

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**ANTALYA İLİNDE DOĞAL KONUKÇULARI ÜZERİNDEN DAYANIKLILIĞI
KIRAN TOMATO SPOTTED WILT VIRUS (TSWV-RB) İZOLATLARININ
BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Ailar GONBADİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİTKİ KORUMA
ANABİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

HAZİRAN 2022

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**ANTALYA İLİNDE DOĞAL KONUKÇULARI ÜZERİNDEN DAYANIKLILIĞI
KIRAN TOMATO SPOTTED WILT VIRUS (TSWV-RB) İZOLATLARININ
BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Ailar GONBADİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

HAZİRAN 2022

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTALYA İLİNDE DOĞAL KONUKÇULARI ÜZERİNDEN DAYANIKLILIĞI
KIRAN TOMATO SPOTTED WILT VIRUS (TSWV-RB) İZOLATLARININ
BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Ailar GONBADİ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez T.C. Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından FDK-2020-5290 nolu proje ile desteklenmiştir.

HAZİRAN 2022

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTALYA İLİNDE DOĞAL KONUKÇULARI ÜZERİNDEN DAYANIKLILIĞI
KIRAN TOMATO SPOTTED WILT VIRUS (TSWV-RB) İZOLATLARININ
BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Ailar GONBADİ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 24/06/2022 tarihinde jüri tarafından oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Hakan FİDAN (Danışman)

Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU

Prof. Dr. Bayram ÇEVİK

Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Dr. Öğr. Üyesi Yasin Emre KİTİŞ

ÖZET

ANTALYA İLİNDE DOĞAL KONUKÇULARI ÜZERİNDEN DAYANIKLILIĞI KIRAN TOMATO SPOTTED WILT VIRUS (TSWV-RB) İZOLATLARININ BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Ailar GONBADİ

Doktora Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hakan FİDAN

Haziran 2022; 68 sayfa

Tez çalışması Antalya ilinde sahil (Serik) ve yayla bölgesi (Elmalı) olmak üzere bir biber ve bir domates serasında yürütülmüştür. Sörvey alanlarında kültür bitkileri ve yabancı otlardan örneklemeler yapılmış ve *Tomato spotted wilt virus* (TSWV, Domates Lekeli Solgunluk Virüsü)'nün biyolojik, serolojik (DAS-ELISA testi) ve moleküler testler (RT-PCR, qRT-PCR) ile varlığı, yaygınlığı ve ırkları araştırılarak dayanıklılığı kıran izolat için tarama yapılmıştır. Toplamda 270 adet yabancı ot ve 112 adet farklı bitki türü (domates, biber, patlıcan, marul, fasulye, mısır, bamya, pazı, maydanoz) test edilmiştir. Serolojik çalışmalar sonucunda virüs ile enfekteli bulunan bazı yabancı otların yapraklarında mozaik, klorotik lekeler, sararma, şekil bozukluğu, bodurluk ve tripslerin beslenme izleri gibi çeşitli belirtiler gözlemlenirken, bazı enfekteli yabancı otlarda herhangi bir belirtiye rastlanılmamıştır. Testlenen 39 yabancı ot türünden 19 tanesi hastalıkla bulaşık bulunmuştur, bu türler arasında en yüksek bulaşıklılık oranı Asteraceae familyasında ve *Sonchus asper* (L.) türünde saptanmış ve sırasıyla Poaceae ve Solanaceae familyaları takip etmiştir. Çalışma esnasında tasarlanan ve virüsün medium segmentindeki nokta mutasyonu saptayabilen özel primer çifti ve domateste dayanıklılığı kırmayan izolat (TSWV-NRB) kullanılarak yapılan qRT-PCR ve melt-curve analizi sonucunda enfekteli yabancı otlarda virüsün ırkı belirlenmiştir. İzolatların karşılaştırılması sonucunda iki farklı Tm değeri saptanmış olup bu bulgular sekans verileri ile teyit edildikten sonra kullanılan kit, protokol ve primerlerin Sw-5 dayanıklılığını kıran izolatların belirlenmesinde sekans hizmetine gerek duymaksızın hızlı ve güvenilir bir tanı kiti oluşturduğunu ortaya koymuştur.

ANAHTAR KELİMELER: Dayanıklılığı kıran izolat, TSWV, Tanı kiti, qRT- PCR, Yabancı ot

JÜRİ: Doç. Dr. Hakan FİDAN

Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU

Prof. Dr. Bayram ÇEVİK

Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Dr. Öğr. Üyesi Yasin Emre KİTİŞ

ABSTRACT

IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF TOMATO SPOTTED WILT VIRUS (TSWV-RB) RESISTANCE BREAKING ISOLATES THROUGH NATURAL HOSTS IN ANTALYA PROVINCE

Ailar GONBADI

PhD Thesis in Plant Pathology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr Hakan FIDAN

June 2022; 68 pages

The study was carried out in a pepper and tomato greenhouse in Antalya, in the coastal (Serik) and highland region (Elmalı). Cultivated plants and weeds were sampled in the survey areas and the presence, prevalence and races of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) were investigated by biological, serological (DAS-ELISA test) and molecular tests (RT-PCR, qRT-PCR) and a screening was performed for the isolate that broke resistance. A total of 270 weeds and 112 different plant species (tomato, pepper, eggplant, lettuce, bean, corn, okra, chard, parsley) were tested. As a result of serological studies, various symptoms such as mosaic, chlorotic spots, yellowing, deformity, stunting and feeding traces of thrips were observed on the leaves of some weeds infected with the virus, while no symptoms were observed in some infected weeds. Of the 39 weed species tested, 19 were infected with the disease. The highest rate of infestation was found in the Asteraceae family and *Sonchus asper* (L.) species, followed by the Poaceae and Solanaceae families, respectively. The strain of the virus in the infected weeds was determined as a result of qRT-PCR and melt-curve analysis using a special primer pair designed during the study and the isolate that does not break resistance in tomato (TSWV-NRB). As a result of the comparison of the isolates, two different T_m values were determined, and these findings were confirmed by the sequence data, revealing that the kit, protocol and primers used constitute a fast and reliable diagnostic kit without the need for sequencing service in identifying the isolates that break the Sw-5 resistance.

KEYWORDS: Diagnostic kit, Isolate breaking resistance, TSWV, qRT-PCR, Weed

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr Hakan FIDAN

Prof. Dr. Saadettin BALOGLU

Prof. Dr. Bayram CEVIK

Assoc. Prof. Dr. Ozer CALIS

Asst. Prof. Dr. Yasin Emre KITIS

ÖNSÖZ

Tez çalışması kapsamında, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV, Domates Lekeli Solgunluk Virüsü)'ne inokulum kaynağı olabilecek potansiyelde olan doğal konukçular araştırılmış ve hastalığın döngüsü belirlenerek TSWV salgınları hakkında etkili ve sürdürülebilir kapsamlı bir anlayış geliştirilmiştir. Birçok virüste olduğu gibi, TSWV'nin enfeksiyon bölgesindeki varlığı ve yayılışı, ürün ve coğrafik konuma göre değişkenlik gösterebilmektedir. Bu nedenle, domates ve biber yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Antalya ilinde TSWV'nin yayılmasına neden olan ve çoğu zaman göz ardı edilen faktörler incelemeye alınmıştır. Elde edilen bulgular ülkemizde gerek kültür bitkilerinde gerekse yabancı otlarda TSWV izolatlarının belirlenmesi ve Sw-5 dayanıklılığını kıran izolatların tespit edilmesinde kullanılabilir.

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Moleküler Viroloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasının planlanması ve yürütülmesinde ilgi ve desteğini esirgemeyen,engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren danışman hocam Doç. Dr. Hakan FİDAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez jürime katılarak görüş ve tecrübeleri ile tezime destek olan Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Yasin Emre KİTİŞ, Doç. Dr. Özer ÇALIŞ ve Prof. Dr. Bayram ÇEVİK hocalarıma sonsuz şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmada projeyi destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu'na, çalışma imkânları sunan Akdeniz Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Başkanlığına ve doktora eğitim sürecimde bana ücretsiz öğrenim fırsatı sağlayan, geçim masraflarımı karşılarken, barınma imkanı ve sağlık sigortası gibi giderlerime de destek olan Yurtdışı Türkler ve Akraba Toplulukları Başkanlığına minnet ve şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim. Uluslararası öğrencilerin yaşamları boyunca elde ettikleri başarılarla katkıda bulunan Türkiye Bursları programı kapsamında eğitime devam ederek mezuniyet aşamasına gelmekten büyük onur ve gurur duymaktayım.

Sörvey çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Elmalı İlçe Tarım ve Orman Müdürü Dilek BOĞATİMUR ve güler yüzlü personeline, arazi çalışmalarında ulaşım desteği sağlayan Murat ÖLÇÜLÜ, Muhammet Ali Çiftçioğlu ve Hacı AÇIKGÖZ'e teşekkür ederim. Ayrıca örneklerin toplanmasında yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Gülşen (ERBERK) KOÇ ve Hasty SAYADY'ye teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen ekip arkadaşlarıma (Çekirgeler) ve her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan değerli annem Alieh GONBADİ, canım babam Abdolvahab GONBADİ ve sevgili aileme yaptıkları tüm fedakârlıklardan dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	9
2.1. Hastalığın Bulunuşu ve Yayılması	9
2.2. TSWV'nin Yayılmasında Yabancı Otlar ve Vektör Tripslerin Rolü	11
2.3. Domateste Sw-5 Geniyle İlgili MAS Çalışmaları	15
2.4. Biberde Tsw Geniyle İlgili MAS Çalışmaları.....	17
3. MATERYAL VE METOT.....	18
3.1. Materyal.....	18
3.1.1. Test bitkileri.....	18
3.1.2. Antiserum	19
3.1.3. ELISA plateleri	19
3.1.4. Moleküler çalışmalarda kullanılan kit ve primerler.....	19
3.2. Metot	20
3.2.1. Sörvey çalışmalarının yapıldığı alanlar	20
3.2.2. Sörvey takvimi.....	21
3.2.3. TSWV'nin kültür bitkileri üzerinde örneklenmesi ve saha tespiti	21
3.2.4. Yabancı ot örneklerinin toplanması.....	22
3.2.5. DAS-ELISA testleri	25
3.2.6. Primerlerin tasarımı.....	26
3.2.7. TSWV'nin örneklerde moleküler olarak belirlenmesi	27
3.2.8. Kantitatif RT-PCR (qRT-PCR) çalışmaları.....	28
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
4.1. Sörvey Çalışmalarında Toplanan Bitki Örnekleri	31
4.2 Sörvey Çalışmalarında Seralarda Enfekteli Bitkilerde Görülen Belirtiler	33

4.3 TSWV'nin Yabancı Ot Konukçuları.....	34
4.4 DAS-ELISA Testlerinin Sonuçları	43
4.5 TSWV'nin Moleküler Yöntemler ile Tespit Edilmesi	45
4.5.1. Yüksek çözünürlüklü erime analizi.....	45
4.5.2. Medium segmentine ait dizilerin filogenetik açıdan incelenmesi.....	48
5. SONUÇLAR.....	52
6. KAYNAKLAR.....	55
7. EKLER.....	62
ÖZGEÇMİŞ	



AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “Antalya İlinde Doğal Konukçuları Üzerinden Dayanıklılığı Kıran Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV-RB) İzolatlarının Belirlenmesi ve Moleküler Karakterizasyonu” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

24.06.2022

Aılar GONBADİ

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	: Santigrat Derece
%	: Yüzde
µg	: Mikrogarm
µl	: Mikrolitre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
3'	: Üç üssü
+4	: Artı dört
5'	: Beş üssü

Kisaltmalar

A	: Adenin
AÜ	: Akdeniz Üniversitesi
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
bp	: Base pair - Baz çifti
C	: Sitozin
Cys	: Sistein
CAPS	: Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
DAS-ELISA	: Double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay
ddH ₂ O	: Çift distil su

dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoxyribonucleotide triphosphate
DTBIA	: Direct Tissue Blot Immunoassay - Direkt doku boyama
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
EPPO	: Avrupa ve Akdeniz Bitki Sağlığını Koruma Örgütü
F	: Forward
G	: Guanin
GC (G1)	: reseptör görevi yapan glikosilat membran proteini
GN (G2)	: reseptör görevi yapan glikosilat membran proteini
HR	: Hypersensitivity Reactions - Aşırı hassasiyet reaksiyonu
ICTV	: International Committee on Taxonomy of Viruses
Kb	: Kilo baz çifti
M	: Molar
MAS	: Marker Assisted Selection - Markör Destekli Seçim
N	: Nükleokapsid protein geni
NCBI	: National Center of Biotechnology Information
NGS	: Next-generation sequencing -Yeni nesil dizileme
NRB	: None Resistance Breaking- Dayanıklılığı kırmayan izolat
NSm	: Non-Structural protein – Yapısal olmayan protein
ORF	: Open Reading Frame - Açık Okuma Çerçevesi
PCR	: Polymerase Chain Reaction
pH	: Power of hydrogen
qRT-PCR	: Quantitative Reverse Transcription PCR
R	: Reverse

RAPD	: Rastgele oğaltılmış Polimofik DNA
RB	: Resistance Breaking - Dayanıklılığı Kıran İzolat
RdRp	: RNA-dependent RNA polymerase
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Rounds per minute - Devir/dakika
RT-PCR	: Reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu
SCAR	: Sequence Characterized Amplified Region
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SNP	: Single Nucleotide Polymorphisms - Tek Nükleotit Polimorfizmi
Sp.	: Species - Tür
ss	: Tek iplikçikli
Sw-5	: Domateste 9. kromozomda bulunan dayanıklılık geni
T	: Timin
TAE	: (Tris-Asetat-EDTA) Elektroforez buffer
Taq	: Termo stabil polimeraz enzimi
TM	: Melting Temperature - Erime sıcaklığı
TMV	: Tobacco Mosaic Virus -Tütün Mozaik Virüsü
ToMV	: Tomato Mosaic Virus -Domates Mozaik Virüsü
TSWV	: Tomato spotted wilt virüs - Domates Lekeli Solgunluk Virüsü
Tsw	: Biberde TSWV'ye karşı dayanıklılık sağlayan gen
UV	: Ultra Viole
V	: Volt
vd	: ve dięerleri
Y	: Tyr – Triozin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bir TSWV virionunun şematik gösterimi. Konukçu kökenli (mavi) çift katmanlı bir zar, monomerik ve dimerik konfigürasyonlarda yüzeyden çıkıntı yapan viral kodlu proteinler GN ve GC (yeşil) ile gösterilmiştir.....	4
Şekil 1.2. Tospovirüslerin tripsler ile biyolojik döneme göre taşınma periyodu.....	5
Şekil 3.1. Bitki örneklerinin kodlanması ve hazırlanması.....	18
Şekil 3.2. ELISA da kullanılan tanılama kiti.....	19
Şekil 3.3. Antalya ilinde örnekleme yapılan ilçeler.....	20
Şekil 3.4. Domateslerde TSWV için verilen ve sörvey çalışmalarında aranan karakteristik belirtiler.....	22
Şekil 3.5. Biberlerde TSWV için verilen ve sörvey çalışmalarında aranan karakteristik belirtiler.....	22
Şekil 3.6. Seraların içinden ve dışından yabancı otların toplanması.....	23
Şekil 3.7. Tek yıllık, çok yıllık, yazlık ve kışlık yabancı otların toplanması	24
Şekil 3.8. Seraların etrafında yetişen diğer bitkiler ve yakınlarında bulunan yabancı otların toplanması çalışmaları.....	25
Şekil 3.9. ELISA aşamalarını özetleyen şema	26
Şekil 3.10. NCBI dan seçilen dayanıklılığı kıran ve kırmayan izolatlara ait sekans bilgileri.	27
Şekil 3.11. NEB Luna Universal Tek Adımlı RT-qPCR Kiti, örneklerin hazırlanması ve cihaza yerleştirilmesi	28
Şekil 3.12. Melt-Curve aşamasında testlenen örneklerle ait pik görünümü ve sıcaklık değerleri.....	30
Şekil 4.1. Sörvey alanlarında kültür bitkileri üzerinde gözlemlenen TSWV belirtileri.....	34
Şekil 4.2. Biber seralarında gözlenen TSWV belirtileri ve bitkilerin genel görünümü (Serik-Çakallık, Ocak 2021).....	34
Şekil 4.3. TSWV ile bulaşık olduğu saptanan yabancı otlardan bazıları	36
Şekil 4.4. Yabancı otlar üzerinde gözlemlenen bazı belirtiler; A, B: yapraklarda hafif sararma ve mozaik görünümü, C: tripslerin beslenme zararı, D: yaprak kenarında sararma, E: yapraklarda gevreklik ve beneklenme, F: meşe yaprağı deseni.....	37

Şekil 4.5. TSWV'nin doğal yabancı ot konukçularındaki yaşam döngülerinin şematik diyagramı. Üç farklı daire, çalışmada tanıtılan yabancı otların üç farklı yaşam döngüsünü göstermektedir.....	39
Şekil 4.6. TSWV'nin enfeksiyon döngüsü.....	40
Şekil 4.7. Seranın iç kenarında süs bitkisi olarak dikilen Kadife çiçeği.....	42
Şekil 4.8. Primer3 programında mutasyon bölgesine özgü tasarlanan primerler.....	46
Şekil 4.9. Melt-curve aşamasında iki izolatın iki farklı sıcaklık değerinde oluşturduğu pik görünümü. Dayanıklılığı kırmayan eski izolat 82.0°C Tm değerinde pik oluştururken (A) , dayanıklılığı kıran yeni izolat 81.4°C'de pik vermiştir (B) , iki izolatın karşılaştırılması (C)	47
Şekil 4.10. Sörvey alanlarından toplanan izolatlar da C118 noktasında tespit edilen mutasyon.....	49
Şekil 4.11. TSWV'nin medium segmentinde NSm proteini üzerinde C118Y noktasındaki mutasyon.....	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Tospovirüsler için bazı indikatör konukçular	6
Çizelge 3.1. RT-PCR çalışmasında kullanılan kitin içerikleri	20
Çizelge 3.2. RT-PCR çalışmalarında kullanılan primerlere ait bilgiler	20
Çizelge 3.3. Toplanan bitki materyallerine ait bilgiler.....	23
Çizelge 3.4. RT-PCR çalışmalarında kullanılan protokol	27
Çizelge 3.5. qRT-PCR çalışmasında kullanılan kitin içerikleri.....	29
Çizelge.3.6. qRT-PCR çalışmasında kullanılan protokol	29
Çizelge 4.1. TSWV enfeksiyonu açısından testlenen yabancı otlar.....	31
Çizelge 4.2. Toplanan yabancı otların iki farklı lokasyona göre sıralanması	32
Çizelge 4.3. Tür teşhisi yapılan yabancı otlara ait bilgiler	33
Çizelge 4.4. DAS-ELISA sonucuna göre bitkilerin TSWV ile bulaşıklık durumları	43
Çizelge 4.5. . DAS-ELISA sonuçlarına göre biber ve domates dışındaki bitkilerden toplanan yaprak örneklerinin TSWV ile bulaşıklık durumları ve hastalık yüzdeleri	44
Çizelge 4.6. DAS-ELISA sonuçlarının 405 nm absorbans okuma değerleri	45
Çizelge 4.7. qRT-PCR Öncesi testlenen örneklerin aynı oranda seyreltilmesi için yapılan hesaplamalar.....	46

1. GİRİŞ

Bitkiler, birçok hastalığa neden olan biyotik etmenler tarafından enfeksiyonlara karşı duyarlıdırlar ve sonuçta kalite, verim ve yaşam sürelerinde önemli azalmalara maruz kalabilmektedirler. Kayıplar, tüm bitkilerde ve özellikle de gelişmekte olan ülkelerde şiddetli olarak ortaya çıkmaktadır. Küresel açıdan bakıldığında, tarımsal üretimde bitki hastalıkları yıllık milyarlarca dolar değerinde kayıplara neden olmaktadır (Agrios 2005). Günümüze kadar hastalık salgınları nedeniyle önemli bazı kıtlıklar yaşanmıştır. Örneğin, yaklaşık iki milyon insanı öldüren ve çok daha fazlasının Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'ye göç etmesine neden olan 1840' lardaki İrlanda kıtlığı, patateslerde (*Solanum tuberosum*) mildiyö hastalığının (*Phytophthora infestans*) bunların arasında en önemlilerinden biri olduğu bilinmektedir (Vidhyasekaran 2007).

Domates ve biber yetiştirilen tüm alanlarda sıkça karşılaşılan Domates lekeli solgunluk virüsü (*Tomato spotted wilt virus*-TSWV), RNA virüsleri arasında en geniş konukçu yelpazesine sahip genel bir patojen olarak dikkate alınmaktadır. Bu virüsün 2020 yılında Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV)'nin yaptığı son güncellemelere göre Bunyaviridae familyasından alınıp, Bunyavirales takımındaki *Tospoviridae* familyasının *Orthotospovirus* cinsinin içerisine yerleştirildiği Herath vd. (2020) tarafından bildirilmiştir.

Sebze ürünleri ekonomik açıdan önemli bitkilerdir ve Türkiye'de Antalya ilinde yaygın olarak yetiştirilmektedir. Antalya'nın subtropikal bir iklime sahip olduğu göz önüne alındığında, şu anda bildirilenden daha fazla tospovirüs türünün bulunma olasılığı yüksektir. Antalya'nın sahil kısmında örtü altı üretimin Haziran ayının sonuna kadar devam etmesi, Temmuz ayı başında ise yaylalarda örtü altı üretiminin başlaması, üretimin hiç durmadan devam etmesini ve seralarda yaz kış ürün bulunmasını sağlamaktadır. Dolayısıyla yaş sebze ve meyve başta olmak üzere çeşitli tarımsal üretimde adından söz ettiren Antalya'da, tarım işçileri yaz kış demeksizin sera ve tarlalarda üretim yapmaya devam etmektedir.

Hastalık etmeni dünyanın birçok tropik ve subtropik bölgesinde kültür bitkilerinin yanı sıra, yabancı otlar ve tek yıllık süs bitkileri dahil 1500'den fazla bitki türünden rapor edilmiştir (Oliver ve Whitfield 2016). TSWV açısından süs bitkileri yetiştiriciliğinin ayrı bir önemi vardır. Virüsün tohumla taşınmasının söz konusu olmadığı ancak özellikle vejetatif olarak çoğaltılan süs bitkilerinin TSWV için en önemli inokulum kaynaklarını oluşturduğu bilinmektedir (Fidan ve Koç 2016). Etmen virüs 15 farklı trips türü ile taşınabilmektedir (Riley vd. 2011). Bu arada enfekteli yabancı otlar veya süs bitkileri etmen virüs için hem ara konukçu hem de inokulum kaynağı olarak bilinmektedir.

Virüs trips vektörlerinde, özellikle *Frankliniella occidentalis* tarafından persistent-propagatif olarak hızlı ve kolayca yayılmakta, konukçu yelpazesinin geniş olması ve domatesten sonra, özellikle biberde benzer ekonomik kayıplara sebep olmasının sıklıkla epidemiler yapmasına neden olduğu Ramchiary vd. (2014) tarafından rapor edilmiştir.

Yabancı otlar TSWV vektörlerinin konukçusu olarak, inokulum kaynağı oluşturmaları nedeniyle kritik öneme sahip oldukları bildirilmektedir (Duffus 1971). Bu arada virüsün izolatlarının değişkenliği, kısa süreli virüs alım periyodu, etmenin vektör bünyesinde çoğalması, yüksek taşınma oranı, tripslerin geniş dağılımı ve birçok insektisite karşı dayanıklılık oluşturmaları nedeniyle mücadelenin zorlaşması ve sonuçta TSWV mücadelesinin daha da zorlaşmasına neden olduğu bazı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Roselló vd. 1998).

Whitfield vd. (2005) TSWV'nin pleomorfik partiküllerinin, büyük (L), orta (M) ve küçük (S) RNA olarak adlandırılan üç tek iplikli RNA segmentinden oluşan üçlü bir genom içerdiğini rapor etmişlerdir. Negatif anlamda L RNA segmentinin tamamlayıcı ipliği, viral RNA'ya bağımlı RNA polimerazı kodladığı, M ve S RNA segmentlerinin her birinin, bir ambisense düzenlemesinde iki proteini kodladığı M RNA'nın zarf membran glikoproteinlerinin öncüsünü ve viral hareket proteinini (NSm) kodladığı ve üç genomik RNA, N proteininin birçok kopyası tarafından ayrı ayrı kapsüllendiği ve GN ve GC'nin entegre olduğu konukçulardan türetilmiş bir lipid zarf ile çevrili olduğu da bildirilmektedir (Van De Wetering vd. 1996; Whitfield vd. 2005).

TSWV tarafından neden olunan belirtiler, konukçuya, etmenin ırkına, enfeksiyon süresine ve çevresel koşullara bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Belirtiler arasında bitki boyunun kısalması, yani bodurlaşma ve solma, yaprak ve meyvelerde halkalı lekeler yanında, klorotik ve nekrotik lekeler, yaprak ve gövdelerde değişik lezyonlar ve deformasyonlar virüsle bulaşık, hastalanmış bitkilerde sıkça görülmektedir. Ancak hafif enfeksiyonlarda domates bitkilerinin genç yapraklarında bronzlaşma (morumsu-kahverengi) ve daha sonra çok sayıda küçük, koyu lekelerin gelişimi görülmektedir.

Yapraklarda bronzlaşma yaprak ayasının, yüzeyinin tamamına kadar yayılabilmekte ve bronzlaşmış alanlar içe doğru kıvrılarak sonuçta dokularda sıklıkla ölümler ortaya çıkmaktadır. Şiddetli gelişen enfeksiyonlarda ise domates bitkilerinde bodurlaşma, meyve ve yaprak saplarında parlak, koyu kahverengi çizgiler ortaya çıkmakta ve büyüyen uç noktalarda geriye doğru ölüm gerçekleşirken bazen de enfekte olmuş bitkilerde şiddetli nekroz belirtilerinin ortaya çıktığı bildirilmektedir (Holguin-Pena ve Rueda-Puente 2007).

Tez çalışması Antalya ilinin iki farklı coğrafik ilçesinde özellikle domates ve biber yetiştiriciliği yapılan seralar ve çevresinde bulunan yabancı ot türleri ve diğer çeşitli kültür bitkilerinde TSWV'nin varlığının serolojik ve moleküler testler ile belirlenmesi ve saptanan virüsün moleküler karakterizasyonunun yapılması amacıyla planlanmış ve yürütülmüştür. Çalışmalara 2019-2021 yılları arasında Ekim-Mayıs ayları arasında yürütülmüş ve yapılan sorveylerde hem belirti gösteren hem de belirti görülmeyen bitkilerden taraflı ve tesadüfi örnekleme yoluyla alınan bitki örneklerinden virüs taraması yapılmıştır. Sonuç olarak sorveylerin yürütüldüğü alanlarda etmen virüs belirlenmiş, ayrıca TSWV'ye konukçuluk eden yaygın yabancı ot türleri de saptanmıştır.

Bu esas amaçların yanında, özellikle bitki verimliliğini arttırmak için etkili hastalık yönetimi stratejileri geliştirmek, Antalya ilinin farklı coğrafik bölgelerinde TSWV'nin yaşam döngüsünü belirlemek ve alternatif doğal konukçuları tespit etmek,

konukçular hakkında bilgi oluşturmak ve bu bitkilerin hastalığın epidemiyolojisindeki önemlerini değerlendirmek, farklı konukçulardan elde edilen TSWV izolatlarını belirlemek, karakterize etmek ve hangi izolatin yaygın olduğunu ortaya koymak, ve ayrıca tüm tarımsal paydaşların yaygın TSWV konukçuları hakkındaki bilgilerini ve farkındalığını yenilemek ve geliştirmek amaçları da yer almıştır.

1.1. Tospovirüslerin Dağılımı

Tospovirüsler Antarktika hariç tüm kıtalarda bulunur. Ilıman bölgelerde, seralarda tospovirüsler yaygındır (Cebolla-Cornejo vd. 2003). Tropikal ve subtropikal bölgeler Asya ve Güney Amerika sırasıyla 20 ve 11 rapor edilen türe sahip en büyük tospoviral çeşitliliğe sahiptir. Küresel çiçekçilik endüstrisi, tospovirüslerin yayılımına büyük katkı sağlamıştır. TSWV ve INSV, geniş konukçu yelpazesiyle (Sether ve DeAngelis, 1992), uluslararası giriş limanlarında tespit edilmiştir. Bazıları bu tospovirüsleri bulaştıran trips türlerinin de uluslararası ticarete hareket eden süs bitkileri üzerinde taşındığı tespit edilmiştir. Kesme çiçek ticareti, tospovirüslerin ve vektörlerinin yayılmasında büyük ölçüde rol oynamıştır (Coutts vd. 2005). Ayrıca, daha düşük işçilik maliyetleri, daha iyi ulaşım ve Kuzey Amerika Serbest Ticaret Anlaşması ve Dünya Ticaret Örgütü Anlaşması gibi anlaşmalar nedeniyle domates üretiminde ılıman bölgelerden tropik bölgelere kaymalar, tropik ve subtropiklerdeki tospovirüs sorunuyla çakışmaktadır (Robbins vd. 2010).

