

Frankliniella occidentalis (Pergande) (Thysanoptera:Thripidae) tarafından taşınan Tospovirüslerin Moleküler Tespitinde RT-qPCR yönteminin uygulanması

Murat Kemal AVCI¹ , **Ferhat KİREMİT¹** , **Eyyüp Mennan YILDIRIM¹** 

¹ Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Aydın, TÜRKİYE

Öz: *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) polifag bir tür olup, pamuk, çilek, domates ve süs bitkileri gibi birçok tarımsal üründe zararlılara yol açabilmektedir. *F. occidentalis* bitkilerin çiçeklerindeki özsuunu emmek suretiyle çiçeklerin erken dökülmesine ve verim düşüklüğüne neden olmaktadır. Ayrıca virüs vektörü olması nedeniyle bitkilerde dolaylı yoldan da zarar yapabilmektedir. Bu çalışmanın amacı, Aydın ili için ekonomik öneme sahip çileklerden elde edilen tripslerde vektörü oldukları tospovirüslerin varlığının RT-qPCR yöntemiyle tespit edilmesidir. Bu amaçla ilk olarak çilek bitkilerinin çiçeklerinden elde edilen tripslerin PCR-RFLP protokolüyle moleküler tanılaması yapıldıktan sonra RNA izolatları elde edilerek RT-qPCR yöntemiyle tospovirüslerin varlığı tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda; elde edilen verilerle, elde edilen örneklerin *F. occidentalis* olduğu ve bu böceklerle taşınan virüslerin de tospovirüs olduğu tespit edilmiştir. Her iki yöntem (PCR-RFLP ve RT-qPCR) hızlı ve güvenilir sonuç vermesi açısından, hem trips tespiti hem de tospovirüs tespiti amacıyla önümüzdeki çalışmalarda kullanılmak için ümitvar görünmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Frankliniella occidentalis*, RFLP, Tospovirüs, RT-qPCR

The detection of RT-qPCR method of Tospoviruses carried by *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera:Thripidae)

Abstract: *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) is a polyphagous species and can cause damage to many agricultural products such as cotton, strawberries, tomato and ornamental plants. *F. occidentalis* sucks the sap from the flowers of plants and causes premature flower fall and low yield. In addition, it can cause indirect damage because it is a virus vector. In this study, it was aimed to perform molecular identification of thrips obtained from the flowers of strawberry plants, which have economic importance for Aydın province, by applying PCR-RFLP protocol and to detect the presence of tospoviruses by the RT-qPCR method by obtaining RNA isolates. As a result of the study; it was determined that all species obtained were *F. occidentalis*. In addition, the presence of tospoviruses transmitted by these insects was also detected. Both methods seem promising to be used in future studies in terms of providing fast and reliable results.

Keywords: *Frankliniella occidentalis*, RFLP, Tospovirus, RT-qPCR

GİRİŞ

Frankliniella spp. (Thysanoptera: Thripidae) polifag türler olup birçok tarımsal üründe zarar yapabilmektedir (Kirk ve Terry, 2003). Türkiye’de ilk defa 1993 yılında Antalya’da seralarda tespit edilen *F. occidentalis*, pamuk, çilek, domates ve süs bitkileri gibi birçok üründe zararlılara yol açabilmektedir (Tunç ve Göçmen, 1994). Çiçek tripsleri bitkilerin çiçeklerinde özsu emmek suretiyle çiçeklerin erken dökülmesine ve verim düşüklüğüne neden olmaktadır. Önceki çalışmalarda domates, çilek, pamuk ve süs bitkileri gibi birçok bitkide zararları nedeniyle kalite ve verim kayıplarının olduğu tespit edilmiştir (Schoonhoven ve Peña, 1976; Navas ve ark., 1991; Coll ve ark., 2006). Zararlı aynı zamanda tospovirüslerin taşınmasında önemli bir rol oynamakta, bu sayede bitki virüslerinin yayılımını da kolaylaştırmaktadır (Moriones ve ark., 1998; Beaudoin ve ark., 2009). Çiçek tripsleri *F. occidentalis* ve *F. intonsa* üretim alanlarında yaygın olarak bulunmakla beraber, *F. occidentalis*’in son yıllarda daha baskın bir konumda bulunduğu söylenebilir. Daha önce yaptığımız çalışmalarda Aydın ilinde çileklerdeki yaygın türün *F. occidentalis* olduğu belirlenmiştir (Yıldırım ve Başpınar, 2013). Morfolojik açıdan değerlendirildiğinde iki türün teşhisinde çok az farklılık bulunmaktadır. Antenlerin 8 segmentli olması, göz arkasında bulunan yan setae’lardan birinin üçüncü ocellar setadan daha uzun olması ve 8. segmentin 7. segmentin iki katı kadar

