



İstanbul İli Adalar İlçesi'nde Hobi Bahçeleri ve Peyzaj Alanlarında Yetiştirilen Süs Bitkilerinde Tospovirüslerin Saptanması

Fatma Şafak¹, Muharrem Arap Kamberoğlu^{2*}

¹İstanbul İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, 34728 İstanbul, Türkiye

²Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 01330 Adana, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Araştırma Makalesi

Geliş 30 Haziran 2017
Kabul 09 Ağustos 2017

Anahtar Kelimeler:

Süs bitkileri
TSWV
INSV
IYSV
RT-PCR
ELISA

* Sorumlu Yazar:

E-mail: makamber@cu.edu.tr

ÖZET

Bu çalışma, İstanbul ili Adalar İlçesinde (Büyükada, Heybeliada, Kınalıada, Burgazada) hobi bahçeleri ve peyzaj alanlarında yetiştirilen süs bitkilerinde *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Iris yellow spot virus* (IYSV) ve *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) varlığının saptanması amacıyla, 2015 ile 2016 yılları arasında yürütülmüştür. Bölgede yapılan survey çalışmalarında semptomolojik olarak şüpheli süs bitkileri ile semptom göstermeyen süs bitkilerinden doku örnekleri alınmıştır. Toplanan 150 adet süs bitkisi örneği öncelikle Double Antibody Sandwich (DAS) ELISA yöntemi ile testlenmiş ve örneklerin hiçbirinde TSWV ve INSV enfeksiyonu saptanmamıştır. ELISA testlerinde IYSV ile bulaşık olduğu saptanan örnekler RT-PCR çalışmalarında kullanılmıştır. IYSV-465c; IYSV-239f primer çifti ile yapılan RT-PCR çalışmalarında *Pittosporum tobira* ve *Hydrangea macrophylla* için 240 bp büyüklüğe sahip band gözlenmiştir. Böylece, IYSV'nin Adalar ilçesinde varlığı moleküler olarak da ortaya konulmuştur.

Turkish Journal Of Agriculture - Food Science And Technology, 5(9): 1119-1124, 2017

Detection of Tospoviruses in Ornamental Plants in Hobby Gardens and Landscaping Areas in Adalar District of Istanbul Province

ARTICLE INFO

Research Article

Received 30 June 2017
Accepted 09 August 2017

Keywords:

Ornamentals
TSWV
INSV
IYSV
RT-PCR
ELISA

* Corresponding Author:

E-mail: makamber@cu.edu.tr

ABSTRACT

This study was conducted in order to detect *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Irish yellow spot virus* (IYSV) and *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) in ornamental plants growing in hobby gardens and landscaping areas in Adalar district (Büyükada, Heybeliada, Kınalıada and Burgazada) of Istanbul province between 2015 and 2016. During the surveys carried out in that district, the samples were collected from both symptomatologically suspicious ornamental plants and the plants which did not show any symptoms. All of the collected samples (n=150) were firstly tested by Double Antibody Sandwich (DAS) ELISA and none of the samples were found to be infected with TSWV and INSV. The samples detected to be positive with IYSV by ELISA tests were then used in RT-PCR studies. At the RT-PCR using the IYSV-465c; IYSV-239f primer pair, a band with a size of 240 bp was observed for *Pittosporum tobira* and *Hydrangea macrophylla*. Therefore, the presence of IYSV infection in Adalar was also confirmed molecularly.

Giriş

İnsanlar, özellikle şehir hayatının artmasıyla birlikte yaşadığı ortamı ve çevresini daha yaşanılır bir duruma getirmek ve estetik açıdan zenginleştirmek, doğa özlemini gidermek ve kendilerini mutlu etmek amacıyla kişisel olarak hobi bahçeleri kurmuşlar, balkon veya pencere önü düzenlemeler yapmışlar veya park ve yeşil alanlar oluşturmuşlardır.

Süs bitkileri üretimi, ülkemizde 1940'lı yıllarda önce İstanbul'un Adalar ilçesinde başlamış ve Yalova'da gelişmeyi sürdürmüştür. Türkiye'de 2000'li yılların başında 1.513 hektar düzeyinde olan süs bitkileri üretim alanları 2015 yılında yaklaşık 4.619 hektara yükselmiştir (Anonim, 2015).

Adalar, izole bir bölge olması, kara yoluyla bağlantısının bulunmaması, bitki florası açısından zengin olması, hemen hemen her mülkün bahçesinde hobi amaçlı süs bitkileri yetiştirmeye imkân sağlayan alanların bulunması gibi özelliklerinden dolayı diğer birçok ilçeden farklılık göstermektedir.

