alatarım *2016, 15 (2): 28-36*

Anthurium sp.'de Tomato Spoted Wilt Virus (TSWV) Enfeksiyonu ve Moleküler Karakterizasyonu

Hakan FİDAN[1] Gökmen KOÇ[2] Tuba TOPÇU[3]

[1]Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antalya
[2]Ç.Ü. Pozantı MYO, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Adana
[3]Ayer Tarım Sanayi ve Ticaret A.Ş., Antalya

Özet

Çalışma Antalya/Türkiye'de yetiştirilen *Anthurium* sp,'de (*Anthurium scherzerianum*) bitkilerinde virüs benzeri simptomlar görülmesi üzerine 2015 yılında gerçekleştirilmiştir. Gözlemler sırasında Flamingo çiçeği bitkilerinin yapraklarında, sistemik klorotik mozaik ve düzensiz sarımsı koyu kahverengi nekrotik lekeler gözlenmiştir. Tanılanma için yaprak DAS-ELISA tekniğine göre AMV (*Alfalfa Mosaic Virus*), ArMV (*Arabis Mosaic Virus*), CMV (*Cucumber Mosaic Virus*), Poty (*Group Poty Virus*), SLRSV (*Strawberry Latent Ringspot Virus*), TMV (*Tobacco Mosaic Virus*), TNV (*Tobacco Necrosis Virus*), ToMV (*Tomato Mosaic Virus*), ToRSV (*Tomato Ringspot Virus*), Tospogrup (*Tospovirus*), TRSV (*Tobacco Ringspot Virus*), TSWV (*Tomato Spotted Wilt Virus*), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV),PVX (*Potato Virus* X), SqMV (*Squash mosaic virus*) ve ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*) gibi süs bitkilerinde bulunma olasılığı bulunan virüsler için 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 sonucu kılıf proteinine ait 276 bp cDNA bantları %2'lik agaroz jelde gözlenmiştir. 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 yalnızca TSWV'nin *Anthurium* bitkisindeki Türkiye için ilk kaydı olup aynı zamanda etmenin türler arasında kontrolsüz yayılımının kanıtıdır.

Anahtar Kelimeler: Flamingo çiçeği, TSWV, Türkiye, DAS-ELISA, RT-PCR.

Infection and Molecular Characterization of Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) *on Anthurium* sp.

Abstract

This research was conducted on *Anthurium sp* (*Anthurium scherzerianum*) observed the virus-like symptoms which was grown in Antalya in Turkey in 2015. During the observations, systemic mosaic and irregular yellowish dark brown necrotic spots were recorded on Flamingo flower plants. To identification, leaf samples were tested by DAS-ELISA using a specific polyclonal antiserum AMV (*Alfalfa Mosaic Virus*), ArMV (*Arabis Mosaic Virus*), CMV (*Cucumber Mosaic Virus*), Poty (*Group Poty Virus*), SLRSV (*Strawberry Latent Ringspot Virus*), TMV (*Tobacco Mosaic Virus*), TNV (*Tobacco Necrosis Virus*), ToMV (*Tomato Mosaic Virus*), ToRSV (*Tomato Ringspot Virus*), Tospo (*Tospovirus*), TRSV (*Tobacco Ringspot Virus*), TSWV (*Tomato Spotted Wilt Virus*), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), PVX (*Potato Virus* X), SqMV (*Squash Mosaic Virus*) and ZYMV (*Zucchini Yellow Mosaic Virus*) presence and identification of common ornamental plant viruses. Then samples which were positive in DAS-ELISA were confirmed by RT-PCR using total RNA extracted from leaves RT-PCR assay was conducted by primer pairs Sense TSWV L1r and Antisense TSWVL2f. As a result of RT-PCR, 276 bp cDNA bands were observed in 2% agarose gel. RT-PCR products were sequenced directly, and as the result of BLAST using datas from sequences, TSWV isolate in *Anthurium* showed 96-99 % similarity with different pepper isolates of TSWV. In Turkey, the occurrence of TSWV has reported on *Anthurium sp.* by serologically and molecular techniques. This study is not only the first record of TSWV in Turkey on *Anthurium sp* but also is evidence of uncontrolled distribution between plant species.

Key Words: *Anthurium* sp., TSWV, Turkey, DAS-ELISA, RT-PCR.

Sorumlu Yazar/Correspondence to: H. Fidan; hakanfidantr@hotmail.com
Geliş Tarihi/Received: 22.03.2016 Kabul Tarihi/Accepted: 29.11.2016
Makalenin Türü: Araştırma
Category: Research