uzunlukta olması *F.occidentalis*’i tanımlarken; göz arkasında bulunan postocellar seta’nın üçüncü ocellar seta’nın yarısından daha kısa olması ve 8. segmentin 7. segment uzunluğunda olması *F. intonsa* ’yı tanımlamaktadır (Doğanlar ve Aydın, 2009). Böceklerin morfolojik olarak tanınması oldukça zahmetli bir süreç olup, özel uzmanlık alanı gerektirmektedir. Bu nedenle son yıllarda böceklerin moleküler düzeyde tanınması ile ilgili birçok çalışma bulunmakta olup, yapılan bu çalışmalarda hata oranı oldukça düşüktür (Kuipers ve Jongsma, 2004; Mainali ve ark., 2008; Huang ve ark., 2010). Benzer durum yukarıda sözü edilen bu böceklerin virüs vektör özelliklerinin saptanması açısından da geçerlidir (Rotenberg ve ark., 2009; Okazaki ve ark., 2011; Sokmen ve Sevik, 2013). Tospovirüsler (TSWV, INSV, WSMoV, MYSV, IYSV, TCSV, GRSV, WBNV, GBNV) genel olarak üç adet negatif (ambisens) ssRNA’dan oluşan bir genom yapısına sahiptir. Bu RNA molekülleri S (2.9 kb), M

***Sorumlu Yazar:** emyildirim@adu.edu.tr

Bu çalışma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından ZRF-16010 no’lu proje ile desteklenmiştir

Geliş Tarihi: 29 Temmuz 2024

Kabul Tarihi: 27 Eylül 2024

(4.8 kb), ve L (8.9 kb) olup her birinin 3' ve 5' uçlarındaki yaklaşık 60 kadar complementer nükleotit bulunması nedeniyle tava sapı (panhandle) konformasyonu sergilerler (Law ve ark., 1992; Marie-Nguyen ve Haenni, 2003). Tospovirüs türlerinin türe özgü genomik dizilerinin yanı sıra yaygın korunmuş dizilerin bulunması, klasik yöntemlerden farklı olarak, Tospovirüslerin tayinine yönelik ideal yöntemlerin keşfedilmesini teşvik etmektedir (Mainali ve ark., 2008; Li ve Du, 2013). Bu bağlamda korunmuş dizilerin belirlenip uygun primer dizilerinin belirlenmesi en yaygın yöntemlerden biridir (Wijkamp ve ark., 1993; Zhang ve ark., 2013). Tospovirüs türlerinin tayininde dot blot, ELISA yöntemlerinin yanı sıra kullanılan önemli yöntemlerden biri de RT-qPCR yöntemidir (Roberts ve ark., 2000; Okuda ve Hanada, 2001). *Bunyaviridae* ailesi hayvansal virüslerden oluşan *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, ve bitki patojeni olan *Phlebovirus* ve *Tospovirus* cinslerini içerir ve bu grupların konağı tripslerdir (Riley ve ark., 2011). Bu çalışma çerçevesinde de yukarıda belirtildiği gibi hem elde edilen örneklerden *F. occidentalis*'in moleküler tanınması hem de virüs vektör özelliklerinin RT-qPCR Yöntemiyle saptanması hedeflenmiştir

MATERYAL ve YÖNTEM

***Frankliniella occidentalis*'in izolasyonu**

Çalışmada 2016-2019 yıllarında arasında Mayıs- Haziran ayı arasında Aydın ilinin Efeler, Sultanhisar, Nazilli, Yenipazar, Köşk ve Söke ilçelerindeki çilek bahçelerinde rasgele örneklemeler yapılmış, bu örneklemelerde çilek çiçekleri beyaz küvet içerisine 10-15 sn süreyle silkelenmiştir. Küvete düşen tripsler emgi tüpüyle toplanmıştır. Laboratuvara getirilen bu örnekler Doğanlar ve Aydın (2009)'da belirtilen teşhis anahtarına göre değerlendirilmiş, daha sonra moleküler çalışmalarda kullanılmıştır. *Frankliniella occidentalis* örnekleri Cryo tüplerde bulunan 0,5 ml %96 ET-OH içerisine her tüpe 1 örnek olacak şekilde konmuş ve laboratuvar çalışmalarına kadar -20 °C de saklanmıştır.

***Frankliniella occidentalis*'in moleküler tanınması**

DNA izolasyonu aşamasında öncelikle 37 °C etüvde tüm örneklerden alkol tamamen uzaklaştırılmıştır. Alkolden arınmış örnekler EZNA Insect DNA kit kullanılarak DNA izolasyonu aşamasına geçilmiştir. Örneklerin çok küçük olması nedeniyle protokol biraz modifiye edilmiş; ancak temelde üreticinin protokolü kullanılmıştır. Finalde DNA 70 µl elüsyon tamponu kullanılarak izolatlar yeni bir tüpe alınmıştır. Bu protokole göre DNA İzolasyonu için, Elüsyon Tamponundan 70 µl tam kolon matrisine konulmuştur. Elde edilen total DNA %0,8'lik agaroz jelde yürütülmüş ve DNA kalite ve miktarı kontrol edilmiştir. Elektroforez jellerinde ve tamponda boyar madde olarak EtBr kullanılmış ve jel görüntülemeleri MaestroGen Slider İmager ile UV 320nm dalga boyunda yapılmıştır.