Birçok bitkisel üründe olduğu gibi süs bitkilerinde de çeşitli hastalık etmeni infeksiyona neden olmakta, hobi amaçlı yetiştiriliyorsa görselliği etkilemekte ve hatta bitkinin ölümüne neden olmakta, çevresindeki sağlıklı bitkiler için risk oluşturmaktadır, ticari olarak yetiştiriliyorsa, bunlara ilaveten ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Tospovirüsler, süs bitkilerinde hastalık yapan en önemli virüs gruplarından biridir ve bitkilere zarar veren en yıkıcı ilk on bitki virüsü arasında yer almaktadır (German ve ark. 1992). Nükleotid dizisi ve serolojik özelliklerine göre, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (type species), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Iris yellow spot virus* (IYSV) ve *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) olmak üzere altı türe ayrılmıştır (Mumford ve ark., 1996). Bitkinin çeşidine, gelişim aşamasına ve çevresel faktörlere göre farklılık göstermekle beraber, enfekteli bitkilerde çiçeklerde kahve veya siyah-beyaz beneklenmeler, petiol üzerinde nekrozlar, sarı leke ya da renk değişimi, genç bitkilerde uç meristem ölümü, bodurluk, gövdede kaverengi veya siyah çürüklük, yoğun halka lekeler, mozaikleşme, düz yada desenli lekeler gibi belirtiler gözlenmektedir. Tospovirüslerin dünya çapında Thripidae takımına ait 14 thrips türü ile taşındığı tespit edilmiştir (Ullman ve ark. 1997; Jones, 2005; Pappu ve ark. 2009, Ciuffo ve ark. 2010; Hassani-Mehraban ve ark. 2010).

Tospovirüsler üzerine ülkemizde yapılan çalışmalar daha çok TSWV üzerine yoğunlaşmış ve bu viral etmenin farklı bölgelerde yetiştirilen tütün, domates, biber, marul, patlıcan, kabak ve yerfıstığı ile çeşitli yabancı otlar üzerindeki varlığı bildirilmiştir (Bozdoğan ve Kameroğlu, 2015). Bunun yanında, süs bitkilerinde TSWV, *Anthurium* sp., *Pelargonium* spp., *Gloxinia* spp., *Dahlia* spp. ve süs biberi üzerinde rapor edilmiştir (Fidan, 2016; Uzunogulları ve ark., 2016; Atakan ve ark., 2016). Ülkemizde süs bitkilerinde diğer tospovirüslerin saptanmasına yönelik yapılmış yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışma, peyzaj düzenlemelerine, yetiştirdikleri bitkilerin görünümüne ve sağlığına önem veren kişilerin

ikamet ettiği ve Türkiye'de ticari anlamda süs bitkileri yetiştiriciliğinin başlangıç yeri olan Adalar ilçesi'nde mevcut ev bahçelerinde hobi amaçlı yetiştirilen süs bitkileri ile park ve peyzaj alanlarında bulunan süs bitkilerinde tospovirüslerin (INSV, IYSV ve TSWV) saptanması amacıyla yürütülmüştür.

Materyal ve Metot

Materyal

Survey alanı ve çalışma materyali hakkında bilgiler: Bu çalışma, İstanbul İli Adalar ilçesinde (Büyükkada, Heybeliada, Kınalıada, Burgazada) süs bitkilerinde tospovirüslerin; *Iris yellow spot virus* (IYSV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) ve *Impatiens necrotic spot virus* (INSV)'ün saptanması amacıyla, 2015 yılı Nisan-Ekim ayları ve 2016 yılı Mayıs-Eylül ayları arasında gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın materyalini Adalar ilçesinde hobi bahçeleri ve peyzaj alanlarında bulunan ve simptom gösteren süs bitkilerinden alınan bitki dokuları oluşturmuştur.

Serolojik çalışmalarda kullanılan materyal: DAS-ELISA testlerinde IYSV, TSWV ve INSV etmenlerine spesifik poliklonal antiserumlar, pozitif ve negatif kontroller kullanılmış ve Agdia (ABD) ve Bioreba (İsviçre) firmalarından ticari olarak temin edilmiştir.

