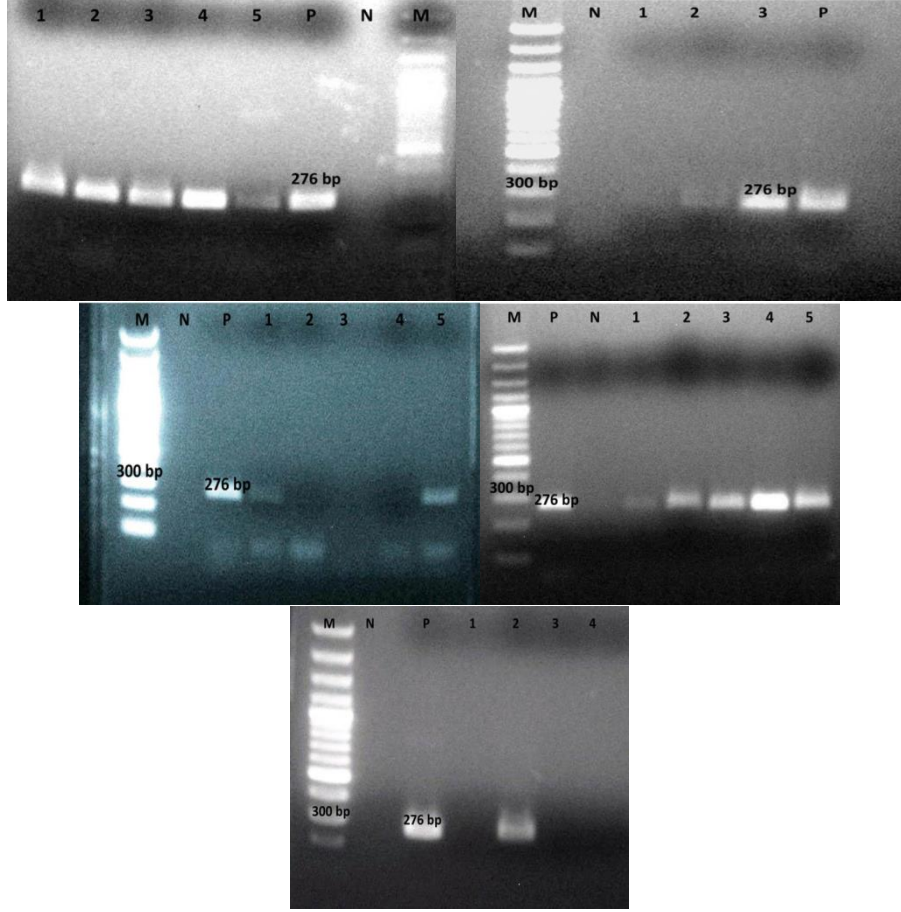
SONUÇLAR

Virüslerin çok sayıda konukçularını ve ırklarının bulunması, taşınma şekillerinin farklı olması ve kimyasal bir mücadele yönteminin bulunmamasından dolayı virüs hastalıkları ile mücadele etmek oldukça zor olmaktadır. Bu sebeple aşağıdaki hususlara mutlaka dikkat edilmelidir.

- Virüsten arı üretim materyali kullanılmalıdır.
- TSWV'nin konukçusu olmayan bitkiler ile münavebe yapılmalıdır.
- Thrips ile doğru ve zamanında mücadele edilmelidir.
- Virüse ve tripslere konukçuluk eden yabancı otlar temizlenmelidir.
- TSWV'ye dayanıklı çeşitler kullanılmalıdır.

TSWV EPPO A2 karantina listesinde, Türkiye Bitki Karantinası Yönetmeliği'nde ise 'Türkiye de sınırlı olarak bulunan ve ithale mani teşkil eden karantinaya tabi zararlı organizmalar' listesinde yer almaktadır.

Bu sebeple karantina analizlerinde örneklerin DAS-ELISA yöntemi yerine, daha hassas inceleme ve tanılama olanağı sunan PCR yöntemleri ile analiz edilmesi daha etkin olabilecektir.



Şekil 3. TSWV için uygulanmış RT- PCR sonuçları (M. Marker (100 bp DNA Ladder,); N. Negatif Kontrol; P. Pozitif Kontrol.