Giriş

Anthurium bitkisinin (Flamingo çiçeği) anavatanı Orta ve Güney Amerika'dır. 500'ün üzerinde türü olduğu bilinmektedir. Hem saksıda hem de kesme çiçek olarak yetiştirilmektedir. Ülkemizde Anthurium bitkisi Marmara Ege ve Akdeniz bölgemizde yetiştirilmektedir. Anthurium bitkisinin etli 8-15 cm çapında bir çiçek tablası, kuyruğu andıran üreme organı ve 40-70 cm uzunluğunda çiçek sapı bulunmaktadır. Anthuriumların yaprakları koyu yeşil, geniş ayalı ve uzun saplıdır. Anthurium çiçekleri ve yaprakları kökten itibaren ayrı saplarla yükselir. Kazık köklü yapı toprak altında fazla kalırsa kütük oluşturur. Kılcal kökler ise çok sayıdadır ve saçak kök görünümündedir. Anthuriumlar tropik karakterli yapıdadır. Bu nedenle yüksek oranda nem, sıcaklık ve gölgeleme isterler. İklim isteklerinden dolayı ülkemizde de Akdeniz, Ege ve Marmara bölgelerinde örtü altında saksı ve kesme çiçek olarak yetiştirilmektedir. Akdeniz Bölgesi içinde yer alan ve süs bitkileri üretiminde önemli bir yeri olan Antalya'da iç mekân ve kesme çiçek olarak Anthurium yetiştiriciliği yapan üreticilerden virüs hastalıkları ile ilgili taleplerin gelmesi üzerine çalışma başlatılmıştır.

Diğer süs bitkilerinde olduğu gibi Anthurium bitkisinde yetiştirildiği alanlarda birçok hastalık rapor edilmiştir; *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (Robbs, 1953), *Acidovorax anthurii* (Almeida ve ark., 2002); *Alternaria* sp., *Cercospora richardiaecola*, *Cladosporium* sp., *Colletotrichum falcatum*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp., *Helminthosporium* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Phyllosticta* sp., *Septoria* sp., *Uredo anthurii*, *Phytophthora parasitica* and *Phytophthora* sp. (Lacerda, 2006); *Dasheen mosaic virus* (DsMV) (*Cucumber mosaic virus* (CMV) (Rivas ve ark., (1997) Miura ve ark., (2013) ve *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), Uchida ve ark., (1999), Chen ve ark., (2003), Norman ve Ali (2012) tarafından rapor edilmiştir.

Üreticilerin şikâyetlerine söz konusu olan belirtiler (yaprak kıvırcıklığı, nekrotik lekeler, nekrotik çizgiler, cüceleşme, yapraklarda yeşil, açık yeşil, kahverengi halka şeklinde belirtiler) incelendiğinde *Tomato Spotted Wilt Virus*, (TSWV) (Domates lekeli solgunluk virüsü) ile ilişkili olduğu kanaati oluşmuştur. Üretim yapılan alanların genellikle örtü altı sebze üretim alanları ile iç içe olmasından dolayı hem sebzede hem de süs bitkilerinde sorun olan virüs hastalıkları açısından incelenmiştir. Karışık enfeksiyon olmaları ihtimali de değerlendirilmiştir.

Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV), domates, biber ve marul bitkilerine zarar veren en önemli virüslerden bir tanesidir. TSWV çok geniş bir konukçu dizisine sahiptir, aralarında patlıcan, karpuz, bezelye, bakla, yerfıstığı ve patates gibi kültür bitkileri yanında, birçok süs bitkisi ve yabancı otların da dahil olduğu monokotiledon ve dikotiledon 80 familyaya ait 1.090 bitki türünün, TSWV'nin konukçusu olduğu belirlenmiştir (Goldback ve Peters,1994). Anthurium bitkisinde de değişik bölgelerden (Hawai, Hollanda,Çin, Florida/ABD, Brezilya) virüs hastalıkları rapor edilmiştir (Rivas ve ark., 1997; Miura ve ark., 2013; Uchida ve ark.,. 1999: Chen ve ark., 2003;, Norman ve Ali, 2012).

TSWV, *Bunyaviridae* familyasına dahil olup, bitkilerde en yıkıcı zararlara sebep olan ilk on virüs içerisinde yer alan *Tospovirüs* cinsine aittir (German ve ark, 1992; Gnayem, 1995). TSWV, Tysanoptera takımından *Frankliniella occidentalis, Thrips tabaci, T. setosus, T. parmi*, *F. shultzei, F. fusca* ve *Scirtothrips dorsalis* thrips'i ile persistent olarak taşınmaktadır (Cho ve ark., 1987; Eckel ve ark., 1996; German ve ark., 1992). *F. occidentalis* (Western Flower Thrips, WFT), TSWV'nin en önemli vektörü olarak bildirilmiştir (Ullman ve ark., 1992). Thripsler, virüsü larva döneminde 15 dakika beslenerek bünyesine alabilmekte ve yaklaşık 4- 18 gün sonra sağlıklı bitkiye taşımaktadır. TSWV thripslerle taşınmanın yanı sıra mekanik inokulasyon yöntemi ile de taşınabilmektedir. TSWV ile mekanik inokulasyondan 2-4 hafta sonra bitkilerde virüsün tipik simptomları gözlenmeye başlanabilmektedir (Korbin, 2005). TSWV, infeksiyon

zamanı ve çevre koşullarına bağlı olarak değişmekle beraber, genel olarak, bulaşık bitkilerde gelişme geriliği, cüceleşme, solgunluk, yapraklarda ve meyveler üzerinde halkalı lekeler, nekrotik ve klorotik lezyonlar, deformasyon ve genç sürgünlerde geriye doğru ölüm şeklinde simptomlara neden olmaktadır (Şevik, 2015). TSWV, tropik ve subtropik bölgelerde birçok sebze, meyve, süs bitkileri ve yabancı otlarda enfeksiyon gerçekleştirmektedir (Wilson ve ark., 2000). Örneğin, TSWV serada yetişen 41 süs bitkisini enfekte edebilmektedir (Sherman ve ark., 1998).