Total RNA ekstraksiyonu çalışmalarında kullanılan materyal: IYSV ile enfekteli olduğu ELISA sonucunda tespit edilen örneklerden elde edilen bitki özsuvarı materyal olarak kullanılmıştır. Ayrıca, Universal 320R marka masa tipi soğutmalı santrifüj, pipetler, havan ve havan eli, tampon çözeltiler, ependorf tüpleri kullanılmıştır.

RT-PCR çalışmalarında kullanılan materyal: IYSV ile enfekteli bitkilerden elde edilen total nükleik asit ekstratları ve IYSV'ye spesifik IYSV-465c 5'-CAG CAA AGT GAG AGG ACC ACC-3'; IYSV-239f 5'-TGA GCC CCA ATC AAG ACG-3' primer çifti (Pappu ve ark., 2008) materyal olarak kullanılmıştır.

Metot

Arazi gözlemleri, enfekteli bitki materyallerinin elde edilmesi ve muhafazası: TSWV, IYSV ve INSV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen bitkilerin belirlenmesi amacıyla öncelikle semptomatolojik gözlemler yapılmış, örnek alınan bitkilerde tospovirüslerin neden olduğu yapraklarda deformasyon, mozaik, klorotik halkalı lekeler, sararma, klorotik ve nekrotik alanlar, gövde ve yaprak sapı üzerinde yağ lekeleri, yaprak ve sürgün uçlarında kurumalar şeklinde belirtiler aranmıştır. Ayrıca, simptom göstermeyen süs bitkilerinden de örneklemeler yapılmıştır.

Toplanan süs bitkileri dokuları etiketlenerek polietilen torbalara konulmuş ve buz kutusu içerisine yerleştirilerek laboratuvara getirilmiştir. Toplanan materyaller kısa süreli muhafaza için +4°C'de buzdolabında, uzun süreli muhafaza için ise -20°C'de derin dondurucuda muhafaza edilmişlerdir.

Serolojik çalışmalar: Arazi çıkışlarında, semptomatolojik olarak tospovirüsler ile bulaşık olduğundan şüphelenilen örnekler, öncelikle DAS-ELISA

testi ile testlenmiştir. Yapılan ELISA testlerinde kullanılan plâtelere her birinde, örnek tampon çözeltisi ve firmalardan ticari olarak temin edilen dokular ile hazırlanan ekstrakt olmak üzere iki farklı negatif kontrol ve ticari temin edilmiş bir pozitif kontrol karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır. DAS-ELISA çalışmaları, ELISA kitlerinin temin edildiği firma tarafından önerilen sulandırma oranları ve yöntem dikkate alınarak bazı modifikasyonlarla yürütülmüştür.

ELISA testleri sonucunda, sağlıklı kontrol için 405 nm'de elde edilen absorpsiyon değerinin en az iki katı ve daha fazla absorpsiyon değeri veren örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir (Barba ve Riccioni, 1993; Helguera ve ark., 2002).

Total RNA ekstraksiyonu: ELISA testleri sonucunda, IYSV ile bulaşık olduğu saptanan arazi örneklerinden alınan taze dokular kullanılarak yapılan total RNA ekstraksiyon çalışmaları Astruc ve ark. (1996)'nin önerdiği yöntemle yürütülmüştür. Buna göre, örnekler ekstraksiyon tamponu (100 mM Tris-HCl pH.8,0, 50 mM EDTA pH. 7,0, 500 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol (1/1000)) ile 1:2 (w/v) oranında sulandırılarak ekstrakte edilmiş ve bitki özsu steril tülbentten süzülükten sonra, 1 ml'si 3 dakika 4.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Supernatant üzerine %20'lik sodium dodecylsulfat (SDS)'den 50 µl ilave edilmiş ve 65°C'de 30 dakika su banyosunda inkübe edildikten sonra, tüplere 250 µl potasium asetat (5M) ilave edilip, 20 dakika buz içerisinde bekletilmiş ve 15 dakika 13.000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Supernatantın 500 µl'si yeni hazırlanan eppendorf tüplerine alınarak, üzerine %100'lük etanol ile 500 µl ilave edilerek 1 ml'ye tamamlanmış ve vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra tüplere 50 µl sodium asetat (3M) ilave edilmiş ve örnekler tekrar karıştırılarak, 70°C'de bir gece bekletildikten sonra 15 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Supernatant ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, pellet üzerine %70'lik etanol ile 1 ml ilave edilerek, 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve tüp içerisindeki etanol atılarak eppendorf tüpleri kurutma kağıtları ile dikkatlice kurutulmuştur. Elde edilen total RNA'lar 50 µl RNase free saf su ile sulandırılarak -20°C'de muhafaza edilmiştir.