PCR Amplifikasyonu

Total DNA'lar kullanılarak 18S-ITS1-5,8S-ITS2-28S rDNA bölgeleri standart protokollerle PCR reaksiyonuna sokulmuştur. PCR reaksiyonunda forward primer olarak FrUNIF 5' –GAT RCG ACT GTC AGA GWA C –3' ve reverse primer olarak FrUNIR 5' –GAT ACC GAC ACT TCA TCT G- 3' kullanılmıştır. PCR reaksiyonu 50 µl hacimde hazırlanarak 0,2 ml PCR tüplerinde gerçekleştirilmiştir. Bioron Taq polimeraz 0,5 U/µl, Bioron 10X Taq Buffer 5 µl, forward ve reverse primerlerden 2'şer µl (10pmol/µl), Fermentas dNTPs Mix 2 µl (20 pmol/µl), 1 µl MgCl₂ (10mM), 2 şer µl kalıp DNA ve 35 µl ddH₂O kullanılmıştır. PCR reaksiyonu LongGene A300 Fast Gradient Thermal Cycler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan PCR protokolü 94 °C 3 dk başlangıç denatürasyonu, 28 döngü 94 °C 45 sn denatürasyon, 57 °C 1 dk primer bağlanma (annealing) ve 72 °C 1 dk uzama (extension), 28 döngü sonunda 72 °C 5 dk final uzaması şeklindedir. PCR reaksiyonu sonrası ürünler %1,2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir.

RFLP analizi

RFLP uygulaması için daha önce *Frankliniella* türlerinin ayırmada kullanılan Tru1 (5'-T^ΔTAA-3') ve Hinfl (5'-G^ΔANTC-3') FastDigest enzimi yine pek çok enzimle başarılı bir şekilde çalışan FastDigest Buffer (Thermo Scientific) kullanılmıştır. PCR ürününden 10 µl kullanılmış ve her reaksiyon için 5U Tru1 ve Hinfl, 2 µl FastDigest Buffer eklenerek üzeri bidistile su ile 25 µl ye tamamlanmıştır. Enzim kesimi LongGene Fast Gradient Thermal Cycler kullanılarak 25 dk 37 °C de gerçekleştirilmiştir. Restriksiyon sindirimi sonrası ürünler TBE (0,5M Tris Base, 0,5M Borik asit, 0,01M EDTA, pH 8,13-8,23) içeren %1,5'luk agaroz jelde kontrol edilerek tanılama yapılmıştır. Çalışmada 6X yükleme tamponu (%3 Gliserol, %0,03 Bromfenol Blue) kullanılmıştır.

Tospovirüslerin RT-qPCR yöntemiyle tespit edilmesi

Trips örneklerinin konakçısı oldukları TOSPO virüslerinin RT-qPCR yöntemiyle tespit edilmesine yönelik analizler için trips örneklerinden DNA/RNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından, izole edilen DNA/RNA örnekleri (karışım halinde) kalıp olarak kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Elde edilen cDNA lar kullanılarak qPCR yöntemi uygulanarak virüs genomu tespit edilmeye çalışılmıştır.

Total RNA izolasyonu ve Reverse Transkriptaz/RT-PCR ile cDNA Sentezi

Böcek örneklerinden DNA/RNA izolasyonu için "AnalytikJena innuPREP Virus DNA/RNA Kit" kullanılmıştır. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpünde tek zincirli cDNA sentezi için reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Bunun için sırasıyla 1 µl DNA/RNA izolatı (Total RNA), 3 µl random primerler, 10.2 µl RNase free distile su eklenerek master mix hazırlanmıştır. Karışım 65° C ta 5 dk inkübe edilmiş, ardından yaklaşık 10-15

dk bekletilerek karışımın oda sıcaklığına soğuması ve primerlerin bağlanması sağlanmıştır. Daha sonra 2 µl 10X RT-Buffer, 0.8 µl 25 mM dNTP mix, 2 µl 100 mM DTT, 1 µl RT-Enzimi eklenerek son hacim 20 µl ye tamamlanmıştır. Karışım 25 °C de fazladan 10 dk daha bekletilerek primerlerin daha iyi bağlanması sağlanmıştır. Tüpler hafifçe karıştırılarak PCR cihazına yerleştirilmiş ve karışımlar 42-55 °C de 60 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda sıcaklık 70°C'ye çıkartılarak 15 dk bekletilmek suretiyle reaksiyon sonlandırılmıştır. Tek zincirli cDNA sentezi tamamlandıktan tüpler -20 °C' ye kaldırılarak saklanmıştır. RT-PCR işlemleri Bio-Rad PCR cihazıyla

yapılmıştır. RT-PCR işlemi sonunda elde edilen cDNA örnekleri doğrudan real time PCR aşamasında kalıp olarak kullanılmıştır.

Real-Time-QPCR reaksiyonları için primer dizaynı

Frankliniella occidentalis' in bitki enfeksiyonuna yol açan ve Bunyaviridae familyasına ait olan Tosopovirüs cinsindeki virüslerin vektörü olması nedeniyle primer dizaynında tospovirüs cinsinin genetik yapısı dikkate alınmıştır (Nagata ve ark., 2004). Bu nedenle primer dizaynında Çizelge.1'deki primerler kullanılmıştır (Eiras ve ark., 2021).