Türkiye'de ilk kez Çanakkale'de tütün yetiştirilen alanlarda TSWV görülmüş, bunun ardından Balıkesir, Manisa, Uşak ve Samsun illerinde de tespit edilmiştir (Azeri, 1981). Hastalık, İzmir ve Manisa'da önemli zararlara neden olmuştur (Azeri, 1994). Akdeniz Bölgesine virüsün tespiti, 1995 yılında İçel ili ve çevresinde açık alanda yetiştirilen domates bitkilerinde belirlenmiştir (Güldür ve ark., 1995). 1997 yılında Şanlıurfa'da domates yetiştirilen alanlarda Güldür (1997) tarafından TSWV etmeninin bulunduğu ilk kez rapor edilmiştir. Arli-Sökmen ve ark. (2005)'da, Samsun ilinde biber yetiştirilen alanlarda yapmış oldukları bir çalışmada TSWV'nin varlığını belirlemişlerdir. Anthurium'da TSWV ile ilgili bir tespit bulunmazken dünyanın değişik bölgelerinde TSWV ile ilgili tespitler yapılmıştır (Uchida ve ark., 1999; Chen ve ark., 2003; Norman ve Ali, 2012).

TSWV enfeksiyonu sonucunda oluşan simptomların görünüşü ve şiddeti; konukçu bitkinin türü, çeşidi, yaşı, gelişme dönemi (fide, vejetatif, çiçeklenme, meyve dönemi. vs.), virüsün ırkı, enfeksiyon zamanı ve iklim şartlarına (sıcaklık, ışık vs.) bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Soler ve ark., 1998). TSWV, domates bitkilerinde; bronzlaşma, yaprak kıvırcıklığı, nekrotik lekeler, nekrotik çizgiler, cüceleşme, olgunlaşmamış meyvelerde yeşil, açık yeşil, kahverengi halka şeklinde belirtiler, olgun meyvelerde açık koyu sarı, kırmızı alanlar, şiddetli nekroz simptomları oluşturmaktadır. Bazen şiddetli enfeksiyonlarda, virüs bitkiyi tamamen öldürebilmektedir (Chen ve ark., 2003; Norman ve Ali, 2012).

Materyal ve Metot

Çalışma materyali 2015 yıllın da Antalya ilindeki Anthurium üretim alanlarından toplanmıştır. Virüsle enfekteli olduğu düşünülen Anthurium örnekleri Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarında serolojik ve moleküler tekniklerle testlenmiştir.

Double Antibodysandwich Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (DAS-ELISA) Testi

Serolojik olarak ticari antiserumu olan ve süs bitkilerinde enfeksiyon oluşturan AMV (*Alfalfa Mosaic Virus*), ArMV (*Arabis Mosaic Virus*), CMV (*Cucumber Mosaic Virus*), Poty (*Group Poty Virus*), SLRSV (*Strawberry Latent Ringspot Virus*), TMV (*Tobacco Mosaic Virus*), TNV (*Tobacco Necrosis Virus*), ToMV (*Tomato Mosaic Virus*), ToRSV (*Tomato Ringspot Virus*), Tospo (*Tospovirus*), TRSV (*Tobacco Ringspot Virus*), TSWV (*Tomato Spotted Wilt Virus*), *Impatiens necrotic spot virus* (*INSV)*,PVX (*Potato Virus* X), SqMV (*Squash mosaic virus*) ve ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*) virüs hastalıkları açısından DAS ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Clark ve Adams (1977)'ye göre yürütülmüştür. Belirti gözlenen *Anthurium* yaprak ve çiçek örnekleri havan-havan eli yardımıyla phosphate buffer solution (PBS) (8.0 g NaCl, 0.2 g KH_2PO_4, 2.9 g $Na_2HPO_4.12H_2O$, 0.2 g KCl, 0.2 g NaN_3, 20 g polyvinylpyrrolidone-25 per L, pH 7.4) içerisinde 1/5 oranında ezilmiş ve bitki öz suyu çıkartılmıştır. ELISA plateleri karbonat bufferda (1.59 g Na2CO3, 2.93 g $NaHCO_3$, 0.2 g NaN_3 per L, pH 9.6) sulandırılmış virüse özgü antiserumlarla öncelikli olarak kaplanmış ve 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben PBST buffer (8.0 g NaCl, 0.2 g KH_2PO_4, 2.9 g $Na_2HPO_4.12H_2O$, 0.2 g KCl, 0.2 g NaN_3, 0.5 mL Tween- 20 per L) ile yıkanan platelere ezilen örneklerden eklenmiş ve 4°C'de. overnight yapılmıştır. Overnight sonrası tekrar yıkanan platelere konjugat buffer (PBST + 2%

