

Asma virüslerinin tanılanmasında DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemlerinin duyarlılıklarının karşılaştırılması¹

Serpil ERİLMEZ² Aydan KAYA²

ABSTRACT

Comparison of DAS-ELISA and RT-PCR methods for the diagnosis of grapevine viruses

The present study was conducted to compare the sensibility of different methods (DAS-ELISA and RT-PCR) which are used to detect the agents of viral diseases in grapevine. Purposive sampling was done in vineyards in Manisa and İzmir provinces and a total of 50 samples were taken from grapevines showing virus symptoms. DAS-ELISA and RT-PCR methods were used for identification of viral agents in these samples. Total RNA extractions were made from serially diluted fresh leaf tissue, root, bark and one year old green bark tissue using silica-based method. Purified total RNA extracts were used as template for cDNA synthesis by reverse transcription. PCR products were analysed by gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining. DAS-ELISA test results showed that the plants were infected with GFkV, ArMV, GLRV 1, 2, 3 and 4-9 viruses. PCR analysis confirmed DAS-ELISA results.

Keywords: Grapevine, virus, DAS-ELISA, RT-PCR

ÖZ

Bu çalışmada asma virüslerinin tanılanmasında kullanılan farklı yöntemlerin (DAS-ELISA and RT-PCR) duyarlılık durumlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Manisa ve İzmir illerinde bağ alanlarında güdümlü örnekleme yapılmış ve virüs belirtisi gösteren asma bitkilerinden toplam 50 örnek alınmıştır. Bu örneklerdeki viral etmenlerin tanılanmasında DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri kullanılmıştır. Total RNA ekstraksiyonu silica temelli metoda göre sürgünlerin yaprak/ floem dokusundan gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan RNA revers transkripsiyonda cDNA sentezi için kalıp olarak kullanılmıştır. Çoğaltılan PCR ürünleri agaroz jel'de yürütülmüş ve ethidium bromide ile boyanarak gözlemlenmiştir.

¹ Bu çalışma, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğünün TAGEM-BS-05/04-01/02-14 nolu "Asma Virüs Hastalıklarının Tanılanmasında Moleküler Tekniklerin Kullanımı" isimli projenin bir bölümüdür.

² Bornova Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsü, 35040 Bornova-İzmir
Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: serpilerilmez@gmail.com
Alınış (Received): 23.06.2015, Kabul ediliş (Accepted): 19.11.2015

DAS-ELISA ve RT-PCR testleri sonucu asma bitkilerinde GFLV, GFkV, ArMV, GLRaV 1,2,3 ve 4-9 etmenleri saptanmıştır. PCR analiz sonuçları, DAS-ELISA sonuçları ile paralel olmuş ve birbirini doğrulamıştır.

Anahtar kelimeler: Asma, virüs, DAS-ELISA, RT-PCR

GİRİŞ

Türkiye, bağcılık için dünyanın en elverişli iklim koşullarına sahip ülkelerinden birisidir. Asmanın (*Vitis vinifera* L.) gen merkezi olmasının yanı sıra çok eski tarihlere dayanan bir bağcılık kültürüne sahip olan Anadolu bağcılığının kökeni M.Ö. 2300 yıllarına dayanmaktadır (Çelik ve ark. 1998).

Türkiye İstatistik Kurumunun 2010 verilerine göre ülkemiz, dünya ülkeleri arasında, bağ alanı yönünden 4.sırada (477.786 ha), üzüm üretimi yönünden ise 6. (4.255.000 ton) sıradadır. Ülkemiz dünyada en büyük çekirdeksiz kuru üzüm üreticisi ve ihracatçısı konumundadır. Üzüm üretimi bakımından ülkemiz bölgelere göre değerlendirildiğinde ise, gerek alan (1.392.082 da), gerekse üretim (1.952.356 ton) açısından Ege Bölgesi ilk sırada yer almaktadır. İllere göre değerlendirildiğinde ise, hem alan (715.895 da) hem de üzüm üretimi (1.372.571 ton) yönünden Manisa ilk sırada yer almaktadır (TÜİK 2010).

Dünyada asmalarda 60'a yakın virüs hastalığı kayıtlıdır. Vejetatif olarak çoğaltılan asmalarda bu virüslerin bir yerden başka bir yere yayılmasında virüs ile enfekteli üretim materyali en önemli taşıma aracı olarak rol oynamaktadır. Bazı virüsler böcek vektörler bazıları da toprak kaynaklı olup nematodlarla taşınmaktadır. Bağları etkileyen virüsler ekonomik önem ve coğrafi dağılımına göre 2 grupta toplanmaktadır. İlk grup bağcılık ve şarap endüstrisi için büyük önem taşıyan majör grupta yer alan, yaprak kıvrılma hastalıkları, gövde çukurlaşma hastalık kompleksi ve nematodla taşınan virüslerdir. İkinci grup ise ekonomik önemi az olan ve sınırlı coğrafik alanlarda bulunan virüslerdir (Anonymous 2011).