Çizelge 1. Tosopovirus tayininde kullanılan primerler (Eiras ve ark., 2001)

Bölge	Primer No	Primer Adı	Primer Yönü	Primer Dizisi
Küçük Bölge (S)	1	kaBR60	İleri	5'-CCCGGATCCTGCAGAGCAATTGTGTCA-3'
	2	kaBR65	Geri	5'-ATCAAGCCTTCTGAAAGTCAT-3'
Orta Bölge (M)	3	kaNS1	İleri	5' CCCTGCAGGATCCAGAGCAATCAGTGCA-3'
	4	kaCLA1	Geri	5'-GCAGGCTTCAATGAATGC-3'
Büyük Bölge (L)	5	kaPDH001	İleri	5'-CCCGGATCCTCGAGAGCAATCAGGTAACA-3'
	6	kaL1	Geri	5'-AATATAACTATAGAAACGAAA-3'

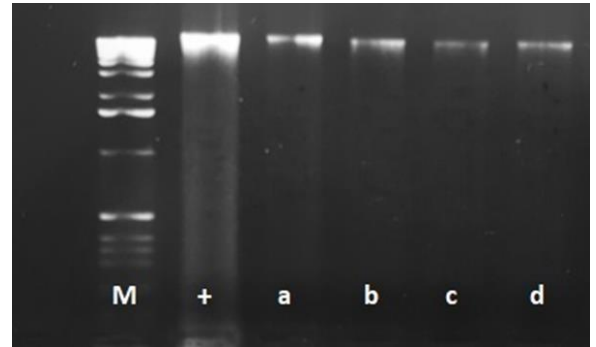
Real-Time Q-PCR yöntemiyle Tosopovirüslerin tayini

PCR uygulamalarında primer olarak Çizelge 1'de belirtilen 3 farklı primer çifti kullanılmıştır. Uygulama, kiti üreten firmanın talimatlarına göre yapılmıştır. Bu amaçla 200 µl lik PCR tüplerine 10 µl 2x innuMIX qPCR, 1 µl forward primer, 1 µl reverse Primer, 2 µl cDNA ekleyip toplam hacim 20 µl olacak şekilde üstü ddH₂O (6 µl) ile tamamlanmıştır. Karışım hafifçe pipetaj yapılarak karıştırılmış ve ardından karışımın dipte toplanması sağlanmıştır. Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra PCR tüpleri veya 96-well plaka Applied Biosystems ABI StepOne Plus Real-Time PCR cihazına yerleştirilerek uygun program kurulmuştur.

qPCR programı, AnalytikJena innuMIX qPCR MasterMix SyGreen Kit üretici firmanın talimatlarına göre hazırlanmıştır. Buna göre başlangıç aktivasyonu için 95 °C ta 2-3 dk ve 40 döngü olacak şekilde 95°C ta 5 sn, 60 °C'de 20 sn bekletilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

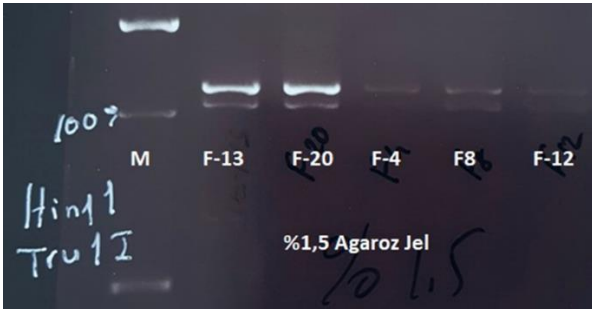
Modifiye edilmiş DNA izolasyon kiti protokolü ile elde edilen total DNA örnekleri % 0,8'lik Agaroz jelde 70 Volt ta 1 saat yürütülmüştür. Elde edilen agaroz jel görüntüsü Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. DNA izolasyonu sonrası %0,8 lik agaroz jel görüntüsü. İlk kuyucuk Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker (Fermentas), 2. Kuyucuk 50ng/µl kontrol DNA, a,b,c,d örneklere ait total DNA.

Yukarıdaki jel görüntüsünde görüldüğü üzere mikrolitrede 50 ng DNA içeren pozitif kontrol DNA ile karşılaştırıldığında mikrolitrede yaklaşık 3-10 ng DNA elde edildiği görülmektedir. Başlangıç örneklerinin çok küçük olması nedeniyle DNA 70 µl elüsyon tamponuna alındığından spektrofotometrik kantitatif ölçüm yapılmamıştır. Genomik DNA jel görüntüsünde bir degradasyon görülmemektedir. Çalışılan 70 örnekten 1 tanesinde genomik DNA tespit

edilememiştir. Geri kalan örnekler için DNA'nın PCR reaksiyonu için uygun ve yeterli olduğu görülmüştür. 69 adet trips örneğine ait total DNA izolatları kullanarak yukarıda belirtilen şartlarda PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Tüm örnekler için PCR ürünleri % 1,2'lik Agaroz Jelde 70 V 90' yürütülmüş daha sonra aynı total DNA'larda olduğu gibi EtBr ile boyanarak 320 nm UV ışıkta görüntülenmiştir. Negatif kontrolde bant gözlemlenmemiş, PCR ürünlerinde de herhangi bir çalışmayan örnek veya spesifik olmayan bant olmadığı görülmüştür. Oluşan ürün boyutu, kullanılan primer çiftinin *F. occidentalis* için vermesi gereken 337 bp boyutuyla uygundur. Elde edilen PCR ürünleri Hinf1/Tru1I enzimleri ile kesildikten sonra elde edilen jel görüntüsü tüm örneklerin *F. occidentalis* olduğunu gösteren 190 bp ve 147bp fragmentlerine sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2).