polyvniylpyrrolidone-25 + 0.2% BSA (bovine serum albumin, Sigma A-4503, pH 7.4) içerisinde sulandırılmış virüse spesifik Alkalin Fosfatas ile konjuge antibody eklenmiştir. Bu işlemi 37°C'de 2 saat inkübasyon takip etmiştir. İnkübasyon sonrası tekrarlanan yıkama işleminin ardından plate çukurlarına P-nitrophenylphosphate in (97 ml diethanolamine, 0.2 g NaN_3 L-1, pH 9.8) içeren substrate buffer eklenmiş ve oda sıcaklığında karanlık koşullarda 2 saat bekletilmiştir. Test sonucu beklenen absorbans değerleri 405 nm'de Medispec ESR 200 ELISA Reader'da ölçülmüştür. Buffer ve negatif kontrolün en az iki katı absorbans değeri elde edilen örnekler TSWV ile enfekteli kabul edilmiştir (Clark ve Adams, 1977).

***RT-PCR*;** Thermo Scientific GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit yardımıyla ekstrakte edilen toplam RNA'lar RT-PCR da kullanılmıştır**.** Sense L1TSWVF AATTGCCTTGCAACCAATTC ve Antisense primerleri L1TSWVR ATCAGTCGAAATGGTCGGCA (Adkins ve ark., (2005) TSWV kılıf protein (CP) genine özgü 276 bp lik bir bölgenin saptanması için sentezlettirilmiştir. Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR kullanılarak RT-PCR aşaması (95 ^{o}C, 45 sn; 52 ^{o}C, 30 sn; and 72 ^{o}C, 45 sn) ve final uzama 72 ^{o}C'de 10 dakika toplam 35 döngüde gerçekleştirilmiştir. Çoğaltılan RT-PCR ürünleri %2'lik agaroz jel içerinde elektroforez edilip ethidium bromide ile boyanmıştır.

TSWV CP Geni Dizi Analizi, TSWV-CP genine özgü primerler ile 50 µl hacimde çalışılan RT-PCR agaroz jelde yürütülerek UV transimilatör altında kontrolleri yapıldıktan sonra kalan 40 µl'si gen dizi analizi (sekanslama) hizmeti almak için Macrogen firmasına gönderilmiştir. Elde edilen dizilerin nükleotid ve amino asit dizi homoloji analizleri GenBank databasede karşılaştırmaları BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı ile incelenmiştir.

Bulgular

Antalya Anthurium üretim alanlarında özellikle sonbahar döneminde virüs benzeri simptomların gözlemlenmesi ve belirtilerin seraların %40'ını etkilemesi sonucunda virüs belirtisi gösteren bitkilerde simptomatolojik gözlemler yapılmıştır. İlk belirtiler yaprak üzerinde 5-10 mm çapında sarı yeşil alanlar şeklinde görülmüştür. Hastalık ilerledikçe bu alanlar yuvarlak sarımsı lekeler şeklinde ve yüzeysel kahverengi girintili çıkıntılı lekeler şeklinde belirmiştir. Yaprak yüzeyinin altı ise sarı görünüm almaktadır. Yaprağın üzerinde bu lekelerin kenarındaki kahverengi sınırları daha geniş ve daha farklılık göstermektedir. Kahverengi nekrotik sınırlar bu lekelerde daha geniş ve farklı olduğu belirlenmiştir. Yuvarlak lekeler ise 10 ila 20 mm çapında ve daha yaygın olduğu gözlemlenmiştir. Yaprağın altındaki lekeler sarı ile birlikte kahverengi alanlar şeklindedir. Çiçeklerde ise halkalı lekelerin etrafında sarımsı haleler yerine daha koyu siyahımsı sınırlar olduğu belirlenmiştir ve o bölgede renk farklılığı meydana gelmiştir. Benzer simptomlar Hawaii, Hollanda,Çin, Filorida/ABD, Brezilya'da rapor edilmiştir (Uchida ve ark.,. 1999; Chen ve ark., 2003, Norman ve Ali, 2012). Özellikle Hawaii'de yapılan çalışmada bu belirtiler bakteri enfeksiyonları ile karıştırıldığı bildirilmiş olmasına rağmen TSWV enfeksiyonundan kaynakladığı tespit edilmiştir. Hastalıklı genç yapraklar ya da çiçeklerde sulu lekeler ve noktalar ve yanıklıklarla birlikte tipik bakteri yanıklığı semptomları görülmesine rağmen TSWV de bakteriyel akıntı oluşmayacağı ve nekrotik alanlar incelendiğinde bu alanlarda bakteri hücresine rastlanmayacağı rapor edilmiştir (Uchida ve ark., 1999; Norman ve Ali, 2012). TSWV enfeksiyonundan sonra bitkiler kuru bir ortama taşındığında bu sulu lekelerin çoğunun kaybolduğu gözlemlenmiştir. Erken dönemde Anthurium bitkileri TSWV ile enfekte olursa taze sürgünlerin öldüğü bitki gelişiminin durduğu gözlemlenmiştir (Şekil 1).