KAYNAKLAR

- Adkins, S. (2000). *Tomato spotted wilt virus* positive steps towards negative success. *Molecular Plant Pathology* 1(3): 151-157.
- Anonim (2014). <http://faostat.fao.org/site/567/Desktop>. (Erişim Tarihi: 20 Mayıs 2014).
- Anonim (2015). *Bitkisel Üretim*. <http://tuikrapor.tuik.gov.tr/reports> (Erişim Tarihi: 12 Nisan 2015).
- Arlı-Sokmen, M., Sevik, M.A. (2006). Viruses infecting field grown tomatoes in Samsun province, Turkey. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 39: 283-288.
- Azeri, T. (1981). Preliminary report of Tomato spotted wilt virus and its epidemy on tobacco in the Çanakkale Region of Turkey. *Journal of Turkish Phytopathology* 10(2-3): 79-87.
- Cho, J.J., Mau, R.F.L., Gonsalves, D., Mitchell, W.C. (1986). Reservoir weed hosts of Tomato spotted wilt virus. *Plant Disease* 70: 1014-1017.
- Fidan, Ü. (1993). Recent records on virus diseases of vegetables in greenhouses. *Journal of Turkish Phytopathology* 22(1): 45-45.
- Fidan, Ü. (1995). Virus disease of vegetables in Greenhouses in İzmir and Muğla. *Journal of Turkish Phytopathology* 24(1): 7-14.
- Güldür, M.E., Marchoux, G., Yurtmen, M., Yılmaz, M.A. (1995). Mersin ve çevresinde yetiştirilen domateslerde zararlı yeni bir virüs: *Tomato spotted wilt virus*. Türkiye VII. Fitopatoloji Kongresi, Eylül 26-29, 1995, Adana, Türkiye, Kongre Kitabı, 303-305.
- Güldür, M.E. (1997). Şanlıurfa ili için yeni bir virüs: Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV). *Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi* 1(3): 71-76.
- Günay, A. (1992). Özel Sebze Yetistiriciliği. Cilt II. A.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Yayınları, Ankara.
- Hanssen, I.M., Lapidot, M., Thomma, B.P. (2010). Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular Plant Microbe Interaction* 23: 539-548.
- Kaya, A., Özdemir, S., Yasarakinci, N., Gümüş, M., Erkan, S. (2009). The Detection of virus diseases in the protected tomato production areas around Muğla Province. *ISHS Acta Horticulturae* 808: II International Symposium on Tomato Diseases, Oct 8-12, 2007, Kuşadası, Muğla, Turkey, Book of Proceedings, 31p.
- Küçük, B., Kamberoğlu, M.A. (2008). Adana ve Mersin illerinde Domates lekeli solgunluk virüsü (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)' nun saptanması ve bazı TSWV izolatlarının biyolojik karakterizasyonu. *Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi* 23(4): 17-24.

- Mau, R.F.L., Martin, J.L. (2002). Frankliniella occidentalis Pergande).www.extentohawaii.edu/kbase/crop/type/f-occid.html.
- Mumford, R.A., Barker, I., Wood, K.R. (1996). An improved method for the detection of Tospoviruses using polymerase chain reaction. Journal of Virological methods 57: 109- 115.
- Özdemir, S., Erilmez, S., Kaçan, K. (2009). Detection of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) on tomato crops and some weeds in Denizli province of Turkey. ISHS Acta Horticulturae 808: II International Symposium on Tomato Diseases, Oct 8-12, 2007, Kuşadası, Muğla, Turkey, Book of Proceedings, 171-174p.
- Peralta, I. E., Knaap, S., Spooner, D. M. (2005). New Species of wild Tomatoes (Solanum Section Lycopersicon: Solanaceae) from Northern Peru. Systematic Botany 30 (2): 424-434.
- Perez, Y.V., Mejias, A., Rodriguez-Roman, E., Avilan, D., Zambrano, K.A., Gomez, J.C., Olachea, J.E., Marys, E.E. (2014). Identification of Tomato spotted wilt virus associated with fruit damage during a recent virus outbreak in pepper in Venezuela. Plant disease. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-11-14-1202-PDN>.
- Rosello, S., Diez, M.J., Nuez, F. (1996). Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. I. The *Tomato spotted wilt virus* -a review. Scientia Horticulturae 67: 117-150.
- Salem, N.M., Mansour, A., Badwan, H. (2012). Identification and partial characterization of *Tomato Spotted Wilt Virus* on Lettuce in Jordan. Journal of Plant Pathology 94(2): 431-435.
- Shoushtari, S., Jafarpour, B., Falahaty Rastegar, M. (2013). Serological and Molecular Detection of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in Khorasan Razavi Province. Journal of Plant Protection, 26(4): 43.
- Sönmez, K., Ellialtıoğlu Ş.Ş. (2014). Domates, karotenoidler ve bunları etkileyen faktörler üzerine bir inceleme. Derim 31(2): 107-130.
- Şevik, M.A. (2007). Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV) nun Samsun İlinde Domates Üretim Alanlarındaki Yayılış Durumunun ve Bazı Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi, Samsun, 109s.
- Şevik, M.A., Arlı-Sökmen, M. (2007). Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV) nün trips türleri (Thrips tabaci Lindeman ve Frankliniella intonsa Tryborn) ile yayılış durumunun incelenmesi. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi, Ağustos 27-29, 2007, Isparta, Türkiye, Kongre Kitabı, 115s,
- Tekinel, N., Dolar, M.S., Sağsöz, S., Salcan, Y. (1969). Mersin Bölgesinde ekonomik bakımdan önemli bazı sebzelerin virüsleri üzerinde araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni 9(1): 37-49.
- Turhan, P., Korkmaz, S. (2006). Çanakkale ilinde Domates lekeli solgunluk virüsü' nün serolojik ve biyolojik yöntemlerle saptanması. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi 12(2): 130-136.
- Valizadeh, M., Valizadeh, J., Jafar, M. (2011). Identification, distribution and incidence of important tomato and cucurbits viruses in Southeast of Iran. American Journal of Plant Physiology 6(5): 242-251.
- Yazgan, A., Fidan, S. (1996). Tokat koşullarına uygun Kiraz domates (*Lycopersicon esculentum* Mill. var. cerasiforme) çeşitlerinin belirlenmesi. GAP 1. Sebze Tarımı Sempozyumu, Mayıs 7-10, 1996, Şanlıurfa, Türkiye, Kongre Kitabı, 19-23s.
- Yılmaz, M.A., Balođlu S., Özaslan, M., Güldür, M.E. (1995). GAP bölgesinde kültür bitkilerinde belirlenen virüsler. GAP Bölgesi Bitki Koruma Sorunları ve Çözüm Önerileri Sempozyumu, Nisan 27-29, 1995, Şanlıurfa, Türkiye, Kongre Kitabı, 241-250.