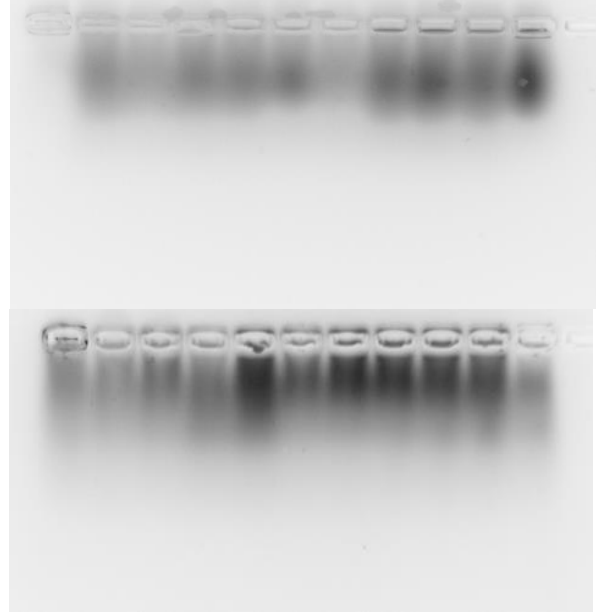
Şekil 2. Kuyucuk AMRESKO Ladder, 2-6 FrUNIF-FrUNIR primer çifti ürünlerinin Hinf1/Tru1I enzimleriyle PCR-RFLP ürünleri, Son kuyucuk Negatif Kontrol (-).

Çalışılan 70 örnekten 1 tanesinde DNA elde edilememiştir. Geriye kalan 69 örneğin tamamı *F. occidentalis* PCR-RFLP patternine uygun 190 ve 147 bp içeren 2 bant vermiştir. Elde ettiğimiz tüm örneklerin morfolojik tanımlamalarının yanında moleküler olarak da *F. occidentalis* türü olduğu teyit edilmiştir.

Bu yöntem daha önce de belirttiği üzere *F. occidentalis*, *F. intosa*, *F. pallida* ve *F. tenuicornis* türlerini diğer tüm Trips türlerinden ayırmada ve bu 4 türün birbirinden ayrılmasında en geçerli PCR-RFLP protokolüdür. Bunun yanında *F. occidentalis* ve *F. intosa* ayrımı için (Mainali ve ark., 2008), *Hercinothrips femoralis*, *F. occidentalis*, *Thrips palmi*, *T. tabaci* ve *Heliethrips haemorrhoidalis* ayrımı için (Brunner ve ark., 2002) ve *F. occidentalis*, *F. intosa*, *T. hawaiiensis*, *T. coloratus*, *T. flavus*, *T. palmi*, *T. tabaci* ve *T. setosus* için (Toda ve Komazaki, 2002) çeşitli PCR-RFLP protokolleri de bulunmaktadır. Ancak en geçerli yöntem bu çalışmada kullanılan yöntemdir ve buna göre tüm örnekler *F. occidentalis* olarak tespit edilmiştir.

Total RNA izolasyonunun ilk aşamasında böcek yapısının tamamen parçalanması sağlanmış ve DNA/RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA/RNA örnekleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir. Jel görüntüleri değerlendirildiğinde Şekil 3' de görüldüğü gibi

smear bir bant görüntüsü pozitif bir sonuç olarak değerlendirilmiştir. Bütün izolatlar ayrı ayrı jellerde yürütülmüş ve pozitif değerlendirilen DNA/RNA izolatları reverse transkriptaz enzimiyle RT-PCR yöntemi kullanılarak cDNA sentezinde kalıp olarak kullanılmıştır.



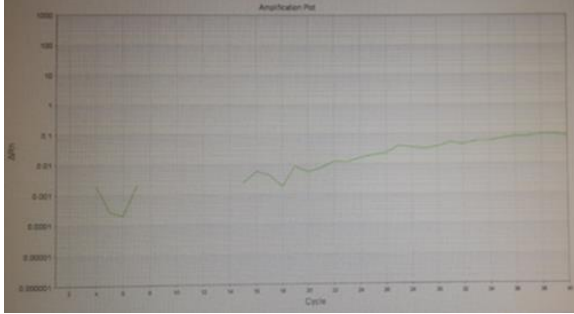
Şekil 3. *F. occidentalis* örneklerinden elde edilen DNA/RNA izolatlarının agaroz jel elektroforezinde kontrolü