Hastalık ilerledikçe yaprak ve çiçek yüzeyinde yüzeysel kahverengi çukurlaşma (Şekil 1) ile dairesel, sarımsı lekeler oluşmuş yaprağın alt yüzeyinde düzensiz sarı renk değişimleri gözlemlenmiştir. Gözlemlenen simptomlar çok küçük farklılıklar dışında TSWV'nin en fazla

enfeksiyon meydana getirdiği biber ve domatesteki simptomlarla benzerlik göstermektedir. (Wilson ve ark., 2000, Azeri, 1994).



Şekil 1 TSWV ile enfekteli olduğu ELISA ve RT-PCR ile doğrulanan *Anthurium sp*. bitkisinde TSWV'e özgü meydana gelen halkalı leke ve solgunluklar, yaprak şeklinde deformasyon ve çiçekte renk kırılması belirtileri

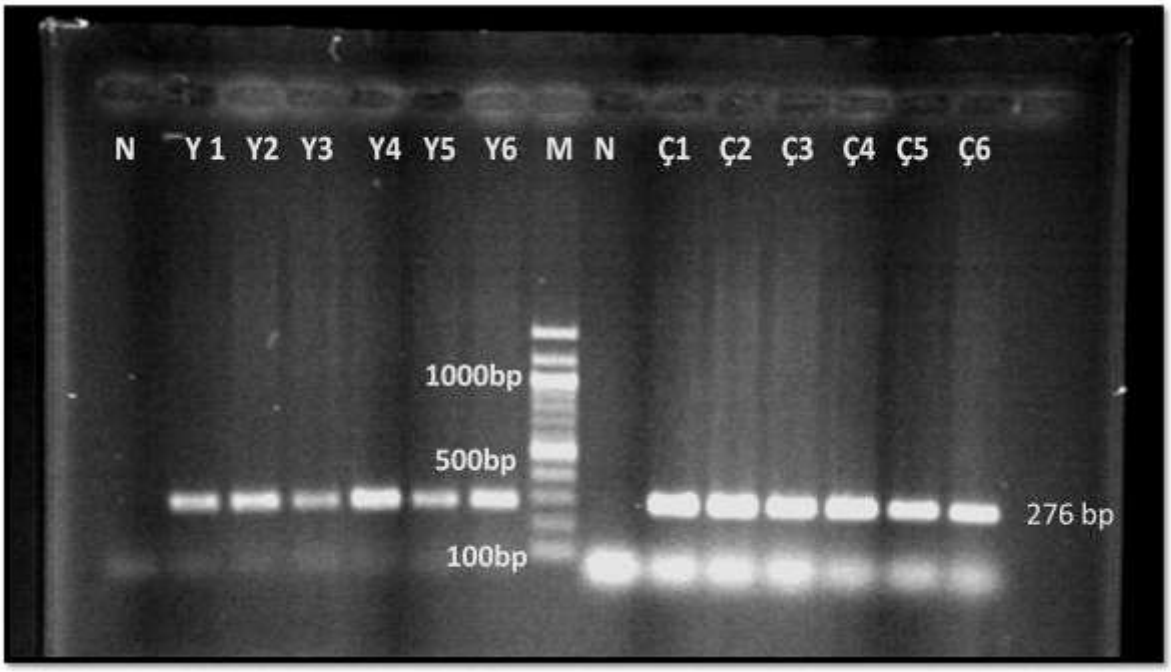
Anthurium bitkisinin yapraklarında ve çiçeklerinde gözlemlenen kahverengi nekrotik noktaların kenarları daha geniş ve daha belirgin hale gelmekte bu halkaların çaplarının 10-20 mm ye kadar büyüyebildikleri gözlemlenmiştir (Şekil 1). İlk bakışta bitkilerin bir bakteri ile bulaşık olduğu düşünülmesine rağmen yapılan izolasyon ve analizler sonucunda bakteri enfeksiyonu olmadığı anlaşılmıştır. Fungal hastalıklar açısından da incelenen örneklerde hastalık etmeni herhangi bir fungal patojen izole edilmemiştir. Son olarak örnekler virüs hastalıkları açısından simptomatolojik, serolojik, moleküler açıdan incelenmiştir. Özellikle Antalya'da Anthurium üretim alanları sebze ıslahı ve yetiştiriciliği yapılan alanlarla iç içe olduğu tespit edilmiştir. Virüslerin vektörler aracılığı ile sebze alanlarından süs bitkilerine taşınabilme ihtimali olmasından dolayı hem sebzelerde hem de süs bitkilerinde enfeksiyon oluşturan virüs hastalıkları açısından incelenmiştir.