RT-PCR çalışmaları: IYSV'nin moleküler tanısı amacıyla kullanılan RT-PCR yöntemi, Jain ve ark. (1998) ve Pappu ve ark. (2008)'e göre yürütülmüştür.

RT aşamasında; her PCR tüpüne, 1 µl saflaştırılmış total RNA ve 1 µl reverse primer konularak, 70°C'de 5 dakika bekletilmiş ve tüpler buz üzerine alınarak üzerine, 16,6 µl saf su, 5 µl RT tampon çözeltisi (250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 1 µl dNTP (2 mM), 0,3 µl RNase ve 0,1 µl RT enzimi ilave edilmiştir. Daha sonra tüpler, 42°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.

PCR aşamasında ise, her bir PCR tüpüne elde edilen cDNA'dan 1 µl konulmuş, üzerine 16,8 µl saf su, 2,5 µl 10X PCR tampon çözeltisi (100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 500 mM KCl, %0,8 Nonidet P40), 1,5 µl MgCl₂, 1 µl dNTP (2 mM), 0,2 µl Taq DNA polymerase, 1 µl ileri primer ve 1 µl geri primer ilave edilmiştir. RT-PCR yönteminin her iki aşamasında; tüplerdeki karışım, toplam hacim 25 µl olacak şekilde hesaplanarak hazırlanmıştır.

Agaroz gel elektroforez çalışmaları: RT-PCR işlemleri sonunda, IYSV'nin çoğaltılan nükleik asit materyalleri % 1-1,5'lük agaroz jel elektroforez yöntemine tabi tutulmuştur. Gallitelli ve Minafra (1994)'e göre modifiye edilerek uygulanan yöntemde, 100-150 mg agaroz 10 ml 1x TAE tampon çözeltisi (4,84 gr Tris, 2 ml 0,5 M Na₂EDTA, 1,142 ml glacial asetic acid/l) içerisinde eritildikten sonra, hazırlanan kısma boşaltılarak tarak takılmıştır. Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çekilmiş ve elektroforez tankına yerleştirilerek jeli 1-2 mm geçecek kadar 0,5x TAE tampon çözeltisi ilave edilmiştir. Örnekler 5 µl örnek ve 1 µl 6x loading buffer olacak şekilde hazırlandıktan sonra, jeldeki kuyulara dikkatli bir şekilde yüklenmiştir. Jel elektroforez işlemi sonunda, oda sıcaklığında 10 dk. 30 µl ethidium bromide/100 ml saf su (10 mg/ml saf su) çözeltisinde çalkalanarak boyanmış ve daha sonra fazla ethidium bromide'i uzaklaştırmak için 5 dk. saf su içerisinde tutulmuştur. Yıkanan jel, UV transilluminatör üzerine konularak, UV ışıkta ortaya çıkan bantlar gözlenmiş ve fotoğrafı çekilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Survey Çalışmaları

Çalışmanın yürütüldüğü İstanbul ili Adalar İlçesinde (Büyükkada, Heybeliada, Kınalıada, Burgazada) hobi bahçeleri ve peyzaj alanlarında yetiştirilen süs bitkilerinde IYSV, TSWV ve INSV'nin varlığının ortaya konulması ve toplanan örneklerde bu virüslerin varlığının farklı yöntemlerle saptanması amacıyla yürütülen çalışmalarda, Büyükkada'dan 80 adet, Heybeliada'dan 50 adet Kınalıada'dan 15 adet, Burgazada'dan 5 adet olmak üzere, 23 familyaya ait 31 türden toplam 150 adet bitkiden örnekleme yapılmıştır (Çizelge 1).

Örnekleme, Trkulja ve ark. (2013) tarafından Bosna Hersek'de bardak menekşesi (*Sinningia speciosa*) bitkisinde rapor edilen klorotik halka noktalar, klorotik ve nekrotik desenler, yaprak nekroz ve deformasyon belirtileri ve Kibar (2014) tarafından; Yalova ili örtüaltı kesme çiçek türlerinden *Anthurium andreanum*, bazı orkide (*Cymbidium* sp.), gül (*Rosa* spp.) ve gerbera bitkilerinde tespit edilmiş olan sistemik, mozaik, sarılık, klorotik ve nekrotik lekeler ile yaprak ve çiçeklerde deformasyon belirtileri dikkate alınmış ve bu çalışmada yapılan survey çıkışlarında benzer belirtiler gözlenmiştir. Yapraklarda sararma, damar bantlaşması, deformasyon, klorotik ve nekrotik lekeler gibi, viral etmenler tarafından meydana getirilen belirtilerden bir veya birkaçını gösteren bitkilerden örnekleme yapılmıştır. Bunun yanında, herhangi bir belirtiler gözlenmeyen bitkilerden de örnekleme yapılmış ve çalışmada kullanılmıştır.