RT-qPCR sonuçları değerlendirildiğinde; birinci örnek PrimerS (primer 1 ve primer 2) ile 25. döngüden itibaren 0.7 seviyelerinden 1.1 seviyesine kadar artış göstermiş ve bu artış yaklaşık 32. döngüden sonra durağanlaşmıştır. Benzer şekilde aynı örneğin 2. paraleli de 25. döngüden itibaren artış göstermiş fakat farklı olarak başlangıç 1.7'den bitiş seviyesi yaklaşık 10 değerine ulaşmıştır. Bununla beraber; ikinci örneğin PrimerS ile yapılan qPCR işleminde olumlu bir sonuç alınmamıştır. Üçüncü örneğin PrimerS ile yapılan qPCR işlemi sonucunda birinci örneğe benzer şekilde artış görülmüş fakat farklı olarak artış 30. döngüden sonra (31. ve 34. Döngü) başlamış olup ekspresyon seviyesi 0.02 den 1.1 seviyesine çıkmıştır. Dördüncü örneğin PrimerS ile qPCR uygulandığında ise 36. döngüden sonra bir miktar artış görülmüştür.

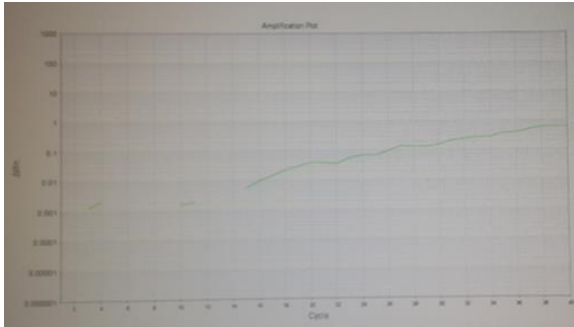
PrimerM ile yapılan analizlerde birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü örneklerin her iki paralelinde de ekspresyon seviyesinde bir artış tespit edilememiştir.

PrimerL ile yapılan qPCR analizlerinde birinci örnekte olumlu bir sonuç alınamamasına karşın ikinci örnekte her iki paralelde 14-15. döngüden itibaren bir artış eğilimi yakalanmıştır (Şekil 4). Ancak bu artış 0.004 seviyelerinden 0.1 seviyesine doğru olmuştur. Üçüncü örneğin birinci paralelinde de benzer şekilde 15. döngüden itibaren bir ekspresyon artışı gözlemlenmiştir (Şekil 5). Bu artış 0.007 seviyelerinden 0.07 seviyelerine doğru olmuştur. Üçüncü örneğin ikinci paralelinde ise 14. döngü itibarıyla kendini

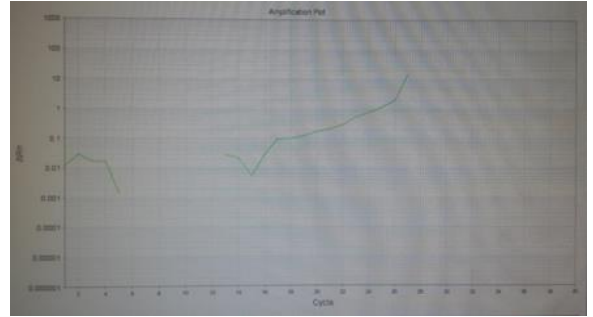
gösteren ancak birkaç döngü varlığını sürdüren bir ekspresyon tespit edilmiştir. Fakat ekspresyonun kesik olmasına karşın 0.07 seviyesinden başlayıp 6 seviyesine çıkmış olması dikkat çekicidir. Çalışmanın en dikkat çekici sonucu dördüncü örneğin PrimerL ile elde edilen qPCR sonucudur. Dördüncü örneğin PrimerL ile ekspresyonu 0.3 seviyesinden başlayıp 10.1 seviyesine çıkmıştır (Şekil 6).



Şekil 4. İkinci örneğin PrimerL ile qPCR sonucu.