Türkiye'de asmalarda en önemli virüslerin Asma yelpaze yapraklılık virüsü (*Grapevine fanleaf nepovirus*-GFLV), Domates siyah halka leke virüsü (*Tomato ringspot nepovirus*-ToRSV), Arabis mozaik virüsü (*Arabis mosaic nepovirus*-ArMV), Yıldızimsı mozaik virüsü, Gövde çukurlaşması virüsü, Asma flek virüsü (*Grapevine fleck vitivirus*-GFkV), Asma A virüsü (*Grapevine A virus*-GVA), Çilek latent halkalı leke virüsü (*Strawberry latent ringspot nepovirus*-SLRSV), Ahududu halkaleke virüsü (*Raspberry ringspot nepovirus*-RpRSV) ve Asma yaprak kıvrılma virüsleri 1,2,3,5,6 ve 7 (*Grapevine leafroll closterovirus* 1,2,3,5,6,7) olduğu bildirilmektedir (Kepsutlu ve ark. 1962, Tekinel ve ark. 1972, Erdiller 1982, Azeri 1983, Gürsoy ve ark. 1988, Gürsoy 1991, Azeri ve Çiçek 1995, Akbaş ve Erdiller 1993, Özaslan ve Yılmaz 1994, Yılmaz ve ark. 1997, Çağlayan ve Gazel 1998, Köklü 1999, Köklü ve Baloğlu 2000, Çığışar 2002, Akbaş ve ark. 2007, Buzkan ve ark. 2010).

Ülkemizde ve özellikle Ege bölgesinde çok eski zamanlardan beri asmanın yetiştirilmesi virüs ve virüs benzeri hastalıkların durumunun incelenmesini önemli kılmaktadır. Asma gibi vejetatif olarak çoğaltılan bitkilerde sistemik olarak bulunan bu hastalık etmenleri üretim materyali ile yayılmaktadır.

Virüs hastalıklarından korunmada en önemli yol sağlıklı ve temiz üretim materyali kullanılmasıdır. Asma bitkilerinde bulunan virüslerin belirlenmesi bu hastalıklara karşı alınabilecek önlemlerin temelini oluşturmaktadır. Bu düşüncelerden hareketle, alınan asma örnekleri belirtilerine göre gruplandırılmış ve temsili olarak 50 adet örnek seçilmiştir. Bu örnekler DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemlerinden yararlanılarak testlenmiştir. Ayrıca, sözü edilen yöntemlerin virüsleri saptamadaki başarı oranları değerlendirilmiştir.

MATERYAL VE METOT

Çalışmanın ana materyalini, Manisa ve İzmir illerinde bağlarda virüs belirtileri gösteren asma bitkileri, asma virüslerine ait DAS-ELISA tanı kitleri, primerler, moleküler analiz kimyasal maddeleri ve cihazları oluşturmuştur.

Survey çalışmaları

Çalışma alanını kapsayan 2 ilde (Manisa ve İzmir) bağlarda bulunan virüsleri tanılamak için virüs belirtisi gösteren bitkileri toplamak amacıyla güdümlü örnekleme yapılmıştır (Hewitt and Gifford 1956, Bovey 1965, Bora ve Karaca 1970).

Örnekleme, ilkbahar ve sonbahar olmak üzere iki dönemde yapılmıştır. İlkbahar döneminde, virüs benzeri belirti (mozaik, damarlarda renk açılması, halkalı lekeler, damar bantlaşması, sürgünlerde yassılaşıma, çatallaşıma, şekil bozukluğu, gelişme geriliği) gösteren asma bitkilerinin yıllık sürgünlerinden yaprak ve sürgün örnekleri toplanmıştır. Sonbahar döneminde ise yine yıllık sürgünlerde, yapraklarda kızarma ve aşağı doğru kıvrılma (özellikle alt yapraklar) gösteren bitkilerden örnekler toplanmıştır. Kontrollerde omcaların dört tarafında yaprak, sürgün, salkım ve gövdeleri incelenmiş, örnekleme yapılmıştır. Toplanan örnekler polietilen torbalar içinde etiketlenerek buz kutusunda laboratuvara getirilmiş ve testleninceye kadar 4°C' de buzdolabında saklanmıştır.

Serolojik yöntemler (DAS-ELISA testi)

Survey çalışmaları sonucunda ilkbaharda ve sonbaharda asma bitkilerinden alınan yaprak ve sürgünlerdeki virüsleri tanılamak için serolojik testler yapılmıştır (Clark and Adams 1977, Gonsalves 1979, Ramsdell et al. 1979, Engelbrecht 1980, Shanmugathan and Fletcher 1982). Asma örnekleri, ilkbahar döneminde *Grapevine fanleaf nepovirus* (GFLV), *Arabis mosaic nepovirus* (ArMV), *Tobacco black ring nepovirus* (TBRV), *Strawberry latent ringspot nepovirus* (SLRSV), *Raspberry ringspot nepovirus* (RpRSV), *Tobacco ringspot nepovirus* (TRSV), *Tomato ringspot nepovirus* (ToRSV), *Grapevine fleck vitivirus* (GFkV) ve *Grapevine A*

vitivirus (GVA), sonbahar döneminde ise *Grapevine leafroll closterovirus* 1,2,3,4-9,6,7 (GLRV 1,2,3,4-9,6,7) tanı kitleri ile BIOREBA firmasının prosedürlerine göre DAS-ELISA testleri gerçekleştirilmiştir. GLRV-5 için ADGEN firmasının önerdiği prosedüre göre DAS-ELISA testleri yapılmıştır (Çizelge 1).

Bağlarda, ilkbaharda asmaların virüs belirtili genç yapraklarından ve sürgünlerin floem kazıntılarında, sonbaharda ise virüs belirtili orta ve alt yapraklardan ve sürgünlerin floem kazıntılarında örnek hazırlanarak DAS-ELISA testleri gerçekleştirilmiştir.

Sonuçlar E Max Precision Microplate Reader cihazı kullanılarak 405 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Örneklerde sağlıklı kontrolün 3 katı olan absorban değerleri enfekteli olarak değerlendirilmiştir (Erkan ve ark. 1994).

