



Antalya İlinde Marul Üretim Alanlarında Domates Lekeli Solgunluk Virüsü'nün (TSWV) Serolojik ve Moleküler Yöntemlerle Tanılanması

Handan ÇULAL KILIÇ^{1*}, Muharrem KARASOY¹

¹ Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Isparta

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

Özet

Bu çalışma Antalya ilinde yetiştirilen marul üretim alanlarında domates lekeli solgunluk virüsü (tomato spotted wilt virus, TSWV)'nün tespit edilmesi amacıyla 2023 yılında yürütülmüştür. Son yıllarda bölge üreticilerinden marul yetiştiriciliği yapılan alanlarda TSWV benzeri belirtiler ile ilgili şikayetlerin gelmesi sonucunda bu çalışma planlanmıştır. TSWV'nün varlığı serolojik ve moleküler yöntemlerle belirlenmiştir. Araziden toplanan ve virüslü olduğundan şüphelenilen bitkiler, öncelikle DAS-ELISA (Double-antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay) yöntemi ile testlenmiştir. Testlenen toplam 92 örneğin 39 adedinin TSWV ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Testlenen örneklerdeki hastalık oranı ise % 42.39 olarak belirlenmiştir. Toplam RNA ekstraksiyonu için bölgeleri temsil eden 5 bitki örneği seçilerek, RT-PCR (Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu) metodunda kullanılmışlardır. Agaroz jel elektroforezde 4 örnekte beklenen seviyede TSWV'ne spesifik 276 bp'lik bant oluşumu gözlemlenmiştir. Bir izolatta (Aksu izolatu) ve negatif kontrolde ise herhangi bir bant oluşumu gerçekleşmemiştir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi

Geliş Tarihi :03.06.2024

Kabul Tarihi :25.07.2024

Anahtar Kelimeler

Marul
TSWV
DAS-ELISA
RT-PCR

Detection of Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) in Antalya Province Lettuce Production Areas by Serological and Molecular Methods

Abstract

This study was conducted to determine of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in lettuce production areas in Antalya province in 2023 year. This study was planned as a result of receiving complaints from regional producers about TSWV-like symptoms in lettuce production areas in recent years. The presence of MWMV was determined by serological and molecular methods. Collected samples suspected to be TSWV were firstly tested with DAS-ELISA (Double-antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay) test. ELISA tests showed that among 92 samples, 39 were infected with TSWV and infection ratio for TSWV was determined as 42.39% of the field samples. In the study, 5 plant samples representing the regions were used for total RNA extraction and tested by RT-PCR (Reverse transcription polimerase chain reaction) for TSWV. The respected size of band with 276 bp in 4 samples was observed on agarose gel electrophoresis for TSWV. No band formation was observed in one isolate (Aksu isolate) and negative control.

Research Article

Article History

Received :03.06.2024

Accepted :25.07.2024

Keywords

Lettuce
TSWV
DAS-ELISA
RT-PCR

1.Giriş

Dünya nüfusunda oluşan artışla beraber, tarım ürünlerine olan ihtiyaçta gün geçtikte artmaktadır (Öncel ve ark., 2023). Beslenmemizde önemli bir yeri olan sebzeler vitamin ve mineraller bakımından oldukça zengindirler (Abak ve ark., 2010). Sebzeler işlenerek ya da taze olarak tüketilebilmektedirler (Erkan ve ark., 2013). Ülkemiz sebze üretiminde Çin, Hindistan ve ABD'den sonra 4. sırada yer almaktadır (Sırrı ve Özasan, 2020). Meyvesi yenen sebzeler, toplam sebze üretiminin yaklaşık %83.2'sini oluştururken, % 10.6'sını kök ve yumrusu yenen sebzeler izlemektedir. Marul, ıspanak, lahana ve brokoli gibi sebzeler ise %6.2'lik kısmı oluşturmaktadır. Marul, yaprağı yenen bir bitki olup, Asteraceae familyası içerisinde yer almaktadır. A, C ve mineral madde bakımından oldukça zengindir. Ülkemizde marul açıkta ve örtü altında yıl boyunca yetiştirilebilmektedir (Balkaya ve ark., 2018).