1.2. Taksonomi

Tospovirüsler, *Tospoviridae* familyasındaki *Orthotospovirus* cinsine aittir ve Bunyavirales takımında yer almaktadır. Dünya çapında 1 milyar doların üzerinde kayba neden olan bitki verimliliğine yönelik en büyük tehditlerden sayılmaktadır (Prins ve Goldbach 1998). Esas olarak hayvan ve insanları enfekte eden virüs türlerini içeren bu yeni virüs düzeninde bitkiyi enfekte eden sadece üç virüsten biridir (Tsompana vd. 2005; Rotenberg vd. 2009). Tospovirüsler, adlarını ilk kez 1915'te Victoria, Avustralya'da bildirilen Domates lekeli solgunluk virüsünden almıştır (Brittlebank 1919). Etmen, 1970 yılında partikül morfolojisine, konukçu aralığına ve trips ile bulaşmaya dayalı olarak "domates lekeli solgunluk virüsü grubu"nun tip üyesi olarak sınıflandırılmıştır. Virüs grubu daha sonra ICTV tarafından bir cins olarak belirlenmiştir.

1.3. Tospovirüslerin Özellikleri

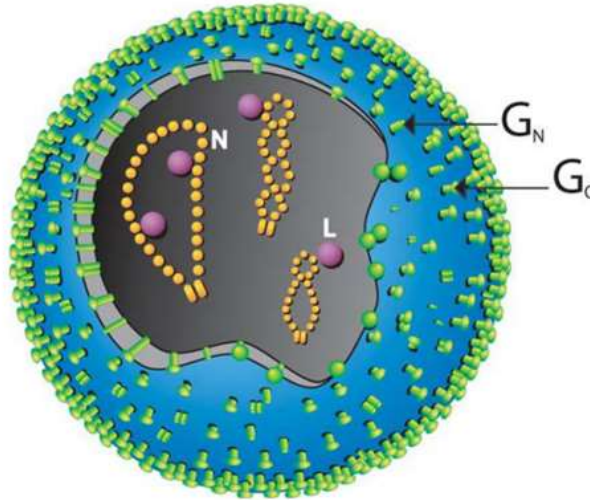
1.3.1. Morfolojik ve fizikokimyasal özellikler

Tospovirüsler, 80-120 nm çapında benzersiz yarı küresel parçacık morfolojisine sahiptir. Virionlar, bir lipid çift tabakasına gömülü olan 5-10 nm'lik yüzey glikoprotein projeksiyonlarını gösterir. 5 nm kalınlığında zarf. Viral nükleokapsidler 200-300 nm uzunluğunda ve 2-2.5 nm çapındadır (Whitfield vd. 2005; King vd. 2012). Virion %5 nükleik asit, %5 karbonhidrat, %20 lipid ve %70 protein içerir. Molekül ağırlığı 300 × 106 ila 400 × 106'dır ve çökeltme özelliğine sahiptir (Adkins 2000).

1.3.2. Genomik organizasyon

Tospovirüsler, hataya meyilli replikasyon, yüksek replikasyon oranları, kısa nesil süreleri ve büyük bir popülasyon boyutuna atfedilen yüksek genetik çeşitliliğe sahiptir (Tsompana vd. 2005). Yüksek çeşitlilik aynı zamanda eski virüslerden yeni izolatlarını ortaya çıkmasını ve yeni veya dirençli konukçulara hızla adapte olma yeteneğini de açıklar.

Genom üç tek sarmallı RNA'dan oluşur: L RNA (~8.9kb), viral tamamlayıcı (vc) dizideki RNA'ya bağlı RNA polimerazı (RdRp) (331k) kodlar. M ve S segmentlerinin her biri iki protein kodlar. M RNA (~4.8kb), vc anlamında zarf membran glikoproteininin öncüsünü ve viral (v) anlamında NSm'yi kodlar. Genomik RNA'lar tamamlayıcı 5' ve 3' uçlarına sahiptir (5' ucunda AGAGCAAU, 3' ucunda UCUCGUUA) ve sözde dairesel bir kanatçık yapısı alabilir. M ve S RNA'ların her biri, stabil bir saç tokası yapısı oluşturabilen yüksek A-U içeriğine sahip bir intergenik bölgeye (IGR) sahiptir (Bag vd. 2010). Üç genomik RNA, tek tek N proteininin birçok kopyası tarafından kapsidlenir ve iki harici glikoprotein (GN ve GC) entegre edildiği konukçudan türetilmiş bir lipid zarf ile çevrilidir (King vd. 2012). İki glikoprotein, virüs partikülünün yüzeyini kaplayan başak benzeri çıkıntılar olarak görülür (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Bir TSWV virionunun şematik gösterimi. Konukçu kökenli (mavi) çift katmanlı bir zarf, monomerik ve dimerik konfigürasyonlarda yüzeyden çıkıntı yapan viral kodlu proteinler GN ve GC (yeşil) ile gösterilmiştir. Genomik RNA, birçok N proteini (şeftali) kopyası ile birleşmesi ile oluşturulan bir ribonükleoprotein (RNP) kompleksi formunda kovalent olmayan şekilde kapalı daireler olarak sunulur. Viryonla ilişkili RNA'ya bağlı RNA polimerazın (RdRp) birkaç kopyası, RNP'lerle bağlantılı olarak (mor) gösterilmiştir (Whitfield vd. 2005)

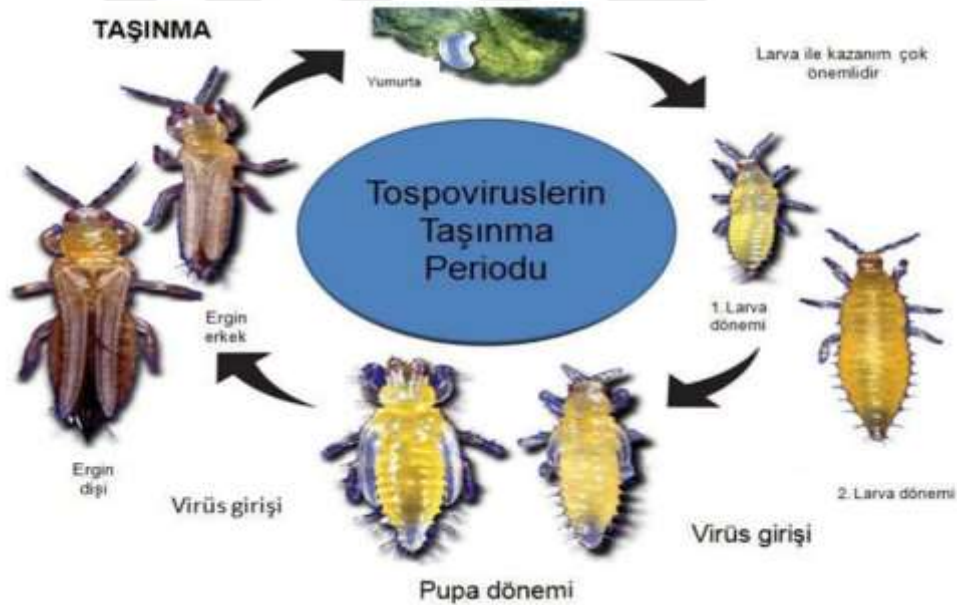
1.3.3. Tospoviral replikasyon

Viral replikasyonun ve virion oluşumunun tüm aşamaları, konukçu bitki sitoplazmasında ve böcek vektöründe meydana gelir. Virüs, bitki hücresine, virüslü trips tarafından sondalama veya beslenme sırasında girer (Whitfield vd. 2005).

Hücreye girdikten sonra virüs partikülü nükleokapsidini sitoplazmada kaybeder. N protein konsantrasyonuna bağlı olarak viral RNA ya transkripte olur ya da kopyalanır. N proteinlerinin konsantrasyonu arttıkça, polimeraz replikaz moduna geçer ve viral genomik RNA'lar çoğalır (Maris vd. 2003). S ve M ambisense RNA'larından proteinlerin translasyonu, subgenomik mRNA'lardan meydana gelmektedir. Çoğaltılan viral RNA'lar, plazmodesmata yoluyla bitişik bitki hücrelerine hareket için muhtemelen NSm proteini ile birleşebilen ribonükleoproteinleri (RNP'ler) oluşturur. Alternatif olarak, RNP'ler glikoproteinlerle birleşerek ve Golgi zarları boyunca tomurcuklanarak virionlar oluşturur. Virionlar başlangıçta çift zarlıdır, ancak kısa süre sonra birleşerek başka bir zarla çevrili tek bir zarlı virion grupları oluştururlar (Bag vd. 2010).

1.3.4. Taşınma

Virüsleri larva aşamasında edinmiş olan yetişkin tripsler, tospovirüsleri iletirler (Naidu vd. 2008; Riley vd. 2011). Besleme sırasında virüsleri ilk kez alan yetişkin tripsler, tospovirüs bulaşmış bitkilerde uzun süre beslenmelerine izin verilse bile vektör olamazlar. Bunun nedeni, virüslerin yetişkin böceklerin içindeki yaşam döngülerini bulaşmaya izin verecek şekilde tamamlayamamalarıdır (Pappu vd. 2009). Birinci ve ikinci dönem larvalar, virüsün alınmasında etkilidirler ve trips larvaları geliştikçe TSWV'yı edinme oranları düşer (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Tospovirüslerin tripsler ile biyolojik döneme göre taşınma periyodu (Whitfield vd. 2005)

Tospovirüsler trips vektörlerinde çoğalırlar, bu nedenle böcekler sadece virüsü yaymakla kalmaz, aynı zamanda virüs konukçusu olarak da hizmet ederler. Tripsler, enfekteli bitkilerden larva evrelerinde virüsü alırlar ve bunları larva evrelerinin sonunda sağlıklı bitkilere aktarırlar. Türkiye'nin Samsun ilinde TSWV'nin domates verimi üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir vaka çalışması, TSWV'nin domatesin veriminde ve pazarlanabilir değerinde sırasıyla %42.1 ve %95.5'lik bir azalmaya neden olduğunu göstermiştir (Şevik ve Arlı-Sökmen 2007).

TSWV'nin geniş bir konukçu yelpazesi nedeniyle, diğer konukçu bitkilerde, özellikle biberlerde benzer ekonomik kayıplar bildirilmiştir (Ramchiary vd. 2014). Trips bitki dokusunda yumurtlar ve birkaç gün içinde ilk dönem larvaları ortaya çıkar.

Virüs edinimi, yalnızca virüsün transstadial olarak yetiştikine geçtiği larva evrelerinde gerçekleşir. Pupa evreleri beslenmez ve virüs enfeksiyonunu sürdürmelerine rağmen hareket etmezler. Bu evreler ya toprakta ya da yapraklarda gerçekleşir. Daha sonra yetişkinler ortaya çıkar ve geniş bir alana yayılma eğilimi gösterir. Yalnızca larva evrelerinde virüsü kapmış olan yetişkin tripsler tospovirüsleri bulaştırabilir.

1.4. Tospovirüslerin Tespiti ve Teşhisi

Başarılı tospovirüs teşhisi, kullanılan örnekleme tekniğine bağlıdır. Diğer RNA virüslerinde olduğu gibi, toplanan örnekler bozulmadan hemen önce işlenmelidir. Tropik ve subtropiklerde, toplanan bitki örnekleri bozulmadan önce doğru koşullarda laboratuvarlara teslim etmek bazen zordur. Bu nedenle, hızlı alan algılama ve/veya daha sonraki işlemler için depolama teknikleri geliştirilmiştir. Birkaç tospoviral tanı tekniği mevcuttur ve daha fazlası geliştirilmeye devam etmektedir. Temel olarak teknikler simptomatoloji, konukçu indeksleme, seroloji, elektron mikroskobu ve moleküler teknikler olarak sınıflandırılabilir.

1.5. Konukçu İndeksleme

İndeksleme, bulaşıcı patojenlerin varlığını veya yokluğunu tekrarlanabilir bir şekilde değerlendiren veya spesifik indikatör bitkilerde oluşturulan reaksiyon temelinde bir hastalığı tanımlayan herhangi bir testtir. Tospovirüsler, indikatör bitkilerde belirti üretimi temelinde tespit edilebilir (Çizelge 1.1). İndikatör bitkiler, virüs içermemeli ve büyümesi kolay olmalıdır. Belirli bir virüs türüne hızlı ve spesifik olarak tepki vermeli, farklı koşullar altında tanısal belirtiler göstermeli ve büyüme mevsimleri boyunca kolayca erişilebilir olmalıdırlar (Lin vd. 2012).

Çizelge 1.1. Tospovirüsler için bazı indikatör konukçular

Bitkisel isim	Yaygın isim	Familya
<i>Arachis hypogaea</i>	Yer fıstığı	Fabaceae
<i>Capsicum annuum</i>	Biber	Solanaceae
<i>Chenopodium album</i>	Kazayağı	Amaranthaceae
<i>Chenopodium quinoa</i>	Kinoa	Amaranthaceae
<i>Cucumis sativus</i>	Hıyar	Cucurbitaceae
<i>Datura stramonium</i>	Şeytan elması	Solanaceae
<i>Impatiens</i>	Cam güzeli	Balsaminaceae
<i>Solanum lycopersicum</i>	Domates	Solanaceae
<i>Spinacia oleracea</i>	Ispanak	Amaranthaceae
<i>Nicotiana tabacum</i>	Tütün	Solanaceae
<i>Nicotiana glutinosa</i>	Tütün	Solanaceae
<i>Nicotiana clevelandii</i>	Tütün	Solanaceae
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Tütün	Solanaceae
<i>Petunia hybrida</i>	Petunya	Solanaceae
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Tarla fasulyesi	Fabaceae
<i>Pisum sativum</i>	Bezelye	Fabaceae
<i>Vigna unguiculata</i>	Börülce	Fabaceae

1.6. Seroloji

Serolojik tespit veya immünokimyasal teşhis, virüs tespiti için monoklonal veya poliklonal antikorların kullanımına dayanır. Antikorlar, spesifik virüs antijenlerine bağlanma yeteneğine sahiptir. En yaygın olarak kullanılan serolojik yöntem, enzime bağlı immünosorbent testidir. Bu test çift antikorlu sandviç ELISA (DAS-ELISA) ve üçlü antikorlu sandviç ELISA (TAS-ELISA) olmak üzere ikiye ayrılır (Naidu vd. 2008). ELISA, bitki örneği başına bir kuyu kullanılarak tek bir tospovirüs için birden fazla bitkiyi test etmek için kullanılabilir. Ayrıca, tek bir bitki, her bir kuyucuğa iki veya üç kopya halinde kaplanmış farklı antikorlarla tek bir plaka üzerinde birçok tospovirüs için aynı anda test edilebilir. Doğru, ucuz, son derece hassas ve basit bir şekilde patojenleri ölçebilir. ELISA'nın önemli bir sınırlaması, bitki proteinleri ile çapraz reaksiyona girmeyen ilgili her virüs için spesifik monoklonal veya poliklonal antikor serumu gerektirmesidir (Webster vd. 2004; Lin vd. 2012).

1.7. Moleküler Teşhis

Moleküler testler nükleik asit moleküllerini oluşturan farklı bazların spesifik tamamlayıcı ilişkisine dayanırlar. Bu tür testler, duyarlılık, hız, özgüllük veya uygun serolojik testlerin bulunmadığı durumlarda diğer yöntemlere göre daha iyi alternatiflerdir. Özgüllük, hem primerlerin tasarımı hem de amplifikasyon protokolleri ile doğrudan ilişkilidir (Olmos vd. 2007). Yaygın olarak kullanılan moleküler teknikler, ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve yeni nesil dizilemedir (NGS).

RT-PCR, tek iplikli RNA'yı tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) dönüştüren bir ilk ters transkripsiyon adımını içerir. Bu, ters transkriptaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilir. Ardından, yeni sentezlenen cDNA, geleneksel PCR kullanılarak amplifiye edilir. RT-PCR çok hassastır ve gerçekleştirmek için minimum beceri gerektirir. Virüs tespitinin etkinliği, şablon nükleik asit, polimeraz enzimi, tampon bileşimi, stabilite, deoksinükleotit trifosfatların (dNTP'ler) saflığı ve konsantrasyonu ile döngü parametrelerine bağlıdır (Lin vd. 2012).

1.8. Yeni Nesil Dizileme (Next-Generation Sequencing-NGS)

Yüksek verimli dizileme olarak da adlandırılan NGS, nükleik asitlerin dizilenmesini Sanger dizilemesinden çok daha hızlı ve ucuza sağlayan bir dizi farklı modern dizileme teknolojisi olarak kabul edilmektedir. Bu işlem, tüm genomu küçük parçalara bölerek ve daha sonra bu küçük parçaları DNA sentezi sırasında rastgele okuma için belirlenmiş adaptörlere bağlayarak gerçekleştirilir (Grada ve Weinbrecht 2013). NGS'de, genellikle tek çalıştırma başına onlarca veya yüzlerce gigabayt veya deney başına terabayt olmak üzere çok büyük miktarda veri üretilir (Xuan vd. 2013).

Aşağıdakiler dahil olmak üzere çeşitli NGS platformları mevcuttur; Roche GS-FLX 454, Illumina Genom Analizörü, ABI SOLiD Analizörü, Polonator ve Helicos HeliScope. Bu platformlar, Sanger dizilimine ve birbirlerine göre farklı temel okuma uzunlukları, hata oranları ve hata profilleri üretir. Ortalama okuma uzunluğu, Sanger dizilimi için 1000-1200 bp'ye kıyasla 35-500 bp okumasıdır (Zhang vd. 2011).

1.9. Tospovirüs Hastalıklarının Yönetimi

Tospovirüs yönetiminde kullanılan taktikler, epidemiyolojik ilkelerin tam olarak anlaşılmasına dayanmalı ve biyolojik, kimyasal, kültürel, konukçu-bitki direnci ve fiziksel kontrolü içeren Entegre Hastalık Yönetimi (IDM) yaklaşımlarına girmelidir (Culbreath vd. 2003).

1.9.1. Biyolojik kontrol

Biyokontrol, tripslerin avcı akarlar (*Neoseiulus cucumeris*, *Stratiolaelaps scimitus* ve *Gaeolaelaps aculeifer*), küçük korsan böcekleri (*Orius insidiosus*), entomopatojenik nematod (*Steinernema feltiae*) ve entomopatojenik mantarlar (*Beauliarhizium ansiana*) gibi doğal düşmanların kullanımına dayanır. Başarılı biyokontrolün yolu, doğal düşmanları ürün döngüsünde yeterince erken serbest bırakmaktır (Cloyd 2009).

1.9.2. Kimyasal kontrol

Doğrudan mücadelede herhangi bir kimyasalın ya da etkili bir mücadele yönteminin söz konusu olmadığı virüs ve benzeri hastalıklar, açık alanlarda ve örtü altında yetiştirilen kültür bitkilerinde verimi ve kaliteyi en fazla etkileyen hastalıkların başında gelmektedir. Trips ile bulaşan tospovirüslerin neden olduğu hastalıklar, dünyanın farklı bölgelerinde önemli sebze, baklagil ve süs bitkilerinin üretiminde önemli kısıtlamalar meydana getirmektedir. Şimdiye kadar birkaç tospovirüs için, pratik ve etkili entegre hastalık yönetimi programlarının başarılı bir şekilde geliştirilmesi ve uygulanmasında önemli ilerleme kaydedilmiştir. Bununla birlikte, dayanıklılığı kıran veya bilinen tospovirüslerin diğer yeni izolatları ve dünyanın çeşitli bölgelerinden tamamen yeni tospovirüs türleri tanımlanmaya devam ettiği ve zararlı salgınlara neden olma potansiyeline sahip olduğu için zorluklar devam etmektedir (Pappu vd. 2009).

1.9.3. Kültürel kontrol

Gelişimin ilk aşamalarında virüs ile enfekte olan bitkiler, önemli bir tospovirüs kaynağıdır. Bu tür bitkilerde tripsler ile mücadele önceliklidir. Bu, özellikle Asteraceae ve Solanaceae familyalarından ve sarıçiçekli duyarlı bitkiler ve yabancı otlar için de geçerlidir. Çiftçiler, duyarlı bitkilerin üst üste ekiminden ve yan yana sıralı ekimlerden kaçınmalıdır. Virüsü edinen trips vektörleri eski üründen yeni ürüne göç edip virüsleri yayabileceğinden, bir “yeşil köprü” oluşturma eğilimindedirler (Cloyd 2009).

1.9.4. Fiziksel kontrol

Gümüş yansıtıcı malçlar ve sıra örtüleri trips istilasını azaltır ya da engeller. Sera havalandırma deliklerindeki ve yan duvarlarındaki elek ağları, seraya giren trips popülasyonunu azaltır. Tarlada, zemini samanla kaplamak, trips avcılarının birikmesine izin verir. Bitkisel yağlar ve film oluşturuvcu ürünlerin bitkilere uygulanması da virüslerin vektörler tarafından yayılmasını azaltır. Yağlar vektörde davranış değişikliklerine neden olur (Khan ve Dijkstra 2006).

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Hastalığın Bulunuşu ve Yayılması

Domates lekeli solgunluk virüsü ilk olarak 1915 yılında Avustralya'daki domates bitkilerinde keşfedilmiştir (Brittlebank 1919). Viral kökenli olduğu ise 1930'da Samuel ve arkadaşları tarafından ortaya çıkarılmıştır (Adkins ve Baker 2005). Virüs Cezayir, Avusturya, Belçika, Bulgaristan, Hırvatistan, Kıbrıs, Çek Cumhuriyeti, Mısır, Fransa (ilk olarak 1933'te ortaya çıkmış fakat 1987'den beri bir daha görülmemiş), Almanya, Yunanistan, İrlanda, İsrail, İtalya, Libya, Litvanya, Malta, Moldova, Hollanda, Polonya, Portekiz, Romanya, Rusya, Slovakya, İspanya, İsveç, Türkiye, İran, İngiltere, İskoçya, Ukrayna, Yugoslavya, Tunus ve Fas'dan rapor edilmiştir. Ek olarak, Norveç, Danimarka ve Finlandiya'da virüs tespit edilmiş ancak eradike edilmiş veya edilmektedir (Lewandowski vd. 2005).

Hastalık etmeni Türkiye'de ilk kez Tekinel vd. (1969) tarafından örtü altında sebze yetiştiriciliğinin sık yapıldığı Mersin ili ve çevresinde marul bitkilerinde rapor edilmiştir. Daha sonra, birçok bölgede domates; (Güldür, 1995; ArlıSökmen ve Sevik, 2006; tütün (Azeri 1994), biber (Arlı-Sökmen vd. 2005), patlıcan (Kamberoğlu vd. 2009), kabak (Yardımcı ve Cüla-Kılıç, 2009), marul (Kamberoğlu ve Alan, 2011; Sertkaya 2015) bitkileri ve bazı yabancı otlarda (Arlı-Sökmen vd. 2005; Atakan vd. 2013) değişen oranlarda tespit edilmiştir. Dünya çapında birçok tospovirüs çalışması yapılmış olsa da, Türkiye'de durum böyle olmamıştır.

Samsun'da yapılan bir araştırmada domates, biber ve tütün ekim alanlarından toplanan 414 yaprak örneği ELISA ile TSWV poliklonal antiserum kullanılarak test edilmiştir ve 28 tanesi TSWV ile enfekteli bulunmuştur. Bu nedenle kullanılan bitki materyallerinden en yüksek absorbanza sahip bir TSWV izolatu seçilmiş ve test bitkilerine mekanik olarak aşılanmıştır (Arlı Sökmen vd. 2005).

Çanakkale'de yapılan bir çalışmada 99,2 hektarlık bir alandan 200 adet bitki örneği ELISA ve DTBIA yöntemleri ile incelenmiştir. ELISA testi, 9 örneğin TSWV ile enfekteli olduğunu ortaya çıkarmıştır. ELISA testinde TSWV ile enfekteli bulunan örnekler diğer bir serolojik yöntem olan DTBIA yöntemiyle de test edilmiş ve enfekteli bulunmuştur (Turhan ve Korkmaz, 2006).

Marmara bölgesinde (Bilecik, Bursa, Sakarya) yapılan bir araştırma, test edilen bitki örneklerinin %5-78'inin TSWV ile enfekte olduğunu ortaya koymuştur (Değirmenci ve Uzunoğulları 2007).

Batı Akdeniz bölgesinde yapılan bir çalışmada domates, biber, patates, marul, kabak ve salatalık yapraklarından örneklenmiş ve 12 bölgeden 337 örnek kullanılmış ve DAS-ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Sonuç olarak 157 örneğin TSWV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir (Yardımcı ve Kılıç. 2009).

TSWV'nin tarımsal ürünlerde meydana getirdiği ekonomik kayıpları konu alan bir derlemede, tarımsal ürünlerde virüsten kaynaklanan kantitatif ve kalitatif zararlar ve ekonomik kayıplar incelenmiştir ve hastalık etmeninin ülkemizde oldukça yaygın durumda olduğu ve sürekli yayılış gösterdiği ortaya çıkmıştır (Şevik 2011).

Yalova’da, kesme çiçek üretiminde verimi ve kaliteyi olumsuz yönde etkileyen bazı sistemik hastalıklar gözlenmiş ve enfeksiyonlara neden olan virüslerin varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla 2013 yılı Ekim ve Kasım aylarında sörveyler yapılarak Yalova İli’nde 11 farklı örtüaltı üretim alanında gözlemler yapılarak örnekler toplanmıştır. Sistemik, mozaik, sarılık, klorotik ve nekrotik lekeler ile yaprak ve çiçeklerde deformasyonlar sergileyen *Anthurium andreanum*, bazı orkide, gül ve gerbera bitkilerinden belirti gösteren veya göstermeyen toplam 150 yaprak örneği elde edilmiştir. DAS-ELISA testi kullanılarak 150 adet yaprak örneğinde TSWV, *Dasheen mosaic virus* (DsMV) ve *Cucumber mosaic virus* (CMV) hastalıklarının varlığı araştırılmıştır. DAS-ELISA test sonuçlarına göre 150 yaprak örneğinden 4 adedinin DsMV ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda 2 adet *Anthurium andreanum* (Flamingo çiçeği) ve 2 adet orkide (*Cymbidium* spp.) bitkisinde saptanan DsMV hastalığı, Türkiye’de ilk defa rapor edilmiştir. Ancak Yalova kesme çiçek seralarında TSWV ve CMV virüslerine rastlanmamıştır (Kibar 2014).

Süs bitkileri ve Solonaceae familyası, Antalya’nın tarıma dayalı ekonomisi için gıda ve ekonomik değeri yüksek ürünler olarak önemlidir. Bu nedenle Antalya’da yetiştirilen *Anthurium scherzerianum* (Flamingo çiçeği) bitkilerinde virüs benzeri belirtiler görülmesi üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada, bitki yaprakları DAS-ELISA tekniğine göre süs bitkilerinde görülme olasılığı yüksek bazı virüslere karşı testlenmiştir. DAS-ELISA sonuçları pozitif örneklerden ekstrakte edilen toplam RNA’ların RT-PCR’da kullanılmasıyla doğrulanmıştır. RT-PCR, sense TSWV L1F ve antisense primerlerine TSWV L2R göre düzenlenmiştir. RT-PCR ürünlerinin direkt sekanslaması ve yapılan BLAST sonucunda biber TSWV izolatları ile %96-99 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. *Anthurium* bitkisinde TSWV enfeksiyonu serolojik ve moleküler olarak saptanmıştır. Bu çalışma TSWV’nin *Anthurium* bitkisindeki Türkiye için ilk kaydı olup aynı zamanda etmenin türler arasında kontrolsüz yayılımının kanıtı olmuştur (Fidan vd. 2016).

Yine Antalya ilinde yapılan bir çalışmada dayanıklılığı kıran TSWV izolatının (TSWVAntRB) tüm genom dizilimleri çıkarılarak bu izolatın dünya izolatları içerisindeki yeri filogenetik analizler ile incelenmiş ve dayanıklılığı kıran izolatın üstünde Sw-5 dayanımı kıran mutasyon belirlenmiştir. TSWV’de meydana gelen mutasyonları anlamak amacıyla tüm genomu çıkarılarak dayanıklılığı kıran ve kırmayan izolatlar ile kıyaslaması yapılmış ve farklılıkları belirlenmiştir. RT-PCR tekniği ile çoğaltılmış sekans dizileri elde edilmiş gen dizileri üzerinde protein sentezi yapan açık okuma bölgeleri belirlenmiş bu bölgelerde nükleotid aminoasit ve protein düzeyinde farklılıklar ortaya konulmuştur. TSWVAntRB izolatının medium segmentine ait nükleotid, aminoasit ve protein bazında yapılan eşleştirmelerde bu izolatın (non-structural protein) (NSm) NSm alanındaki bu bölge hücreden hücreye geçişten sorumlu olan alan üzerinde C118Y noktasında bir mutasyon meydana geldiği ve bu mutasyon sebebiyle de dayanıklılık durumunun ortadan kalktığı belirlenmiştir. Filogenetik analizler sonucunda Avrupa’daki dayanıklılığı kıran izolat ile ülkemizde dayanıklılığı kıran izolatın aynı kökenden geldiği ortaya çıkmıştır (Sarı 2018).