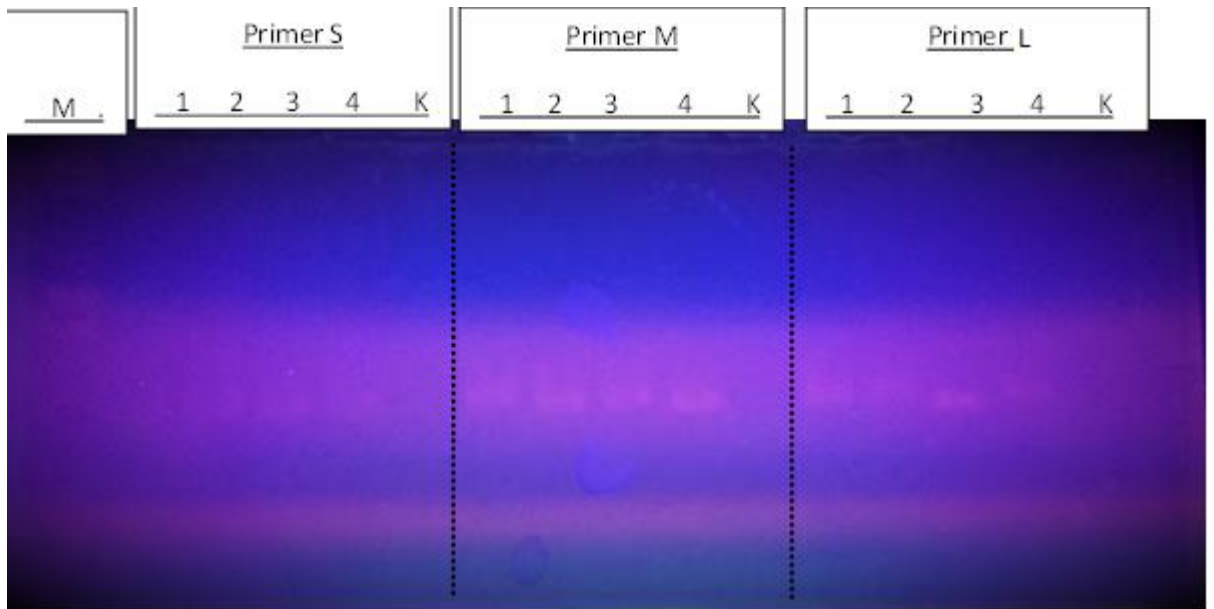


Şekil 5. Üçüncü örneğin PrimerL ile qPCR sonucu.



Şekil 6. Dördüncü örneğin PrimerL ile qPCR sonucu.

Her üç örneğin de ortalama 14. döngü itibarıyla artışa geçmesi de dikkat çekici bir noktadır. Bununla beraber; *F. occidentalis*'de bulunan tospovirüslere ait cDNA izolatları ile yapılan qPCR analizlerinin aynı primer çiftleri (PrimerS, PrimerM, PrimerL) kullanılarak klasik PCR da doğrulaması yapılmıştır. Bu sayede işlem güvenilirliği bir kez daha test edilmiştir. Bu amaçla cDNA örneklerinden 5 ul alınıp kalıp olarak kullanılmış, kontrol tüplerinde cDNA yerine dH₂O eklenmiştir. PCR türlerinin agaroz jel elektroforezinde yapılan kontrollerinde PrimerS, PrimerM ve PrimerL primer çiftlerinin 1, 2, 3 ve 4 no' lu örneklerde pozitif sonuç verdiği, kontrol sütunlarında ise herhangi bir bant oluşmadığı belirlenmiştir (Şekil 7). Bu sonuçlarla cDNA izolasyonundan elde edilen izolatların kalıp olarak kullanılmaya uygun olduğu belirlenmiştir. Tercih edilen primer çiftleri de bu kalıp DNA'lar üzerinde kendilerine tanıyacakları bir dizi bulabilmektedir. Elde edilen bu sonuçlar Erias ve ark. (2001)'ni desteklemektedir.



Şekil 7. Q-PCR sonuçlarını doğrulama amacıyla yapılan kontrol PCR sonuçları, dört örnek üç farklı primer çiftiyle reaksiyona tabi tutulmuştur.

SONUÇ

Aydın ilinin farklı bölgelerinden çilek tarlalarından toplanan trips örnekleri uygulanan PCR-RFLP protokolü ile tanılanmış ve elde edilen tüm türlerin *F. occidentalis* türüne ait olduğu saptanmıştır. Bununla beraber; belirlediğimiz primerler yardımıyla RT-qPCR yöntemi kullanılarak böcekte bulunması muhtemel Tospovirüsler tespit edilmeye çalışılmıştır. RT-qPCR sonuçlarına göre kullandığımız primerlerden “primerM” olarak etiketlenen primer çifti herhangi bir olumlu sonuç vermemiştir. Bununla beraber “primerS” çiftiyle 3 adet, “primerL” çiftiyle 3 adet olmak üzere 6 pozitif sonuç alınmış ve kullanılan bu yöntemle tospovirüslerin varlığı tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar, ribozomal RNA gen bölgelerini hedef alan tespit sistemimizin yüksek derecede hassasiyet ve özgünlüğe sahip olduğunu göstermiştir. Ancak bu sonuçların daha detaylı analizlerle doğrulanması gerekmektedir. Bu çalışmanın devamında örnek sayısı, primer sayısı ve primer çeşidi artırılarak ve kantitatif analizlere imkan verecek teknik alt yapı da çalışmaya dahil edilerek bir çok tarımsal üründe zararlara sebep olan *F. occidentalis* ve bunun taşıdığı Tospovirüslerin tespitini kolaylıkla yapabilecek bir yöntem geliştirilebilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde finansal destek sağlayan Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimizi sunarız (Proje No: ZRF-16010).

KAYNAKLAR

- Beaudoin ALP, Kahn ND, Kennedy GG (2009) Bell and Banana Pepper Exhibit Mature-Plant resistance to Tomato Spotted Wilt Tospovirus Transmitted by *Frankliniella fusca* (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Economic Entomology* 102 (1): 30-35.
- Brunner P, Fleming C, Frey J (2002) A molecular identification key for economically important thrips species (Thysanoptera: Thripidae) using direct sequencing and a PCR-RFLPbased approach. *Agricultural and Forest Entomology* 4 (2): 127–136.
- Coll M, Shakya S, Shouster I, Nenner Y, Steinberg S (2006) Decision-making tools for *Frankliniella occidentalis* management in strawberry: consideration of target markets. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 122 (1): 59-67.
- Doğanlar M, Aydın S (2009) Güneydoğu Anadolu Bölgesi (Türkiye)'nde yeni bir zararlı, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 33(2): 153-160.
- Eiras M, Resende RO, Missiaggia AA, Avila AC (2001) RT-PCR and dot blot hybridization methods for a universal detection of tospoviruses. *Fitopatologia Brasileira*, 26:170–175. <https://doi.org/10.1590/s0100-41582001000200009>
- Huang, KS., Lee, SE, Yeh Y, Shen GS, Mei E, Chan CM (2010) Taqman real-time quantitative PCR for identification of western flower thrip (*Frankliniella occidentalis*) for plant quarantine. *Biology letters*, 6(4):555-557.