Antalya ili coğrafi konumu, toprak ve iklim özelliklerinden dolayı marul yetiştiriciliğinde önemli bir yere sahiptir. Marul üretiminde Ankara ve Adana illerinden sonra Antalya 3. sırada yer almaktadır (Kandemir ve Balkaya, 2022).

Marul üretimini sınırlayan çok sayıda abiyotik ve biyotik hastalık etmenleri bulunmaktadır. Dünyada ve ülkemizde marul üretim alanlarında bazı virüs hastalıkları belirlenmiştir (Alan, 2012; Moreno ve Fereres, 2012; Sertkaya, 2015; Zelyüt, 2016).

İlk olarak 1915 yılında tanımlanan TSWV, Bunyaviridae familyasının Orthotospovirus cinsine aittir. Küresel partiküllere sahip olan TSWV, başta *Frankliniella occidentalis* Pergande ve *Thrips tabaci* Lindeman olmak üzere dokuz thrips türü ile taşınmaktadır (Adkins, 2000). Virüs ayrıca mekanik yolla mekanik yolla da taşınabilmektedir (Sherwood ve ark., 2009).

Sertkaya (2012) yaptığı çalışmada TSWV'nün enfeksiyon oranını % 8.2 olarak belirtirken; Wilson (1998) marulda bu virüsün % 5-60 oranında verim kaybına neden olduğunu bildirmiştir. Rosello ve ark. (1996)

ise TSWV'nün bitkilerde % 42.1-100 arasında kayıpların görüldüğünü ifade etmiştir. TSWV bitkilerde gelişme geriliği, cüceleşme, sararma, solgunluk, nekrotik ve klorotik lokal lezyonlar ve yapraklarda halkalı leke gibi belirtilere neden olmaktadır (Yardımcı ve Çulal-Kılıç, 2009).

Virüslerin neden olduğu kayıpların en düşük seviyeye indirilmesi ve yayılmasının engellenmesi için; öncelikle virüsün tanısının yapılması, yayılma yollarının ortaya konulması ve izlenecek yolun belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

Ülkemizde, marulda virüs hastalıklarının belirlenmesi ile ilgili farklı bölgelerde yapılan çalışmalar bulunmaktadır (Döken ve ark., 1993; Özdemir ve Erilmez, 2007; Yardımcı ve Çulal-Kılıç, 2009; Kamberoğlu ve Alan, 2011; Sertkaya, 2012; Sertkaya, 2015; Zelyüt, 2016; Sağlam ve Kamberoğlu, 2019; Ertunç ve Randa-Zelyüt, 2019; Akbaş ve ark., 2021; Yeşil ve Ağca, 2021).

Antalya ilinde 2009 yılında domates, biber ve marulda TSWV'nün varlığının belirlenmesi için Bozdoğan, (2009) tarafından yürütülen bir çalışmada; 58 marul örneğinden 54'ünün TSWV ile enfekteli olduğu bildirilmiştir.

Son yıllarda bölge üreticilerinden marul üretim alanlarında TSWV benzeri semptomlar ile ilgili şikayetlerin gelmesi sonucunda bu çalışma planlanmıştır. Bu çalışma ile marul yetiştiriciliğinin yapıldığı Antalya ilinde TSWV etmeninin varlığı serolojik yöntem DAS-ELISA ve moleküler yöntem RT-PCR yöntemi ile ortaya konulmuştur.

2.Materyal ve Yöntem

2.1. Arazi çalışmaları

2023 yılı, Temmuz-Ağustos-Eylül aylarında Antalya ili marul yetiştiriciliğinin yapıldığı Finike, Serik, Aksu, Kaş ve Muratpaşa üretim alanlarında arazi çalışması yapılarak marul yaprak örnekleri toplanmıştır.

2.2. Enfekteli bitki materyalinin temini

Arazi çalışmaları boyunca marullarda mozaik, kloroz, nekroz, şekil bozukluğu ve bodurluk gibi belirtiler gösteren bitkilerinden

örnekler alınmıştır. Toplanan örnekler -20 C'de muhafaza edilmiştir.

2.3. Das-elisa

Çalışmada kullanılan ELISA kitleri (antiserumlar, pozitif ve negatif kontroller) BIOREBA-AG firmasından temin edilmiştir. Test sonuçlarının incelenmesinde ELISA okuyucusundan yararlanılmıştır. Böylece arazi çıkışlarında simptomatolojik olarak şüphe duyulan bitki örneklerinde TSWV etmeninin tanısının yapılması için DAS-ELISA yöntemi uygulanmıştır. Yöntem, firmanın yönergeleri doğrultusunda yapılmıştır.