Çizelge 1. Asma bitkilerinden alınan yaprak ve sürgün örneklerinde serolojik ve moleküler yöntemler ile testlenen viral etmenler

Viral Etmenler	Test Yöntemi	
	Serolojik	Moleküler
GFLV	+	+
ArMV	+	+
SLRSV	+	+
TBRV	+	+
RpRSV	+	+
ToRSV	+	+
GFkV	+	+
GVA	+	+
GLRV 1,2,3,4-9,5,6,7	+	+

Moleküler yöntemler

Toplam RNA izolasyonu

RNA ekstraksiyonunda kullanılan tüm malzemeler, yapısına uygun olarak ekstrakte edilmiştir. Her izolat için yaklaşık 0,2 g örnek (yaprak+sürgün kazıma) 10 ml %1 mercapto-ethanol içeren ekstraksiyon tampon çözeltisi varlığında steril örnek poşetleri içinde homojenize edilmiştir. Tüpler ısıtıcıda 70°C 10 dakika inkube edildikten sonra, 5 dakika buzda bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş, üst sıvıdan 300 µl alınarak, yeni tüplere aktarılmıştır. Tüplere 150 µl ethanol, 300 µl 6M NaI, 50 µl silika süspansiyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkubasyona bırakılmıştır. Tüpler 6000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra, üst sıvı atılmış tüpün içinde kalan silika partiküllerinin yıkanması için 500 µl yıkama tampon çözeltisi eklenmiştir. Bu işlemden sonra tüpler 6000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi iki kere yapılmıştır. Yıkamadan sonra silika partikülleri içeren tüplere 150 µl RNase'dan arı steril su eklenmiştir. 70°C'de 4 dakika ısıtıcıda inkube edilen tüpler 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün üst kısmında kalan sıvıdan 145µl

alınarak, yeni tüplere aktarılmış ve RNA ekstraksiyonu tamamlanmıştır. Örnekler cDNA sentez ve PCR uygulamaları yapılmaya kadar -80°C'de derin dondurucuda saklanmıştır (Foissac et al. 2001).

Komplementer DNA (cDNA) sentezi

RNA ekstraksiyonu yapılmış olan örneklerle komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Fermentas firmasından temin edilen cDNA sentez kitleri kullanılmış ve firmanın belirttiği prosedür doğrultusunda cDNA sentezleri gerçekleştirilmiştir.

Bu yöntemle göre ilk olarak eppendorf tüplerin içerisine 0,1–5 µg total RNA, 1 µl oligo (dT) primer konulmuş ve DEPC su ile 12 µl'ye tamamlanmıştır. 65°C'de 5 dakika inkubasyon uygulandıktan sonra, tüpler buz üzerine konulmuş ve içlerine sırasıyla 4 µl 5X reaction buffer, 1 µl Ribolock Ribonuclease inhibitor, 2 µl 10mM dNTP mix eklenmiştir. Kısa süreli santrifüj (3-5 saniye) uygulandıktan sonra 25°C'de 5 dakika inkubasyon uygulanmıştır ve tüplerin içine 1 M-MuLV reverse transcriptase eklenerek, toplam 20 µl hacme ulaşılmıştır. Karışım daha sonra 42°C'de 60 dakika ve 70°C'de 5 dakika inkubasyon uygulanarak cDNA sentez aşaması tamamlanmıştır.

RT-PCR yöntemi

PCR işlemi Fermentas firmasının önerdiği prosedüre göre 50 µl hacimde yapılmıştır. Çizelge 2'de verilen spesifik primerler ile RT-PCR testleri gerçekleştirilmiştir.

Steril PCR tüplerine 25 µl 2x PCR master mix, 1 µl primer 1, 1 µl primer 2, 2 µl cDNA ve 21 µl nuclease free su eklenmiştir. Tüpler PCR cihazına yerleştirilerek test edilecek virüs için spesifik olan program uygulanmıştır (Candresse et al. 1995). Tüm işlemler boyunca eldiven kullanılmış ve herhangi bir kontaminasyon olasılığını belirlemek için de nükleik asit eklemeyen sadece karışımın yer aldığı bir tüpte (kontrol), PCR programında çoğaltma işlemine alınmıştır.

Agaroz jel elektroforez yöntemi

Agaroz jel 100 ml 1X TAE tamponu içine 1,5g agaroz konulup, mikrodalga fırında 3.5 dakika tutularak hazırlanmıştır.

Agaroz jel hazırlanmasında ve elektroforez koşulunda kullanılan 1X TAE tamponu, stok 50 X TAE tamponunun seyreltilmesi ile elde edilmiştir. Stok TAE 50X tamponu; 40mM Tris-acetate (pH 8), 57.1 ml Glacial Acetic Acid, 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8)'den oluşmaktadır. Bu karışım 1000 ml'ye tamamlanarak stok solüsyon oluşturulmuştur. Stok çözeltiliden 20 ml alınarak, distile H₂O ile 1000 ml'ye tamamlanmış ve 1X TAE konsantrasyon hazırlanmıştır.

Elektroforez koşumu, 100 V'da, yatay düzenekte 60 dakika süreyle ve 1X TAE çözeltisi içerisinde uygulanmıştır. Jel yükleme yapılmadan önce, örneklerle (10 µl örneğe) 2 µl yükleme tamponu eklenmiştir.

Jel görüntüleme cihazında PCR sonuçlarının değerlendirilmesi

Ethidium bromide ile boyanan jel, ETX-20.M marka Jel Dokümantasyon ve Analiz Sistemi ile fotoğrafı çekilerek kayıt edilmiştir.