Serolojik olarak ticari antiserumu olan hem süs bitkilerinde hem de sebzelerde enfeksiyon olusturan AMV, ArMV , CMV, Poty (*Group Poty Virus*), SLRSV, TMV, TNV, ToMV, ToRSV, Tospo (*Tospovirus group*), TRSV, TSWV, INSV, PVX, SqMV ve ZYMV virüs hastalıkları açısından DAS ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Testlemede aynı örneğin yaprakları ve çiçekleri ayrı ayrı test edilmiştir.

DAS ELISA çalışmaları sonucunda yaprakta ve çiçekte dairesel veya halkalı sarı ya da nekrotik lekelerin gözlemlenen örnekler TSWV ile enfekteli bulunmuştur. TSWV inde içinde bulunduğu *Tospovirus* grup spesifik antiserumdan da pozitif sonuç alınmıştır. Diğer virüs hastalıkları

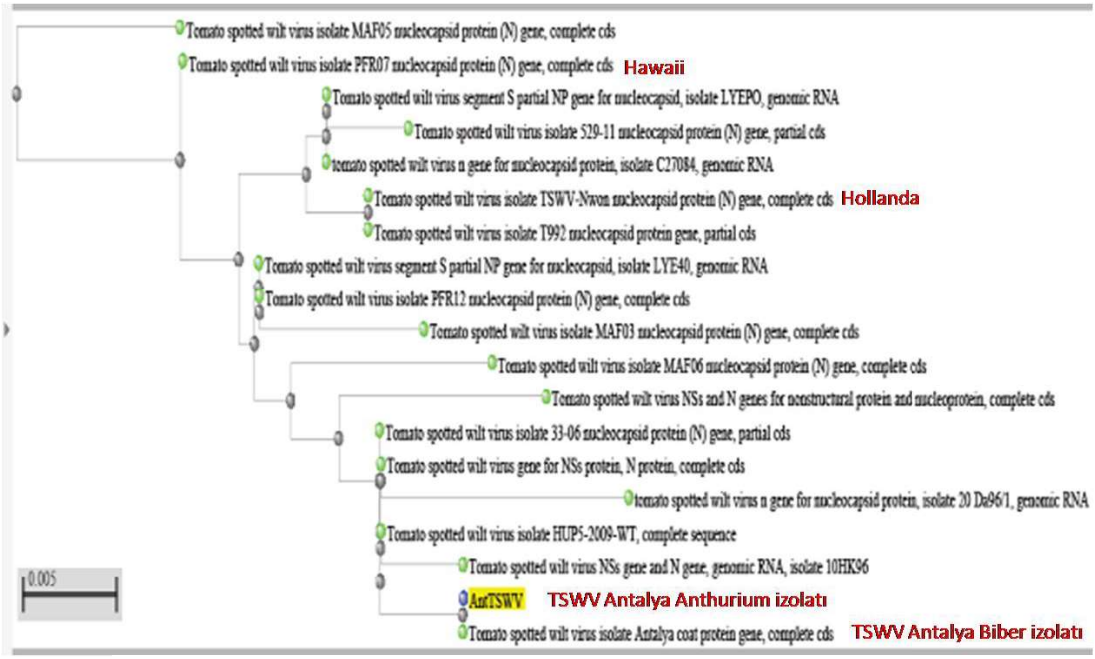
açısından temiz bulunmuştur. TSWV ile enfekteli bulunan örnekler yine aynı (*Tospovirus*) grupta yer alan *F. occidentalis* vektörü ile taşınan *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) açısından tekrar DAS ELISA yöntemi ile test edilmiştir. İkinci testleme sonucunda da örneklerin sadece TSWV ile dahil olduğu *Tospovirus* grubuna karşı pozitif reaksiyon vermiştir. Simptomatolojik gözlemlerde halkalı solgunluklar şeklinde simptom gösteren bitkiler TSWV ile enfekteli bulunması simptomatolji ve seroljik testler açısından uyum göstermiştir. DAS ELISA sonuçlarına göre bitkilerin yaprakları ve çiçeklerinden yapılan testlemelerin paralellik göstermektedir. Bu sonuçlar testlemler için örnek almada her iki organında kullanılabileceğini göstermektedir (Şekil 1). Norman ve Ali (2012)'nin yaptıkları sürveylerde Anthurium bitkisinde TSWV tek başına enfeksiyon meydana getirebildiği gibi bazı bölgelerde CMV ve INSV ile karışık enfeksiyon şeklinde kendini gösterdiğini bildirmişlerdir. Antalya ilindeki Anthurium yetiştirilen alanlarda karışık enfeksiyon gözlemlenmemiştir.

Serolojik olarak TSWV ile enfekteli bulunan örneklerden RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA'lar ile yapılan RT-PCR sonucunda TSWV kılıf proteini bölgesine özgü 276 bp'lik bölge çoğaltılmıştır.