TSVW’nin, dünyada domates yetiştirilen alanlarda verim ve kalite kaybına neden olan hastalıklar içerisinde çok önemli olduğu, hatta önem sıralamasında genellikle ikinci sırada yer aldığı rapor edilmiştir (Fidan ve Sarı 2019).

2.2. TSWV'nin Yayılmasında Yabancı Otlar ve Vektör Tripslerin Rolü

Birçok yabancı ot türü, TSWV için önemli virüs rezervuarları, yani ara konukçu olarak hizmet etmektedirler. Mücadele edilmediği durumlarda yabancı otlar dayanıklı ve uzun ömürlü olmaları nedeniyle hem virüs ve hem de tripslerin etmeni taşımalarına hizmet etmektedirler (Batuman vd. 2020). Bu durum göz önüne alındığında hastalıkla mücadelede yetiştirilme alanlarında yabancı ot ve vektör böcek kontrolünün etkili bir şekilde sağlanmasının önemli olduğu ortaya çıkmaktadır. Kültürel önlemlere ne kadar dikkat edilse de tüm bu mücadele çabalarının yanında artık üreticilerin dayanıklı çeşit kullanmaya yönlendirilmeleri önem kazanmıştır. Virüs hastalıklarıyla mücadelede dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi ve zararın azaltılması ve epidemilerin önüne geçilmesi son derece önemlidir.

Tospovirüslerin konukçusu olan ve zarar verdiği bitkiler dışında tüm yıl boyu canlılığını sürdüren muhtelif yabancı ot ve diğer bitkilerin varlığı tospovirüslerin doğada devamlı olarak var olmasına ve kolayca haytını devam ettirmesine neden olmaktadır. Ayrıca bitki ve bitkisel ürünlerin, her ne kadar karantina sınırlamaları ve kontrolleri olsa da özellikle süs bitkilerinin uluslararası ticareti tospovirüslerin ve vektörlerinin ülkelere giriş olasılıklarını da artırmaktadır. Bu durum doğal olarak diğer ülkeler gibi Türkiye'de yeni tospovirüs ırklarının gelişmesi ve tospovirüslerin neden olduğu hastalıkların görülme sıklığı ve salgınlarının ortaya çıkmasına veya artmasına neden olmaktadır. Ayrıca diğer virüs ve vektör ilişkilerinde olduğu gibi son yıllarda artan iklim değişikliği etkileri de bu çıkış oranı veya salgınların artışına da neden olmaktadır.

Hastalığı kontrol etmek için pestisitler ile çeşitli tarım teknikleri kullanılmıştır. Son gözlemler, kimyasalların TSWV vektörü tripsleri yeterince kontrol etmediğini göstermiştir. Bu durum, daha fazla TSWV enfeksiyonunun meydana gelmesine ve seralarda ve açık alanlarda trips sayısının artmasına sebep olmuştur. Hastalığa neden olan virüsle mücadelede çeşitli yöntemler denenmiştir. Arjantinli araştırmacılardan oluşan bir ekip, yüksek sıcaklıkların TSWV'nin şiddeti üzerindeki etkisini incelemiştir. Yüksek sıcaklıklar bitkilerde salisilik asit birikimini artırır ve salisilik asidin hastalık belirtilerinin altında yatan fizyolojik mekanizmalarda yer aldığı gösterilmiştir.

Çalışmalar, tripsleri kontrol etmek için kullanılan pestisitlerin ve bitki büyüme destekleyicilerinin bir kombinasyonunun TSWV'nin yayılmasını önleyebileceğini göstermiştir (Momol vd. 2004). Bir başka çalışmada, domates veriminin *F. fusca* sayısı ve TSWV yoğunluk oranı ile ters orantılı olduğu ve çiçek başına *F. fusca* sayısının TSWV bitki belirti yoğunluğu ile pozitif yönde ilişkili olduğu görülmüştür. Çalışmanın sonuçları, tripslerin büyüme mevsiminin başlarında bu yöntemlerle kontrol altına alınmasının, TSWV'nin oldukça etkili olduğu (>%17) dönemde domates verimini artırmada etkili olduğunu göstermektedir (Pappu. 2009).

Önceki araştırmalar, dar yapraklı *Gamochaeta falcata* (L) Cabrera, *Stellaria media* L., *Lepidium virginicum* L., *Geranium carolinianum* L. ve çeşitli yabancı otlarda yüksek oranda TSWV enfeksiyonu olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, bazı kışlık yabancı ot türlerinin yüksek bir yüzdesinin (%20'ye kadar) TSWV ile enfekte olduğu gözlemlenmiştir (Groves vd. 2001; Mullis ve Martinez 2009).

Kamberoğlu vd. 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada Türkiye’de ilk defa domates lekeli solgunluk virüsünün *Ranunculus arvensis* ve *Ranunculus muricatus* üzerinde doğal infeksiyon oluşturduğunu tespit etmiştir. TSWV belirtileri saha çalışmalarında sadece *R. muricatus*’ta bildirilmiştir ve bu türün bölgede yüksek oranda TSWV yaygınlığına sahip olduğu, ancak yabancı ot popülasyonunun küçük bir bileşeni olduğu gözlemlenmiştir.

Çukurova bölgesinde gerçekleştirilen bir çalışmada, yabancı otlar üzerinde trips ve TSWV, 2004–2006 yılları arasında araştırılmaya alınmıştır. Yabancı otlardaki trips türleri, 15 saniye boyunca beyaz bir kapta kuvvetlice çalkalanarak toplanmıştır. Saha araştırmaları sırasında toplanan bitki materyali ve TSWV’nin mekanik aşılması için kullanılan bitkiler DAS-ELISA ile test edilmiştir. Yabancı ot türleri *Ranunculus muricatus*, *Melilotus officinalis*, *Sinapis arvensis* ve *Portulaca oleracea* kapalı yüksek plastik tünelde ve kabin deneylerinde virüs bulaştırılması için kullanılmıştır.

Trips türleri arasında, *Frankliniella occidentalis*, örneklenen 82 yabancı ot türünün 80’inde yaşayan en yaygın tür olarak tespit edilmiştir. *F. occidentalis*’ in erginleri ve larvaları, *S. arvensis* üzerinde, örneklenen diğer yabancı ot türlerine göre önemli ölçüde daha fazla bulunmuştur ($P<0.05$). Tripslerin erginleri ve larvaları, çoğu yabancı ot üzerinde Nisan veya Mayıs aylarında en yüksek popülasyona ulaşmıştır. Çalışmanın sonucunda tek yıllık yazlık yabancı otların, tripslerin üremesi için iyi bir konukçu olmadıkları belirlenmiştir. 11 bitki familyasına ait 17 bitki türünden toplam 90 örnek TSWV için ELISA testinde pozitif sonuç vermiştir. 26 bitki familyasına ait 65 yabancı ot türünde ise TSWV tespit edilememiştir. TSWV ile enfekte olmuş çok sayıda bitki örneği *P. oleracea*’da (21 örnek) ve *R. muricatus*’ta (15 örnek) elde edilmiştir. Saha araştırmalarında sadece *R. muricatus*’ta TSWV belirtileri tespit edilmiştir. Bu çalışmada, *Amaranthus viridis*, *Amaranthus retroflexus*, *Portulaca oleracea* ve *Echium plantagineum* dahil olmak üzere yedi yazlık yabancı ot türünde TSWV enfeksiyonu tespit edilmiştir. Şiddetli TSWV belirtileri gösteren biber tünellerinin çevresinde yetişen *A. viridis* ve *P. oleracea* örneklerinde TSWV sıklıkla saptanmıştır. TSWV ile enfekte olmuş biberlerden veya yüksek tünellerde büyüyen domateslerden gelen göçmen *F. occidentalis*’in yetişkinleri, virüsü yakındaki yabancı otlara veya diğer bitkilere bulaştırmış olabilecekleri konusu da dikkat çekmiştir. TSWV’nin yazlık otlardan elde edilmesi ve TSWV’nin yetiştirilen bitkilerde veya yaz/kış tek yıllık yabancı otlara tripsler yoluyla aktarılması, yabancı otların bölgedeki TSWV epidemiyolojisinde önemli bir role sahip olduğunu vurgulamıştır. Aynı zamanda *A. viridis* ve *P. oleracea* türlerinin, tripslerin üremesini desteklemediği ortaya çıkmıştır (Atakan vd. 2013).

Türkiye’deki en önemli örtü altı üretim alanlarından biri olan Kumluca (Antalya) İlçesi’ndeki domates seralarında görülen yabancı ot türlerini, yaygınlıklarını, yoğunluklarını ve bazı bitkisel özelliklerini ortaya koymak amacıyla yürütülen bir çalışmada, 65 serada toplam 148 dekar kapalı alan incelenmiştir. Sera içerisinde bulunan tüm yabancı ot türleri kaydedilmiş, yoğunluk, kaplama alanı ve rastlama sıklıkları belirlenmiştir. Tespit edilen türlerin, ilgili kaynaklardan yararlanılarak fitocoğrafik bölgeleri ve hayat formları ortaya konmuştur. Çalışma sonunda; 1’i parazit, 5’i tek çenekli, 38’i çift çenekli olmak üzere, 21 familyaya ait toplam 44 yabancı ot türü saptanmıştır. Belirlenen türlerin büyük bölümünün tek yıllık (%61), terofit (%59) ve geniş yayılışlı (%52) olduğu ortaya konmuştur.

İlçe genelinde domates seralarında bulunan yabancı otların ortalama yoğunluğu 25,5 adet/m², kaplama alanı ise %13,3 olarak tespit edilmiştir. Gerek rastlama sıklığı gerekse yoğunluk ve kaplama alanı bakımından en önemli türler; *Amaranthus retroflexus* L. (horozibiği), *Portulaca oleracea* L. (semizotu), *Cyperus rotundus* L. (topalak) ve *Melilotus officinalis* (L.) Desr. (taş yoncası) olarak belirlenmiştir. Plastik ve cam seralardaki yabancı otların yoğunluğu sırasıyla 25,7 ve 22,6 adet/m², kaplama alanı ise %13,1 ve %16,8 olarak tespit edilmiştir. İlçedeki seraların %95'inde solarizasyon yapıldığı ve ortalama solarizasyon süresinin 52 gün olduğu belirlenmiştir. Solarizasyon yapılan ve yapılmayan seralarda yabancı ot yoğunluğu sırasıyla 23,5 ve 66,4 adet/m², kaplama alanı sırasıyla %11,9 ve %18,2 olarak belirlenmiştir. Yabancı otların %10'un üzerinde bir kaplama alanına ve metrekarede 25 adedin üzerinde yoğunluğa sahip olmaları, yabancı ot mücadelesine daha fazla önem verilmesi gerektiği kanaatini oluşturmuştur (İbrişim ve Kitiş 2020).

Pamuk üretimi bakımından önemli illerden biri olan Antalya'da yapılan bir başka çalışmada, pamuk üretimini sınırlayan en önemli etmenlerden birinin yabancı otlar olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, Antalya ili pamuk ekim alanlarında görülen yabancı ot türleri ve bunların popülasyon durumları belirlenmiştir. Gözlemler, pamuk yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Aksu, Serik ve Manavgat ilçelerinde toplam 55 tarlada gerçekleştirilmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda 12 familyaya ait 24 yabancı ot türü saptanmıştır. Bunlar içerisinde topalak (*Cyperus rotundus* L.), pembe sarmaşık (*Ipomoea triloba* L.), kanyaş (*Sorghum halepense* (L.) Pers.), darıcan (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.) ve semizotu (*Portulaca oleracea* L.) öne çıkan türler olmuştur (Arslan ve Kitiş 2021).

Biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda üretimi sınırlayan pek çok virüs bulunmaktadır. Bu virüsler arasında TSWV biber dâhil ekonomik öneme sahip 35 bitki familyasına zarar vermektedir. Kumluca ilçesinde yapılan bir çalışmada biber üretim alanlarında sorun olan bu hastalığın yaygınlık oranları ortaya konulmuş ve bazı konukçu yabancı ot türleri belirlenmiştir. Çalışma kapsamında; 2020 yılı Eylül-Aralık aylarında Antalya ili Kumluca ilçesinde biber seralarında gerçekleştirilen sürveyler ile virüs belirtisi gösteren biber bitkilerinden 57 adet ve sera içerisinde ve bitişğinde bulunan biber dışındaki bitkilerden veya yabancı otlardan 99 adet olmak üzere toplam 156 adet yaprak örnekleri toplanmıştır. Daha sonra tüm örnekler DAS-ELISA yöntemi ile TSWV enfeksiyonlarını belirlemek için testlenmiştir. Testlemeler sonucunda, testlenen yaprak örneklerinin %55,76'sının TSWV ile bulaşık olduğu saptanırken, bu oran biber örnekleri için %96,49 ve diğer bitki örnekleri için ise %32,32 olarak belirlenmiştir. Sürvey çalışmaları sırasında biber dışındaki 31 farklı bitki ve yabancı ot türünden 13'üne ait yaprak örneklerinin virüsle bulaşık olduğu tespit edilmiştir (Yeşil ve Gömlekli 2021).

Tüm çabalara rağmen, TSWV, Türkiye dahil birçok ülkede domates ve biber üretimine yönelik en ciddi tehditlerden biri olmaya devam etmektedir. Güncel bir çalışmada, virüs varlığı için daha önce hiç araştırılmamış beş ilde (Ankara, Bartın, Eskişehir, Konya ve Zonguldak) virüs belirtisi gösteren 227 adet domates, biber ve yabancı ot yaprak örneği toplanmış ve bu örneklerde TSWV moleküler olarak tespit edilmiştir. NCBI GenBank veri tabanından seçilen diğer izolatlar ile birlikte yeni edinilen 23 Türk izolatının N geninin tam nt dizileri üzerinde filogenetik, genetik çeşitlilik ve popülasyon yapısı analizleri de yapılmıştır (Morca vd. 2022).

Küçük domates ve biber ekim alanlarından alınan örneklerde bile, tanımlama çalışması %43.6 gibi yüksek bir insidans oranı göstermiştir. Bu nedenle, TSWV'nin tüm ülkede olası yaygın varlığı, daha fazla yayılmayı ve verim kayıplarını en aza indirmek için daha iyi stratejilere odaklanmak gerekmektedir (Morca vd. 2022).

TSWV, ABD'nin Georgia eyaletinde ilk kez 1986'da rapor edilmiştir, fakat 1989'a kadar bir sorun olarak kabul edilmemiştir. Hastalık, bölgedeki birçok ekonomik önem taşıyan ürünü ve Georgia'nın kıyı ovalarında bulunan birçok yabancı otu etkilemiştir. Ülkede TSWV vektörlerinden üçü rapor edilmiştir (Webb vd. 1997).

Louisiana'da TSWV'nin en sık enfekte ettiği yabancı otları arasında, Asteraceae'nin iki türü, *Sonchus asper* ve *Lactuca floridana* ve Ranunculaceae'nin bir üyesi, *Ranunculus sardous* bulunmaktadır (Chatzivassiliou vd. 2001).

Groves ve arkadaşları tarafından 2001 yılında yürütülen bir çalışmada, trips popülasyonları, Kuzey Karolina'daki altı tarla lokasyonunda, bitki olmayan iki mevsim boyunca 28 yaygın çok yıllık, iki yıllık ve tek yıllık bitki türü üzerinde izlenmiştir. *Sonchus asper*, *Stellaria media* ve *Taraxacum officinale*, olgunlaşmamış TSWV vektör türlerinin en büyük popülasyonlarını tutarlı bir şekilde desteklemiştir. *Frankliniella fusca*, her sezonda vektör türlerinin %95'inden fazlasını oluşturan, toplanan en bol TSWV vektör türü olarak rapor edilmiştir. Çok yıllık bitki türleri (yani, *Plantago rugelii* ve *Taraxacum officinale*) genellikle yalnızca yerel olarak boldu ve birçok tek yıllık türler (*Cerastium vulgatum*, *Sonchus asper* ve *Stellaria media*) daha geniş çapta dağılmış idi. Çok yıllık türler, önemli ve uzun ömürlü TSWV aşı kaynakları olarak hizmet edebilirler.

Cundinamarca'nın Andean bölgesinde (Oriente, Sumapaz ve Ubate illeri) başlıca domates üretim alanlarında TSWV, yabancı otlar ve trips vektörlerinin varlığı ve dağılımı DAS-ELISA tekniği ile değerlendirilmiştir ve domates dokusunda TSWV'nin varlığı doğrulanmıştır. Ortalama viral insidans Sumapaz'da %23.3'e, Oriente'de %19.4'e ve Ubate'de %4'e ulaşmıştır. Gözlenen belirtiler: yaprak bölgesinde, gövdelerde ve meyvelerde kahverengi lekeler ve eşmerkezli halkalar; çiçekte esmerleşme ve lekelenme ve yapraklarda, gövdelerde ve çiçeklerde solma şeklinde ortaya çıkmıştır.

En yüksek varlığa sahip trips türleri *F. occidentalis* olurken, onu *Thrips palmi* ve *Thrips tabaci* izlemiştir. Sonuç olarak, *Emilia sonchifolia* ve *Amaranthus dubius* türlerinin aşı kaynakları ve vektör rezervuarları oldukları belirlenmiştir (Ebratt vd. 2013).

Kenya'daki domates üretim alanlarında yabancı ot türlerinin varlığını ve bunların TSWV ve vektörlerinin konukçusu olarak rollerini belirlemek için bir araştırma yapılmıştır. Seçilen yabancı ot türleri, TSWV'ye tepkileri, *F. occidentalis* tarafından iletim verimliliği ve trips üremesini destekleme yetenekleri açısından ayrıca değerlendirilmiştir. Tarlada tespit edilen 43 yabancı ot türünden 29'unun TSWV'nin konukçusu olduğu rapor edilmiş, ikisinin konukçu olmadığı ve 11'inin durumlarına ilişkin bir kayıt bulunamamıştır. Daha yaygın türler arasında, *Amaranthus hybridus*, *Solanum nigrum*, *Tagetes minuta* ve *Datura stramonium* virüse karşı hassas ve yüksek düzeyde trips üremesini desteklemiştir.

TSWV, mekanik transmisyon testlerinde oldukça duyarlı olmalarına rağmen *F. occidentalis* tarafından *Galinsoga parviflora* ve *Sonchus oleraceus*'a bulaşamamıştır. *F. occidentalis*'in farklı yabancı otlardaki larva sayısı ile beslenme zararı arasında önemli bir ilişki bulunmuştur. Trips üremesini destekleyen ve TSWV'nin iyi konukçuları olan yabancı otların varlığı, epidemiyolojideki rollerinin ve hastalık kontrolü için yönetimlerinin öneminin açık bir göstergesidir (Macharia vd. 2016).

Georgia'da TSWV'nin yer fıstığı, domates, biber ve tütün üretimini sürekli olarak etkilediği bilinmektedir. Bu bitkiler Mart'tan Kasım'a kadar yetiştirilir. Bitkinin olmadığı dönemde, yabancı otların trips ve TSWV için yeşil bir köprü görevi gördüğü varsayılır. Önceki çalışmalar, birkaç kışlık yabancı otu TSWV ve trips konukçuları olarak tanımlamıştır. Ancak, bitkilerde TSWV iletimini etkileme yetenekleri hala tam olarak anlaşılmamıştır. Bu etkileşimleri daha iyi anlamak için, iki yaygın vektörün, yani *F. fusca* (Hinds) ve *F. occidentalis*'in (Pergande) seçilen kışlık yabancı otlar üzerindeki popülasyon dinamikleri, 2004'ten 2008'e kadar dört ilçede Ekim'den Nisan'a kadar izlenmiştir. Mart ayında *F. fusca* ve *F. occidentalis* erginlerine kışlık yabancı otlarda rastlanmış ve yüzdeleri diğer erginlere göre %0 ile %68 arasında değişmiştir (Srinivasan vd. 2018).

Kaliforniya Merkez Vadisinde ekonomik açıdan önemli bir virüs olarak ortaya çıkan TSWV için, 2007'den 2013'e kadar Kaliforniya'nın domates üreten seralarında ve ilgili açık tarlalarda tripslerin popülasyon yoğunlukları ve TSWV insidansı izlenmiştir. Tripsler sarı yapışkan kartlarla ve domatesin çiçeklerinde takip edilmiştir. TSWV insidansı ise virüs belirtileri için indikatör bitkiler ve saha araştırmaları ile değerlendirilmiştir. Domates tarlalarının işlenmesinden tespit edilen tüm tripsler *F. occidentalis* olarak belirlenmiştir ve dişiler yapışkan kartlarda erkeklere göre üç kat daha fazla oldukları ortaya çıkmıştır. Tüm izlenen işleme domates tarlalarında TSWV enfeksiyonu belirtileri gözlenmiştir. TSWV insidansı %1 ila %20 arasında değişmekte olup, en yüksek insidans geç ekilen tarlalarda bulunmuştur. Bu sonuçlara göre ortaya çıkan model, düşük seviyelerde birincil TSWV aşısının erken ekilen domateslerde ve diğer hassas ürünlerde büyütüldüğünü ve daha sonra ekilen tarlalarda, özellikle yüksek trips popülasyonları olanlarda en yüksek enfeksiyon seviyelerine yol açtığını öngörmüştür. Bu bulgulara dayanarak, Kalifornia'da domateslerin işlenmesinde TSWV için entegre bir zararlı yönetimi (IPM) stratejisi tasarlanmıştır (Batuman vd. 2020).

Bu IPM stratejisi, stratejik saha yerleştirme (yüksek riskli durumların belirlenmesi), TSWV ve trips içermeyen transplantların dikilmesi, dirençli çeşitlerin dikilmesi, TSWV belirtilerinin ve tripslerin izlenmesi, erken nesilleri hedefleyen trips yönetimi, sonrasında kapsamlı sanitasyon üzerine odaklanmıştır (Batuman vd. 2020).

2.3. Domateste Sw-5 Geniyle İlgili MAS Çalışmaları

Polonya'da yapılan bir çalışmada 271 primer kullanılarak üç farklı özelliğe sahip domates çeşidinde RAPD analizleri yapılmıştır. Kullanılan 271 primerden 28 tanesi bu bitkilerde sürekli polimorfizm oluşturmuş ve bunların dayanıklılık geniyle ilişkili olduğu test edilmiştir. Dayanıklı ve duyarlı bireylerden oluşturulan F2 bireyine bulk segregant analizi (BSA) uygulanmıştır. Sonuç olarak kullanılan primerlerden 5 tanesi dayanıklı ve duyarlı çeşitler arasında farklılık göstermiştir (Berniak 2016).

Domateste tospoviruslere karşı şimdiye kadar bildirilen en geniş spektrumlu dayanıklılık Sw-5 lokusu tarafından sağlanmaktadır. Bu lokus Sw-5a'dan Sw-5e'ye kadar en az beş homolog gen içermektedir. Bu genlerden Sw-5b asıl dayanıklılık genini temsil etmektedir. Brezilya ve Hollanda iş birliğiyle yapılan bir çalışmada Sw-5a ve Sw-5b gen bölgesini kapsayan bir genom bölgesinde farklı dizilerdeki 7 çift PCR primeri domateste Sw-5 geninin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır (Soler vd. 2003).

Sw5 geninin bitkilerde bir aşırı duyarlılık reaksiyonunu (HR) indüklediği gösterilmiştir. Bu nedenle bitkiler virüsle enfekte olduğunda enfeksiyon lokal nekrotik lezyonlarla sınırlıdır. Bir aşırı duyarlılık reaksiyonunda, virüsle enfekte olan ilk bitki hücreleri hızla ölür ve canlılığını kaybeden hücrelerde virüsde hayatını devam ettiremeyerek ölür. Bu tepki, bitki dokusunun dışından bakıldığında lokal nekrotik bir lezyonla sonuçlanır. Bu yanıt, virüs bitki hücresine girdiğinde başlar. Virüs bitkiye girdiğinde, bitkinin direnç geni (baskın direnç geninin ürünü = direnç geni; R geni) hemen reaksiyona girerek saldırıya uğrayan hücreleri öldürür (Goldbach vd. 2003).

Avustralya'da yapılan bir çalışmada daha önceden geliştirilen ve Sw-5 geniyle bağlantılı olduğu belirlenen CT220 markörüne ek olarak Sw-5b geninin LLR (leucine-rich repeat) motifine spesifik yeni bir markör geliştirilerek domates çeşitlerinin taranmasında kullanılmıştır. Geliştirilen LRR ve CT220 markörlerine spesifik primerler bir arada kullanılarak test edilen bitkilerden LLR için 300 bp CT220 için ise 200 bp büyüklüğünde bantlar çoğaltılarak bitkilerde Sw-5 geninin varlığı belirlenmiştir (Garland vd. 2005).

Çin'de yapılan bir çalışmada, TSWV'ye karşı doğal direnç kaynakları, doğal direnç genlerinin özellikleri, MAS için moleküler belirteçler ve TSWV'ye direnci değerlendirme yöntemleri özetlenmiştir. Çalışmanın amacı ise, direnç genlerinin belirlenmesi, kullanılması ve TSWV'ye dayanıklı domates çeşitlerinin geliştirilmesi için teorik bir temel sağlamaktır. TSWV'ye karşı savunma olarak, domateste Sw-1a, Sw-1b, Sw-2, Sw-3, Sw-4, Sw-5, Sw-6 ve Sw-7 dahil olmak üzere doğal direnç genleri tanımlanmıştır. Ancak, yalnızca Sw-5, TSWV'ye karşı yüksek düzeyde direnç göstermiştir. TSWV'nin küresel yayılması nedeniyle, Sw-5'in neden olduğu direnç zamanla azalır ve yüksek bir TSWV konsantrasyonu ile üstesinden gelinebilir veya kırılabilir. Diğer direnç genlerinin nasıl kullanılacağı ve yeni direnç kaynaklarının nasıl belirleneceği, TSWV'ye dirençli domates yetiştirmek için temel yaklaşımlardır (Jiang vd. 2021).

Son zamanlarda Sw-5 genine sahip domates bitkileri üzerinde TSWV enfeksiyonları gözlemlenmiştir. Virüsün L segmentinde RdRp bölgesine ait genomik bilgiler, Asya ve Amerika'ya ait izolatlar ile karşılaştırılarak meydana gelen değişimler ifade edilmeye çalışılmıştır (Pappu vd. 2009). Bu tarz çalışmaların amacı; TSWV gibi meyve verimi ve kalitesini olumsuz etkileyen bir virüsün genomunda meydana gelen değişikliğin anlaşılması ile hastalığa karşı yeni dayanıklılık kaynaklarının üretilmesidir. Bu başarıya ulaşıldığı takdirde, ülkemizde en çok tüketilen gıda maddelerinden olan domates ve biberin TSWV'ye dayanıklı hale gelmesi önemli bir adım olacaktır. TSWV'nin Sw-5 direncini kıran izolatları, hasat dönemine kadar gizli kalabileceğinden üretim alanlarında büyük sorun oluşturmaktadır. Bu durum nedeniyle dönem boyunca serada varlığını koruyarak yeni enfeksiyon kaynağı olabilmektedir. Üreticiler verim ve zaman kaybı açısından olumsuz etkilenebilmektedir (Fidan vd. 2021).

Tospovirüsler ile mücadelede en etkili ve çevre dostu yöntem dayanıklı çeşit kullanımıdır. Antalya da domates ekim alanlarında tespit edilen Sw-5 direncini kıran izolatlar nedeniyle TSWV'ye dayanıklı yeni domates genetik kaynakları geliştirmek amacıyla bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada 15 hat, 9 ticari çeşit ve 16 yabancı genotip olmak üzere toplam 40 domates materyali moleküler ve biyolojik test yöntemleri ile test edilmiştir. Biyolojik testler için mekanik inokulasyon yöntemi, moleküler analizlerde ise SCAR markörü kullanılmıştır. Sonuç olarak *Solanum penellii*, *S. chmielewski*, *S. habrochaites*, *S. peruvianum* ve *S. sitiens*, LA0716, LA1028, LA1777, LA2744 ve LA4110 genotiplerinin, gelecekte domateste yapılacak ıslah çalışmaları için iyi bir direnç kaynağı oldukları ortaya konulmuştur (Kabaş vd. 2021).