Çizelge 2. RT-PCR testlerinde kullanılan primerler, baz uzunlukları ve sıcaklık döngüleri

Hedef Virüs/Primer	Primer Dizilimi	Baz Uzunluğu	Referans
GFLV-V1-F	ACC GGA TTG ACG TGG GTG AT	321 bp	Rowhani et al., 1993
GFLV-C1-R	CCA AAG TTG GTT TCC CAA GA		
GfKv-F	TTCTCTTCATGAACATGACCGTGG	262 bp	Matus et al., 2008
GfKv-R	ACAACACAATCCAGAAGGATAC		
GLRV1-F	CGA CCC CTT TAT TGT TTG AGT ATG	401 bp	Martin et al., 2005
GLRV1-R	GTT ACG GCC CTT TGT TTA TTA TGG		
GLRaV 2-F	ATA ATT CGG CGT ACA TCC CCA CTT	332 bp	Martin et al., 2005
GLRaV 2-R	GCC CTC CGC GCA ACT AAT GAC AG		
GLRaV3-F	CGC TAG GGC TGT GGA AGT ATT	546 bp	Turturo et al., 2005
GLRaV3-R	GTT GTC CCG GGT ACC AGA TAT		
GLRaV4up	CCAACCTGTCGTGGGTATAAGGAAT	243 bp	Maliogka et al., 2008
GLRaV4do	CCCAGACACCGGTCCTATACTIA		
GLRaV5-F	CTCTGCTTTTCTGCTGGCA	161 bp	Maliogka et al., 2008
GLRaV5-R	TATCTTTTATCTCCCGATAAACGAG		
GLRaV6-F	CGATAGGTTTGGGGGCACT	283 bp	Maliogka et al., 2008
GLRaV6-R	GGCACAGAACACACCGACAAAAC		
GLRaV7-F	TATATCCCAACGGAGATGGC	502 bp	Engel ve ark., 2008
GLRaV7-R	ATGTTCCCTCCACAAAATCG		
GLRaV9-F	CGGCATAAGAAAAGATGGCAC	393 bp	Alkowni et al., 2004
GLRaV9-R	TCATTCACCACTGCTTTGAAC		
GVA-F	AGGTCCACGTTTGCTAAG	235 bp	MacKenzie et al., 1997
GVA-R	CATCGTCTGAGGTTTCTACTA		
SLRSV-F	CCCTTGTTACTTTTACCTCCTCATTGTCC	293 bp	Faggioli et al., 2002
SLRSV-R	AGGCTCAAGAAAACACAC		
ToRSV-F	GAC GAA GTT ATC AAT GGC AGC	450 bp	Griesbach 1995.
ToRSV-R	TCC GTC CAA TCA CGC GAA TA		
ArMV-F	TTGGCCCAGATATAGCGTAAAAAT	519 bp	MacKenzie et al., 1997
ArMV-R	CAGCGGATTGGGAGTTCGT		
RpRSV-F	TGTGTCTGGTTTTGATGCT	385 bp	Ochoa-Corona et al., 2006
RpRSV-R	GAGTGCATAGGGGCTGTT		
TBRV-F	ATGGGAGAAGTGCTGG	332 bp	Le Gall et al., 1995
TBRV-R	AATCTTTTGTGTCCAACA		

SONUÇLAR VE TARTIŞMA**Arazi gözlemleri**

Survey yapılan bütün bağ alanlarının büyük bir kısmında virüs hastalıklarının belirtilerini gösteren omcalara rastlanmıştır. İlkbahar döneminde, asmaların yapraklarında damar açılması, damar bantlaşması, deformasyon, sarı lekelenme,

sararma, anormal dişlenme, yelpaze şeklini alma ve küçülme; sürgünlerde boğum aralarında kısılma, zikzak gelişme, çatallanma, çift sürgün oluşumu ve yassılaşıma; salkım ve danelerde küçülme, seyrek dane oluşumu en çok karşılaşılan belirtiler olmuştur (Şekil 1).

Sonbahar döneminde, yapraklarda içe doğru kıvrılma, yaprak damarları yeşil kalıp yaprak ayalarında kırmızılaşma (kırmızı asma çeşitlerinde), yaprak ayalarında sararma (beyaz asma çeşitlerinde); salkım ve danelerde geç ve düzensiz olgunlaşma, danelerin normal rengini alamaması en önemli belirtiler olarak gözlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 1. Boğum aralarında kısılma, çatallanma ve yapraklarda sararma.



Şekil 2. Yapraklarda içe doğru kıvrılma, damar aralarında kızarma, danelerde düzensiz olgunlaşma.

Örneklerin simptomatolojik açıdan incelenmesi diğer tanılama yöntemleri için sadece bir ön basamak oluşturmaktadır. Bunun yanında oluşan belirtilerin viral etmenlerden kaynaklı olabileceği sonucunun yanı sıra diğer patojenler ya da etkenler tarafından oluşturulabileceği bilinmektedir (Erkan 1998).