ELISA Testleri

Toplanan süs bitkisi örneklerinden yapılan ELISA testleri sonucunda, yapraklarında sararma, klorotik halkalı lekeler, renk açılmaları, damar bantlaşması, kabarcıklar ve deformasyon belirtileri gözlenen 16 adet bitkinin IYSV ile infekteli olduğu saptanmış, fakat herhangi bir bitkide TSWV ve INSV enfeksiyonu bulunmamıştır. (Çizelge 2).

Çizelge 1 Survey çalışmalarında örnekleme yapılan bitkilerin adı, bilimsel adı ve familyası

Bitki Adı	Bilimsel Adı	Familyası	Örneklenen Bitki Sayısı
Kar topu çiçeği	<i>Viburnum opulus</i>	Adoxaceae	2
Horoz ibiği	<i>Amarantus</i> spp.	Amaranthaceae	3
Medine çiçeği	<i>Gomphrena globosa</i>	Amaranthaceae	1
Nergis	<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	Amaryllidaceae	2
Zakkum	<i>Nerium oleander</i>	Apocynaceae	2
Kala	<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Araceae	5
Hosta	<i>Hosta undulata</i>	Asparagaceae	1
Kadife çiçeği	<i>Tagetes</i> spp.	Asteraceae	8
Kalendula	<i>Calendula officinalis</i>	Asteraceae	5
Gazanya (Koyun gözü)	<i>Bellis perennis</i>	Asteraceae	2
Papatya	<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Asteraceae	5
Begonya	<i>Begonia</i> spp.	Begoniaceae	3
Katır tırnağı	<i>Spartium junceum</i> L.	Fabaceae	2
Mimoza	<i>Acacia dealbata</i>	Fabaceae	1
Sardunya	<i>Pelargonium</i> spp.	Geraniaceae	16
Ortanca	<i>Hydrangea macrophylla</i>	Hydrangeaceae	32
Ateş çiçeği	<i>Salvia splendens</i>	Lamiaceae	4
Zambak	<i>Lilium candidum</i>	Liliaceae	3
Japongülü	<i>Bellis perennis</i>	Malvaceae	1
Akşam sefası	<i>Mirabilis jalapa</i>	Nyctaginaceae	1
Begonvil	<i>Bougainvillea spectabilis</i>	Nyctaginaceae	1
Küpe çiçeği	<i>Fuchsia</i> spp.	Onagraceae	5
Bodur yıldız çalısı	<i>Pittosporum tobira</i>	Pittosporaceae	1
Çuha çiçeği	<i>Primula vulgaris</i>	Primulaceae	2
Gül	<i>Rosa</i> spp.	Rosaceae	25
Paşa çadırı	<i>Begonia 'Erythrophlla'</i>	Rubiaceae	1
Petunya	<i>Petunia hybrida</i>	Solanaceae	2
Boru çiçeği	<i>Datura metel</i>	Solanaceae	1
Melisa	<i>Cestrum nocturnum</i> L.	Solanaceae	1
Lantana-çalı minesı	<i>Lantana camara</i>	Verbenaceae	5
Hercai menekşe	<i>Viola tricolor</i>	Violaceae	7

Çizelge 2 ELISA testleri sonucunda IYSV enfeksiyonu saptanan bitkiler

Türkçe Adı	Örneğin Alındığı Yer	İnfekteli Bitki Sayısı	Tür/Cins
Sardunya	Heybeliada	2 adet	<i>Pelargonium</i> spp.
Bodur yıldız çalısı	Büyükada	1 adet	<i>Pittosporum tobira</i>
Süpürge çiçeği	Büyükada	1 adet	<i>Hosta undulata</i>
Gül	(1) Heybeliada (2) Büyükada	3 adet	<i>Rosa</i> spp.
Melisa	Büyükada	1 adet	<i>Cestrum nocturnum</i> L.
Ortanca	Büyükada	2 adet	<i>Hydrangea macrophylla</i>
Gazanya (Koyun gözü)	Büyükada	1 adet	<i>Bellis perennis</i>
Zakkum	Büyükada	1 adet	<i>Nerium oleander</i>
Katır tırnağı	Heybeliada	1 adet	<i>Spartium junceum</i> L.
Begonya	Büyükada	1 adet	<i>Begonia</i> spp.
Kadife çiçeği	Heybeliada	1 adet	<i>Tagetes</i> spp.
Çalı minesı	Heybeliada	1 adet	<i>Lantana camara</i>