- Kirk WDJ, Terry LI (2003) The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Agricultural and Forest Entomology*,5 (4): 301-310.
- Kuipers AGJ, Jongsma MA (2004) Isolation and molecular characterization of cathepsin L-like cysteine protease cDNAs from western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 139 (1): 65-75.
- Law MD, Speck J, MOYER JW (1992) The M RNA of Impatiens Necrotic Spot Tospovirus (Bunyaviridae) Has an Ambisense Genomic Organization. *Virology*, 188 (2):732-741.
- Li HB, Du YZ (2013) Molecular cloning and characterization of an Hsp90/70 organizing protein gene from *Frankliniella occidentalis* (Insecta: Thysanoptera, Thripidae). *Gene*, 520 (2): 148–155.
- Mainali BP, Shrestha S, Lim UT, Kim Y (2008) Molecular markers of two sympatric species of the genus *Frankliniella* (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 11(1): 45-48.
- Marie-Nguyen M, Haenni AL (2003) Expression strategies of ambisense viruses. *Virus Research*, 93 (2): 141-150.
- Moriones E, Aramburu J, Riudavets J, Arno J, Lavina A (1998). Effect of plant age at time of infection by tomato spotted wilt tospovirus on the yield of field-grown tomato. *European Journal of Plant Pathology* 104: 295-300.
- Nagata T, Almeida ACL, Resende RO, DeAvila AC (2004) The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses. *Plant Pathology* 53(2): 136–140.
- Navas SVE, Funderburk JE, Beshear RJ, Olson SM, Mack TP (1991) Seasonal Patterns of *Frankliniella* spp. (Thysanoptera: Thripidae) in Tomato Flowers. *Journal of Economic Entomology*,84 (6):1818-1822.
- Okazaki S, Okuda M, Komi K, Yamasaki S, Okuda S, Sakurai T, Iwanami T (2011) The effect of virus tirtre on acquisition efficiency of Tomato spotted wilt virus by *Frankliniella occidentalis* and the effect of temperature on detectable period of the virus in dead bodies. *Australian Plant Pathology*, 40: 120-125.
- Okuda M, Hanada K (2001) RT-PCR for detecting five distinct Tospovirus species using degenerate primers and dsRNA template. *Journal of Virological Methods*, 96 (2): 149–156.
- Riley DG, Joseph S, Srinivasan S, Diffie S (2011) Thrips Vectors of Tospoviruses. *Journal of Interated. Pest Management*, 2(1): I1-I10.
- Roberts CA, Dietzgen RG, Heelan LA, Maclean DJ (2000) Real-time RT-PCR fluorescent detection of tomato spotted wilt virüs. *Journal of Virological Methods*, 88 (1): 1–8.
- Rotenberg D, Kumar NKK, Ullman DE, Astua MM, Willis DK, German TL, Whitfield AE (2009) Variation in Tomato spotted wilt virus Titer in *Frankliniella occidentalis* and Its Association with frequency of Transmission, *Phytopathology* 99(4): 404-410.

- Schoonhoven AV, Peña JE (1976) Estimation of Yield Losses in Cassava Following Attack from Thrips. *Journal of Economic Entomology*, 69 (4):514-516.
- Sokmen MA, Sevik MA (2013) Spread of Tomato spotted wilt virus from an internal virus source by thrips species in Samsun, Turkey. *Phytoparasitica*, 41: 159-168.
- Toda S, Komazaki S (2002) Identification of thrips species (Thysanoptera: Thripidae) on Japanese fruit trees by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal ITS2 region. *Bulletin of Entomological Research* 92 (4): 359–363.
- Tunç I, Göçmen H (1994) New greenhouse pests, *Polyphagotarsonemus latus* and *Frankliniella occidentalis* in Turkey. *FAO Plant Protection Bulletin*, 42: 218–220.
- Wijkamp I, Van Lent J, Kormelink R, Goldbach R, Peters D (1993) Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of General Virology*, 74 (3):341-349.
- Yıldırım EM, Başpınar H (2013) Aydın ili çilek alanlarında *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae)'nin popülasyon dalgalanmaları. *Türkiye Entomoloji Bülteni*, 3(4): 135-138.
- Zhang GF, Meng XQ, Min L, Qiao WN, Wan FH (2012) Rapid diagnosis of the invasive species, *Frankliniella occidentalis* (Pergande): a species-specific COI marker, *Journal of Applied Entomology*, 136 (6): 410–420.