Survey çalışmaları sırasında, Bovey and Martelli (1992), Martelli (1993)'nin de bildirdiği gibi, bağ alanlarında makroskopik gözlemlerde asmalarda kısa boğum (GFLV) ve yaprak kıvrılma hastalıklarının (GLRaV) tipik belirtileri gözlenmiştir. GFLV ile enfekteli bitkilerde yapraklarda sarı lekelenme, sararma, yaprak ayasında dişlenme, sürgünlerde boğum aralarında kısılma, aynı noktada çift sürgün oluşumu, yassılaşıma belirtilerine rastlanmıştır. Analiz sonuçlarına göre bu

belirtileri gösteren bitkilerde GFLV saptanmıştır. Ancak bazı örneklerde belirti olmasına rağmen viral etmen tespit edilmemiştir. Bu durum virüs benzeri belirtilerin, bitki besin elementi eksiklik/fazlalıkları, genetik açılmalar, demir klorozu, fitotoksite belirtileri ile benzerlik göstermesinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Sonbahar döneminde yaprak kıvrılma hastalıkları ile ilgili olarak, asma bitkilerinde yaşlı yapraklarda aşağı doğru kıvrılma, yaprak damarları yeşil kalıp yaprak ayalarında kızarma (kırmızı asma çeşitlerinde), yaprak ayalarında sararma (beyaz asma çeşitlerinde) belirtileri gözlenmiştir. Bu tip belirtiler de özellikle kırmızı üzüm çeşitlerinde asmanın fizyolojik olarak yaşlanması sonucu olan kızarma belirtileri ile kolaylıkla karışabilmektedir. Ayrıca bazı bitki besin elementlerinin eksikliği ile de benzerlik gösterebilmektedir.

Semptomatolojik olarak incelenen asma örneklerine serolojik yöntemlerden DAS-ELISA testi uygulanmıştır. Bağlarda, ilkbaharda asmaların virüs belirtili genç yapraklarından ve sürgünlerin floem kazıntılarında, sonbahar da ise virüs belirtili orta ve alt yapraklardan ve sürgünlerin floem kazıntılarında örnek hazırlanarak DAS-ELISA testleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda ilkbaharda alınan örneklerde GFLV ve GFkV, sonbaharda alınan örneklerde GLRaV 1,2,3,4-9 tespit edilmiştir. Asma örneklerinde, ToRSV, TBRV, SLRSV, RpRSV, GVA ve GLRaV-5,6,7 enfeksiyonu tespit edilmemiştir (Çizelge 3).

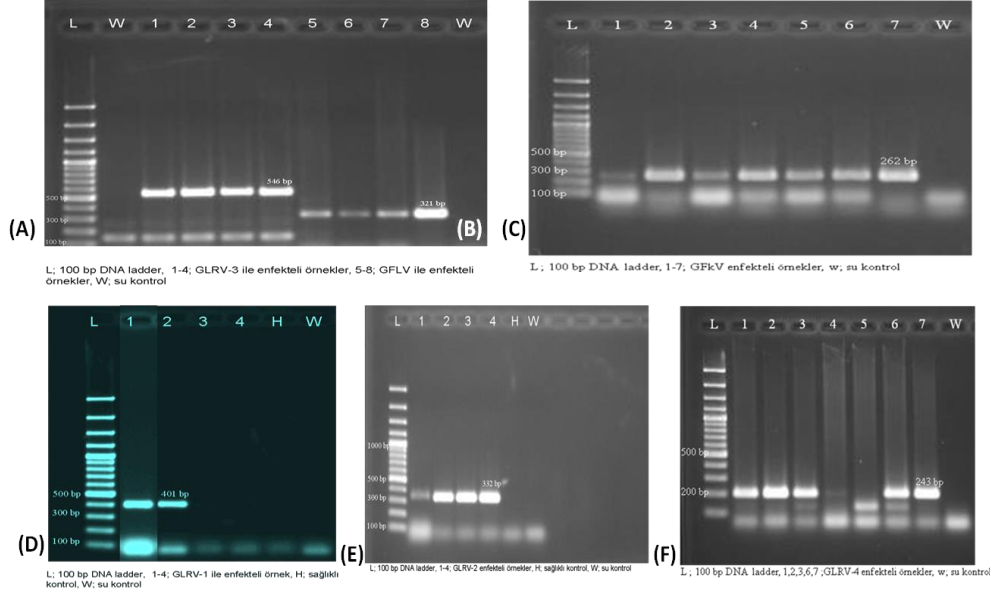
Asma virüslerinin tanılanmasında biyolojik indeksleme, serolojik testler (DAS-ELISA), dsRNA, RT-PCR, nested PCR ve Real-time PCR yöntemleri kullanılmaktadır (Gugerli et al. 1984, Rowhani 1992, Habili et al. 1992, Boscia et al. 1997, Acheche et al. 1999, Digiario et al. 2000, Rowhani et al. 2000, Dovas and Katis 2003, Maliogka et al. 2008). Bu çalışmada asma virüslerinin teşhisinde DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri kullanılmıştır. Analiz sonuçlarına göre, testlenen örneklerde DAS-ELISA testleri ve RT-PCR sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, sonuçların birbirleri ile paralel olduğu görülmektedir. Bu çalışmada da Buzkan ve Walker (2001)'in bildirdiği gibi, viral RNA'yı elde etmede kullanılan silika yöntemi etkili bulunmuş, virüsün bitki dokusunda düşük konsantrasyonda olması ve düzensiz dağılmasına rağmen yüksek kalitede RNA elde edilmiştir.

PCR çalışmalarında, GFLV Rowhani et al. (1993), Buzkan ve Walker (2001), GLRV-3 Turturo et al. (2005), GLRV-1 ve 2 Martin et al. (2005), GFkV Matus et al. (2008) ve GLRV-4 Maliogka et al. (2008)'un önerdiği primerler, PCR yöntemleri kullanılarak uygulanmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Asma örneklerine uygulanan bazı PCR testlerinin jel görüntüleme cihazında çekilmiş fotoğrafları Sekil 3' de verilmiştir.