2.4. Biberde Tsw Geniyle İlgili MAS Çalışmaları

TSWV'ye karşı dayanıklılık çalışmalarında biberin yabancı akrabalarından olan *Capsicum chinense* Jacq. türünden geliştirilen PI152225, PI159236 ve 7204 no'lu genotipler ıslah programlarında dayanıklılık kaynağı olarak kullanılmaktadır. TSWV'nin kalıtımından sorumlu Tsw geni ile ilgili yapılan çalışmalar Tsw geninin *C. chinense* hatlarının (PI152225, PI159236 ve 7204) aynı lokusları üzerinde bulunduğunu göstermiştir. Dayanıklılığı sağlayan dominant özellikteki bu gen, yabancı akraba türler ile hassas kültür çeşitleri arasında yapılan melezlemelerle kültür bitkilerine aktarılmaktadır. Moury vd. (2000) *Capsicum chinense* PI 152225 x *Capsicum frutescens* PI 195301 türler arası melez popülasyonunu kullanarak Tsw genine bağlı dört adet RAPD markırı tespit etmişlerdir. Bu markır, moleküler ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere spesifik co-dominant CAPS markırına (SCAC568) çevrilmiş olup günümüzde Tsw geninin tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Geliştirilen CAPS markırı ülkemizde de biber ıslah programlarında kullanılarak TSWV'ye dayanıklı sivri ve çarliston tipte hibrit biber geliştirilmiştir (Çelik vd. 2018).

TSWV enfeksiyonuna duyarlı bitkilerin başında domates, biber, marul, patates, papaya, yer fıstığı ve tütün gelmektedir. Hastalık etmeni *Capsicum* spp'de dünya genelinde ciddi zararlara yol açmıştır (Momol vd. 2004). Örneğin İtalya'da *Capsicum annuum* türü hem tarlalarda hem de seralarda artan kayıplara maruz kalmıştır (Roggero vd. 2002). TSWV ve diğer tospovirüslerin artan sorunu, geleneksel veya geleneksel olmayan yöntemler kullanılarak genetik direnç kaynaklarının araştırılmasını teşvik etmiştir. Biberlerde Tsw adı verilen baskın bir gen tarafından taşınan direnç, yüksek sıcaklıklarda kırılır ve genç bitkiler daha hassastırlar. Tsw geni, iyi agronomik performansa sahip birkaç ticari tatlı ve acı biber çeşidine dahil edilmiştir. Dayanıklı bitkileri sistemik olarak enfekte eden TSWV'nin dayanıklılığı kıran izolatları, deneysel koşullar altında ve tarlada bulunmuştur. *Capsicum*'da dayanıklılık araştırması için gelecekteki yönler ve bitkilerde tospovirüslere karşı dayanıklılığın yönetimi hala tartışılmaktadır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Test bitkileri

Çalışmada, 2019-2021 yılları arasında yapılan sörveylerde TSWV'nin doğal konukçularını belirlemek amacıyla farklı familyalara ait örnek bitkiler toplanmıştır. Bitki materyallerini, TSWV ile enfekteli olma olasılığı taşıyan, yani virüs için şüpheli belirtiler gösteren veya sağlıklı görünümlü kültür bitkileri ve yabancı otlar oluşturmuştur. Toplanan örnekler buz kutusu içinde soğuk zincir ile laboratuvara getirilmiştir. Domates ve biber bitkilerinin meyve ve yaprak örnekleri ile yabancı otların yaprak ve çiçek örnekleri test çalışmalarında kullanılmıştır. Toplanan örnekler testleninceye kadar kısa süre için $+4^{\circ}\text{C}$ de saklanırken tüm örneklerin birer kısmı alüminyum folyoya sarılarak olası ikinci testlemelerde kullanılmak üzere -20°C 'de muhafaza altına alınarak yedekleme yapılmıştır. Bitki ekstraktlarının elde edilmesinde porselen havan ve havaneli kullanılmıştır (Şekil 3.1). Örneklerin hazırlanması işlemlerinde hassas terazi, vorteks cihazı, cam ve plastik malzemeler kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Bitki örneklerinin kodlanması ve hazırlanması

3.1.2. Antiserum

Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV)'ne spesifik antiserum Bioreba firmasından (BIOREBA AG Chr. Merian-Ring 7 CH-4153 Reinach BL 1 İsviçre) kit olarak temin edilmiştir (Şekil 3.2). Sonuçların değerlendirilmesinde 405 nm de ölçüm yapan ELISA-reader (Tecan Tradinding AG, İsviçre) kullanılmıştır. Çalışmalarda 96 çukurlu polystrene ve U tabanlı Agdia marka ELISA plateleri kullanılmıştır. Ayrıca testlerde muhtelif tampon çözeltiler kullanılmış ve bu tampon çözeltilerinin hazırlanışı EK. 1' de verilmiştir.



Şekil 3.2. ELISA da kullanılan tanılama kiti

3.1.3. ELISA plateleri

Çalışmada 96 çukurlu polystrene maddeden yapılmış olan ve U tabanlı agdia marka (Kolombiya) ELISA plateleri kullanılmıştır.

3.1.4. Moleküler çalışmalarda kullanılan kit ve primerler

Molekuler çalışmalarda Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD) firmasından temin edilen Verso One-Step RT-PCR Kit ReddyMix (Çizelge 3.1) ve virüsün medium bölgesindeki mutasyon bölgesine özgü tasarlanmış olan yeni primer çiftleri kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Primerler Nanogen (Türkiye) firması tarafından sentezlenmiştir. Klasik RT-PCR çalışmaları için BIO-RAD firmasının T¹⁰⁰ Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır. Ürünlerin jel üzerinde görüntüsünün elde edilmesi için agaroz (Sigma), 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific firmasının yatay jel elektroforez cihazı, Consort E 861 güç kaynağı, Barnsteadlab-line e-class çalkalayıcı, etidium bromide ve jel görüntüleme için ise BioDocAnalyze firmasının Biometra cihazı kullanılmıştır. qRT-PCR çalışmalarında Real-Time PCR Tespit Sisteminde (Applied Biosystems) Luna Universal One-Step RT-qPCR Kiti kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. RT-PCR çalışmasında kullanılan kitin içerikleri

İçerik	Hacim µL	Son Konsantrasyon
Verso Enzim Mix	0.25	
2X-1- Step PCR ReddMix*	7.5	1X
RT Enhanser	0.75	
Forwrd primer (10)	1	200 nM
Reverse primer (10)	1	200 nM
(RNA)	1-2	1 ng
ddH2o	3.5	
Toplam	15	

Çizelge 3.2. RT-PCR çalışmalarında kullanılan primerlere ait bilgiler

Virüs	Primer İsmi	Primer Dizilimi	Ürün boyu (bp)	Annealing (°C)	Referans
TSWV	L2TSWVF	5'-AATTGCCTTGCAACCAATTC-3'	276	52	Fidan ve Sarı (2019)
	L1TSWVR	5'-ATCAGTCGAAATGGTCGGCA-3'			
TSWV	TSWVF1	5'- TAACCAAAGCCATGGACGCA-3'	374	54	Bu çalışmada mutasyon belirleme primeri
	TSWVR1	5'-TGTCCCTTGACCCTTCAGGA-3'			
TSWV	TSWVF2	5'- GCCGGAAGGATGAAGGTCC-3'	293	54	Bu çalışmada mutasyon belirleme primeri
	TSWVR1	5'-TGTCCCTTGACCCTTCAGGA-3'			

3.2. Metot

3.2.1. Sörvey çalışmalarının yapıldığı alanlar

Antalya İl Tarım ve Orman Müdürlüğü'nden alınan veriler, Zirai ilaç bayileri ve çiftçilerle yapılan anketler sonucunda yoğun olarak TSWV ile bulaşık olduğu saptanan biri Serik ilçesi diğer Elmalı ilçesinde olmak üzere iki adet domates ve biber serası çalışma alanı olarak seçilmiştir (Şekil 3.3). (Konumlar–Serik (A) (Enlem: **36.917**, Boylam: **31.1** 36°55' 1" Kuzey, 31°6' 0" Doğu, Rakım: 28 m, İklim: Akdeniz iklimi) ve Elmalı (B) (Enlem: **36.7339**, Boylam: **29.9174** 36°44' 2" Kuzey, 29°55' 3" Doğu, Rakım: 1.066 m, İklim: Akdeniz iklimi) Antalya il sınırları içerisinde yer almaktadır).

**Şekil 3.3.** Antalya ilinde örnekleme yapılan ilçeler

3.2.2. Sörvey takvimi

Ülkemizde örtüaltı yetiştiriciliği Türkiye’de özellikle Antalya’da iklimin uygun olduğu sahil kuşağında son derece gelişmiştir. Bu nedenle Antalya’nın Serik ilçesinin Çakallık köyünde yer alan ve yoğun TSWV bulaşıklılığı görülen bir biber serası sörvey alanı olarak seçilmiştir. Sera demir iskelet üzerine saydam plastik örtülerden yapılmıştır ve yan havalandırmalarda böcek neti kullanılmıştır. Sadece dondan korumaya yönelik ısıtmanın yapıldığı serada topraklı yetiştiricilik yapılmakta ve çift ürün şeklinde biber ve karpuz yetiştirilmektedir. Serik ilçesinde genel itibarıyla fideler Ekim ayında dikilmekte ve iki sezon boyunca üretim devam ederek ikinci hasat Mart ayının sonlarına doğru gerçekleşmektedir. Bahar döneminde ara ürün olarak ta karpuz yetiştiriciliği yapılmakta ve takiben Temmuz–Ağustos ayları arasında fungal ve bakteriyel hastalıklar, nematodlar ve yabancı otlar için müacdele amacıyla solarizasyon uygulaması yapılmaktadır.

Çalışmada seçilen ikinci alan (sera) Elmalı ilçesinde deniz seviyesinden yüksekliği 1050-1150 metre arasında değişen bölgeden seçilmiştir. Elmalı ilçesinin denize yaklaşık 40 km mesafede ve yüksek yayla olması yanında rakım göz önüne alınınca, ısı ortalamasındaki sahil yayla etkileşmesi açıkça görülmektedir. İlçe konumu itibarıyla Serik ilçesinin aksine farklı iklim koşullarına sahip olup yayla yetiştiriciliğine ağırlık verilmektedir. Bölgede sebzeler bahar döneminde dikilmekte ve hasat Kasım ayının ortalarına kadar devam etmektedir. Serik ilçesinde üretimde ağırlıklı olarak yeşilbiber, domates, karpuz; soğan ve turpgiller gibi kışlık sebzeler yetiştirilmekte, buna karşılık Elmalı ilçesinde, yayla tipi domates, biber ve kabakgiller yetiştiriciliği ağırlık kazanmaktadır.

Çalışmanın başlangıcında iklim koşulları ve yetiştiricilik sezonuna göre her iki ilçe için sörvey zamanları ayrı ayrı planlanmış, Ekim ve Mart ayları arasında Serik ilçesine yoğunluk verilirken, Nisan-Eylül aylarında (bahar ve yaz dönemi) daha çok Elmalı bölgesinde sörvey çalışmaları yürütülmüştür. Arazi çalışmaları, özellikle ana ürünün hasatını takip eden dönemlere denk gelecek şekilde yürütülmüştür.

3.2.3. TSWV’nin kültür bitkileri üzerinde örneklenmesi ve saha tespiti

Sörveylerde daha önce TSWV için domates ve biberlerde belirlenmiş karakteristik belirtiler (Şekil 3.4, 3.5) veya bu belirtilere benzer belirtiler gösteren domates ve biber bitkileri ile yabancı otlardan 2-3 yaprak ve meyve örnekleri alınmıştır. Örneklem, arazide çapraz şekilde gidilerek yapılmış, toplanan örnekler etiketlenerek, poşetlenmiş ve buz kutusu içinde laboratuvara getirilmiştir. Çalışmalar hem sera hem de laboratuvar koşullarında yürütülmüştür.



Şekil 3.4. Domateslerde TSWV için verilen ve sörvey çalışmalarında aranan karakteristik belirtiler



Şekil 3.5. Biberlerde TSWV için verilen ve sörvey çalışmalarında aranan karakteristik belirtiler

3.2.4.Yabancı ot örneklerinin toplanması

Antalya'nın sera alanlarında kışlık yabancı otların TSWV etmenine ait vektör böceklerin rezervuarları olarak hizmet etme kabiliyetlerini daha iyi anlamak için, 24 ay boyunca düzenli aralıklarla iki ayrı iklimde (sahil kesim ve yüksek kesim) bir domates ve bir biber serası gözlem altına alınmıştır. Örnekleme hem açık alanlarda hem de seralarda/korunan ortamlarda yapılmıştır (Şekli 3.6). Yabancı otların toplanmasında herhangi bir belirti aranmamıştır. Yabancı otlar sökülmeden önce tek tek fotoğrafları çekilmiş olup her biri için kodlama yapılmıştır.

Toplanan örnekler morfolojik tanımlamanın ardından viroloji laboratuvarında önce serolojik, takiben moleküler testlemelere tabi tutulmuştur (Çizelge 3.3). Çalışmalar yılın her döneminde (üretim sezonu boyunca ve özellikle hasat sonrasında ana konukçunun yokluğunda) yaz-kış devam etmiştir (Şekil 3.7).

Çizelge 3.3. Toplanan bitki materyallerine ait bilgiler

İlçe/Köy	Sera Büyüklüğü (da)	Bitki Türü	Örnek Sayısı	İlçe /Köy	Sera Büyüklüğü (da)	Bitki Türü	Örnek Sayısı	TOPLAM ÖRNEK
Serik Çakallık	2.5	Biber	25	Elmalı Gölova	2	Biber	33	58
		Domates	13			Domates	21	34
		Diğer (*)	11			Diğer (*)	9	20
		Yabancı ot	185			Yabancı ot	85	270
		TOPLAM	234			TOPLAM	148	
GENEL TOPLAM							382	

*Diğer: Seralarda taze tüketim için yetiştirilen bazı sebzeler



Şekil 3.6. Seraların içinden ve dışından yabancı otların toplanması



Şekil 3.7. Tek yıllık, çok yıllık, yazlık ve kışlık yabancı otların toplanması

Yabancı otların çeşitli yaşam döngüleri olmasından dolayı aynı anda birçok farklı türde yabancı ot bulmak zordur, bu nedenle, sörvey çalışmaları yalnızca belirli bir zamanda değil, yılın her döneminde yürütülmüş ve tekrar tekrar aynı seradan örnekler alınmasına dikkat edilmiştir. Ayrıca kış aylarında ısınmaya bağlı olarak tespit edilebilecek yabancı ot türleri değişebileceğinden daha çok açık alanda, örnekleme yapılmış, Şekil 3.8’de çalışmadan görüntüler verilmiştir.

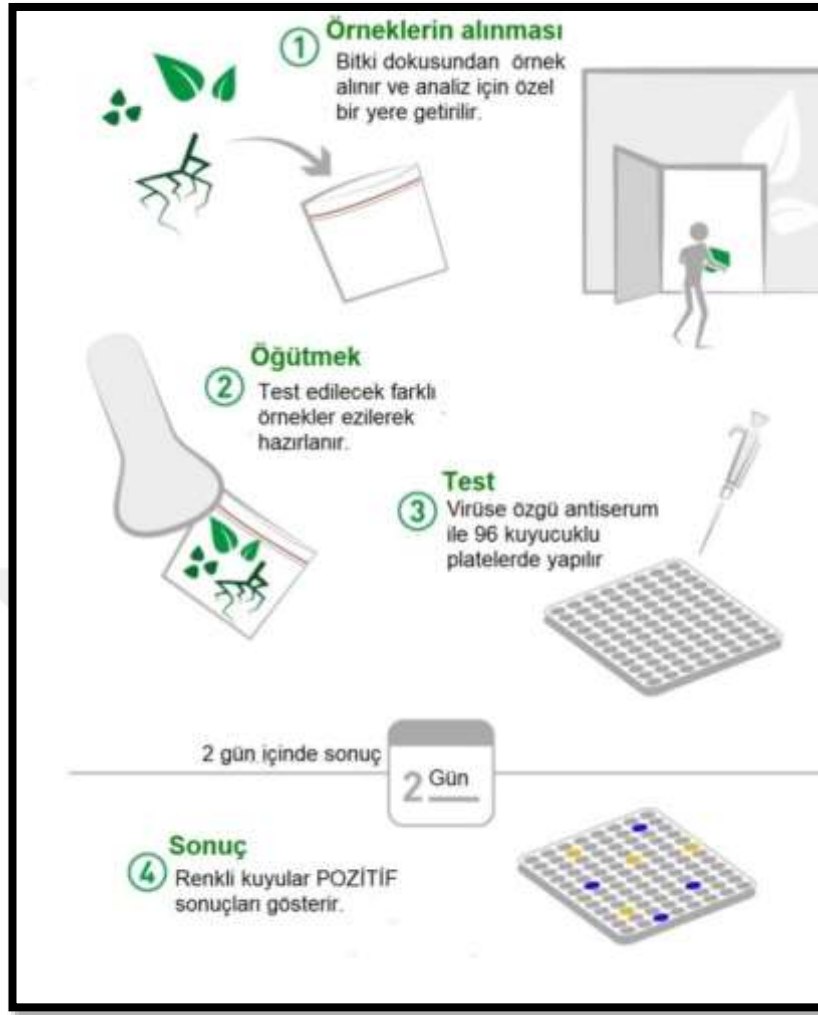




Şekil 3.8. Seraların etrafında yetişen diğer bitkiler ve yakınlarında bulunan yabancı otların toplanması çalışmaları

3.2.5. DAS-ELISA testleri

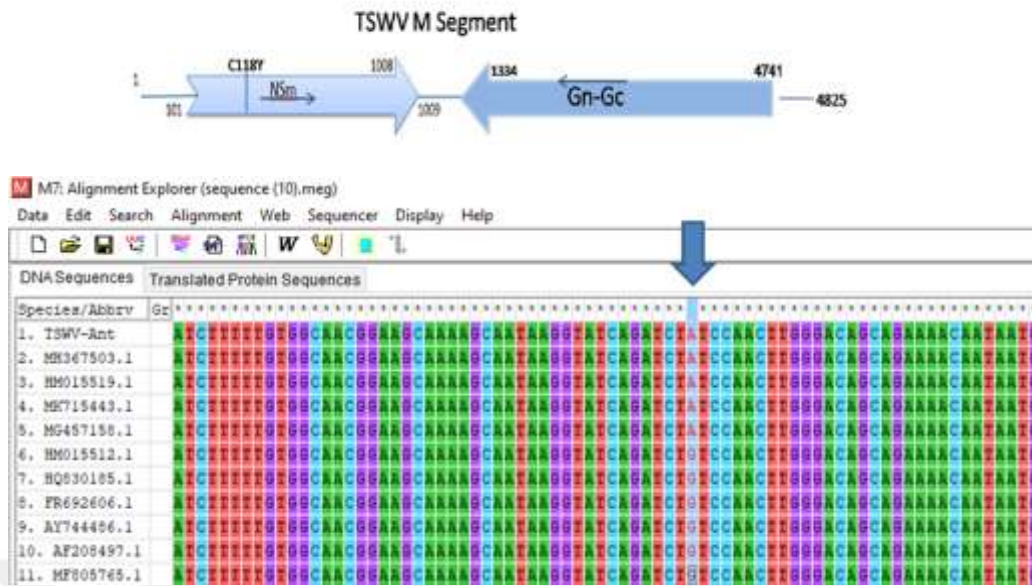
DAS-ELISA testi çalışmaları, Clark ve Adams (1977) tarafından bildirilen yöntemle göre ve firmanın belirttiği protokol dikkate alınarak uygulanmıştır (Şekil 3.9). Toplanan tüm örnekler ticari TSWV DAS-ELISA teşhis kiti (Bioreba Co. Reinach, İsviçre) ile testlenmiştir. DAS-ELISA yöntemi gereğince yaprak özleri fosfat tamponlu tuzlu su içinde hazırlanmıştır. Absorbans değerleri, bir substrat eklendikten 30 ve 50 dakika sonra bir ELISA-reader kullanılarak 405 nm'de ölçülmüştür. Negatif kontrolün en az üç katı değer gösteren tüm örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir. DAS-ELISA testinde izlenen basamaklar Ek. 2'de özetlenmiştir.



Şekil 3.9. ELISA aşamalarını özetleyen şema; (https://www.agdia-emea.com/wp-content/uploads/2014/10/1409_agdia_infographie_kitelisa_en.jpg)

3.2.6. Primerlerin tasarımı

TSWV genomuna ait NSm proteini üzerindeki C118Y noktası dayanıklılığın kırılmasında spesifik bir nokta olduğu bilinmektedir. Dayanıklılığı kıran TSWV izolatlarının dizileme karşılaştırmaları sonucunda; virüsün bu yeteneğinin, 118 (C118Y) pozisyonundaki C aminoasitinin Y aminoasitlerine ve 120 (T120N) pozisyonundaki T aminoasitinin N aminoasitlerine değişiminden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Padmanabhan vd. 2019). Bu bilgilere dayanarak primerlerin tasarımı için NCBI dan seçilen 10 tane dayanıklılığı kıran izolat (Resistance Breaking) ve 10 tane dayanıklılığı kırmayan (Non-Resistance Breaking) izolatın medium segmentindeki 118. aminoasit mutasyon bölgesinin 100 baz çift ileri ve gerisine odaklanılmış ve Primer3 programı yardımıyla tasarlanmıştır. Seçilen sekans verilerin analizinde Mega7 programı kullanılmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. NCBI dan seçilen dayanıklılığı kıran ve kırmayan izolatlara ait sekans bilgileri. Mavi ok medium segmentindeki 118. aminoasit mutasyon bölgesini göstermektedir

3.2.7. TSWV'nin örneklerde moleküler olarak belirlenmesi

TSWV'nin varlığını moleküler yöntemler ile saptayabilmek için önce Total nükleik asit izolasyonu Dellaporta yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Presting vd. 1995). Total nükleik asit EK. 3'te tarif edildiği gibi, farklı bitkilerden farklı organlar (yaprak, meyve, sap, çiçek) kullanılarak ekstrakte edilmiştir (Kullanılan kimyasalların içeriği Ek. 4'tte verilmiştir).

Elde edilen RNA'lar spektrofotometrede ölçülerek (A260/280 1,8-2,0) konsantrasyonları 200 ng/μL olacak şekilde ayarlanmıştır. RNA optimizasyonu yapıldıktan sonra Thermo Fisher Scientific Verso 1-Step RT-PCR Kit ReddyMix kullanılarak tek aşamalı RT-PCR çalışmaları yürütülmüştür. RT-PCR yönteminde TSWV için dizayn edilmiş spesifik primerler kullanılmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. RT-PCR çalışmalarında kullanılan protokol

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
Ön Denaturasyon	50	15	1 cDNA yapımı
	95	2	
Denaturasyon	95	45 Saniye	38
Bağlanma	52-54		
Uzama	72		
Son uzama	72	7	1

Elde edilen RT-PCR ürünleri %1,5 lik agaroz jel de yürütülmüş, ethidium bromide ile boyandıktan sonra Biometra jel görüntüleme cihazında UV altında bantların durumu görüntülenmiştir.

Sanger metodu ile mutasyon bölgesinin dizi analizi aşamasında TSWV'nin medium segmentine özgü primerler kullanılarak yapılan RT-PCR ürünleri (13 farklı yabancı ot ve Isparta'dan temin edilen dayanıklılığı kırmayan izolat) hizmet alımı yoluyla doğrudan sekans belirlenmesi amacıyla Nanogen firmasına gönderilmiştir. Bu aşamada 50 µl hacim ile çalışılmış, doğrulamak amacıyla 10 µl'lik hacim jelde yürütülmüş ve geriye kalan 40 µl'lik ürün ise sekans analizi için gönderilmiştir. Firmadan gelen analiz sonuçları ile ilgili sekans verileri Mega7 (Kumar vd. 1994) programı kullanılarak düzenlenmiştir.

3.2.8. Kantitatif RT-PCR (qRT-PCR) çalışmaları

Antalya ilinin sörvey alanlarından toplanan ve farklı yabancı ot türlerinden elde edilen TSWV izolatlarının dayanıklılığını kıran izolat olup olmadığını anlamak için, dayanıklılığı kırmayan eski izolat temin edilmiştir (Prof. Dr. Bayram ÇEVİK, Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi). Söz konusu izolatın optimizasyonu yapıldıktan sonra çalışmada belirlenmiş izolatlar ile birlikte Melt-Curve analizi gerçekleştirilmiş ve izolatlar karşılaştırılmıştır. Dayanıklılığı kırmayan eski izolat ve yabancı ot ile farklı kültür bitkilerinden ekstrakte edilen TSWV izolatlarının 13 tanesi için negatif kontrol dahil edilerek toplam 14 örnek için Yüksek Çözünürlüklü Erime (High Resolution Melting) (HRM) analizi yapılmıştır. NEB Luna Universal Tek Adımlı RT-qPCR Kiti (Şekil 3.11), kullanılarak enfekteli bitkilerden ekstrakte edilen RNA'lar Real-time çalışması için optimize edilmiştir.



Şekil 3.11. NEB Luna Universal Tek Adımlı RT-qPCR Kiti, örneklerin hazırlanması ve cihaza yerleştirilmesi

Optimizasyon için tüm örnekler aynı konsantrasyon değerine gelecek şekilde ddH₂O eklenerek seyreltilmiş olup qRT-PCR aşamasında kullanılan kitin içeriği ve çalışma protokolü Çizelge 3.5 ve 3.6'da verilmiştir.

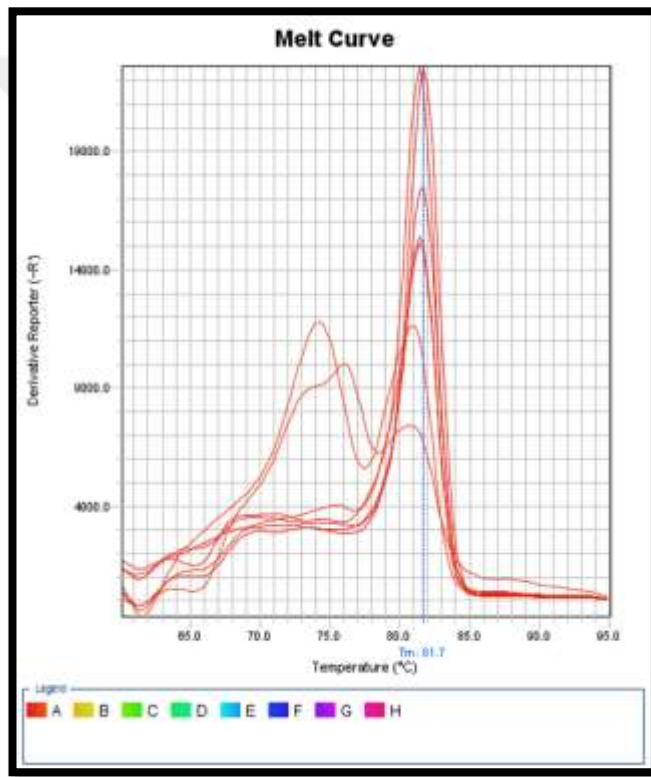
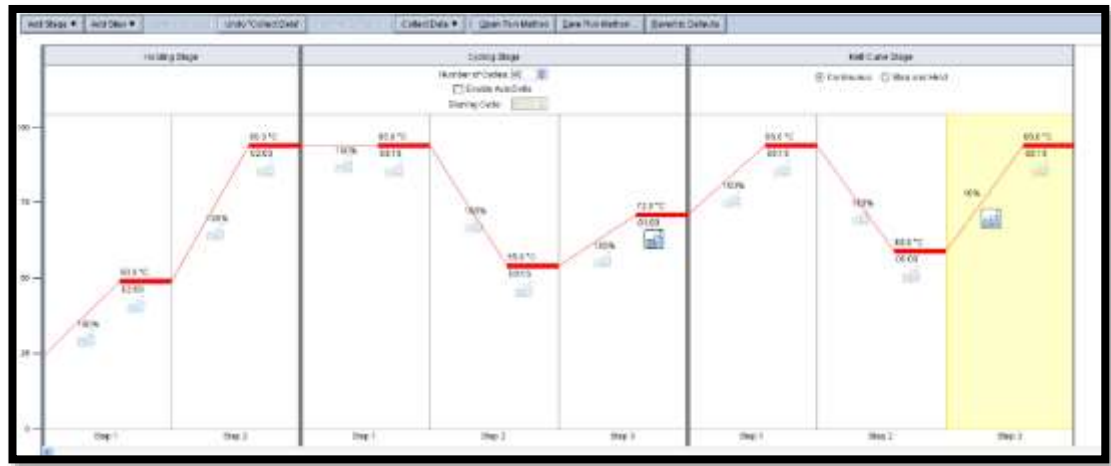
Çizelge 3.5. qRT-PCR çalışmasında kullanılan kitin içerikleri

İçerik	Hacim μ L	Son Konsantrasyon
Luna Universal One-Step Reaction Mix (2X)	10	1X
Luna WarmStart® RT Enzyme Mix (20X)	1	1X
Forwrd primer (10 μ M)	0.8	0.4 μ M
Reverse primer (10 μ M)	0.8	0.4 μ M
Kalıp RNA	1-2	En az 1 μ g
Nuclease-free Water	5.4	

Çizelge.3.6. qRT-PCR çalışmasında kullanılan protokol

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
Reverse Transkripsiyon Ön Denaturasyon	55	10	1 cDNA yapımı 1
	95	1	
Denaturasyon	95	10 saniye	40-45
Uzama	60	30 saniye	
Melt Curve	60-95	15-60 saniye	1

Melt-Curve aşamasında farklı pik veren RB ve NRB izolatlarının HRM sonucunu doğrulamak amacıyla Sanger metodu kullanılarak sekanslama işlemleri yapılmış ve gerekli kontroller sağlanmıştır. Real-Time PCR cihazının değerlerine bakılarak, ortaya çıkan Sıcaklık-Değişimli Fark Eğrilerine göre allellerin tespiti ve ayırt edilmesi işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ile izolatlarda medium segmentinde mutasyon gerçekleşip gerçekleşmediği incelenmiştir. Son 20 μ l hacimde üreticinin önerdiği standart bir protokole, 60 °C'lik annealing sıcaklığında test edilmiş ve çoğaltma eğrileri elde edilmiştir (Şekil 3.12). Sıcaklık kaydırma çubuğu yüksekliği 0,20 °C'ye ayarlanmış ve daha homozigot kümeler elde edilmiştir. Yazılımın farklı küme olarak adlandırılacağı örnekler arasında en düşük T_m farkını belirleyen erime sıcaklığı fark eşiği (T_m), küme saptaması için 0.25 °C'ye ayarlanmıştır.