2.4. Toplam nükleik asit izolasyonu

Bitkiden toplam nükleik asitler, RNA izolasyon kiti (Takara) kullanılarak izole edilmiştir. Sürvey yapılan alanlardan Finike, Serik, Muratpaşa ve Kaş'tan DAS-ELISA'da pozitif çıkan marul örneklerinden birer tane, Aksu'dan yine bir örnek seçilerek (toplam 5 örnek) toplam nükleik asit izolasyonu ve RT-PCR çalışmalarında kullanılmıştır.

2.5. RT-PCR çalışmaları

Ekstraksiyon aşamasından sonra, elde edilen total RNA'lar TSWV'ne spesifik primer kullanılarak (F-5-AATTGCCTTGCAACCAATTC-3; R-5-ATCAGTCGAAATGGTCGGCA-3) RdRp

geninin yaklaşık 276 bp'lik bir kısmı çoğaltılmıştır (Perez ve ark., 2014). RT-PCR çalışmaları tek aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. (Primescript One step RT-PCR kit; Takara Bio Inc). Tek bir reaksiyon karışımında; 1µl RNA, 1'er µl virüs spesifik primer çifti (her biri 20 µM), 25 µl 2x1 step buffer (Reaksiyon buffer, dNTP mix), 2 µl 1x step enzim mix (Reverstranscriptase, Taq Polimeraz, Rnase inhibitör) ile hazırlanmıştır.

TSWV için PCR koşulları; 50 °C'de 30 dakika, 94 °C'de 2 dakika; 94 °C'de 30 sn, 54 °C'de 30 sn, 72 °C'de 30 sn 30 döngü; 72 °C'de 1 dakika ve 4 °C'de ∞ olarak uygulanmıştır.

PCR ürünleri ethidium bromide ilaveli %1'lik agaroz jelde 100 V'da 1 saat süreyle koşturularak, UV ışığı altında görüntülenmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

Antalya ilinin Finike, Serik, Aksu, Kaş ve Muratpaşa ilçeleri marul üretim alanlarında gerçekleştirilen arazi çalışmalarında kloroz, mozaik, deformasyon, nekroz ve baş büyüklüğünde azalma gibi genel olarak virüslerden kaynaklanan belirtiler gözlenmiştir (Şekil 1, 2). Benzer belirtiler farklı araştırmacılar tarafından da ifade edilmiştir (Yeşil ve Ağca, 2021; Akbaş ve ark., 2021).



Şekil 1. Yapraklarda nekroz ve deformasyon belirtisi



Şekil 2. Yapraklarda solgunluk, nekroz, bitkide baş büyüklüğünde azalma

Antalya ilinde sürvey alanlarından toplam 92 yaprak örneği alınarak DAS-ELISA testine tabi tutulmuştur. Toplanan örnek sayısı,

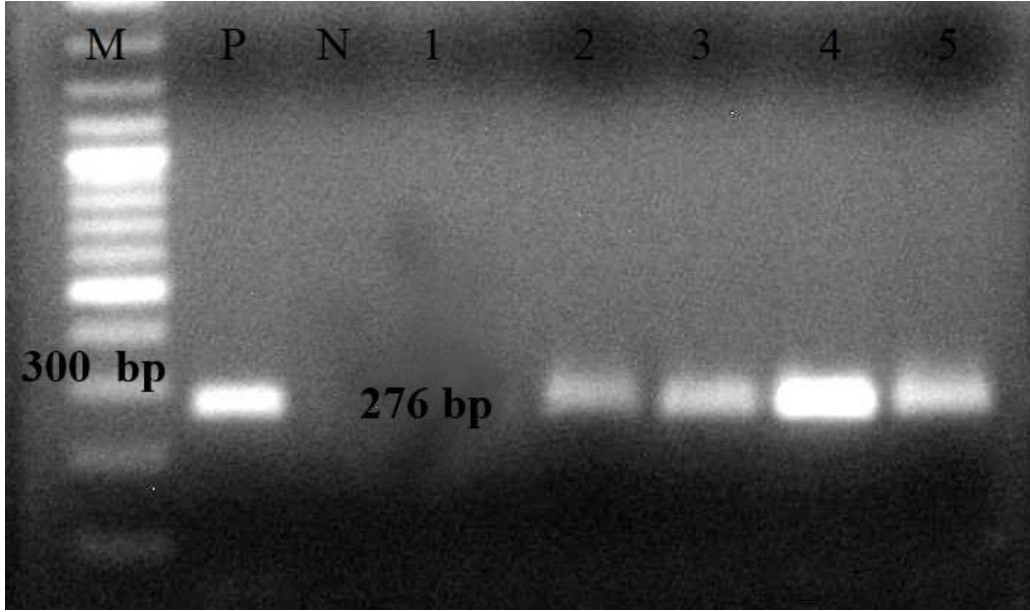
TSWV ile enfekteli örnek sayısı ve enfeksiyon oranları Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. DAS-ELISA testi sonucunda marul bitkilerinde belirlenen TSWV enfeksiyon oranı