Buna karşılık, Peters (2003) tospovirüslerin 1500'den fazla konukçusu olduğunu, bunun 900'den fazlasının TSWV'ye konukçuluk yaptığını, IYSV'nin ise kısıtlı bir konukçu dizisine sahip olduğunu ve genel olarak soğan, frenk soğanı ve pırasa gibi monokotiledon bitkilerde enfeksiyon yaptığını bildirmiştir. Diğer yandan IYSV *Dendranthema grandiflora*, *Eustoma russelianum*, *E. grandifolium* ve *Iris hollandica* üzerinde saptanmıştır (Ochoa ve ark., 1996; Cortes ve ark., 1998; Kritzman ve ark., 2000; Mumford ve ark., 2008). Benzer şekilde, Stankovic ve ark. (2011) Sırbistan'da yaptıkları çalışmada, *Gerbera hybrida* bitkisinin yapraklarında

deformasyon, nekroz ve klorotik lokal leke gibi semptomların varlığını gözlemişler ve yaptıkları ELISA testleri sonucunda bu bitkilerin IYSV ile bulaşık olduğunu bildirmişlerdir.

RT-PCR Çalışmaları

ELISA testleri sonucunda, IYSV ile bulaşık olduğu saptanan süs bitkisi örneklerinden elde edilen total nükleik asit ekstraktları kullanılarak yapılan RT-PCR çalışmaları sonucunda yapraklarda renk açılması, damar bantlaşması ve küçülme semptomları gözlenen *Pittosporum tobira* ve *Hydrangea macrophylla*

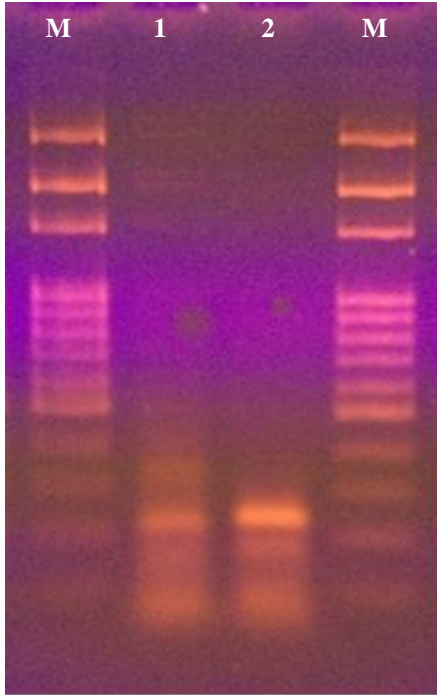
bitkilerinden alınan örnekler (Şekil 1 ve 2) için 240 bp büyüklüğünde band elde edilmiştir (Şekil 3). Böylece, bu örneklerde IYSV'nin varlığı moleküler olarak da ortaya konulmuştur.



Şekil 1 IYSV ile infekteli *Pittosporum tobira* bitkisi yapraklarında renk açılması, küçülme ve damar bantlaşması



Şekil 2 IYSV ile infekteli *Hydrangea macrophylla* bitkisinin yaprağında renk açılması ve damar bantlaşması



Şekil 3 IYSV enfeksiyonunun RT-PCR yöntemi ile saptanması (M, 100 bp DNA ladder; 1, *Pittosporum tobira*; 2, *Hydrangea macrophylla*; M, 100 bp DNA ladder)

Benzer şekilde, Pappu ve ark. (2008), soğan bitkisi üzerinde IYSV'nin saptanması amacıyla 465c ve 239f primer çiftini kullanarak yapmış oldukları RT-PCR çalışmaları sonucunda, 227 bp büyüklüğe sahip band elde etmişlerdir. Buna ilaveten, Pappu ve Rauf (2013) aynı primer çiftini kullanarak soğan bitkisi üzerinde yaptığı bir çalışmada 240 bp uzunluğa sahip band elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Bunun yanında, ELISA testlerinde IYSV ile bulaşık olduğu saptanan *Pittosporum tobira* ve *Hydrangea macrophylla* hariç diğer süs bitkilerinden RT-PCR testleri sonucunda band gözlenmemiştir. Bu sonucun gerek total RNA ekstraksiyon çalışmalarında kullanılan bitki dokularından (dokularda oksidasyon gibi) ve gerekse de çalışmanın farklı aşamaları sırasında ortaya çıkan bazı problemler yüzünden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Kennedy (2017) genomik DNA, RNA degradasyonu, RNA inhibitörleri ve düşük miktarda RNA varlığı gibi nedenlerin total RNA ekstraksiyon çalışmalarının sonuçlarını olumsuz etkilediğini bildirmiştir.