Şekil 3.12. Melt-Curve aşamasında testlenen örneklere ait pik görünümü ve sıcaklık değerleri

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Sörvey Çalışmalarında Toplanan Bitki Örnekleri

Antalya ilinde 2019-2021 yılları arasında, TSWV'nin doğal konukçularını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen sörveylerde, 270 adet yabancı ot ve çeşitli sebzelerden 112 adet olmak üzere toplam 382 bitki örneği toplanmıştır. Sörvey çalışmaları TSWV'nin yoğun olarak görüldüğü bir domates ve bir biber serasında yürütülmüştür. Toplanan yabancı otlara ait bilgiler Çizelge 4.1 ve 4.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. TSWV enfeksiyonu açısından testlenen yabancı otlar

Familiya	Latince Adı	Türkçe Adı	Toplanan örnek sayısı
Amaranthaceae	<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	Horozibiği	3
	<i>Amaranthus chlorostachys</i> WILLD.	Tilkikuyruğu	13
	<i>Chenopodium album</i> L.	Sirken	17
Caryophyllaceae	<i>Cerastium dichotomum</i> L.	Serçe dili	3
	<i>Stellaria media</i>	Kuş otu	8
	<i>Spinacia oleracea</i>	Ispanak	3
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia helioscopia</i> L.	Güneş sütlegeni	4
Asteraceae	<i>Conyza canadensis</i>	Kanada şifa otu	8
	<i>Lactuca serriola</i> L.	Dikenli yabancı marul	16
	<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Hakiki papatya	4
	<i>Senecio vulgaris</i> L.	Adi kanarya otu	2
	<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill.	Dikenli eşek marulu	22
	<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Adi eşek marulu	13
	<i>Xanthium strumarium</i> L.	Domuz pıtrağı	2
	<i>Calendula officinalis</i>	Aynisefa	1
	<i>Silybum marianum</i>	Devedikeni	1
	<i>Cirsium arvense</i> (L.) SCOP.	Köygöçerten	2
	<i>Tagetes patula</i>	Kadife çiçeği	2
	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Çobançantası	10
	<i>Raphanus</i> spp.	Yabancı turp	1
Cyperaceae	<i>Cyperus rotundus</i> L.	Topalak	14
	<i>Cyperus</i> spp.		2
Fabaceae	<i>Medicago minima</i> (L.) Bartal	Yoncacık	3
	<i>Medicago</i> sp.	Karayonca	5
Malvaceae	<i>Malva parviflora</i> L.	Ebegümeci	17
Poaceae	<i>Sorghum halepense</i> L.	Kanyaş	9
	<i>Digitaria sanguinalis</i> L.	Çatal otu	5
Lamiaceae	<i>Ocimum basilicum</i>	Fesleğen	3
	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Kekik	1
Portulacaceae	<i>Portulaca oleracea</i> L.	Semizotu	20
Solanaceae	<i>Datura stramonium</i>	Şeytan elması	13
	<i>Solanum nigrum</i> L.	Köpek üzümü	15
Rubiaceae	<i>Galium aparine</i> L.	Yoğurt otu	1
Urticaceae	<i>Urtica dioica</i>	Isırgan otu	2
Convulvulaceae	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	Tarla sarmaşığı	9
Zygophyllaceae	<i>Tribulus terrestris</i>	Demir diken	3
Polygonaceae	<i>Polygonum aviculare</i>	Çobandeğneği	10
	<i>Rumex</i> spp.	Kuzukulağı	1
Plantaginaceae	<i>Veronica hederifolia</i>	Adi yavşan otu	2
	Toplam		270

Çizelge 4.2. Toplanan yabancı otların iki farklı lokasyona göre sıralanması

Serik-Çakallık (Sahil keim)	Elmalı-Gölova (Yaylı kesim)
<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	<i>Amaranthus chlorostachys</i> WILLD.
<i>Chenopodium album</i> L.	<i>Chenopodium album</i> L.
<i>Euphorbia helioscopia</i> L.	<i>Euphorbia helioscopia</i> L.
<i>Stellaria media</i>	<i>Lactuca serriola</i> L.
<i>Cerastium dichotomum</i> L.	<i>Matricaria chamomilla</i> L.
<i>Conyza canadensis</i>	<i>Senecio vulgaris</i> L.
<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill.	<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill.
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	<i>Sonchus oleraceus</i> L.
<i>Xanthium strumarium</i> L.	<i>Xanthium strumarium</i> L.
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	<i>Capsella bursa-pastoris</i>
<i>Cyperus rotundus</i> L.	<i>Cyperus rotundus</i> L.
<i>Cyperus</i> spp.	<i>Cirsium arvense</i> (L.) SCOP.
<i>Medicago minima</i> (L.) Bartal	<i>Tagetes patula</i>
<i>Medicago</i> sp.	<i>Calendula officinalis</i>
<i>Malva parviflora</i> L.	<i>Malva parviflora</i> L.
<i>Sorghum halepense</i> L	<i>Sorghum halepense</i> L
<i>Digitaria sanguinalis</i> L.	<i>Veronica hederifolia</i>
<i>Portulaca oleraceae</i> L	<i>Portulaca oleraceae</i> L
<i>Solanum nigrum</i> L.	<i>Solanum nigrum</i> L.
<i>Galium aparine</i> L.	<i>Raphanus</i> spp.
<i>Urtica dioica</i>	<i>Datura stramonium</i>
<i>Convolvulus arvensis</i> L.	<i>Convolvulus arvensis</i> L.
<i>Tribulus terrestris</i>	<i>Silybum marianum</i>
<i>Polygonum aviculare</i>	<i>Polygonum aviculare</i>
<i>Urtica dioica</i>	<i>Rumex</i> spp.

*Gri renk ile vurgulanan türler her iki lokasyonda bulunan ortak türlerdir (Toplamda 13 ortak tür tespit edilmiştir)

Örnekleme çalışmaları hem seraların içinden hem de etrafından yapılmış olup, toplanan örneklerin seçilmesinde herhangi bir belirti varlığına bakılmaksızın hem belirti gösteren hem de herhangi bir belirti göstermeyen bitkilerden örnekler seçilerek alınmıştır. Toplamda 18 bitki familyasına ait 39 farklı yabancı ot türü tanımlanmıştır. Çalışma boyunca örnek olarak toplanan yabancı otların tür teşhisleri Akdeniz Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü öğretim üyesi Sn. Dr. Öğr. Üyesi Yasin Emre KİTİŞ tarafından yapılmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Tür teşhisi yapılan yabancı otlara ait bilgiler

	Bitki Türü	Örnek Sayısı	Simptom		Bitki Türü	Örnek Sayısı	Simptom
1	<i>Amaranthus retroflexus</i>	3	-	21	<i>Cyperus rotundus</i>	14	-
2	<i>Amaranthus chlorostachys</i>	13	+	22	<i>Cyperus nitidus</i>	2	-
3	<i>Chenopodium album</i>	17	-	23	<i>Medicago minima</i>	3	-
4	<i>Cerastium dichotomum</i>	3	-	24	<i>Medicago sp.</i>	5	-
5	<i>Stellaria media</i>	8	-	25	<i>Malva parviflora</i>	17	-
6	<i>Spinacia oleracea</i>	3	-	26	<i>Sorghum halepense</i>	9	-
7	<i>Euphorbia helioscopia</i>	4	-	27	<i>Digitaria sanguinalis</i>	5	-
8	<i>Conyza canadensis</i>	8	+	28	<i>Ocimum basilicum</i>	3	-
9	<i>Lactuca serriola</i>	16	+	29	<i>Thymus vulgaris</i>	1	-
10	<i>Matricaria chamomilla</i>	4	-	30	<i>Portulaca oleraceae</i>	20	-
11	<i>Senecio vulgaris</i>	2	+	31	<i>Datura stramonium</i>	13	-
12	<i>Sonchus asper</i>	22	+	32	<i>Solanum nigrum</i>	15	+
13	<i>Sonchus oleraceus</i>	13	-	33	<i>Galium aparine</i>	1	-
14	<i>Xanthium strumarium</i>	2	-	34	<i>Urtica dioica</i>	2	-
15	<i>Calendula officinalis</i>	1	-	35	<i>Convolvulus arvensis</i>	9	-
16	<i>Silybum marianum</i>	1	-	36	<i>Tribulus terrestris</i>	3	-
17	<i>Cirsium arvense</i>	2	+	37	<i>Polygonum aviculare</i>	10	-
18	<i>Tagetes patula</i>	2	-	38	<i>Rumex spp.</i>	1	-
19	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	10	-	39	<i>Veronica hederifolia</i>	2	+
20	<i>Raphanus spp.</i>	1	+				
Toplam 39 farklı bitki türünden 270 adet örnekleme yapılmıştır. Farklı 9 bitki türünde symptom görülmüştür.							

4.2. Sörvey Çalışmalarında Seralarda Enfekteli Bitkilerde Görülen TSWV Belirtileri

Yürütülen sörvey çalışmalarında TSWV'nin ana konukçuları olarak bilinen domates, biber ve marul gibi kültür bitkilerinde virüsün tipik belirtileri gözlemlenmiş ve %75-100 arasında yüksek oranlarda TSWV enfeksiyonları saptanmıştır (Şekil 4.1, 4.2). Bu belirtiler genel bir solgunluk görüntüsünün yanı sıra yapraklarda değişen şiddetlerde mozaik şeklinde renk değişimleri ve meyvelerde içiçe geçmiş halkalı lekeler, yabancı otlarda ise yapraklarda hafif mozaik, nekrotik beneklenmeler ve tripslerin beslenme zararı dışında herhangi bir TSWV belirtisine rastlanmamıştır.

TSWV ile bulaşık olduğu belirlenen bitkiler ve sağlıklı görünümdeki bitkiler karşılaştırıldığında, bulaşık olan bitkilerde büyüme ve gelişme geriliği ile birlikte ciddi bodurlaşmalar, gövde belirtileri ve ilerleyen aşamalarda ölümlerin meydana geldiği belirlenmiştir. Hava sıcaklıklarının artışı ile beraber öncelikle meyvelerde deformasyonlar ortaya çıkmıştır. Sörveyler boyunca gözlenen tüm belirtiler daha önce

farklı araştırmacılar tarafından rapor edilmiş belirtiler ile benzerlik gösterdiği de belirlenmiştir (Bozdoğan vd. 2015; Özdağ vd. 2017). Hastalığın belirtileri gerçekten oldukça değişken olup konukçu bitkinin çeşidi, yaşı ve yetiştirme koşulları, virüsün izolatına/ırkına ve özellikle sıcaklık gibi çevresel faktörlere bağlı olduğu söylenebilir.



Şekil 4.1. Sörvey alanlarında kültür bitkileri üzerinde gözlemlenen TSWV belirtileri; Soldaki domates ve sağdaki marul bitkisi (Serik-Çakallık, Şubat 2020)



Şekil 4.2. Biber seralarında gözlenen TSWV belirtileri ve bitkilerin genel görünümü (Serik-Çakallık, Ocak 2021)

4.3. TSWV'nin Yabancı Ot Konukçuları

İki yıl boyunca yılın her döneminde (bahar, yaz, sonbahar ve kış) tekrarlanan sörveyler sonucunda, çeşitli yabancı otlar üzerinde TSWV'nin varlığı araştırılmış ve toplamda 39 farklı yabancı ot türü (Çoğunlukla *Convolvulus*, *Portulaca*, *Sonchus*, *Solanum*, *Conyza* ve *Malva* cinsine ait bitkiler seralarda yoğun olarak belirlenmiştir) detaylı analizlere tabi tutulmuştur.

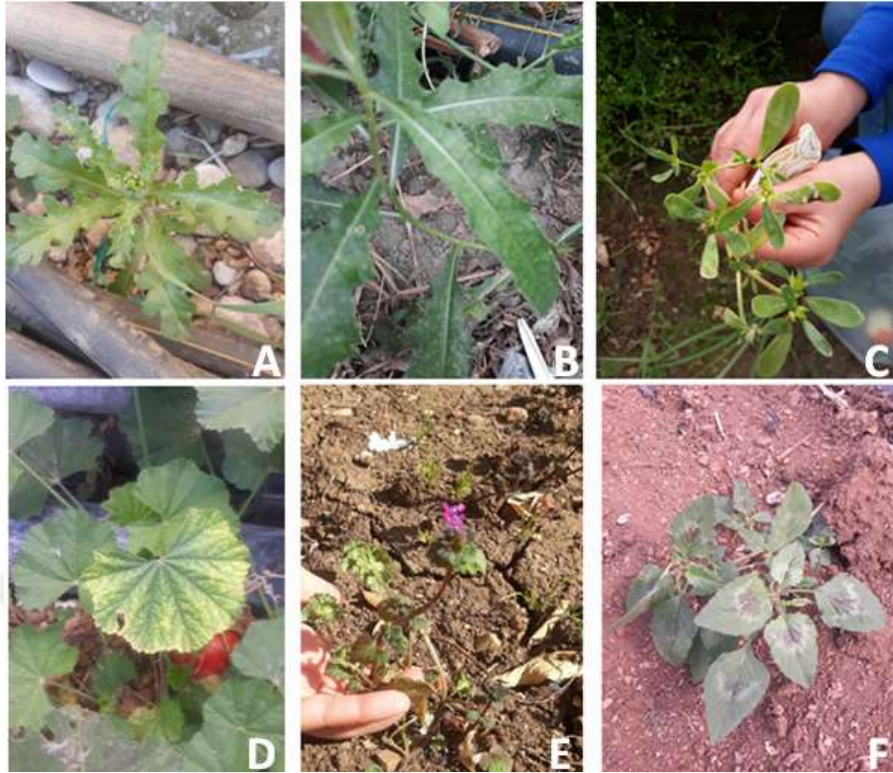
Sörvey alanlarından toplanan yabancı otlar, Antalya ilinin Kumluca ilçesinde domates seralarında bulunan yabancı otların ortalama yoğunluğunu belirlemek adına yapılan bir çalışma ile karşılaştırıldığında gerek rastlama sıklığı gerekse yoğunluk bakımından; *Amaranthus retroflexus* L., *Portulaca oleracea* L. ve *Cyperus rotundus* L. ilçeler arasında benzerlik gösteren en önemli türler olarak belirlenmiştir. Kumluca ilçesinde yabancı otların %10'un üzerinde bir kaplama alanına ve metrekarede 25 adedin üzerinde yoğunluğa sahip olmaları, yabancı ot mücadelesine daha fazla önem verilmesi gerektiği kanaatini oluşturmuştur (İbrişim ve Kitiş 2020). Benzer şekilde Serik ve Elmalı ilçelerinde özellikle seraların etrafında ve bitişğinde yoğun olarak gözlemlenen yabancı ot popülasyonları bu tür bitkilerle mücadele için uygulanan yöntemlerin yetersiz kaldığını ve önlemlerin arttırılması gerektiği hususunun altını çizmiştir.

Antalya'da yapılan bir başka çalışmada, pamuk üretimini sınırlayan en önemli etmenlerden birinin yabancı otlar olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, Antalya ili pamuk ekim alanlarında görülen yabancı ot türleri ve bunların popülasyon durumları belirlenmiştir. Gözlemler, pamuk yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Aksu, Serik ve Manavgat ilçelerinde toplam 55 tarlada gerçekleştirilmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda 12 familyaya ait 24 yabancı ot türü saptanmıştır. Bunlar içerisinde topalak (*Cyperus rotundus* L.), pembe sarmaşık (*Ipomoea triloba* L.), kanyaş (*Sorghum halepense* (L.) Pers.), darıcan (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.) ve semizotu (*Portulaca oleracea* L.) öne çıkan türler olmuştur (Arslan ve Kitiş 2021). Bu türler arasında *Cyperus rotundus* L. *Sorghum halepense* ve *Portulaca oleracea* L. tez çalışması kapsamında incelenen yabancı otlar ile benzerlik göstermiştir. TSWV ile bulaşıklılık açısından *Cyperus rotundus* L. temiz bulunurken diğer iki tür adı geçen virüs ile enfekteli olarak tespit edilmiştir. *Sorghum halepense* türünde 9 bitkiden 1'inde ve *Portulaca oleracea* L. türünde 20 bitkiden 2'sinde hastalık etmenine rastlanılmıştır. Ancak bu türlerin hiç birinde herhangi bir belirti gözlemlenmemiştir.

DAS-ELISA testleri sonucunda toplam 39 tür yabancı ottan 19 türü (%48) TSWV etmeni açısından pozitif bulunmuştur. *Chenopodium*, *Cerastium*, *Stellaria* ve *Euphorbia* gibi birçok tür (20 tür) ise hastalık açısından ari bulunmuştur (%51). Pozitif olarak saptanan 19 türden sadece 9 tanesinde yapraklarda hafif sararma, mozaik ve şekil bozukluğu, bodurluk, yaprak sapında morarmalar, yapraklarda klorotik ve nekrotik lezyonlar, beneklenmeler ve tripslerin beslenmesinden kaynaklı gümüşümsü lekeler gibi değişik belirtiler saptanmıştır (Şekil 4.3, 4.4).

*Sorghum halepense**Convolvulus arvensis**Veronica hederifolia**Raphanus spp.**Portulaca oleraceae**Solanum nigrum*

Şekil 4.3. TSWV ile bulaşık olduğu saptanan yabancı otlardan bazıları (Bulaşıklılık DAS-ELISA testi ile saptanmıştır. Örneklerin üzerinde mozaik, klorotik beneklenmeler, yapraklarda şekil bozukluğu ve sararmalar gibi değişik belirtiler gözlemlenmiştir



Şekil 4.4. Yabancı otlar üzerinde gözlemlenen bazı belirtiler; **A, B:** yapraklarda hafif sararma ve mozaik görünümü, **C:** tripslerin beslenme zararı, **D:** yaprak kenarında sararma, **E:** yapraklarda gevreklik ve beneklenme, **F:** meşe yaprağı deseni

Diğer türlerin belirti göstermemesine rağmen enfeksiyon açısından pozitif bulunmuş olması, daha ciddiye alınması gereken gizli konukçular olarak katagorize edilmesine yol açmıştır. Bu türler sırasıyla: *Sonchus oleraceus*, *Xanthium strumarium*, *Tagetes patula*, *Medicago* sp., *Sorghum halepense*, *Digitaria sanguinalis*, *Portulaca oleraceae*, *Convolvulus arvensis*, *Tribulus terrestris* ve *Polygonum aviculare*'dir.

Burada yine, dört mevsimde test edilen türlerin arasında yer alan ve bitki virüslerinin tanımlama ve teşhisinde indikatör bitki olarak sıkça kullanılan *Chenopodium album* (Sirken)'un beklenenin aksine geri kalan yabancı otlar gibi hiçbir belirti göstermemesi ve TSWV açısından temiz bulunması, tripslerin bu bitkiyi tercih etmemesine ya da bitkinin toplandığı dönemdeki yaşam evresine yorulmuştur. Bitkiler erken dönemlerde virüs ile karşılaştığında, bazen çevre koşulları elverişli olmasına rağmen enfeksiyon gelişmemekte ya da düşük miktarlarda olduğu zamanlarda gözden kaçabilmektedir. Ancak bu türün TSWV'nin yaygın konukçuları arasında olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir (Groves vd. 2002).

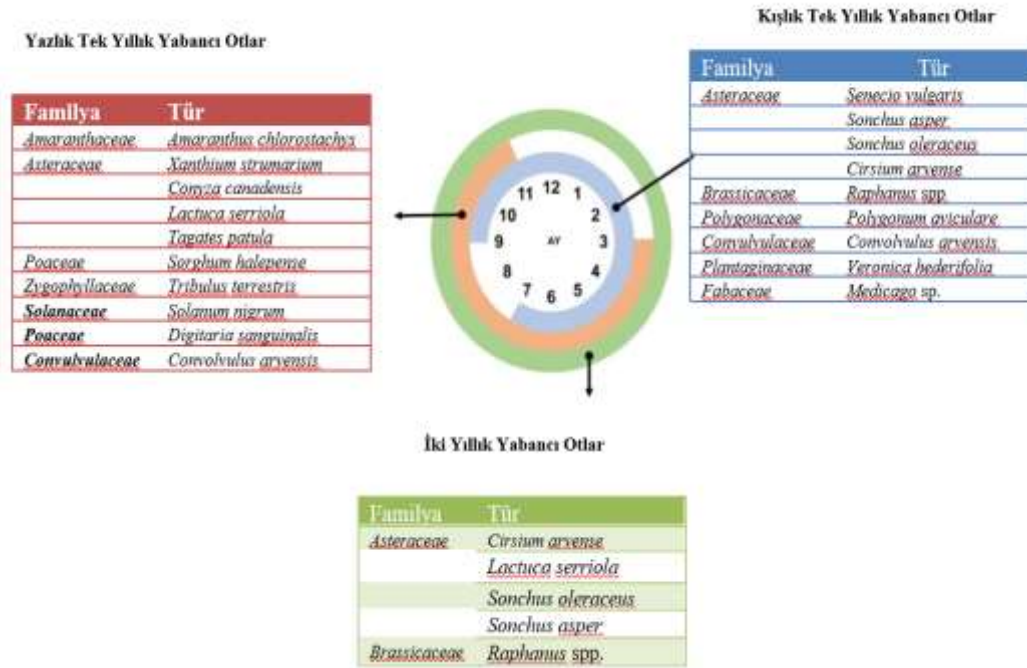
Chenopodium album örnekleri, Türkiye'de daha önce yapılan birçok gözlemde TSWV'ye karşı test edilmiş, ancak hiçbir pozitif sonuç vermemiştir. Morca ve arkadaşlarının yürütmüş olduğu bir çalışmada *C. album*'deki virüs enfeksiyonu, diğer birçok yabancı otlarla karşılaştırıldığında çok nadir olarak belirlenmiştir. Bu çalışma TSWV'nin Türkiye'de bildirilen ilk *C. album*'deki doğal oluşum olması, yabancı ot türlerinin virüs için rezervuar konukçu olarak epidemiyolojik rolünü ortaya koymaktadır (Morca vd. 2022).

Çoğu durumda, TSWV ile enfekte olmuş yabancı otların virüs belirtileri göstermediği birçok çalışmada rapor edilmiş ve yabancı otlardaki TSWV enfeksiyon oranlarının oldukça düşük bulunduğu rapor edilmiştir (Batuman vd. 2020). Dolayısıyla yabancı otların belirti gösteriyor olup olmaması TSWV enfeksiyonu açısından doğru ve sağlıklı bir kıstas olmamakla birlikte var olan belirtilerin de TSWV ile ilişkili olmayabileceği veya herhangi bir abiotik ya da diğer bazı biyotik faktörlerden kaynaklanabileceği bildirilmektedir.

Yabancı otlarda TSWV araştırmalarında tipik TSWV belirtilerinin aranması gerektiği, diğer bir deyişle, bu virüs konusunda yabancı otlardaki belirtilerin enfeksiyon ile ilgili olmayabileceği, ve görülen belirtilerin TSWV için karakteristik belirtiler olmayabileceği rapor edilmiştir. Yürütülen çalışmada TSWV ile enfekteli birçok yabancı ot ya belirti göstermeksizin kalmış ya da daha önce birkaç türde ve diğer virüslerde de rapor edilen belirtiler ile ilişkili olmadığı ihtimalinden söz edilmiştir. Türe özgü özellikler dışında, belirti oluşmamasının nedeni doğal seçim (Power vd. 1992) veya sıcaklık (Roggero vd. 1997) gibi diğer faktörlerin sonucunda ortaya çıkmaktadır. Sonuç olarak çalışma da yabancı otlarda TSWV enfeksiyonunun varlığı ve belirti gelişimi çeşitli faktörlere bağlanmıştır.

Çalışmada TSWV'nin doğal konukçularına ait yaşam döngüsü için yapılan değerlendirmede (Şekil 4.5), serolojik ve moleküler çalışmalar sonucunda pozitif sonuç gösteren 9 türün tek yıllık kışlık (%47) ve 10 türün tek yıllık yazlık (%53) olduğu doğrulanmıştır. Bu türlerin çoğu TSWV'nin görüldüğü alanlarındaki ısıtılmalı seralarda kışı geçirdiği için yazlık yabancı otlara kıyasla hemen hemen aynı oranda kışlık yabancı ot doğrulanmıştır. Bu sonuçlar, hem kışlık hem de yazlık yabancı otların TSWV'nin ana konukçusunun yokluğunda önemli roller oynadığını göstermektedir. *Sonchus asper* (Dikenli eşek marulu), tek yıllık kışlık yabancı otlar arasında en yüksek enfektiviteyi göstermiş ve Serik ilçesinde kış mevsiminde seralarda baskın tür olarak ortaya çıktığı belirlenmiştir. Tek yıllık yazlık yabancı otlar arasında ise *Solanum nigrum* (Köpek üzümü) en yüksek enfeksiyon oranını göstermiş ve hem Serik hem de Elmalı da yaygın olarak bulunan yabancı ot türü olmuştur.

Söz konusu iki türün TSWV için önemli bir inokulum kaynağı olduğu, aynı zamanda tripsler için çekici gelen çiçek ve meyve yapısından dolayı da vektör böcekler için beslenme habitatı oluşturduğu düşünülmektedir. Yine aynı şekilde sörvey yapılan alanlarda *Convolvulus arvensis* gibi iki yıllık yabancı otlar seraların içinde ve dışında yaygın olarak gözlenmiş, bu türün TSWV için yeşil köprü görevi görmesinin olasılıklar arasında olduğu kanısına varılmıştır.