Çizelge 3. Virüs tanılama yöntemlerinin karşılaştırmalı sonuçları

No	Örnek No.	RT-PCR	DAS-ELISA	Simptomatoloji
1	Kemalpaşa 1	+ (GFLV)	+	+
2	Kemalpaşa 2	+ (GFLV+GFkV) (SLRSV)	+	+
3	Kemalpaşa 3	+ (GLRaV 1,2,3)	+	+
4	Kemalpaşa 4	+ (GLRaV-3)	+	+
5	Kemalpaşa 5	-	-	X
6	Menderes 1	+ (GFLV)	+	+
7	Menderes 2	- (ArMV)	+ (ArMV)	-
8	Menderes 3	-	-	X
9	Menderes 4	+ (GLRaV 4-9)	+	+
10	Menderes 5	+ (GLRaV-3)	+	+
11	Menemen 1	-	-	X
12	Menemen 2	+ (GFLV)	+	+
13	Menemen 3	+ (GFkV)	+	+
14	Menemen 4	+ (GLRaV-2)	+	+
15	Menemen 5	+ (GLRaV-3)	+	+
16	Urla 1	- (ArMV)	+ (ArMV)	-
17	Urla 2	-	-	+
18	Urla 3	+ (GLRaV 1,2)	+	+
19	Urla 4	+ (GLRaV 2,3)	+	+
20	Urla 5	+ (GLRaV-3)	+	+
21	Ahmetli 1	+ (GFLV)	+	+
22	Ahmetli 2	-	-	X
23	Ahmetli 3	+ (GFLV)	+	+
24	Ahmetli 4	+ (GLRaV-3)	+	+
25	Ahmetli 5	-	-	X
26	Alaşehir 1	+ (GFLV)	+	+
27	Alaşehir 2	-	-	X
28	Alaşehir 3	+ (GLRaV-3)	+	+
29	Alaşehir 4	+ (GLRaV-1)	+	+
30	Alaşehir 5	+ (GLRaV 4-9)	+	+
31	Salihli 1	+ (GFLV)	+	+
32	Salihli 2	-	-	X
33	Salihli 3	+ (GFLV)	+	+
34	Salihli 4	+ (GLRaV-3)	+	+
35	Salihli 5	+ (GLRaV-3)	+	+
36	Sarıgöl 1	+ (GFLV)	+	+
37	Sarıgöl 2	-	-	X
38	Sarıgöl 3	+ (GLRaV-3)	+	+
39	Sarıgöl 4	+ (GLRaV-3)	+	+
40	Sarıgöl 5	-	-	X
41	Turgutlu 1	+ (GFLV)	+	+
42	Turgutlu 2	-	-	X
43	Turgutlu 3	+ (GFLV+GFkV)	+	+
44	Turgutlu 4	+ (GFLV+GFkV)	+	+
45	Turgutlu 5	-	-	X
Viral Etmenleri Saptama Oranları		45/45 (%100.00)	43/45 (%95.55)	32/45 (%71.11)

+: Viral enfeksiyon tespit edilen örnek; X: Belirti göstermesine karşın viral etmen saptanmayan örnek



Şekil 3. Asma örneklerine uygulanan bazı PCR testlerinin jel görüntüleme cihazında çekilmiş fotoğrafları (A) GLRaV-3 için uygulanmış RT-PCR testi sonucunun jel görüntüsü (546 bp) (B) GFLV için uygulanmış RT-PCR testi sonucunun jel görüntüsü (321bp) (C) GFkV uygulanmış RT-PCR testi sonucunun jel görüntüsü (262bp) (D) GLRaV-1 uygulanmış RT-PCR testi sonucunun jel görüntüsü (401bp) (E) GLRaV-2 uygulanmış RT-PCR testi sonucunun jel görüntüsü (332bp) (F) GLRaV-4 uygulanmış RT-PCR testi sonucunun jel görüntüsü (204bp).

DAS-ELISA testleri, ilkbaharda asmaların virüs belirtili genç yapraklarından ve sürgünlerin floem kazıntılarında, sonbahar da ise virüs belirtili orta ve alt yapraklardan ve sürgünlerin floem kazıntılarında örnek hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Testlemelerde yaprak ve floem kazıntısından elde edilen sonuçlar arasında farklılık belirlenmiştir. DAS-ELISA testlerinde aynı örnek için yapraktan örnek hazırlandığında floem kazıntısına göre daha düşük absorbans elde edilmiştir. Buna göre benzer şekilde Buzkan ve Walker (2001), Akbaş ve ark. (2007), ELISA yönteminde floem kazıntılarının kullanılmasını önermektedir. Floem kazıntıları kullanılarak yapılan testlemelerde, absorbans değerlerinin yüksek çıkması bu virüslerin floemde bulunmasından (phloem-limited) dolayı olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada da Walter and Ettiene (1987), mayıstan ekime kadar sürgünün uç, orta ve dip kısmından alınan yapraklardan yapılan ELISA testinde de sonuçlar arasında önemli bir farklılık olmadığını bildirmiştir. Bir başka çalışmada da Pekekti ve ark. (2001) GLRV-1 ve GLRV-3'ün fenolojik dönem ve organlara göre dağılımını ELISA testiyle saptamaya yönelik yaptıkları çalışmada en uygun dönem ağustos, eylül ve ekim ayları olarak belirlemiştir. En uygun organlar ise kök, yaşlı/genç yaprak, koruk, olgun meyve ve kabuk dokusu olarak saptanmıştır.

Sonuç olarak, farklı asma örneklerinin deneme sonuçları baz alınarak yapılan karşılaştırmalarda DAS-ELISA yöntemi ile RT-PCR yöntemi sonuçları paralellik göstermiştir. Tanılama yöntemleri arasında denemelerde DAS-ELISA yöntemi ile belirlenen pozitif örneklerin tamamı RT-PCR ile doğrulanarak asma virüslerinin saptanmasında %100 oranında bir başarı sağlamıştır.