Şekil 2. TSWV kılıf proteinine özgü primerlerle yapılan RT-PCR sonucunda oluşan 276 bp jel görüntüsü N; negatif kontrol (Sağlıklı bitki)Y1-6 ;Enfekteli yaprak örnekleri Ç1-6 TSWV ile Enfekteli çiçek örnekleri M; Markır (Thermo 100 bp DNA ladder)

NCBI (National Center for Biotechnology Information) de yapılan nükleotid karşılaştırmaları Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programında yapılmıştır. Anthurium'dan izole edilerek elde edilen izolatların daha önce Antalya'da biberden elde edilen (KM407603.1 Özer ve ark 2013) izolatlarla %99 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Anthurium'dan elde edilen TSWV (AntTSWV)'ın direkt sekanslanması sonucunda Antalya'da biber alanlarından tespit edilen izolat KM407603.1 ile %99 oranında benzerliği gösteren soy ağacı

Sekans sonuçları örneklerin toplandığı alan ve buradaki faaliyetler incelendiğinde zaten çok geniş konukçu dizilimine sahip olan TSWV'ün efekteli sebzelerden süs bitkilerine geçtiğini göstermektedir.

Tartışma ve Sonuç

Antalya'da en fazla virüslü bitki gözlemi yapılan firma aynı zamanda gül yetiştiriciliği ve sebze ıslahını aynı alan içerisinde yapmaktadır. Anthuriumdan elde edilen TSWV sekans sonuçlarının %99 oranında Antalya'da biber alanlarından tespit edilen izolat ile benzerlik göstermesi ve akrabalık ağacında aynı yerde yer alması sebzelerden vektör thripsler vasıtası ile süs bitkilerine geçişi işaret etmektedir. TSWV'nin konukçusu olan bitkiler (domates, biber, marul, tütün vs.) yan yana yetiştirilmemelidir. Anthurium bitkisinde başlangıç materyali genellikle Hollanda'dan ithal edilip ülkemizde çoğaltılmaktadır. RT-PCR sonucu elde edilen sekans bilgileri ile oluşturulan soyağacında TSWV'nin Türkiye'den rapor edilen izolatlar ile aynı yerde yer alması başlangıç materyalinin temiz olduğu bulaşmaların kaynağının etraftaki enfekteli bitkiler olduğu konusunda kanaatimizi desteklemektedir (Şekil 3). TSWV'nin konukçu türler arasında kontrolsüz yayılmasına da örnek teşkil etmektedir. Sherman ve ark., 1998 de yaptıkları çalışmada TSWV'nin .serada yetişen 41 süs bitkisini enfekte edebildiğini ve thripsler vasıtası ile sebze alanlarına bulaştığını bildirmektedir Virüslere ve aynı zamanda thrips vektörlere konukçuluk eden yabancı otların, fidelik, sera veya arazide ortadan kaldırılması gerektiğini. TSWV' nin konukçusu olan bitkiler (domates, biber, marul, tütün vs.) yan yana yetiştirilmemesinin önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Virüs hastalıklarının kimyasal mücadelesinin olmamasından dolayı hastalıktan kaçınmak inokulum kaynaklarını ortadan kaldırmak, vektörlerle etkili mücadele etmek, enfekteli bitkileri eradike etmek en önemli koruma yöntemleri arasındadır. Virüslere karşı gerekli tüm mücadele yöntemleri kullanılmalı ve hem yerel hem de bölgesel bazda ekonomik kayıplar azaltılmalıdır.

TSWV ile mücadelede tek bir mücadele yöntemi etkili olmamaktadır. Bu yüzden mücadelede birden fazla yöntemin entegre kullanılması gerekmektedir. Bunlar arasında yetiştiricilikte virüsten ari sertifikalı başlangıç materyali (tohum, sağlıklı fide, sağlıklı yumru, soğan, rhizom, stolon, çelik, göz gibi vejetatif üretim materyalleri) kullanılmalıdır. Hasat sonu temizlik ile TSWV mücadelesinde başarı sağlanmıştır. Erken dönemde fidelikte, serada veya arazide belirlenen enfekteli kültür bitkilerin derhal sökülüp imha edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla virüs ile mücadelede, vektör thrips türlerinin mücadelesi oldukça önem kazanmaktadır. TSWV'ye karşı mücadelede günümüzde en başarılı yöntemlerden birisi dayanıklı veya tolerant çeşitler kullanmaktır. Tüm bunlar ışığında TSWV'nin tarımsal ürünlerde meydana getirdiği verim kayıplarının önlenebilmesi veya azaltılabilmesi için öncelikle virüsün tespiti, taşınma ve yayılma yolları, epidemiyolojisi ve mücadele yöntemlerinin çok iyi bilinmesi gerekmektedir.

Kaynaklar

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

Almeida Img; Malavolta Junior Va; Destéfano, Sal; Paradela Filho O; Balanı Dm; Ferreira M; Santos Db., 2002. Mancha foliar em antúrio causada por *Acidovorax anthurii*: primeira constatação no Brasil. *Summa Phytopathologica* 28: 96.

Arli-Sökmen, M., Mennan, H., Sevik, M.A., Ecevit, O. 2005. Occurence of viruses in field-grown pepper crops and some of their reservoir weed hosts in Samsun, Turkey. Phytoparasitica 33: 347-358

Azeri, T., 1981. Preliminary report of tomato spotted wilt virus and its epidemiy on tobacco in the Çanakkale region of Türkiye. J. Turkish Phytopath., 10 (2-3): 79-87.