Örnek Alınan Yer	Araziden alınan örnek sayısı	TSWV ile bulaşık örnek sayısı	Enfeksiyon oranı (%)
Finike	24	18	75
Serik	26	18	69.2
Muratpaşa	20	2	10
Aksu	11	0	0
Kaş	11	1	9.09
Toplam	92	39	42.39

Tablo 1’de DAS-ELISA test sonuçlarına göre Finike, Serik, Muratpaşa, Aksu ve Kaş üretim alanlarından toplanan 92 adet örneğin 24’ü Finike’den, 26’sı Serik’den, 20’si Muratpaşa’dan, 11 adeti Aksu ve yine 11 adet Kaş’tan toplanmıştır. Toplam 92 örnekten DAS-ELISA sonuçlarına göre 39 adet örnek TSWV ile enfekteli bulunmuştur. Enfeksiyon oranları, Finike’de % 75; Serikte % 69.2 Muratpaşa’da % 10 Kaş’ta ise %9.09 olarak tespit edilmiştir. Aksu’da ise TSWV enfeksiyonuna rastlanmamıştır.

Finike, Serik, Muratpaşa ve Kaş marul örneklerinden DAS-ELISA testi sonuçlarında pozitif çıkanlar ile Aksu’dan alınan bir örnek total RNA izole edilerek PCR çalışmalarında kullanılmıştır. RT-PCR çalışmalarına göre; DAS-ELISA testinde pozitif reaksiyon veren 4 izolat beklenen seviyede bant verirken; DAS-ELISA testi sonucunda negatif reaksiyon veren Aksu izolatında bant oluşumu gözlenmemiştir. Negatif kontrolde de herhangi bir bant oluşumu gerçekleşmemiştir.



Şekil 3. M: markır (100 bp DNA ladder; P: pozitif örnek; N: negatif örnek 1: Aksu örneği; 2: Finike örneği 3: Serik örneği 4: Muratpaşa örneği; 5: Kaş örneği

Kamberoğlu ve Alan (2011) Adana ve Mersin illeri marul üretim alanlarında yaptıkları çalışmada toplanan 336 örnekten 4'ünün TSWV ile enfekteli olduğunu bildirmiştir. Tanılama yöntemlerinden DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemlerini kullanmışlar ve virüse özgü 811 bp büyüklüğünde bant elde etmişlerdir. Konya ili marul üretim alanlarında yapılan farklı bir çalışmada; 97 adet marul örneğinin testlenmesi sonucunda örneklerin %27.83'ünün TSWV ile enfekteli olduğu bulunmuştur (Yeşil ve Ağca; 2021). Ankara ilinde marullarda virüs hastalıklarının belirlenmesi ile ilgili çalışma da testlenen örneklerde TSWV'ne rastlanmamıştır (Ertunç ve Zelyüt, 2019). Akbaş ve ark., (2021) aynı bölgede yaptıkları çalışmada yine TSWV enfeksiyonuna rastlanmamışlardır.

Sertkaya (2012) Hatay ilinde marullarda yaptığı çalışmada TSWV'nün enfeksiyon oranını % 8.2 olarak belirlemiştir. Sertkaya (2015)'de aynı bölgede yaptığı farklı bir çalışmada da testlenen 53 adet marul örneğinde, TSWV enfeksiyon oranını % 5.6 olarak belirlemiştir.