Sonuçlar

Özellikle viral etmenlerin bölgeye girişi veya bölge içerisinde yayılmasını engellemek, öncelikle saptanmaları ve tanıların yapılması, varsa vektörünün belirlenmesi ve buna göre gerekli kültürel önlemlerin alınması ile mümkün olmaktadır. Bu çalışma, İstanbul İli Adalar ilçesinde peyzaj ve hobi amaçlı yetiştirilen süs bitkilerinde var olan tospovirüslerin (TSWV, INSV ve IYSV) serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak saptanması amacıyla yürütülmüştür. Bu amaçla, Büyükkada'dan 80, Heybeliada'dan 50, Kınalıada'dan 15 ve Burgazada'dan 5 adet olmak üzere 31 tür ve 23 familyaya ait toplam 150 adet bitkiden örnekler alınmış ve öncelikle ELISA testine tabi tutulmuştur. ELISA testleri sonucunda, 12 farklı türe ait bitkiden alınan 16 örneğin IYSV ile bulaşık olduğu saptanmıştır. Çalışmada TSWV ve INSV ile bulaşık örnek bulunmamıştır. IYSV'ye spesifik primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR çalışmaları sonunda, agaroz jelde 240 bp büyüklüğe sahip band görüntülenmiş ve *Pittosporum tobira* ve *Hydrangea macrophylla*'dan alınan bitki dokularının tospovirüs grubundan IYSV ile bulaşık olduğu moleküler olarak da ortaya konulmuştur.

Bu çalışma, IYSV'nin varlığı konusunda İstanbul ili Adalar ilçesinde yapılan ilk araştırma sonuçlarını vermesi bakımından ayrıca bir öneme sahiptir. Elde edilen sonuçlar, İstanbul ilinde diğer ilçelerde de yetiştiriciliği yapılan süs bitkileri ve sebzeler için hem pratikte fikir vermesi açısından faydalı olacak, hem de bilimsel açıdan bundan sonra yapılacak çalışmalara basamak teşkil ederek bir literatür eksiğini tamamlayacak niteliktedir.