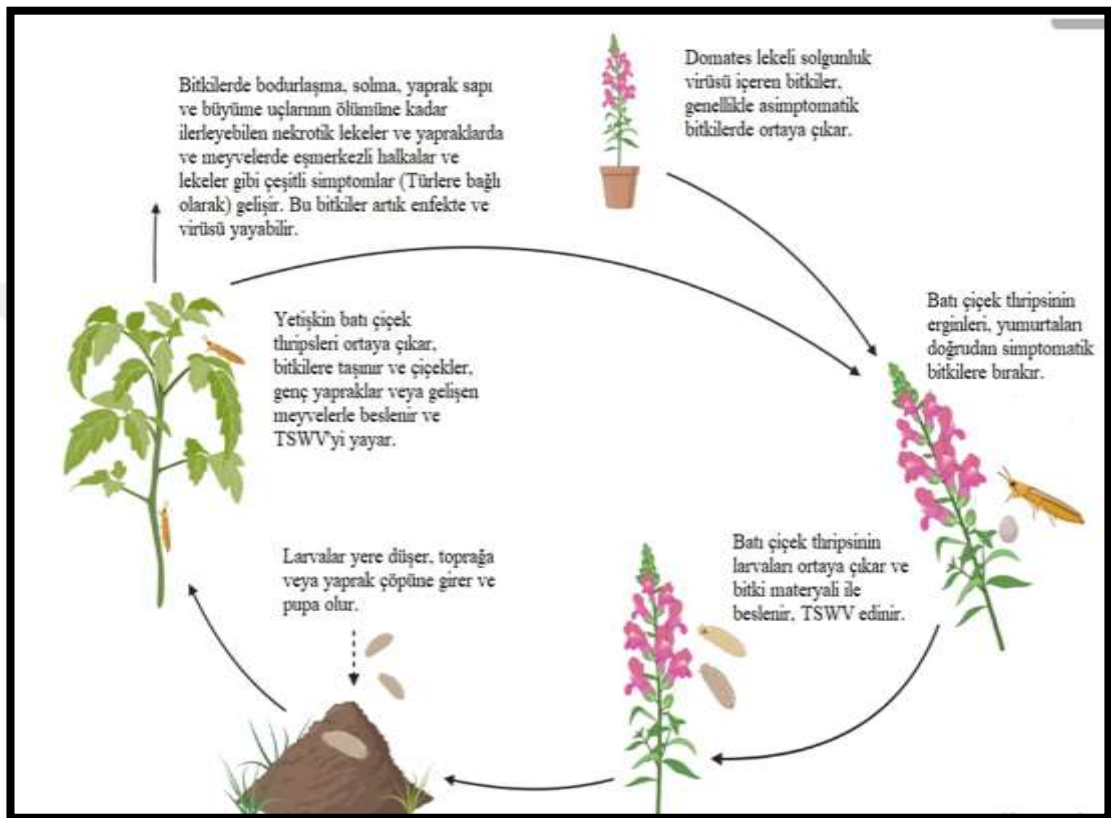
Şekil 4.5. TSWV'nin doğal yabancı ot konukçularındaki yaşam döngülerinin şematik diyagramı. Üç farklı daire, çalışmada tanıtılan yabancı otların üç farklı yaşam döngüsünü göstermektedir. Rakamlar ise oniki ayı temsil etmektedir

Yürütülen çalışmada yabancı otlarda tür bazında belirlenen enfeksiyon oranı (%48) daha önceki yıllarda değişik araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalara kıyasla daha yüksek bulunmuştur (Arli Sokmen vd. 2005; Özdemir vd. 2009; Atakan vd. 2013). TSWV için testlenen yabancı otların yarısında başarılı bir enfeksiyon görülmezken, domates ve biber bitkilerinde hastalığın çok daha yaygın olduğu ortaya konmuştur (%75-%100).

Çalışmadan elde edilen sonuçlar ile Samsun ilinde yürütülen bir çalışmada TSWV'nin biber alanlarında *Amaranthus retroflexus*, *Taraxacum officinale*, *Datura stromonium* ve *Hibiscus trionum* yabancı ot türlerinin virüs ile bulaşık bulunması sonuçları paralel olarak değerlendirilmiştir (ArliSökmen vd. 2005). Özdağ ve Sertkaya (2015), Hatay ili biber üretim alanlarından topladıkları 7 farklı yabancı ot türünde hıyar mozaik virüsü (CMV), Arabis mozaik virüsü (AMV) ve TSWV enfeksiyonlarını saptamışlardır. Araştırmacılar, Hatay ilinin biber yetiştiriciliğinde yabancı otların virüs hastalıkları için önemli doğal konukçular olduklarını rapor etmişlerdir. Çalışmada çok yıllık yabancı otlardan *Cirsium arvense* (Köygöçerten)'den ilkbaharda toprak yüzeyine ilk çıkışından hemen sonra örnek alınmış ve iki örnekten birinde (%50) TSWV enfeksiyonuna rastlanmış olması ve yapraklarda mozaik ve klorotik lekeler gibi değişik belirtilerin gözlenmesi *C. arvense* yabancı otunun TSWV için önemli bir konukçu yani kaynak olabileceği ihtimalini ortaya koymuştur.

C. arvense rizom ve tohumları ile çoğalan bir yabancı ot olup tripslerin yaşam döngüsü göz önüne alındığında (Şekil 4.6) bu türün çok yıllık ve vegetatif aksamıyla çoğalan bitki olması nedeniyle her zaman enfeksiyon kaynağı olabileceği öne

sürülebilir. Ayrıca yaşamlarının belli bir dönemini toprak altında geçiren tripslerin rizomlar ile beslenerek virüsü bünyelerine alabileceği sonucunu ortaya koymaktadır. Dolayısıyla bu tür bitkilerin her aksamının ve her büyüme evresinin TSWV'nin yayılmasında ve epidemiyolojisinde büyük önem taşıyacağı bir gerçektir. Bu nedenle virüsün inokulum kaynağını en aza indirmek için zararlı ile bulaşık bitki artıkları imha edilmelidir. Toprak işlemesi ve yabancı ot mücadelesi yapılmalı ve havalandırma açıklıkları mutlaka tül (462 µm) ile kapatılmalıdır.



Şekil 4.6. TSWV'nin enfeksiyon döngüsü

Virüsün kalıtımını incelemek ve mutasyonları belirlemek için hastalığın meydana geldiği bölgenin iklim özelliklerinin, vektörlerin ve konukçularının çok önemli bir yer tuttuğu gerçektir. TSWV enfeksiyonlarının meydana gelmesinde en büyük etkenlerden birisi de trips vektörlerinin aktif ve yoğun popülasyonlarının varlığı ile ilgili olduğu birçok literatürde de söz konusu edilmektedir (Ruark-Seward vd. 2020).

Yürütülen çalışmada vektör böceklerin saptanabilmesi için sörvey alanlarında kullanılan mavi ve sarı renkli tuzaklar üzerinden toplanan böcekler arasında *Frankliniella occidentalis*'in baskın trips türü olduğu saptanmıştır. (Tür teşhisi Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü öğretim üyesi Dr.Öğr. Üyesi Fatih DAĞLI tarafından yapılmıştır). Bu tür yabancı otlar ve kültür bitkileri üzerinde tek vektör olmuştur. Bu tür, TSWV'ye duyarlı *Cirsium arvense* üzerinde de bulunmuştur. *Sorghum halepense* (Poaceae) gibi duyarlı olmayan türlerde de TSWV enfeksiyonunun yanı sıra tripsin larvaları ve erginlerine rastlanılmıştır.

Domates serasında, çoğu trips *Amaranthus chlorostachys* bitkilerinin çiçeklerinde bulunmuştur, ancak bazıları yaprakların her iki tarafında da gözlemlenmiştir. Trips, esas olarak *Xanthium strumarium* bitkilerinin mevcut çiçeklerinde bulunmuştur. *Solanum nigrum* bitkilerinde, yaprakların üst kısımlarında tripslerin beslenme izlerine bolca rastlanılmıştır.

Bir yabancı otun tripsler için çekiciliği ve üremeye uygunluğu hususunda, çiçek açtıkları dönem veya yaşam süreleri gibi diğer özellikleri ön plana çıkmaktadır. Örneğin çiçek açan *Sonchus* bitkilerinde, polen ile beslenen *F. occidentalis* çiçek açmayan yabancı otlara nazaran daha çok beslenecektir. Vektör böcek için konukçu tercihi muhtemelen indüklenen biyokimyasal değişikliklerden (Selman vd. 1961) dolayı virüs enfeksiyonu (Bautista vd. 1995) tarafından artırılabilir. Virüs, trips'e (Chamberlin vd. 1992) ek olarak, bir sonraki sezonda yayılımın meydana gelebileceği iki yıllık ve çok yıllık türlerde de kışı geçirebilir. Bu yabancı otlar, ekim mevsimleri arasında hayatta kalan, yaşamaya devam eden bitkiler olduklarından, özellikle de Solanaceae familyasına ait yabancı otlar TSWV'nin epidemiyolojisinde kritik ve önemli faktör olarak kabul edilmektedirler.

Önceki çalışmalarda trips vektörlerinin ortamdaki yoğunluğunun TSWV izolatlarının epidemiyolojik karakterinin değerlendirilmesinde etkili olduğu belirtilmektedir. Özellikle sezon sonunda tarladan ürünler hasat edilmesinden sonra tripslerin yabancı otlara göç etmesi nedeniyle virüsün yaşam döngüsünün kırılmasının engellendiği rapor edilmiştir (Ebratt vd. 2013). Bir seranın içinde ve çevresinde çok yıllık ve tek yıllık olarak bulunan ve tripslerin yaşaması ve üremesi için önemli konukçulardan olan bu yabancı otların TSWV'nin inokulum kaynağı olarak büyük risk taşıdığıda bir başka gerçektir. Diğer bir değiş ile TSWV ile enfekte olmuş yabancı otlar, TSWV'nin kışı geçirmesi ve böcek vektörü ile yayılması için başlangıç ve doğal konukçu olarak rol almaktadırlar.

Elmalı ilçesinin Gölova köyünde, Kadife çiçeğinde (*Tagetes patula*) (Şekil 4.7) TSWV'nin varlığı yüksek oranlarda saptanmış (%100) ve bitki üzerinde çiçek tripslerinin büyük kolonileri görülmüştür. Bu sonuca göre, açık tarlalarda kışı geçiremeyen TSWV'nin vektörü, Kadife çiçeğinde kışı geçirdikten sonra bir sonraki baharda açık alanda yetiştirilmeye başlayan bitkilere doğrudan zarar verebilmektedir. Sonuç olarak TSWV'nin etkili kontrolü için yakınlarda bulunan komşu seralarda trips kontrollerinin işbirliği kapsamında senkronize olarak yapılmasının çok önemli olduğu söylenebilir.



Şekil 4.7. Seranın iç kenarında süs bitkisi olarak dikilen Kadife çiçeği (*Tagetes patula*). (Tür teşhisi Dr.Öğr. Üyesi Deniz HAZAR tarafından yapılmıştır)

Tripslerin en çok tercih ettiği çiçekli otlar dışındaki bitkilerde tripslerin bulunuşu gözden kaçabilir, bunların belirlenememesi, tripslerin daha fazla yayılmasına neden olabileceği için önemlidir. Elmalı ve Serik'de bitkisel üretim genellikle küçük ölçekli olarak yapılmaktadır ve birçok kültür bitkisi karışık olarak sera ve çevresindeki açık alanlarda yetiştirilmektedir. Yani odaklanılması gereken bitki grubu sadece Solanaceae familyası üyeleri değil, aynı zamanda fasulye, kabakgiller, susam, arpacık soğanı ve ebegümeci gibi bitkilerdir ki bu bitkilerin herhangi birisinin Antalya'da TSWV'nin doğal konukçusu olma olasılığı yüksektir.

Bu bitkiler bitkisel üretimin yoğun gerçekleştirildiği alanlarda yaygın olarak yetiştirilen birçok bitki bulunmasından dolayı, söz konusu bu bitki türlerine ait mevcut enfekteli bitkilerde beslenen tripslerin sürekli olarak hastalığı virüsten ari üretimin yapıldığı sağlıklı seralara taşınmasına olanak sağlayabilmektedir. Bu aynı zamanda bölgemizde TSWV sorunlarının devam etmesinin de başlıca nedenlerinden biridir. Yakın zamana kadar domateslerde bulunan Sw-5 geni TSWV' ye karşı dayanıklılık yani direnç sağlamasına neden olurken, dayanıklılığı kıran izolatların varlığı bu dayanıklılık genin işlevini yitirmesine neden olmuştur. Son zamanlarda görülen yeni izolatın özellikle meyveler üzerinde neden olduğu yoğun bozulma nedeniyle hemen hemen domates yetiştiriciliğinin neredeyse imkânsız hale geldiği bilinmektedir.

Benzer bir çalışmada gerçekleştirilen sorveyler sırasında, biberle birlikte Kadife çiçeği (*Tagetes erecta*) yetiştirilen seralarda, virüs yoğunluğunun diğer seralara göre daha az olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca, Kadife çiçeği üzerinde tripslerin yoğun bir şekilde popülasyon oluşturdıkları da gözlenmiştir. Buna karşın, bu bitkilerden alınan örneklerin testlenmeleri sonucunda TSWV enfeksiyonları tespit edilememiştir. Bu doğrultuda, tripslerle mücadelede bu çiçeğin seralarda tuzak bitki amaçla yetiştirilmesinin faydalı olabileceği görüşü ortaya çıkmıştır (Yeşil ve Gömlekli 2021).

Sonchus asper, *Sonchus oleraceus*, *Portulaca oleraceae*, *Cirsium arvense*, *Solanum nigrum* ve *Veronica hederifolia* gibi türlerin, seralarda bulunan *F. occidentalis* aracılığıyla TSWV enfeksiyonuna maruz kaldıkları tahmin edilmektedir. Vektör böceğin aynı zamanda *Malva* cinslerine ait türlerle de beslendiği bilinmekte, fakat incelemeler sonucunda bu türlerden çok sayıda örnek çalışmada testlenmiş olmasına rağmen (17 bitki) hiçbirinde herhangi bir TSWV enfeksiyonuna rastlanmamıştır. Buna karşılık, *Amaranthus chlorostachys*, *Conyza canadensis* ve *Sonchus oleraceus* gibi kışlayan konukçuların yanı sıra *Senecio vulgaris* gibi *F. occidentalis*'in bilinen diğer konukçuları, TSWV'nin konukçusu olarak tanımlanmıştır.

Sörvey çalışmalarında elde edilen sonuçlar, TSWV ile enfekte olmuş birçok kışlık yabancı ot türünün (*Senecio vulgaris*, *Cirsium arvense*, *Veronica hederifolia* ve *Sonchus asper*), TSWV ile enfekte olan birçok yazlık türün (*Xanthium strumarium*, *Conyza canadensis* ve *Amaranthus chlorostachys*) ortaya çıkmasıyla eş zamanlı olarak olgunlaştığını göstermektedir. Bu yazlık yabancı otlar, gelişmelerinin başlarında enfekte olmuş gibi görünmektedir ve yaz boyunca TSWV inokulumunu barındırmaktadır. Son olarak, birçok kışlık yabancı ot türünün çimlendiği ve enfeksiyona çok duyarlı olduğu bir zamanda, sonbahar araştırmalarımızda aynı türden pek çok hastalıklı bitkilerle tekrar karşılaşmıştır.

Yerel florada virüs kaynakları olarak rol oynayan enfekte olmuş çeşitli yabancı otların TSWV'nin yayılmasındaki önemini daha iyi bir şekilde anlamak için, türlerin yaşam döngüsünü ve enfeksiyon potansiyellerinin daha detaylı incelenmesi gerekmektedir. Tripslerin seralarda TSWV'nin yayılmasındaki rolünü netleştirmek için ise, karşılaştırmalı çalışmalara ihtiyaç vardır.

4.4. DAS-ELISA Testlerinin Sonuçları

Sörvey planı doğrultusunda toplanan tüm bitkisel materyaller öncelikle DAS-ELISA testi ile testlenmiş ve farklı bitki gruplarındaki hastalık oranları belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, her iki ilçede virüs ile enfeksiyon oranları domates ve biberlerde belirti gösteren örneklerde %100 ve yabancı otlarda ise belirti gösteren ve göstermeyen örneklerde %12.5 olarak bulunmuştur. Yapılan DAS-ELISA testlerinin sonuçları Çizelge 4.4'te listelenmiştir.

Çizelge 4.4. DAS-ELISA sonucuna göre bitkilerin TSWV ile bulaşıklık durumları

Bitki adı	Örnek sayısı	Bulaşık örnek sayısı (+)	Sağlıklı örnek sayısı (-)	Hastalık oranı
Biber	58	58	0	%100
Domates	34	30	4	%88
Diğer	20	8	12	%40
Yabancı ot	270	34	236	%12.5
Toplam	382	130	252	%60

DAS-ELISA sonuçlarına göre yabancı otları kapsayan bitki familyaları arasında en yüksek enfeksiyon oranı Asteraceae familyasında tespit edilmiştir. Bu familyayı Poaceae ve Solanaceae takip etmektedir. Portulacaceae familyasında semizotunda (*Portulaca oleraceae* L.), Brassicaceae familyasında yabani turp (*Raphanus* spp.), Amaranthaceae familyasında (*Amaranthus chlorostachys* WILLD.), Zygophyllaceae familyasında demir diken (*Tribulus terrestris*), Plantaginaceae familyasında adi yavşan otu (*Veronica hederifolia*) ve Convolvulaceae familyasında tarla sarmaşığında (*Convolvulus arvensis* L.) enfeksiyona rastlanılmıştır. Sonuç olarak 39 farklı yabancı ot türüne ait 270 adet bitkinin 34 tanesi (18 yabancı ot türü ve bir süs bitkisi = 19 tür) TSWV ile enfekteli olduğu DAS-ELISA ile tespit edilmiştir (Çizelge 4.5). Enfekteli bulunan türlere ait botanik özellikler EK.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. DAS-ELISA sonuçlarına göre biber ve domates dışındaki bitkilerden toplanan yaprak örneklerinin TSWV ile bulaşıklık durumları ve hastalık yüzdeleri

Bitki Türü	Örnek Sayısı	Bulaşık Örnek Sayısı	Sağlıklı Örnek Sayısı	Hastalık Yüzde Oranları	Belirti
<i>Amaranthus retroflexus</i>	3	0	3	%0	-
<i>Amaranthus chlorostachys</i>	13	2	11	%15	+
<i>Chenopodium album</i>	17	0	17	%0	-
<i>Cerastium dichotomum</i>	3	0	3	%0	-
<i>Stellaria media</i>	8	0	8	%0	-
<i>Spinacia oleracea</i>	3	0	3	%0	-
<i>Euphorbia helioscopia</i>	4	0	4	%0	-
<i>Conyza canadensis</i>	8	2	6	%25	+
<i>Lactuca serriola</i>	16	3	13	%19	+
<i>Matricaria chamomilla</i>	4	0	4	%0	-
<i>Senecio vulgaris</i>	2	1	1	%50	+
<i>Sonchus asper</i>	22	5	17	%22	+
<i>Sonchus oleraceus</i>	13	2	11	%15	-
<i>Xanthium strumarium</i>	2	1	1	%50	-
<i>Calendula officinalis</i>	1	0	1	%0	-
<i>Silybum marianum</i>	1	0	1	%0	-
<i>Cirsium arvense</i>	2	1	1	%50	+
<i>Tagetes patula</i>	2	2	0	%100	-
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	10	0	10	%0	-
<i>Raphanus</i> spp.	1	1	0	%100	+
<i>Cyperus rotundus</i>	14	0	14	%0	-
<i>Cyperus nitidus</i>	2	0	2	%0	-
<i>Medicago minima</i>	3	0	3	%0	-
<i>Medicago</i> sp.	5	1	4	%20	-
<i>Malva parviflora</i>	17	0	17	%0	-
<i>Sorghum halepense</i>	9	1	8	%11	-
<i>Digitaria sanguinalis</i>	5	1	4	%20	-
<i>Ocimum basilicum</i>	3	0	3	%0	-
<i>Thymus vulgaris</i>	1	0	1	%0	-
<i>Portulaca oleraceae</i>	20	2	18	%10	-
<i>Datura stramonium</i>	13	0	13	%0	-
<i>Solanum nigrum</i>	15	4	11	%26	+
<i>Galium aparine</i>	1	0	1	%0	-
<i>Urtica dioica</i>	2	0	2	%0	-
<i>Convolvulus arvensis</i>	9	1	8	%11	-
<i>Tribulus terrestris</i>	3	2	1	%66	-
<i>Polygonum aviculare</i>	10	1	9	%10	-
<i>Rumex</i> spp.	1	0	1	%0	-
<i>Veronica hederifolia</i>	2	1	1	%50	+
Toplam	270	35	235	%17	+/-

ELISA okuyucusunda 405 nm’de alınan absorbens değerleri Çizelge 4.6.’da verilmiştir. Negatif örneğin en az 3 katı değer gösteren örnekler çalışmada pozitif olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4.6. DAS-ELISA sonuçlarının 405 nm absorbens okuma değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0.366	0.381	0.248	0.357	0.304	0.245	0.248	0.299	0.295		
C		1.250	1.251	0.253	0.311	2.272	0.279	0.462	0.304	0.551		
D		0.280	2.558	0.273	3.742	3.274	0.215	0.236	0.276			
E		0.483	3.049	0.263	0.321	2.306	0.364	0.578				
F		0.281	0.461	0.289	0.321	0.246	0.245					
G		0.375	0.291	0.292	0.324	0.289	0.257			Negatif	Pozitif	
H										0.210	2.862	

TSWV'nin saptanamadığı 20 türden bazıları, TSWV'ye duyarlı oldukları bilindiği için (Chatzivassiliou vd. 2001) enfeksiyondan kaçmış olabilecekleri veya TSWV'ye duyarlı türlere sahip familyalara ait olabilecekleri ihtimalini düşündürmüştür. Bu amaçla DAS-ELISA da negatif sonuç veren restgele seçilen 10 örnek TSWV'ye karşı RT-PCR tekniği ile tekrar test edilmiş ve negatif bulunmuş ve sonuçların doğrulaması yapılmıştır. Herhangi bir enfeksiyonun olmaması aynı zamanda TSWV'ye karşı doğal bağışıklığa da bağlanabilir.

4.5 TSWV'nin Moleküler Yöntemler ile Tespit Edilmesi

4.5.1 Yüksek çözünürlüklü erime analizi

qRT-PCR çalışmaları için tez çalışması kapsamında tasarlanan ve TSWV'nin NRB (Non-resistance breaking) ve RB (Resistance breaking) genotipleri arasında ayırım yapan ve mutasyonun gerçekleştiği bölgeyi çevreleyen özel primer çifti kullanılmıştır (Şekil 4.8). qRT-PCR da kullanılacak örneklerin konsantrasyon değerleri ölçülmüş ve aynı değere gelecek şekilde sulandırılarak seyreltilmiştir (Çizelge 4.7).

One Step Plus TM Real-Time PCR Tespit Sisteminde (Applied Biosystems) Luna Universal One-Step RT-qPCR Kiti kullanılarak 13 tane pozitif örnek ve bir negatif örnek olmak üzere toplam 14 örnek için Real-Time işlemi gerçekleştirilmiştir ve kullanıcı talimatının dışında döngülerin sonuna Melt-Curve aşaması eklenerek HRM (High Resolution Melting) analizi’de deneye dahil edilmiştir. Analiz sonucu şekil 4.9’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. qRT-PCR Öncesi testlenen örneklerin aynı oranda seyreltilmesi için yapılan hesaplamalar (konsantrasyon (µg/ml)= A260 okuması × çevirme faktörü)

Örnek Adı	A260 Absorbans Değeri	Konsantrasyon (µg/ml)	Seyreltme Oranı (1µl için)
<i>Convolvulus arvensis</i>	0.035	0.14	0.4
<i>Cirsium arvense</i>	0.033	0.13	0.3
TSWV-NRB-ALS	0.037	0.14	0.4
<i>Lactuca serriola</i>	0.04	0.16	0.6
<i>Raphanus spp.</i>	0.06	0.24	1.4
<i>Senecio vulgaris</i>	0.089	0.35	2.5
<i>Sonchus asper</i>	0.031	0.12	0.2
<i>Xanthium strumarium</i>	0.04	0.16	0.6
<i>Sonchus oleraceus</i>	0.096	0.38	2.8
<i>Solanum nigrum</i>	0.025	0.10	0.10
<i>Portulaca oleraceae</i>	0.049	0.19	0.9
<i>Veronica hederifolia</i>	0.166	0.66	5.6
<i>Conyza canadensis</i>	0.042	0.16	0.6

GenBank: MH367503.1

>MH367503.1:101-1009 Tomato spotted wilt orthotospovirus isolate TSWVAntRB

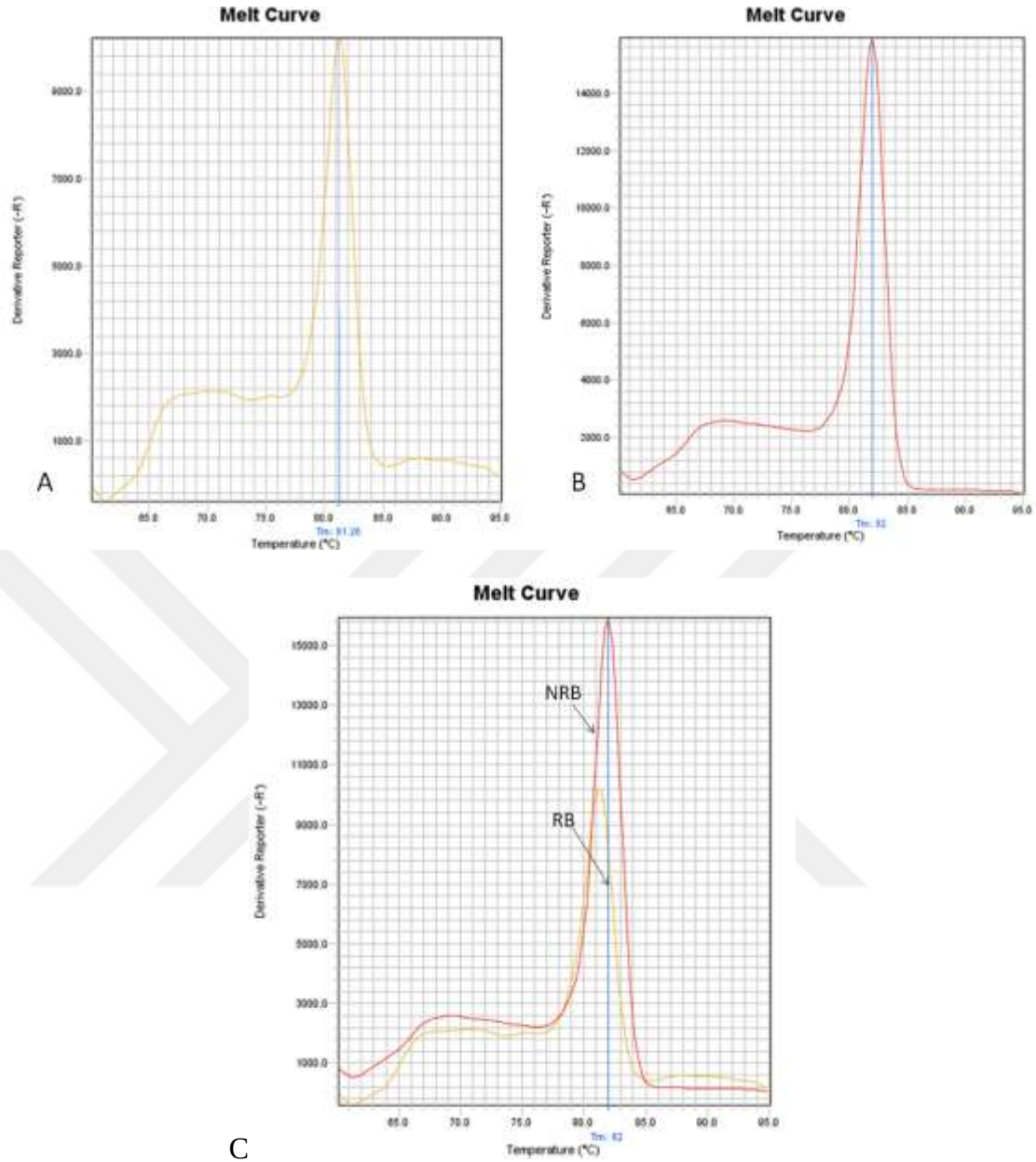
segment M, complete sequence

ATGTTGACTCTTTTCGGTAACAAGAGGCCTTCTAAGTCTGCCGGAAGGATGAAGGTCCCTT
AGTTTCACTTGCTAAACATAATGGCAATGTTGAAGTCTCAAAACCATGGTCTTCTTCTGATGA
AAAGCTTGCTTTAACCAGCCATGGACGCAATCCAAAGGAAAGATACGTGTTGAACACTGAG
GGAACATCTTCCCTTGGAAACCTATGAATCTGATTCTATCACAGAATCAGAGGGTTATGATCTT
TCTGCTAGAATGATAGTAGATACAAACCATCATATCTCAAACCTGGAAAAATGATCTTTTTGT
TGGCAACGGAAAGCAAAATGCTAATAAGGTTATCAGGATCTATCCAACCTGGGACAGCAGA
AAACAATACATGATGATTTCCAGGATTGTGATATGGGTATGCCCCACTATACCAAACCTAC
AGGGAACCTTGTGGTTGCTTTAGTTGATCCCAACATGCCATCTGAAAAGCAAGTCATCCTGA
AGGTCAGGGACAATAACTGATCCTATCTGCTTTGTTTTTATCTGAACTGGTCTATTCCGA
AGATGAACAACACCCCAGAAAACCTGTTGCCAGCTGCATTTGATGTGCAACCAAGAATACAA
GAAAGGGGTTTCTTTTGGTAGTGTGATGATTCTTGGACAAAAGAGTTTGGCATTACCCCA
GAGCTGATAAAGACAAAAGTTGTATGGTTATACCTCTAAACAGGGCCATTAGAGCTAGGTCT
CAAGCATTCAATTGAAGCCTGCAAGCTGATAATTCCTAAAGGAAACAGCGAGAAGCAGATTA
AAAAACAGCTTAAAGAATTGAGCTCAAGTCTTGAGAGATCAGTTGAAGAAGAAGAGGAAGG
GATTTCTGACAGTGTTGCTCAGTTATCCTTTGATGAAATATAG

Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TAACCAAAGCCATGGACGCA	Plus	20	183	202	60.25	50.00	6.00
Reverse primer	TGTCCCTTGACCCTTCAGGA	Minus	20	556	537	60.10	55.00	4.00
Product length	374							

Forward primer	GCCGGAAGGATGAAGGTCC	Plus	20	86	105	60.75	60.00	4.00
Reverse primer	GCATTTTGCTTCCGTTGCC	Minus	20	378	359	59.49	50.00	3.00
Product length	293							

Şekil 4.8. Primer3 programında mutasyon bölgesine özgü tasarlanan primerlerin özellikleri (Sarı renk ile vurgulanan alan mutasyon bölgesini göstermektedir)



Şekil 4.9. Melt-curve aşamasında iki izolatin iki farklı sıcaklık değerinde oluşturduğu pik görünümü. Dayanıklılığı kırmayan eski izolat 82.0°C Tm değerinde pik oluştururken (A), dayanıklılığı kıran yeni izolat 81.4°C’de pik vermiştir (B), iki izolatin karşılaştırılması (C)

Analizler mutasyon bölgesine özgü tasarlanan primer çiftleri kullanılarak hem klasik RT-PCR hem de qRT-PCR yöntemleri ile yapılmış ve sörvey alanlarındaki yabancı otlarda saptanan TSWV izolatinın dayanıklılığı kıran izolat olduğu ortaya çıkmıştır. Bölgemizde sorun haline gelen TSWV izolatinın hava sıcaklıklarına bağlı olarak da virülensliğinde meydana gelen değişimler göz önüne alındığında, bu durumun hem sıcaklığa hem de mutasyona bağlı dayanıklılığı kıran izolatin ortaya çıkmasına katkıda bulunduğunu düşündürmüştür.