Bozdoğan ve Kamberoğlu (2015), Antalya ili sebze üretim alanlarında TSWV tanılama çalışması ile ilgili yaptıkları çalışmada, TSWV'nün varlığını hem DAS-ELISA hem de

RT-PCR ile ortaya koymuşlardır. RT-PCR çalışmaları sonucunda 276 ve 514 bp büyüklüğünde bant elde etmişlerdir.

4. Sonuçlar

Virüs hastalıklarının mücadelesinde kullanılan herhangi bir pestisit bulunmamaktadır. Bu sebeple virüs hastalıklarının belirlenmesi, bitkilerin virüs enfeksiyonlarından korunmasında en önemli adımlardan birini oluşturmaktadır. Böcekler virüslerin taşınmasında vektör olarak çok etkilidirler. Bu nedenle virüs hastalıklarının yaygınlıklarının azaltılmasında; vektörünün biyolojisinin araştırılması, enfekteli bitkilerin ve hasat sonrası artıkların toplanması veya yakılarak imha edilmesi, virüsten arı üretim materyalinin kullanılması oldukça önemlidir.

Yapılan bu çalışma ile TSWV'nin maruldaki varlığı hem DAS-ELISA yöntemi hem de RT-PCR yöntemi ile ortaya konulmuştur. Bununla birlikte, virüs ve virüs benzeri patojenlerden kaynaklı marul bitkilerinin hepsinde TSWV etmeni tespit edilmemiştir. Böylece, bu belirtiler farklı virüs hastalıklarının olabileceğini, bazılarının TSWV etmeni ile birlikte şiddetli enfeksiyonlara neden olabileceğini işaret etmektedir. Dolayısıyla, gelecek çalışmalar

için bölgede farklı viral türlerin araştırılması önem arz etmektedir.

Yazarların Katkı Beyanı

Yazarlar makaleye eşit katkıda bulduklarını, makalenin yayına hazır son halini gördüklerini/okuduklarını ve onayladıklarını beyan ederler.

Çıkar Çatışması Beyanı

Tüm yazarlar, bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

Finansman

Bu çalışmada maddi olarak destek olan TUBITAK-2209 A Öğrenci Araştırma Projeleri Destekleme Programı'na teşekkür ederiz.

Kaynaklar

Abak, K., Düzyaman, F., Şeniz, V., Gülen, H., Pekşen, A., Kaymak, H.Ç., 2010. Sebze üretimini geliştirme yöntem ve hedefleri. *Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, Kongre Bildiriler Kitabı*, 11-15 Ocak, Ankara, s. 477-492.

Adkins, S., 2000. Tomato spotted wilt virus positive steps towards negative success. *Molecular Plant Pathology*, 1(3): 151-157.

Akbaş, B., Morca, A.F., Coşkan, S., 2021. Ankara, Eskişehir ve Konya illeri marul üretim alanlarında görülen viral hastalık etmenlerinin tespiti. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 31(2): 387-395.

Alan, B., 2012. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yetiştirilen bazı kışlık sebzelerde hastalık yapan virüslerin tanılanması ve karakterizasyonu. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Balkaya, A., Sarıbaş, Ş., Özgen, T., 2018. Türkiye'de kışlık sebze türlerinin tarımsal üretimdeki yeri ve önemi. *Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi*, 5(20): 8-12.

Bozdoğan, V., 2009. Antalya ilinde domates, biber ve marul yetiştirilen alanlarda domates lekeli solgunluk virüsü (Tomato Spotted Wilt Virus, TSWV)'nün

saptanması. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Bozdoğan, V., Kamberoğlu, M.A., 2015. Incidence and distribution of Tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) in vegetable crops in Antalya province of Turkey. *Journal of Turkish Phytopathology*, 44(1-3): 39-50.

Döken, M. T., Açıkgöz, S., Demirci, E., 1993. Big-Vein Virus disease of lettuce in Erzurum, Turkey. *Journal of Turkish Phytopathology*, 22(1): 41-43.

Erkan, S., Gümüş, M., Paylan, İ.C., Duman, İ., Ergün, M., 2013. İzmir ili ve çevresindeki bazı kışlık sebzelerde görülen viral etmenlerin saptanması. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 50(3): 311-322.