KAYNAKLAR

- Anonim 2010. <http://www.tuik.gov.tr>. (Erişim Tarihi: 01 Temmuz 2012)
- Anonymous 2011. <http://www.wine.wsu.edu>. (Erişim Tarihi: 05 Haziran 2015)
- Acheche H., Fattouch S., M'hirsi S., Marzouki N. and Marrakchi M. 1999. Use of optimised PCR methods for the detection of GLRAV 3: A Closterovirus associated with Grapevine Leafroll in Tunisian grapevine plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17:31-42.
- Akbaş B. and Erdiller G. 1993. Researches on grapevine virus diseases and determination of their incidences in Ankara. *The Journal of Turkish Phytopathology*, 22(2-3): 55-64.
- Akbaş B., Kunter B. and İlhan D. 2007. Occurence and distribution of Grapevine Leafroll Associated Viruses 1,2,3, and 7 in Turkey. *J. Phytopathol.* 155:122-124.
- Alkowni R., Rowhani A., Daubert S. and Golino D. 2004. Partial characterization of a new Ampelovirus associated with Grapevine Leafroll Disease. *J. Plant Pathology*. 86, 123-133.
- Azeri T. 1983. Ülkemiz bağcılığında virus sorunu ve virüssüz bağ üretim programı. *Bornova Zir. Müc. Araş. Enst. Müdürlüğü, Yıllık*, 1(1) : 61-69.
- Azeri T. ve Çiçek Y. 1995. İntroduksiyon ve klon seleksiyonuyla elde edilmiş bazı bağ çeşitleri ve anaçlarındaki virus ve virus benzeri hastalıkların saptanmasına yönelik araştırmalar. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, Bildiriler, s.374-377, Adana.
- Bora T. ve Karaca İ. 1970. Kültür bitkilerinde hastalığın ve zararın ölçülmesi. E.Ü. Ziraat Fakültesi Yardımcı Ders Kitabı, Yayın No:167, pp:43
- Boscia D., Minafra A. and Martelli G.P. 1997. Filamentous viruses of woody plants, ED: Monette, 19-28.
- Bovey R. 1965. Identification of viruses in clonally propagated plants having one or more viruses. *Proc. Conf. on Virus And Vector on Perennial Hosts with Special Reference to Vitis*, 223-227.
- Bovey R. and Martelli G.P. 1992. Directory of major viruses and virus -like diseases of grapevines. Description, historical rewiev and bibliography. *Icvg*, Pp:111.
- Buzkan N. ve Walker M.A. 2001. İnfekteli asmalarda Asma Kısa Boğum Virüsünün (GFLV) güvenilir teşhisi için RNA ekstraksiyon yöntemlerinin kıyaslanması, Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi, 3-8 Eylül 2001, Tekirdağ, 496-505.

- Buzkan N., Karadağ S., Öztekin V., Kaya A., Minafra A. and Ben-Dov Y. 2010. First report of the occurrence of Grapevine Leafroll Associated Virus-5 in Turkish vineyards. *J. Phytopathol.* 158: 448-449.
- Çağlayan K. ve Gazel M.H. 1998. Asma virüslerinin saptanmasında F (Ab') 2 Antibadi fragmentlerinin kullanımı. Türkiye VIII. Fitopatoloji Kongresi, 21-25 Eylül, Ankara. 158-161
- Candresse T., Lanneau T., Revers F., Grasseau N., Macquaire G., German S., Malinowsky T. and Dunez J. 1995. An immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of Apple Chlorotic Leafspotvirus. *Acta Horticulturae*, 386: 136-147.
- Clark M.F. and Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34, 475-483.
- Digiario M., Martelli G.P. and Savino V. 2000. Phloem-limited viruses of the grapevine in the Mediterranean and Near East. *Extended Abstracts 13 TH ICGV, Adelaide*, 75-76.
- Dovas C.I. and Katis N.I. 2003. A spot multiplex nested RT-PCR for the simultaneous and generic detection of viruses involved in the aetiology of Grapevine Leafroll and Rugose Wood of Grapevine. *Journal of Virological*, 109, 217-226.
- Engel E.A., Escobar P., Montt C., Gomez-Talquenca S. and Valenzuela P.D.T. 2008. First report on the occurrence of Grapevine Leafroll-Associated Virus 7 and 9 in Chilean grapevines. *Plant Dis.*, 92, 1252.
- Engelbrecht D.J. 1980. Application of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay procedure to the detection of Grapevine Fanleaf Virus. *S. Afr. J. Enol. Viticult.* 1, 103-106.
- Erdiller G. 1982. Kısaboğum hastalığı etmeni (Grapevine Fan Leaf Virus Hewitt)'nin morfolojik, serolojik özellikleri ve standart ırklarla karşılaştırılması üzerinde araştırmalar. *Ankara Üniv. Zir. Fak. Yayınları*: 834, pp 58.
- Erkan S., Gümüş M., Yorgancı Ü. ve Yoltaş T. 1994. Sanayi domatesi tohum örneklerinde Domates Mozaik Virüsü ve Bakteriyel Kanser etmenlerinin bulunma durumunun saptanması üzerinde araştırmalar. *Sanayi Domatesi Üretimini Geliştirme Projesi Çalışma Raporu*. İzmir. pp: 47.
- Erkan S. 1998. Tohum patolojisi. E. Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Bornova, İzmir. Gözdem Ofis, 275 S.
- Faggioli F., Ferretti L., Pasquini G. and Barba M. 2002. Detection of Strawberry Latent Ring Spot Virus in leaves of olive trees in Italy using a one-step RT-PCR. *Journal of Phytopathology*, 150: 636-639.
- Foissac X., Svanella-Dumas L., Gentil P., Dulucq M.J. and Candresse T. 2000. Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Capillo and Fovea viruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (Pdo RT-PCR). 18TH International Symposium Virus and Viruslike Diseases of Fruit Trees, July 9-15 2000, Canterbury, 48.