Testlenen örneklerin bazılarının TSWV ile bulaşık bulunması, yılın değişik dönemlerinde (dört mevsim) yabancı otların TSWV için önemli bir alternatif konukçu olabileceğini ortaya koymaktadır. Kilit nokta Temmuz ve Ekim ayları arasındaki süre zarfında ana konukçunun seradan kaldırıldığı dönemlerde virüsün geçiş yaptığı yabancı otlarda daha çok TSWV belirtilerinin gözlenmiş olmasıdır. Böyle durumlarda polyfag beslenen tripsler yabancı otlara yönelmekte ve daha fazla beslenmek suretiyle virüsün yayılmasına neden olmaktadır. Bu hipoteze dayanarak sörveyler yaz boyunca ve sonbaharın ilk aylarında daha sık gerçekleşmiştir. Sonuçlar, viral hareket proteinleri üzerinde nükleotid 354'te mutasyona sahip izolatların yılın herhangi bir zamanında enfekte edebildiğini, sıcaklık nedeniyle enfeksiyonlara neden olan izolatları yaz aylarında yabancı otlarda daha sık rastlandığını göstermektedir.

4.5.2. Medium segmentine ait dizilerin filogenetik açıdan incelenmesi

NSm proteini (Non-Structural protein, Yapısal olmayan protein), bitkilerde Orthospovirüslerin, plasmodemata yoluyla zarfsız nükleokapsitlerin hücreden hücreye hareketi ile yayılmasını kolaylaştıran yapısal olmayan bir proteindir (Kormelink vd. 1994; Storms vd. 1995). Bu nedenle NSm proteini plasmodemata yoluyla komşu sağlıklı hücrelere yayılma imkânı bulabilmektedir. TSWV'nin yeni konukçular üzerinde adaptasyonu için medium segmentinde NSm proteini üzerinde C118Y noktasında meydana getirdiği mutasyonların çok önemli olduğu rapor edilmiştir (Fidan ve Sarı 2019). Sistein (Cys) üzerinde meydana gelebilme ihtimali olan bu mutasyonun TSWV'nin evrimsel süreç içerisinde yeni konukçular üzerinde meydana getirdiği adaptasyonlarda kilit bir nokta olduğu düşünülmektedir (Lopez vd. 2011).

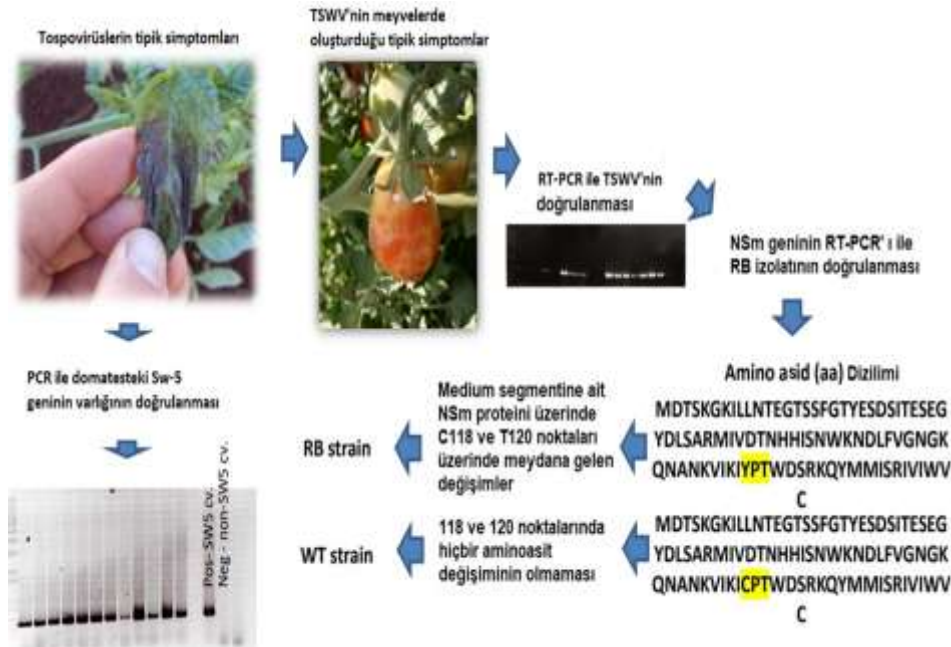
Çalışmada enfekteli yabancı otlardan elde edilen sekans verileri doğrultusunda virüsün medium segmentinde NSm-hareket proteini üzerinde 354. nükleotitte nokta mutasyonu meydana getirmesinden dolayı dayanıklılığı kıran izolatın ortaya çıktığı belirlenmiştir (Şekil 4.10).

Sekans analizine göre yabancı otlardan sadece bir tanesi *Solanum nigrum* (Köpek üzümü) dayanıklılığı kırmayan eski izolat ile benzerlik göstermiştir. Bu bulgulara dayanarak enfekteli yabancı otların %98'i dayanıklılığı kıran izolatlar olarak gruplandırılmıştır.

Species/Abbrv	Sequence
1. Convolvulus arvensis	ATCTCAAACCTGGAAAAATGTGGCAACGGAAAGCAAAAGCTAATAAGGTATCAGATCTTCCAA
2. Cirsium arvense	ATCTCAAACCTGGAAAAATGTGGCAACGGAAAGCAAAAGCTAATAAGGTATCAGATCTTCCAA
3. Conyza canadensis	ATCTCAAACCTGGAAAAATGTGGCAACGGAAAGCAAAAGCTAATAAGGTATCAGATCTTCCAA
4. Lactuca serriola	ATCTCAAACCTGGAAAAATGTGGCAACGGAAAGCAAAAGCTAATAAGGTATCAGATCTTCCAA
5. Raphanus spp.	ATCTCAAACCTGGAAAAATGTGGCAACGGAAAGCAAAAGCTAATAAGGTATCAGATCTTCCAA
6. Senecio vulgaris	ATCTCAAACCTGGAAAAATGTGGCAACGGAAAGCAAAAGCTAATAAGGTATCAGATCTTCCAA
7. Solanum nigrum	ATCTCAAACCTGGAAAAATGTGGCAACGGAAAGCAAAAGCTAATAAGGTATCAGATCTTCCAA
8. Sonchus asper	ATCTCAAACCTGGAAAAATGTGGCAACGGAAAGCAAAAGCTAATAAGGTATCAGATCTTCCAA
9. Veronica hederifolia	ATCTCAAACCTGGAAAAATGTGGCAACGGAAAGCAAAAGCTAATAAGGTATCAGATCTTCCAA
10. Portulaca oleraceae	ATCTCAAACCTGGAAAAATGTGGCAACGGAAAGCAAAAGCTAATAAGGTATCAGATCTTCCAA
11. Sonchus oleraceus	ATCTCAAACCTGGAAAAATGTGGCAACGGAAAGCAAAAGCTAATAAGGTATCAGATCTTCCAA
12. Sorghum halepense	ATCTCAAACCTGGAAAAATGTGGCAACGGAAAGCAAAAGCTAATAAGGTATCAGATCTTCCAA
13. TSWV-NRB-ALS	ATCTCAAACCTGGAAAAATGTGGCAACGGAAAGCAAAAGCTAATAAGGTATCAGATCTTCCAA
14. Xanthium strumarium	ATCTCAAACCTGGAAAAATGTGGCAACGGAAAGCAAAAGCTAATAAGGTATCAGATCTTCCAA

Şekil 4.10. Sörvey alanlarından toplanan izolatlar da C118 noktasında tespit edilen mutasyon. Adenin yerine Guaninin yerleşmesi. Mor renk ile nokta mutasyon vurgulanmıştır

Tek nokta mutasyonu sonucu dayanıklılığı kıran TSWV izolatının filogenetik ilişkileri incelendiğinde (Şekil 4.11), bu izolatların birbirinden farklı bölgelerde (hem Serik hem de Elmalı'da) dağıldığı tespit edilmiştir. Bu durum TSWV'nin taşınmasında etkin rol oynayan trips vektörlerinin varlığı ile ilişkilendirilmektedir. Farklı seralardan elde edilen izolatların filogenetik ilişkisine bakıldığında vektör tripslerin uzun mesafelere göç yetenekleri ile hastalık etmeni virüsün taşınmasında etkili oldukları sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.11. TSWV'nin medium segmentinde NSm proteini üzerinde C118Y noktasındaki mutasyon. UC West Side Research Extension Center'daki Gilbertson sunumundan alıntılanmıştır

Tospovirüsler, RNA virüsleri olduklarından, direnç kıran izolatu üretmek adına kolayca mutasyona uğradıkları (Hoffmann vd. 2001), yeni tospoviral türlerin ortaya çıkışının, tarımsal sistemlerin artan yoğunlaşması ve çeşitlenmesiyle de şiddetlendiği bildirilmiştir. Ek olarak, iklim değişikliği, vektör dağılımı ve davranışı üzerindeki etkileri, bitki duyarlılığı üzerindeki etkileri, yağış düzenleri, sıcaklık ve rüzgar hızı üzerindeki etkileri yoluyla tospovirüs salgınlarının istikrarsızlığını ve öngörülemezliğini artırmakta ve bunların tümü virüs popülasyon dinamiklerini değişik şekillerde etkilemektedir (Eiras vd. 2001).

Üretim alanlarında enfekte materyal mevcutsa, fakat trips mevcut değilse TSWV bitki popülasyonlarında daha düşük bir hızla yayıldığı bilinmektedir (mekanik taşıma). Dolayısıyla virüsü önlemenin en etkili yolu trips popülasyonunun kontrol altında tutulmasıdır. Bitki popülasyonları içinde kaç tane tripsin bulunabileceğini tahmin etmek zor olabilir. Ayrıca tripsler (Batı çiçek tripsi dahil), özellikle peyzaj ve süs bitkileri varsa ara konukçu (zorunlu-devamlı) yapılarda kışı geçirebilir. Yere dökülen hastalıklı yaprak, dal ve meyvelerin toplanması, yakılması veya derine gömülmesi, budama aletleri ve bıçakların her kullanışta dezenfekte edilmesi, temiz ve hastaliksız ambalaj malzemelerinin kullanılması gibi önlemler bu tür durumların çözümü için önerilebilir.

Bir TSWV salgını yaşandıysa veya düzenli olarak vektör böcek popülasyonu mevcut ise, gelecek yıl başka bir salgını önlemek için nasıl adımlar atılabileceği ve vektör popülasyonunu ve TSWV yoğunluğunu azaltmak için iyileştirilmesi gereken güncellemeler olup olmadığı göz önüne alınmalıdır. Seraların ve tarlaların içinde ve çevresinde yabancı otları kontrol edilmelidir. Yabancı otlar TSWV için kültür bitkisi yokluğunda ara konukçu (özellikle bir salgın olduktan sonra) olabilmektedirler. Ayrıca yabancı otlar tripsler için habitat görevi görebilmektedirler.

TSWV'nin yayılmasını yönetmek için domates ve biber yetiştirilen alanlarda mümkün olduğu kadar özellikle seralarda da yabancı ot sayısını azaltmanın son derece önemli olduğu söylenebilir. Hastalık etmeni virüsün yayılması, hastalığın vektörleri için konukçu olan yabancı otların ortadan kaldırılmasıyla daha etkin bir şekilde kontrol edilebilir (Momol vd. 2004). Bununla birlikte, TSWV'nin hayatta kalması ve yayılması üzerindeki etkilerini aydınlatmak ve yüksek ürün kayıplarını önlemek için trips konukçusu olarak yabancı otlar ve virüs kaynağı arasındaki ilişkiler hakkında daha kapsamlı çalışmaların yapılmasına da ihtiyaç vardır. Ek olarak, çok sayıda çalışma, TSWV izolatlarının konukçu-bitki dayanıklılığının üstesinden gelebileceğini rapor ederken tripsler için kullanılan etkili pestisitlere karşı vektörlerin dayanıklılık geliştirmesi de dikkate alınması gerekmektedir.

TSWV'yi taşıyan trips vektörlerine karşı kullanılabilecek sınırlı sayıda kimyasalın bulunması, ayrıca yabancı otlar da dahil olmak üzere çok geniş bir konukçu dizisinin varlığı, diğer hastalıklarda olduğu gibi TSWV hastalığının da epidemiyolojisini etkilemektedir. TSWV'nin, diğer bitki virüslerinden daha yüksek derecede biyolojik çeşitlilik, evrim ve adaptasyon sergilediği bildirilmektedir (Qiu ve Moyer 1999; Tsompana vd. 2005). Birkaç yıl öncesine kadar domates ve biberde bu hastalığa dayanıklı çeşitler yaygın olarak kullanılırken, yeni TSWV izolatu bu dayanıklı olduğu bilinen konukçularda enfeksiyona neden olmaya başlamıştır.

Daha önceki çalışmalarda belirtildiği gibi, TSWV enfeksiyonunun artan sıcaklıkla arttığı bildirilmektedir (Chung vd. 2018). TSWV'nin aktivitesinin bozulmasına karşı direncinde yüksek sıcaklığın belirleyici bir faktör olabileceğine inanılmaktadır. Bu bilgilere göre dayanıklı izolat TSWV'nin yüksek sıcaklık bölgelerinde domates ve biber bitkilerinin büyümesini olumsuz etkilediği ve yüksek sıcaklıktaki bölgelerde domatesin yetiştirilemez hale geldiği bildirilmektedir.

Sıcaklığın yüksek olduğu bölgelerde, üretim sırasında domates, biber gibi konukçuların çıkarılması ve bunların üzerinde konukçu olmayan diğer ürünlerin seçilmesi hastalık kontrolünde önemli bir adım olabilir. Türkiye'de ilk dayanıklılığı kıran izolat Antalya ili ve çevresinde domates bitkilerinde bulunması (Fidan 2016), bu izolatin sıcak bölgelerde endemik hale gelmesiyle açıklanabilir.

Uluslararası tohum ve sebze ticareti ve vektör tripslerinin varlığı, TSWV'nin ve ilişkili hastalıkların dünya çapında hızla yayılmasına neden olmaktadır (Pappu vd. 2009). Bu genişleme döneminde, muhtemelen konukçu ve çevresel faktörlere bağlı olarak TSWV gelişmeye devam etmektedir. Bununla birlikte, tospovirüslerin dolaşım yoluyla yayılma yolu, bitki virüsleri arasında benzersizdir, çünkü yetişkin trips, virüsü ancak virüs thrips'in yaşam döngüsünün larva aşamasında edinildiğinde başarılı bir şekilde iletebilir. Vektör yaşam döngüsü ve virüs aktarımı arasındaki bu karşılıklı bağımlılık, trips vektörlerinin metamorfozuyla ilgili çoklu enfeksiyon ve yayılma engellerini içermektedir (Nagata ve Peters 2001; Kritzman vd. 2002).

Belirli bir bitki türünün potansiyel epidemiyolojik önemine ilişkin herhangi bir değerlendirme, o türdeki TSWV enfeksiyonunun göreceli insidansının bir ölçüsünü de içermelidir. ABD'deki potansiyel TSWV inokulum kaynakları araştırmaları, öncelikle, ekim periyodları arasında meydana gelen yıllık ve çok yıllık kışlık konukçulara odaklanmıştır (Gitaitis vd. 1998). Her durumda, vektör popülasyonları, enfeksiyon vakaları ve bitki bolluğu tahminlerine dayalı olarak, TSWV'nin duyarlı ürünlere yayılmasına yalnızca sınırlı sayıda bitki türünün önemli katkıda bulunduğu kabul edilmiştir.

5. SONUÇLAR

Çalışma kapsamında Ağustos 2019 ile Aralık 2021 arasında TSWV enfeksiyonunun yoğun olarak gözlemlendiği iki adet biber ve domates serasında yılın farklı dönemlerinde toplam 15 kez gidilerek sörvey çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Serik ilçesinin Çakallık köyünde bulunan bir biber serası ve Elmalı ilçesinin Gölova köyünde bulunan bir domates serasından virüs ile enfekteli olma olasılığı taşıyan 58 biber bitkisi, 34 domates ve 270 adet yabancı ot örneği toplanmış ve 18 farklı bitki familyasına ait 39 yabancı ot türü artı 6 farklı kültür bitkisi türü (toplamda 290 adet) testlemeye tabi tutulmuştur. TSWV için potansiyel inokulum kaynağı olabilecek ve TSWV'nin yaşam döngüsünü tamamlayabilmesi için önemli olan yabancı otların tespit edilmesi de çalışmanın amaçları arasında yer almıştır. TSWV'nin yaşam döngüsünde büyük öneme sahip doğal konukçular belirlenmiş ve çalışmada Antalya'nın Elmalı ve Serik ilçelerinden toplanan yabancı otlar değerlendirilmiştir.

Çalışmada elde edilen genel sonuçlar aşağıda özetlenmiştir;

1. Gerçekleştirilen sörveyler sırasında hem biber hem de domateslerde, tipik TSWV belirtileri gözlenmiş ve bu bitkilerdeki hastalıkla bulaşıklık oranlarının %75-%100 arasında olduğu belirlenmiştir.
2. Özellikle domates ve biber yetiştirilen alanların yakınında taze tüketim amaçlı maydanoz, ıspanak, soğan, patlıcan, pazı ve fasulye gibi farklı kültür bitkilerinin yetiştirildiği seralarda, virüs belirtilerinin normalden daha yoğun olduğu gözlemlenmiştir.
3. Yabancı otlarda genel olarak yapraklarda hafif mozaik, klorotik lekeler, sararma ve nekrotik beneklenmeler dışında herhangi bir TSWV belirtisine rastlanılmamıştır. Belirti göstermeden pozitif sonuç veren fazla sayıda örnek belirlenmiştir.
4. Çiçekli yabancı otların, TSWV'nin ve tripsin yaşam döngüsünü tamamlamak için önemli bir ara kaynak oluşturdıkları ortaya konmuştur.
5. Sörvey çalışmalarında tripslerin beslenmek için tercih ettikleri yabancı otların, tercih etmedikleri yabancı otlara göre enfeksiyon oranının daha fazla olduğu belirlenmiştir.
6. Yapılan serolojik ve moleküler çalışmalar sonucunda 270 adet yabancı ot testlenmiş olup bu örneklerin 34 tanesinde TSWV tespit edilmiş ve TSWV konukçusu bazı yabancı otlar belirlenmiştir.
7. Testlemeler sonucu pozitif sonuç gösteren 34 örneğin 20 tanesi Serik ilçesinden, 14 tanesi ise Elmalı ilçesinden alınan yabancı otlar içerisinde yer almıştır. 7 tür ise her iki bölgede ortak konukçu olarak belirlenmiştir.

8. TSWV açısından pozitif bulunan 34 yabancı ot içerisinde 19 farklı tür bulunmuştur. Bu türlerin 11 tanesi tek yıllık, 3 tanesi çok yıllık, 5 tanesinin ise iki yıllık olduğu belirlenmiştir. Bu dağılım örnek alınan lokasyonlara göre farklılık göstermekte olup uniform bir dağılım gözlemlenmemiştir.
9. Testlemeler sonucunda toplanan yabancı otların %42'si Asteraceae ve %10'u Poaceae familyasına ait bulunmuş, kalan %48 lik bölümü ise diğer enfekteli türler oluşturmıştır.
10. Enfekteli türlerin 11 tanesi yazlık, 8 tanesinde kışlık yabancı otlardan oluşmuştur.
11. Toplanan tek yıllık yazlık yabancı otlarda tahmini enfeksiyon oranları *Conyza canadensis*'de %25, *Solanum nigrum*'da %26, *Xanthium strumarium*'da %50 olarak belirlenmiştir.
12. Dört mevsimde örnek alınıp test edilen türlerin arasında yer alan ve bitki virüslerinin tanılama ve teşhisinde indikatör bitki olarak sıkça kullanılan *Chenopodium album* (Sirken)'un beklenenin aksine geri kalan yabancı otlar gibi hiçbir belirti göstermemesi ve TSWV açısından temiz bulunması bu çalışmada ilginç bulunan sonuçlardan biri olmuştur.
13. TSWV açısında pozitif çıkan dar yapraklı yabancı otlar arasında *Sorghum halepense* ve *Digitaria sanguinalis* bulunmaktadır. Bu iki yabancı ot TSWV'nin yaygın konukçusu olmamasına rağmen yapılan testlemelerde pozitif çıkması bu türlerin önemini ortaya koymuştur.
14. *Sonchus* ve *Solanum* türlerinde sararmalar, bronzlaşma, halkalı lekeler, nekroz, genç yaprakların kıvrılması ve büyüme azalması gibi tipik TSWV belirtileri gözlemlenmiştir.
15. Sekans analizine göre yabancı otlardan sadece bir tanesi *Solanum nigrum* (Köpek üzümü) dayanıklılığı kırmayan izolat ile mutasyona sahip olmaksızın benzerlik göstermiştir. Bu bulgulara dayanarak hem yayladan hem de deniz seviyesinden toplanan izolatların %98'i dayanıklılığı kıran izolat (Resistance Breaking) olarak gruplandırılmış ve Antalyada hâkim izolatin dayanıklılığı kıran izolat olduğu belirlenmiştir.
16. Çalışma kapsamında mutasyon bölgesine özgü tasarlanan primerler qRT-PCR çalışmalarında kullanılmış ve TSWV izolatının Sw-5 veya Tsw genlerinin üstesinden gelen izolat olup olmadığını belirlemek için hızlı ve güvenilir bir tanı olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur.
17. Enfekteli yabancı otlardan elde edilen sekans verileri doğrultusunda virüsün medium segmentinde NSm-hareket proteini üzerinde 354. nükleotitte (C118Y) nokta mutasyonu meydana getirmesinden dolayı dayanıklılığı kıran izolatin ortaya çıktığı belirlenmiştir.

18. HRM analizi sonucunda dayanıklılığı kırmayan izolat (TSWV-NRB) 82.0°C T_m değerinde pik oluştururken dayanıklılığı kıran izolat (TSWV-RB) 81.4°C’de pik vermiştir. Bu iki izolatın sekans verileri karşılaştırıldığında kullanılan kit ve primerlerin mutasyonu belirlemek adına güvenilir bir tanı kiti oluşturdukları ortaya konmuştur.
19. Sonraki çalışmalarda mutasyon bölgesine özgü primerler ve Melt-curve aşamasında bu iki sıcaklık değerine bakılarak sekans hizmetine gerek duyulmadan TSWV’nin izolat durumu hızlı ve kolay bir şekilde anlaşılacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Adkins, S., 2000. Tomato spotted wilt virus-positive steps towards negative success. *Molecular Plant Pathology* 1:151-157.
- Adkins, S. and Baker, C. A. 2005. Tomato spotted wilt virus identified in desert rose in Florida. *Plant disease*, 89(5), 526-526.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant pathology*. Elsevier.
- Arli-Sokmen, M., H, Mennan, M.A. Sevik, Ecevit, O. 2005. Occurrence of Viruses in Field-grown Pepper Crops and Some of Their Reservoir Weed Hosts in Samsun, Turkey. *Phytoparasitica*, 33 (4): 347-358.
- Arslan, E., ve Kitiş, Y. E. 2021. Antalya İli Pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) Ekim Alanlarında Görülen Yabancı Otlar ve Popülasyon Durumları. *Turkish Journal of Weed Science*, 24(2), 141-149.
- Atakan, E., Kamberoğlu, M. A. and Uygur, S. 2013. Role of weed hosts and the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, in epidemiology of Tomato spotted wilt virus in the Çukurova region of Turkey. *Phytoparasitica*, 41(5), 577-590.
- Azeri, T. 1994. Detection of Tomato spotted wilt virüs' in Tabacco and Tomato Cultivars by Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Turkish Phytopathology*, 23(1):37-46.
- Bag, S., Druffel, K. L. and Pappu, H. R. 2010. Structure and genome organization of the large RNA of Iris yellow spot virus (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*). *Archives of virology*, 155(2), 275-279.
- Batuman, O., Turini, T. A., LeStrange, M., Stoddard, S., Miyao, G., Aegerter, B. J. and Gilbertson, R. L. 2020. Development of an IPM Strategy for Thrips and Tomato spotted wilt virus in Processing Tomatoes in the Central Valley of California. *Pathogens*, 9(8), 636.
- Berniak, H. 2016. Characterization of a new tomato spotted wilt virus isolates found in *Hippeastrum hybridum* (Hort.) plants in Poland. *Journal of Horticultural Research*, 24(1).
- Brittlebank, C. C. 1919. Tomato diseases. *Journal of the Department of Agriculture in Victoria*, 17, 1348-1352.
- Cebolla-Cornejo, J., Soler, S., Gomar, B., Soria, M. D. and Nuez, F. 2003. Screening Capsicum germplasm for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV). *Annals of applied biology*, 143(2), 143-152.
- Chatzivassiliou, E. K., Boubourakas, I., Drossos, E., Eleftherohorinos, I., Jenser, G., Peters, D. and Katis, N. I. 2001. Weeds in greenhouses and tobacco fields are differentially infected by Tomato spotted wilt virus and infested by its vector species. *Plant Disease*, 85(1), 40-46.
- Chung, B. N., Lee, J.H., Kang, B.C., Koh, S.W., Joa J.H., Choi, K.S., Ahn, J.J. 2018. HR-Mediated Defense Response is Overcome at High Temperatures in Capsicum Species. *Plant Pathology*, 34(1): 71-77.

- Clark, M. F. and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of general virology*, 34(3), 475-483.
- Cloyd, R. A. 2009. Western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) management on ornamental crops grown in greenhouses: Have we reached an impasse. *Pest Technology*, 3(1), 1-9.
- Coutts, B. A. and Jones, R. A. C. 2005. Suppressing spread of Tomato spotted wilt virus by drenching infected source or healthy recipient plants with neonicotinoid insecticides to control thrips vectors. *Annals of applied biology*, 146(1), 95-103.
- Culbreath, A. K., Todd, J. W. and Brown, S. L. 2003. Epidemiology and management of tomato spotted wilt in peanut. *Annual review of phytopathology*, 41(1), 53-75.
- Çelik, İ., Özalp, R., Çelik, N., Polat, İ. ve Görkem, S. Ü. L. Ü. 2018. Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV)'ne dayanıklı sivri biber hatlarının geliştirilmesi. *Derim*, 35(1), 27-36.
- Değirmenci, K., Uzunoğulları, N. 2007. Marmara Bölgesinde domates yetiştiricilik alanlarında sorun olan virüslerin belirlenmesi, Bitki Koruma Bülteni, 47(1-4): 72- 77.
- Duffus, J. E. (1971). Role of weeds in the incidence of virus diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 9(1), 319-340.
- Ebratt R, E. E., Acosta A, R., Martínez B, O. Y., Guerrero G, O. and Turizo A, W. 2013. Tomato spotted wilt virus (TSWV), weeds and thrips vectors in the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the Andean region of Cundinamarca (Colombia). *Agroscopia Colombiana*, 31(1), 58-67.
- Fidan H. 2016. Antalya'da Örtü Altı Domates ve Biber Alanlarında Dayanıklılık Kırın Tomato spotted wilt virus (TSWV) İzolatların Genetik Kıyaslanması, VI. Türkiye Bitki Koruma Kongresi KONYA, TÜRKİYE. 560-560.
- Fidan, H., Koç, G., Topçu, T. 2016. Anthurium sp.'de Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) Enfeksiyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. *Alatarım*. 15(2): 28-36.
- Fidan H. and Sarı N. 2019. Molecular characterization of resistance breaking Tomato spotted wilt virus (TSWV) isolate medium segment in tomato. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17: 2203-2218.
- Fidan, H., Sarıkaya, P., Yıldız, K., Topkaya, B., Erkiş, G. and Calis, O. 2021. Robust molecular detection of the new Tomato brown rugose fruit virus in infected tomato and pepper plant from Turkey. *Journal of Integrative Agriculture* 20(8):2170-2179.
- Garland, S., Sharman, M., Persley, D. and McGrath, D. 2005. The development of an improved PCR-based marker system for Sw-5, an important TSWV resistance gene of tomato. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56(3), 285-289.
- Goldbach, R. W., Peters, D. 1994. Possible causes of the emergence of Tospoviruses diseases. *Seminars in Virology*, 5: 113-120.
- Goldbach, R., Bucher, E., Prins, M. 2003. Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. *Virus Research*, 92: 207-212.