Ertunç, F., Randa-Zelyüt, F., 2019. Virus diseases of lettuce in Ankara province. *International Journal of Agriculture Forestry and Life Sciences*, 3(2): 202-206.

Kamberoğlu, M. A., Alan, B., 2011. Occurrence of Tomato spotted wilt virus in lettuce in Cukurova Region of Turkey. *International Journal of Agriculture & Biology*, 13: 431-434.

Kandemir, D., Balkaya, A., 2022. Türkiye'de marul yetiştiriciliği, sorunları ve çözüm önerileri. *Tarım Gündem*, 54-58.

Moreno, A., Fereres, A., 2012. Virus diseases in lettuce in the Mediterranean Basin. *Advances in Virus Research*, 84: 247-288.

Öncel, H. U., Oğul, O., Akdemir, N., Aktaç, Z., 2023. Evsel sebze ve gıda atıklarından, bokashi kompostlama yöntemi ile pratik kompost üretimi. *ISPEC Tarım Bilimleri Dergisi*, 7(3): 602-613.

Özdemir, S., Erilmez, S., 2007. Denizli ilinde yetiştirilen biber, patlıcan ve marul üretim alanlarında bazı viral etmenlerin saptanması. *Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi*, 27-29 Ağustos, Isparta, s. 114.

- Perez, Y.V., Mejias, A., Rodriguez-Roman, E., Avilan, D., Zambrano, K.A., Gomez, J.C., Olachea, J.E., Marys, E.E., 2014. Identification of tomato spotted wilt virus associated with fruit damage during a recent virus outbreak in pepper in Venezuela. *Plant disease*, 99(6): 896-896.
- Rosello, S., Diez, M.J., Nuez, F., 1996. Viral Diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. I. The Tomato spotted wilt virus a review. *Scientia Horticulturae*, 67: 117-150.
- Sağlam, H. N., Kamberoğlu, M.A., 2019. Identification and characterization of lettuce bigvein disease (LBVD) in lettuce (*Lactuca Sativa*) crops in Adana and Mersin provinces in Turkey. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 32(3): 315-321.
- Sertkaya G., 2012. Hatay ili marul alanlarında domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV)'nün araştırılması. 9. *Ulusal Sebze Tarımı Sempozyumu*, Kongre Bildiriler Kitabı, 12-14 Eylül, Konya, s. 484-487.
- Sertkaya, G., 2015. Hatay ili marul ve ıspanak alanlarında bazı virüslerin araştırılması. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20(1): 7-12.
- Sherwood, J.L., German, T.L., Moyer, J.W., Ullman, D.E., 2009. Tomato spotted wilt. *The Plant Health Instructor*, DOI: 101094.PHI-I-2003-0613-02 Updated.
- Sırrı, M., Özaslan, C., 2020. Siirt ilinde sebze alanlarında görülen yabancı otlar. *ISPEC Tarım Bilimleri Dergisi*, 4(3): 492-504
- Wilson, C.R., 1998. Incidence of weed reservoirs and vectors of Tomato Spotted Wilt Tospovirus on Southern Tasmanian lettuce farms. *Plant Pathology*, 47: 171–176.
- Yardımcı, N., 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., Ağca, H.I., 2021. Determination of virus diseases on lettuce in Konya province. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 9: 2532-2536.
- Zelyüt, F.R., 2016. Ankara ili marul ekim alanlarında görülen virüs hastalıklarının belirlenmesi. Yüksek Lisans tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara

Atıf Şekli	Çulal Kılıç, H., Karasoy, M., 2024. Antalya İlinde Marul Üretim Alanlarında Domates Lekeli Solgunluk Virüsü'nün (TSWV) Serolojik ve Moleküler Yöntemlerle Tanınması. <i>ISPEC Tarım Bilimleri Dergisi</i> , 8(4): 919-925. DOI: https://doi.org/10.5281/zenodo.13352664 .
To Cite	Çulal Kılıç, H., Karasoy, M., 2024. Detection of Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) in Antalya Province Lettuce Production Areas by Serological and Molecular Methods. <i>ISPEC Journal of Agricultural Sciences</i> , 8(4): 919-925. DOI: https://doi.org/10.5281/zenodo.13352664 .