Azeri, T., 1994. Detection of tomato spotted wilt virus in tobacco and tomato cultivars by enzyme linked immunosorbent assay. J. Turkish Phytopath., 23 (1): 37-46.

Chen, J., McConnell, D.B., Henny, R.J., Everitt, K.C., 2003. Cultural Guidelines for Commercial Production of Interiorscape *Anthurium.* ENH956. Gainesville: University.

Cho, J.J., Mitchel, W.C., Mau, R.F.L., Sakımura, K., 1987. Epidemiology of Tomato Spotted Wilt Virüs Disease on Crisphead Lettuce inHawaii. Plant Disease, 71: 505- 508.

Clark M.F., Adams, A.N., 1977. Characteristics Of The Micro-Plate Method Of Enzime Linked Immuno Sorbent Assay For The Detection Of Plant Viruses. Journal Of General Virology. 34, 475-483.

Eckel, C.S., Cho, K., Walgenbach, J.F., Kennedy, G.G., d Moyer, J.W., 1996. Variation in Thrips Species Composition in Field Crops and İmplications for Tomato Spotted Wilt Epidemiology in North Carolina.Entomol.exp., 78: 19- 29.

German, T.L., Ullman, D.E. Moyer, J.W., 1992. Tospovirüses: Diagnosis, Molecular Biology, Phylogeny and Vector Relationships. Ann. Rev. Phytopathol. 30: 315- 348.

Goldbackh, R., Peters, D., 1994. Possible Causes of the Emergence of Tospovirüs Diseases. Seminers in Virology, 3: 113- 120.

Güldür, M.E., 1997., Şanlıurfa ili için yeni bir virüs: Domates lekeli solgunluk virüsü (Tomato spotted wilt virus). HR Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi. 1 (3): 71-76.

Güldür, M.E., Marchoux, G., Yurtmen, M., Yılmaz, M.A., 1995. Mersin ve çevresinde yetiştirilen domateslerde zararlı yeni bir virüs: Tomato spotted wilt virus. VII: Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 26/29 Eylül 1995, Adana, s: 303-305.

Lacerda, J.P., 2006. *Doenças fúngicas e bacterianas em algumas espécies de Araceae*. Lavras: UFLA. 81p (Dissertação mestrado).

Şevik, M.A., 2011 *Domates lekeli solgunluk virüsü* (TSWV)'nün Tarımsal Ürünlerde Meydana Getirdiği Ekonomik Kayıplar HR.Ü.Z.F. Dergisi, 2011, 15(1).

Şevik, M.A., 2015 Sebze Üretimini Tehdit Eden Viral Hastalık Etmeni: Domates lekeli solgunluk virüsü (*Tomato spotted wilt virus* – TSWV) Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Dergisi *Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech.* 5(2): 17-23, 2015.

Miura N.S.; Beriam LO.S., Rivas E.B., 2013. Detection of *Cucumber mosaic virus* in commercial anthurium crops and genotypes evaluation. *Horticultura Brasileira* 31: 322-327.

Norman D.J., Ali, G., 2012. *Anthurium* Diseases: Identification and Control in Commercial Greenhouse Operations UF/IFAS Extension. Original publication date February 2012. Reviewed March 2015. Visit the EDIS website at http://edis.ifas.ufl.edu.

Rivas, E.B.; Duarte L.M.L; Alexandre M.A.V., Galleti S.R., 1997. Dasheen mosaic virus in *Anthurium* species. *Virus Reviews & Research* 2: 192-193.

Robbs, C.F., 1953. A mancha bacteriana das aráceas. *Agricultura e Pecuária, Rio de Janeiro* 24: 18-19.*Tomato Spotted Wilt Virüs* in Common Agapanthus. Plant Disease, 84: 491.

Soler, S., Diez, M.J., Nuez, F., 1998. Effect of temperature regime and growth stage interaction on pattern of virus presence inTSWV-resistant accessions of *Capsicum chinense*. Plant Disease, 82: 1199-1204.

Uchida., J.Y., Ogata, D., Nagata, N., 1999. Tomato Spotted Wilt Virus on Anthurium Plant Disease June 1999 PD-17

Ullman, D.E., Cho, J.J., Mau, R.F.L., Westcot, D.M., Custer, D.M., 1992. A midgut barrier to *Tomato Spotted Wilt Virüs* acguistion by adult western flower thrips. Phytopathology, 82: 1333- 1342

Werkman, A.W. (Arjen) J.Th.J. (Ko) Verhoeven, J.W. (Annelien) Roenhorst 1989 Plant species found infected by *Tomato spotted wilt virus* and *Impatiens necrotic spot virus* at the Dutch Plant Protection Service since 1989.

Wilson, C.R., Wilson, A.J, Petehybridge, S.J., 2000. First record of tomato spotted wilt virus in common agapanthus. Plant Disease 84: 491.