- Grada, A. and Weinbrecht, K. 2013. Next-generation sequencing: methodology and application. *The Journal of investigative dermatology*, 133(8), e11.
- Groves, R. L., Walgenbach, J. F., Moyer, J. W. and Kennedy, G. G. 2001. Overwintering of *Frankliniella fusca* (Thysanoptera: Thripidae) on winter annual weeds infected with Tomato spotted wilt virus and patterns of virus movement between susceptible weed hosts. *Phytopathology*, 91(9), 891-899.
- Groves, R. L., Walgenbach, J. F., Moyer, J. W. and Kennedy, G. G. 2002. The role of weed hosts and tobacco thrips, *Frankliniella fusca*, in the epidemiology of Tomato spotted wilt virus. *Plant Disease*, 86(6), 573-582.
- Güldür, M.E., Marchoux, G., Yürtmen, M., Yılmaz, M.A. 1995. Mersin ve çevresinde yetiştirilen domateslerde zararlı yeni bir virüs: Tomato spotted wilt virus. VII: Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 303-305.
- Herath, V., Romay, G., Urrutia, C. D. and Verchot, J. 2020. Family Level Phylogenies Reveal Relationships of Plant Viruses within the Order Bunyavirales. *Viruses*, 12(9), 1010.
- Holguín-Peña, R. J. and Rueda-Puente, E. O. 2007. Detection of Tomato spotted wilt virus in tomato in the Baja California Peninsula of Mexico. *Plant disease*, 91(12), 1682-1682.
- İbrişim, H., ve Kitiş, Y. E. 2020. Kumluca (Antalya-Türkiye) İlçesi Örtü Altı Domates Yetiştiriciliğinde Görülen Yabancı Otların Bazı Parametrelere Bağlı Yaygınlık ve Yoğunlukları. *Turkish Journal of Weed Science*, 23(1), 63-73.
- Jiang, D., Zhang, J., He, H., Li, J., Hu, D. and Song, B. 2021. Discovery of novel chromone derivatives containing a sulfonamide moiety as potential anti-TSWV agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 53, 128431.
- Kabaş, A., Fidan, H. and Demirelli, M. B. 2021. Identification of new sources of resistance to resistance-breaking isolates of tomato spotted wilt virus. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(5), 3094-3099.
- Kameroğlu, M. A., Atakan, E., Uygur, S., Çalışkan, A. F. ve Küçük, B. 2005. Türkiye'de *Ranunculus* Spp. Üzerinde Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (Tswv) Enfeksiyonu. *The Journal of Turkish Phytopathology*, 34(1-2-3), 27-29.
- Kameroğlu, M.A., Çalışkan A.F., Alan, B. 2009. First Report of Tomato spotted wilt virus on eggplant in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 91(1): 231-231.
- Kay, I. R. and Herron, G. A. 2010. Evaluation of existing and new insecticides including spirotetramat and pyridalyl to control *Frankliniella occidentalis* (Pergande)(Thysanoptera: Thripidae) on peppers in Queensland. *Australian Journal of Entomology*, 49(2), 175-181.
- Khan, J. and Dijkstra, J. 2006. Handbook of plant virology. *Food Products Press*.
- Kibar, H. 2014. *Yalova ili kesme çiçek üretimi yapılan alanlarda Tomato spotted wilt virus (TSWV), Dasheen mosaic virus (DSMV) ve Cucumber mosaic virus (CMV)'lerinin saptanması üzerine araştırmalar* (Master's thesis, Namık Kemal Üniversitesi).

- King, A. M., Adams, M. J., Carstens, E. B. and Lefkowitz, E. J. 2012. Virus taxonomy. *Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 9.
- Kormelink, R., Storms, M., Van Lent, J., Peters, D. and Goldbach, R. 1994. Expression and subcellular location of the NSM protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology*, 200(1), 56-65.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 1994. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Bioinformatics*, 10(2), 189-191.
- Lewandowski, D. J. and Adkins, S. 2005. The tubule-forming NSm protein from Tomato spotted wilt virus complements cell-to-cell and long-distance movement of Tobacco mosaic virus hybrids. *Virology*, 342(1), 26-37.
- Lin, C. Y., Ku, H. M., Chiang, Y. H., Ho, H. Y., Yu, T. A. and Jan, F. J. 2012. Development of transgenic watermelon resistant to Cucumber mosaic virus and Watermelon mosaic virus by using a single chimeric transgene construct. *Transgenic research*, 21(5), 983-993.
- Lian, S., Lee, J.S., Cho, W.K., Kim, M.K., Choi, H.S., Kim, K.H. 2013. Phylogenetic and Recombination Analysis of Tomato spotted wilt virus. *PLOS ONE*, 8: 1-11.
- Lopez, C., Aramburu, J., Galipienso, L., Soler, S., Nuez ,F., Rubio, L. 2011. Evolutionary analysis of tomato Sw-5 resistance-breaking isolates of Tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology*, 92: 210-215.
- Ma, X., Zhou, Y. and Moffett, P. 2019. Alterations in cellular RNA decapping dynamics affect tomato spotted wilt virus cap snatching and infection in Arabidopsis. *New Phytologist*, 224(2), 789-803.
- Macharia, I., Backhouse, D., Wu, S. B. and Ateka, E. M. 2016. Weed species in tomato production and their role as alternate hosts of Tomato spotted wilt virus and its vector *Frankliniella occidentalis*. *Annals of Applied Biology*, 169(2), 224-235.
- Maris, P. C., Joosten, N. N., Peters, D. and Goldbach, R. W. 2003. Thrips resistance in pepper and its consequences for the acquisition and inoculation of Tomato spotted wilt virus by the western flower thrips. *Phytopathology*, 93(1), 96-101.
- Momol, M. T., Olson, S. M., Funderburk, J. E., Stavisky, J. and Marois, J. J. 2004. Integrated management of tomato spotted wilt on field-grown tomatoes. *Plant Disease*, 88(8), 882-890.
- Morca, A. F., Çelik, A., Coşkan, S., Santosa, A. I. and Akbaş, B. 2022. Population analysis on tomato spotted wilt virus isolates inducing various symptoms on tomato, pepper, and *Chenopodium album* in Turkey. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 118, 101786.
- Moury, B., Pflieger, S., Blattes, A., Lefebvre, V. and Palloix, A. 2000. A CAPS marker to assist selection of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in pepper. *Genome*, 43(1), 137-142.
- Mullis, S., Martinez-Ochoa, N. and Mullis, S. W. 2009. Non-crop hosts of TSWV. *Bulletin*, 1354, 20-21.

- Nagata, T., Peters, D. 2001. An anatomical perspective of Tospovirus transmission. In: Harris KF, Smith OP, Duffus JE (eds) *Virus–insect–plant interactions*. Academic Press, New York, 51–67.
- Naidu, R. A., Sherwood, J. L. and Deom, C. M. 2008. Characterization of a vector-non-transmissible isolate of Tomato spotted wilt virus. *Plant Pathology*, 57(1), 190-200.
- Oliver, J. E. and Whitfield, A. E. 2016. The genus Tospovirus: emerging bunyaviruses that threaten food security. *Annual review of virology*, 3, 101-124.
- Olmos, A., Capote, N., Bertolini, E., Cambra, M., Punja, Z. and Boer, S. 2007. Molecular diagnostic methods for plant viruses. *Biotechnology and plant disease management*, 227-249.
- Padmanabhan, C., Ma, Q., Shekasteband, R., Stewart, K. S., Hutton, S. F., Scott, J. W. and Ling, K. S. 2019. Comprehensive transcriptome analysis and functional characterization of PR-5 for its involvement in tomato Sw-7 resistance to tomato spotted wilt tospovirus. *Scientific reports*, 9(1), 1-17.
- Pappu, H.R., Jones, R.A.C., Jain, R.K. 2009. Global status of Tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Research*, 141: 219–236.
- Presting, G.G., Smith, O.P. and Brown, C.R. 1995. Resistance to potato leafroll virus in potato plants transformed with the coat protein gene or with vector control constructs. *Phytopathology* 85:436-442.
- Prins, M. and Goldbach, R. 1998. The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. *Trends in microbiology*, 6(1), 31-35.
- Qiu, W., Moyer, J.W. 1999. Tomato spotted wilt Tospovirus adapts to the TSWV N gene-derived resistance by genome reassortment. *Phytopathology*, 89: 575- 582.
- Ramchiary, N., Kehie, M., Brahma, V., Kumaria, S. and Tandon, P. 2014. Application of genetics and genomics towards Capsicum translational research. *Plant biotechnology reports*, 8(2), 101-123.
- Riley, D. G., Joseph, S. V., Srinivasan, R. and Diffie, S. 2011. Thrips vectors of tospoviruses. *Journal of Integrated Pest Management*, 2(1), I1-I10.
- Robbins, M. D., Masud, M. A., Panthee, D. R., Gardner, R. G., Francis, D. M. and Stevens, M. R. 2010. Marker-assisted selection for coupling phase resistance to tomato spotted wilt virus and *Phytophthora infestans* (late blight) in tomato. *HortScience*, 45(10), 1424-1428.
- Roggero, P., Masenga, V. and Tavella, L. 2002. Field isolates of Tomato spotted wilt virus overcoming resistance in pepper and their spread to other hosts in Italy. *Plant Disease*, 86(9), 950-954.
- Roselló, S., Díez, M. J. and Nuez, F. 1998. Genetics of tomato spotted wilt virus resistance coming from *Lycopersicon peruvianum*. *European Journal of Plant Pathology*, 104(5), 499-509.
- Rotenberg, D., Krishna Kumar, N.K., Ullman, D.E., Montero-Astua, M., Willis, D.K., German, T.L., Whitfield, A.E. 2009. Variation in Tomato spotted wilt virus Titer

- in *Frankliniella occidentalis* and Its Association with Frequency of Transmission. *Phytopathology*, 99: 404-410.
- Ruark-Seward, C. L., Bonville, B., Kennedy, G. and Rasmussen, D. A. 2020. Evolutionary dynamics of Tomato spotted wilt virus within and between alternate plant hosts and thrips. *Scientific reports*, 10(1), 1-16.
- Samuel, G., Bald, J. G. and Pittman, H. A. 1930. Investigations on 'spotted wilt' of tomatoes. Bulletin. Council for Scientific and Industrial Research, (44).
- Sarı, N. 2018. Domates lekeli solgunluk virüs hastalığına karşı dayanıklılığı kıran TSWV (Tomato Spotted Wild Virus) izolatının moleküler karakterizasyonu.
- Sertkaya, G. 2015. Hatay İli Marul ve Ispanak Alanlarında Bazı Virüslerin Araştırılması. Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 20(1): 7-12
- Sether, D. M. and DeAngelis, J. D. 1992. Tomato spotted wilt virus host list and bibliography.
- Soler, S., Nuez, F. and Cebolla-Cornejo, J. 2003. Control of disease induced by Tospoviruses in tomato: an update of the genetic approach. *Control of Disease Induced by Tospoviruses in Tomato*, 1000-1013.
- Srinivasan, R., Abney, M. R., Culbreath, A. K., Kemerait, R. C., Tubbs, R. S., Monfort, W. S. and Pappu, H. R. 2017. Three decades of managing Tomato spotted wilt virus in peanut in southeastern United States. *Virus research*, 241, 203-212.
- Srinivasan, R., Abney, M. R., Lai, P. C., Culbreath, A. K., Tallury, S. and Leal-Bertioli, S. 2018. Resistance to thrips in peanut and implications for management of thrips and thrips-transmitted orthotospoviruses in peanut. *Frontiers in plant science*, 1604.
- Storms, M. H., Kormelink, R., Peters, D., Lent, J. W. M. V., Goldbach, R. W. 1995. The Nonstructural NSm Protein of Tomato spotted wilt virus Induces Tubular Structures in Plant and Insect Cells, 214: 485-493.
- Şevik, M. A., Arlı-Sökmen, M. 2007. Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV) nün thrips türleri (Thrips tabaci Lindeman ve Frankliniella intonsa Tryborn) ile yayılış durumunun incelenmesi. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi. 115.
- Şevik, M. 2011. Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV)'nün Tarımsal ürünlerde meydana getirdiği ekonomik kayıplar. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 15(1), 35-42.
- Tekinel, N., Dolar, M. S., Sağsöz, S. ve Salcan, Y. 1969. Mersin bölgesinde ekonomik bakımdan önemli bazı sebzelerin virüsleri üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 9(1), 37-49.
- Tsompana, M., Abad, J., Purugganan, M., Moyer, J.W. 2005. The molecular population genetics of the Tomato spotted wilt virus (TSWV) genome. *Molecular Ecology*, 14(1): 53-66.
- Turhan, P. and Korkmaz, S. 2006. Determination of tomato spotted wilt virus using serological and biological methods in tomatoes grown in Çanakkale province. *Turkish Journal of Agricultural Sciences*.

- Webb, S. E. 1997. Evaluation of *Frankliniella bispinosa* as a potential vector of tomato spotted wilt virus. *Phytopathology*, 87, S102.
- Webster, C. G., Wylie, S. J. and Jones, M. G. 2004. Diagnosis of plant viral pathogens. *Current science*, 1604-1607.
- Whitfield, A. E., Ullman, D. E. and German, T. L. 2005. Tomato spotted wilt virus glycoprotein GC is cleaved at acidic pH. *Virus Research*, 110(1-2), 183-186.
- Whitfield, A.E., Ullman, D.E., German, T.L. 2005. Tospovirus-thrips interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 459-489.
- Van De Wetering, F., Goldbach, R. and Peters, D. 1996. Tomato spotted wilt tospovirus ingestion by first instar larvae of *Frankliniella occidentalis* is a prerequisite for transmission. *PHYTOPATHOLOGY-NEW YORK AND BALTIMORE THEN ST PAUL-*, 86, 900-905.
- Vidhyasekaran, P. 2007. Fungal pathogenesis in plants and crops: molecular biology and host defense mechanisms. *CRC Press*.
- Xuan, J., Yu, Y., Qing, T., Guo, L. and Shi, L. 2013. Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer letters*, 340(2), 284-295.
- Yardımcı, N. and Çulal-Kılıç, H. 2009. Tomato spotted wilt virus in vegetable growing areas in the west mediterranean region of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 8(18): 4539-4541.
- Yeşil, S. and Gömlekli, Ö. 2021. Determination of Prevalence and Reservoir Weed Species of Tomato spotted wilt tospovirus-TSWV on Peppers Grown in Greenhouses in Kumluca District of Antalya, Turkey. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 9(sp), 2565-2570.
- Zhang, J., Chiodini, R., Badr, A. and Zhang, G. 2011. The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of genetics and genomics*, 38(3), 95-109.

7. EKLER

EK. 1. ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler (gr/l)

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

0.13 M NaCl (8 gr), 0.014 M KH_2PO_4 (0.2 gr), 0.002 M KCl (0.2 gr), 0.08 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (2.9 gr).

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

II. Kaplama Tampon Çözeltisi (pH=9,6)

0.015 M Na_2CO_3 (1.59 gr), 0.035 M NaHCO_3 (2.93 gr)

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

III. Yıkama Tampon Çözeltisi (pH= 7.4)

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

IV. Ekstraksiyon Tampon Çözeltisi (pH=7.4)

1 litre yıkama tampon çözeltisi + 20 gr. (%2) Polyvinylpyrrolidone 40.000 (PVP40) + 1 gr yağsız süt tozu ilave edilerek hazırlanmıştır.

V. Konjugat Tampon Çözeltisi (pH= 7.4)

1 litre PBS içerisinde 20.0 gr Polyvinylpyrrolidone, 2.0 gr BSA ve 0.5 ml Tween-20 ilave edilerek hazırlanmıştır.

VI. Substrat Tampon Çözeltisi (pH= 9.8)

9.7 ml Diethanolamin + 0.02 gr NaN_3 , 80 ml saf su içerisine ilave edildikten sonra konsantre HCl ile pH 9.8'e ayarlanarak 100 ml'ye tamamlanmıştır.

EK. 2. DAS-ELISA testinde izlenen basamaklar

A- Virüse özgü Antibody (IgG), Coating (IgG Kaplama) tamponu ile kullanılacak optimum konsantrasyona (1/1000) göre sulandırılmış γ -globulinden ELISA plate'nin her bir çukuruna 100 μ L eklenmiş ve plate üzeri kapatılarak 37°C de 4 saat inkübe edilmiştir.

B- İnkübasyondan sonra yıkama tamponu ile tüm çukurlar 8 kez plastik piset veya çok kanallı mikro pipet yardımı ile hızlıca yıkanmıştır. Plate ters çevrilerek plate çukurlarındaki yıkama tamponu boşaltılarak kurulanmıştır.

C- Örnekler 1/5 oranında ekstraksiyon tamponu ile ezilerek hazırlanmış ve her bir çukura 100 μ L düzenlenmiş şemaya göre eklenmiş ve plate'in üzeri kapatılıp +4 °C de bir gece (Overnight-16 saat) veya 37 °C'de 2-5 saat boyunca inkübe edilmiştir.

D- İnkübasyondan sonra platelerin yıkama işlemi (B) aşamasındaki gibi tekrarlanmıştır.

E- Enzim Conjugate (enzimle işaretli Ig G), konjugate tamponu ile optimum kullanılacak konsantrasyona (1/1000) göre sulandırılarak her bir çukura 100 μ L eklenmiş ve plate 37°C de 2-4 saat inkübasyona tabi tutulmuştur.

F- İnkübasyondan sonra yıkama tamponu ile platelerin yıkama işlemi (B) aşamasındaki gibi tekrarlanmış ve kağıt havlu üzerine vurarak kuruması sağlanmıştır.

G- Substrat tamponunda taze olarak hazırlanmış substrattan (1mg/ml p-nitrophenyl phosphate) her bir çukura 100 μ L konmuş ve 30-60 dk veya gerekli görüldüğünde daha uzun süre oda sıcaklığında karanlıkta enzimatik reaksiyon için bekletilmiştir.

H- İnkübasyon süresi sonunda, ihtiyaç duyulduğu durumlarda reaksiyonu durdurmak için her bir çukura 20-50 μ L 3 M NaOH ilave edilmiştir.

İ- Plate'in çukurlarındaki renk değişimine dayalı ölçümler ELISA-Reader ile 405 nm dalga boyunda değerlendirilmiştir.

EK. 3. Total Nükleik Asit Protokolü

- 1- 100-400 mg örnek, 1.2 ml ekstraksiyon buffer (100 mM Tris, pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol)'da ezilmiştir.
- 2- Ezilmiş örnekten 600 µl alınıp 1.5 ml'lik tüplere konulmuştur. Üzerine %10'luk SDS'den 70 µl eklenip 65 °C'de 20 dk bekletilmiştir. Bekleme esnasında tüpler bir veya iki kez karıştırılmıştır.
- 3- 200 µl 5 M potasyum asetat, tüplere eklendikten sonra buzda 30 ila 60 dakika arasında bekletilmiştir.
- 4- Buzdan alınan örnekler 10 dk 14.000 rpm'de santrifüj edilmiş, sıvı kısımdan 600 ml alınarak yeni 1.5 ml'lik tüplere konulmuştur.
- 5- Üzerine 600 µl soğuk %96'lık etanol eklenerek bir gece overnight'a bırakılmıştır.
- 6- 10 dk 10.000 rpm'de santrifüj yapılmıştır.
- 7- Çökelti üzerinde kalan sıvı, tüplerden dikkatlice uzaklaştırılmış, 15 sn'lik kısa bir santrifüj daha yapıldıktan sonra alkol, pipetle çekilmiştir.
- 8- Pellet 10 dk kurutulmuş, üzerine 100 µl steril distile su eklenerek karıştırılmıştır.
- 9- 37 °C'de 15 dk. inkübe edilmiş ve inkübasyon sırasında bir iki kez hafifçe karıştırılmıştır.
- 10- Elde edilen total nükleik asitten 5-10 µl alınıp elektroforez sonuç kontrolünden sonra -20 °C ya da -80 °C'de saklanmıştır.

EK. 4. Total Nükleik Analizlerinde Kullanılan Çözelti ve Solusyonlar**1.Ekstraksiyon tamponu**

Aşağıda belirtilen miktardaki kimyasallar 150 ml steril saf su içerisinde manyetik karıştırıcıda çözünmüş ve pH'sı ayarlanarak 200 ml tamamlanmıştır. Daha sonra 1/1000 v/v oranında 2.B.Mercaptoethanol ilave edilmiştir.

(100 mM Tris-HCl (pH: 8.0), 50 mM EDTA (pH:7,0), 500 mM NaCl, 10 mM

2.B.Mercaptoethanol).

Tris- HCl 2.422gr

EDTA 3,722 gr

NaCl 5,844 gr

2.%20 SDS (Sodium Dodecyl Sulphate)

20 gr SDS tartılmış ve 80 ml steril saf su içerisinde ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür. Daha sonra saf su ilave edilerek 100 ml tamamlanmış ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.5 M Potasyum Asetat (CH₃COOK)

60 ml steril saf su içerisinde 49,07 gr potasyum asetat çözdürülmüş ve daha sonra 100 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

EK.5. Tez çalışması esnasında TSWV konukçusu oldukları tespit edilen yabancı otlara ait botanik bilgiler- Kaynak: Tübives (Türkiye Bitkileri Veri Servisi/ Turkish Plants Data Service)

Yabancı ot Türü	Türkçe Adı	Hayat Formu	Yaşam Süresi	Yapı	Yükseklik (m)	Boy (cm)	Habitat	Çiçeklenme Periyodu	Tek/Çift Çenekli
Amaranthaceae									
<i>Amaranthus chlorostachys</i> WILLD.	Tilkikuyruğu, Hoşkuran	Terofit	TY	Ot	0-0	30-100	Çorak yerler	5-7**	ÇÇ
Asteraceae									
<i>Conyza canadensis</i> (L.)	Şifa Otu	Terofit	TY	Ot	0-1300	40-80	Nemli alan, sahil yakını	7-12	ÇÇ
<i>Lactuca serriola</i> L.	Acı marul, Yabancı marul	Hemikriptofit	İY	Ot	0-1750	40-120	Otlı yamaç, tarla kenarı, nadas tarla, ekili tarla	7-9	ÇÇ
<i>Senecio vulgaris</i> L.	İmam Kavuğu	Terofit	TY	Ot	0-700	20-40	Kumlu ve boş alan, tarla, maki	3-8	ÇÇ
<i>Sonchus asper</i> (L.) HILL	Dikenli Eşek Marulu	Hemikriptofit	TY/İY	Ot	0-1920	20-80	Orman açıklığı, kumlu alan, ekili tarla	3-8	ÇÇ
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Adi Eşek marulu, Eşek gevreği,	Hemikriptofit	TY/İY	Ot	0-1300	30-80	Tarla, boş alan	3-5	ÇÇ
<i>Xanthium strumarium</i> L.	Domuz Pıtrağı	Terofit	TY	Ot	0-1750	10-100	Ruderal	6-10	ÇÇ
<i>Cirsium arvense</i> (L.) SCOP.	Köygöçerten	Geofit	ÇY	Ot	30-2100	20-100	Yol kenarı, dere kıyısı, hendek, otlak, ekili alan	5-10	ÇÇ

<i>Tagetes patula</i>	Kadife çiçeği		TY	Çalı		20-120			
Brassicaceae									
<i>Raphanus</i> spp.	Yabani turp	Terofit	TY/İY			0-400	15-50		3-5
Fabaceae									
<i>Medicago</i> sp.	Karayonca	Terofit	TY			0-900	10-40		3-5
Poaceae									
<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.	Çatal otu	Terofit	TY			0-500	20-60		6-10
<i>Sorghum halepense</i> (L.) PERS.	Kanyaş	Geofit	ÇY	Ot		0-1400		Nemli tepeler, akarsu civarı, mısır ve nadas tarlaları	5-11
Portulacaceae									
<i>Portulaca oleraceae</i> L.	Semiz Otu	Terofit	TY				5-50		7-11 ÇÇ
Solanaceae									
<i>Solanum nigrum</i> L.	Köpek Üzüümü	Terofit	TY	Ot		0-1500	10-60	Çakıllı yerler, kumullar, nehir kenarları, yol kenarları	6-11 ÇÇ
Convolvulaceae									
<i>Convolvulus arvensis</i> L.	Mamıza (Konya, Mersin), Çadır	Hemikriptofit	ÇY	Çalı		0-3050		Kumlu bozkır, nadas tarlaları, hendeklerin	4-9

	çiçeği,						kenarlarının üzerinde		
Zygophyllaceae									
<i>Tribulus terrestris</i> L.	Demir dikenli, Çarık dikenli,	Terofit	TY	Ot	0-1200	10-50	Açık ve kumlu yerler, nadas tarlaları	6-9	ÇÇ
Polygonaceae									
<i>Polygonum aviculare</i> L.	Kuşekmeği, Çobandegneği, Eşek madımağı,	Terofit	TY	Ot	0-700	10-60	Çorak yerler	7-11	ÇÇ
Scrophulariaceae									
<i>Veronica hederifolia</i> L.	Adi Yavşan Otu	Terofit	TY	Ot	50-2000	10-60	Ormanlar, gölgeli kayalık yerler	3-6	ÇÇ

**Çiçeklenmenin meydana geldiği aylar

Terofit: Tomurcukları tohum içinde korunan tek yıllık bitkiler.- Tüm tek yıllık otsu bitkiler bu gruba girer. Büyüme mevsiminde (yani ilkbaharda) tohumları çimlenir, yazın sıcaklar başlamadan bitki tohum oluşturur ve ölür. Akdeniz ikliminin hüküm sürdüğü yerlerde baskındırlar. Morfolojik olarak bu bitkiler, köklerinin ince, gövde de geçen yıllara ait kalıntıların bulunmayışı ile ayrılırlar. Kaynak: <https://nedir.ileilgili.org/terofit>

Hemikriptofit: İki veya çok yıllık, genellikle de otsu bitkilerdir. İki yıllık olanlar ilk yılın sonunda rozet şeklinde dip yapraklar oluştururlar, büyüme tomurcuğu rozetin ortasında olup, toprak ile hemen hemen aynı düzeydedir. Yaz kuraklığının başlaması ile tohum verme olanağı bulamazlar ve gelecek ilkbahara kadar rozet şeklinde kalırlar. İkinci ilkbaharda rozetin ortasından çiçek ve tohumları taşıyacak olan gövde çıkar. Tohum oluşumunu takiben bitki ölür.

Geofit: Uygun olmayan dönemleri soğan, yumru ya da rizom şeklinde tamamen toprak altında geçiren çok yıllık bitkilerdir. Erken baharla birlikte yaprak, çiçek gibi toprak üstü kısımları çıkar ve yaz sıcakları başlamadan tohum oluştururlar; gövde üstü kısımları kurur. Bunlarda yazı sıcak ve kurak geçen bölgelerde (örneğin; İç Anadolu, Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu) yaygındırlar.

TY: Tek yıllık, **İY:** İki yıllık, **ÇY:** Çok yıllık, **ÇÇ:** Çift çenekli

ÖZGEÇMİŞ

Ailar GONBADI

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi
2016–2022	Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans	Gorgan Tarım Bilimleri ve Doğal Kaynaklar Üniversitesi
2011-2013	Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, Gorgan, İran
Lisans	Zanjan Üniversitesi
2005-2009	Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, Zanjan, İran

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1- Fidan H. Gonbadi A. Sarıkaya P. Çalış Ö (2022). Investigation of Activity of Tobamovirus in Pepper Plants Containing *L4* Resistance Gene. *Journal of Mediterranean Agricultural Sciences*, 35(2): 83-90 DOI: 10.29136/mediterranean.1083021