Teşekkür

Bu çalışmaya FYL-2016-5997 nolu yüksek lisans projesi olarak maddi destek sağlayan Ç.Ü. Araştırma Projeleri Birimine, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Zir. Müh. Havva Nur SAĞLAM ve Zir. Müh. Fatime DAŞ'a çok teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Anonim, 2015. Türkiye İstatistik Kurumu. <http://www.tuik.gov.tr/UstMenu.do?metod=temelist>
- Astruc N, Marcos JF, Macquarie G, Candresse GT, Vicent P. 1996. Studies on the diagnosis of Hop stunt viroid in fruit trees: Identification of new host and application of a nucleic acid extraction procedure based on non-organik solvents. *European Journal of Plant Pathology*, 102: 837-846.
- Atakan E, Kamberoğlu MA, Çalışkan Keçe AF. 2016. Çukurova bölgesinde süs bitkilerinde Thysanoptera (Thrips) türleri ve Domates lekeli solgunluk virüs hastalığının araştırılması. Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi 5-8 Eylül 2016 Konya, Türkiye, 561.
- Barba M, Riccioni L. 1993. Improvement of diagnostic methods to detect *Plum pox virus* in apricot plants. *Agriculture* 139-141.
- Bozdoğan V, Kamberoğlu MA. 2015. Incidence and distribution of *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV) in vegetable crops in Antalya Province of Turkey. *Turkish Journal of Phytopathology*, 44 (1-3): 39-50.
- Ciuffo M, Mautino GC, Bosco L, Turina M, Tavella L. 2010. Identification of *Dictyothrips betae* as the vector of *Polygonum ring spot virus*. *Annals of Applied Biology* 157: 299-307.
- Cortes I, Liveratos IC, Derks A, Peters D, Kormelink R. 1998. Molecular and serological characterization of Iris yellow spot virus, a new and distinct tospovirus species. *Phytopathology* 88: 1276-1282.
- Fidan H, Koç G, Topçu T. 2016. *Anthurium* sp.'de Tomato spotted wilt virus (TSWV) enfeksiyonu ve moleküler karakterizasyonu. *Alatarım* 15(2): 28-36.
- Gallitelli D, Minafra A. 1994. Electroforesis. Course on plant virus diagnosis, 15-30 October 1994, Adana, Turkey. Page: 89-99.
- German TL, Ullman DE, Moyer JW. 1992. Tospoviruses: Diagnosis, molecular biology, phylogeny and vector relationships. *Ann. Rev. Phytopathol.* 30: 315-348.
- Hassani-Mehraban A, Botermans M, Verhoeven JT, Meekes E, Saaijer J, Peters D, Goldbach R, Kormelink R. 2010. A distinct tospovirus causing necrotic streak on *Alstroemeria* sp. in Colombia. *Arch Virol.* 155: 423-8.
- Helguera PR, Docampo DM, Nome SF, Ducasse DA. 2002. Enhanced detection of *Prune Dwarf Virus* in peach leaves by Immunocapture- Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction with Nested Polymerase Chain Reaction (IC-RT-PCR Nested PCR). *J. Phytopathology* 150: 94-96.
- Jain RK, Pappu SS, Pappu HR, Culbreath AK, Todd JW. 1998. Rapid molecular diagnosis of tomato spotted wilt tospovirus infection of peanut and other field and greenhouse crops. *Plant Dis.* 82: 900-904.
- Jones DR. 2005. Plant viruses transmitted by thrips. *European Journal of Plant Pathology* 113: 119-157.
- Kennedy S. 2017. Troubleshooting RNA Isolation. <http://bitesizebio.com/2345/troubleshooting-rna-isolation/>.
- 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. Yüksek Lisans Tezi, 41 s.
- Kritzman A, Beckelman H, Alexandrov S, Cohen J, Lampel M, Zeidan M, Raccach B, Gera A. 2000. Lisanthus leaf necrosis: a new disease of Lisanthus caused by Iris yellow spot virus. *Plant Dis.* 84: 1185-1189.
- Mumford RA, Barker I, Wood KR. 1996. The biology of the Tospoviruses. *Ann. Appl. Biol.* 128: 159-183.
- Mumford RA, Glover R, Daly M, Nixon T, Harju V, Skelton A. 2008. Iris yellow spot virus (IYSV) infecting lisanthus (*Eustoma grandiflorum*) in the UK: first finding and detection by real-time PCR. *Plant Pathology* 57: 768.
- Ochoa DL, Zavaletamejia E, Johansen RM, Herrera A, Soriano EC. 1996. Tospoviruses, weeds and thrips associated with chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev cv Polaris). *International Journal of Pest Management* 42(3): 157-159.
- Pappu HR, Rosales IM, Druffel KL. 2008. Serological and molecular assays for rapid and sensitive detect of *Iris yellow spot virus* infection of bulb and seed onion crops. Department of Plant Pathology, Washington State University, Pullman. *Plant Dis.* 92: 588-594.
- Pappu HR, Jones RAC, Jain RK. 2009. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Res.* 141: 219-236.
- Pappu HR, Rauf A. 2013. First report of *Iris yellow spot virus* infecting green onion in Indonesia. *Plant Dis.* 97(12): 1665.
- Peters D. 2003. Host list of TSWV. <http://www.dpw.wageningen-ur.nl/viro/research/hostlist.html>.
- Stankovic I, Bulajić A, Vučurović A, Ristić D. 2011. First report of *Tomato spotted wilt virus* on *Gerbera hybrida* in Serbia. *Plant Dis.* 95(2): 226.
- Trkulja V, Mihić Salapura J, Ćurković B, Stanković I, Bulajić A, Vučurović A, Krstić B. 2013. First report *Tomato spotted wild virus* in Bosnia. *Plant Disease* 97(3): 429.
- Ullman DE, Sherwood JL, German TL. 1997. Thrips as vectors of plant pathogens, pp. 539-565. In T. Lewis (ed), *Thrips as Crop Pests*. CAB International, New York.
- Uzunoğulları N, Önder S, Gümüş M. 2016. *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)'ün *Pelargonium* spp., *Gloxinia* spp. ve *Dahlia* spp. bitkilerinde Tespiti ve Karakterizasyonu. Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi 5-8 Eylül 2016 Konya, Türkiye, 562.