- Gonsalves D. 1979. Detection of Tomato Ringspot Virus in grapevines: A comparison of *Chenopodium quino* and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Plant Disease Rep., 63:962-965.
- Griesbach J.A. 1995. Detection of Tomato Ringspot Virus by polymerase chain reaction. Plant Disease, 79:1054-1056.
- Gugerli P., Brugger J.J. and Nad Bovey R. 1984. L'enroulement de la Vigne; Mise en evidence de particules virales et development D'une methode immuno-enzymatique pour le diagnostic rapide. Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic., Vol. 16(5): 299-304.
- Gürsoy Y.Z. 1991. Asma Yaprak Kıvrılma Virüsü (*Grapevine Leafroll Virus* Tip I ve III)'nun bazı üzüm çeşitlerinde ELISA ile saptanması. VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 7-11 Ekim 1991, İzmir, 397-400.
- Gürsoy Y.Z., Yorgancı Ü. ve Erkan S. 1988. Horozköy ve çevresindeki bağlarda görülen virüs hastalıkları üzerinde ön çalışmalar. III. Bağcılık ve Şarapçılık Sempozyumu, Bildiri Özetleri, 1988, Bursa.
- Habili N., Krake L.R., Barlas M. and Rezaian M.A. 1992. Evaluation of biological indexing dsRNA analysis in grapevine virus elimination. Annals Applied Biology, 121, 277-281.
- Hewitt W.B. and Gifford E.M. 1956. Symptoms for identifying Fanleaf in dormant grapevines. The Bulletin Department of Agriculture State of California, Vol Xlv, Number 3.
- Kepsutlu İ., Özekmekçi E., Özek B. ve Uğur A. 1962. Ege bağcılığında Bulaşık Soysuzlaşma (Kısaboğum) üzerinde çalışmalar. Tarım Bakanlığı Mesleki Kitaplar Serisi, D/35.
- Köklü G. 1999. Trakya Bölgesi bağlarında Asma Yaprak Kıvrılma hastalığının karakterizasyonu ve surveyi. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 142s.
- Köklü G. and Baloğlu S. 2000. Determination of incidence of Grapevine Leafroll Associated Viruses in some grapevine varieties grown in Thrace Region. The Journal of Turkish Phytopathology, 29(2-3), 85-94.
- Le Gall O., Candresse T. and Dunez J. 1995. Transfer of the 31 non-translated region of *Grapevine Chrome Mosaic Virus* RNA-1 by recombination to *Tomato Black Ring Virus* RNA-2 in pseudorecombinant isolates. Journal of General Virology, 76, 1285-1289.
- MacKenzie D.J., McLean M.A., Mukerji S. and Green M. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Plant Disease, 81:222-226.
- Maliogka V.I., Dovas C.I. and Katis N.I. 2008. Generic and species-specific detection of viruses belonging to an evolutionary distinct lineage within the Ampelovirus genus. Journal of Virological Methods, 154, 41-47.
- Martin R.R., Eastwell K.C., Wagner A., Lamprecht S. and Tzanetakis I. E. 2005. Survey for viruses of grapevine in Oregon and Washington. Plant Disease, Vol:89(7),763-766.

- Matus J.T., Vega A., Loyola R., Serrano C., Cabrera S. and Arce-Johnson P. 2008. Phytoplasma and virus detection in commercial plantings of *Vitis vinifera* cv. Merlot exhibiting premature berry dehydration. *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol:11, No.5
- Ochoa-Corona F.M., Lebas B.S., Tang J.Z., Bootten T.J., Stewart F.J., Harris R., Elliott D.R. and Alexander B.J.R. 2006. RT-PCR detection and strain typing of *Raspberry ringspot virus*. Proceedings of the XXth International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops & XIth International Symposium on Small Fruit Virus Diseases, Antalya, Turkey.
- Özaslan M. and Yılmaz M.A. 1994. Virus diseases of grapevine in Southeastern Anatolian Region in Türkiye. 9th. Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Kuşadası-Aydın, Türkiye, pp.425-427.
- Pekekti A., Çağlayan K. ve Gazel M. 2000. Hatay ilinde Asma Yaprak Kıvrılma Virüsünün (GLRV-1+GLRV-3) mevsimsel ve organlara göre dağılımının ELISA yöntemiyle belirlenmesi. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi, Tekirdağ, 563-571.
- Ramsdell D.C., Andrews R.W., Gillet J.W. and Morris C.E. 1979. A comparison between Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and *Chenopodium quinoa* for detection of *Peach Rosette Mosaic Virus* in "Concord" grapevines. *Plant Disease Rep.*, 63. 74-78.
- Rowhani A. 1992. Use of F(AB')² antibody fragment in ELISA for detection of grapevine viruses. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 38-40.
- Rowhani A., Chay C., Golino D.A. and Folk B.W. 1993. Development of a Polymerase Chain Reaction technique for the detection of Grapevine Fanleaf Virus in grapevine tissue. *Phytopathology*, 83(7), 749-753.
- Rowhani A., Biardi L., Jonson R., Saldarelli P., Zhang Y.P., Chin J. and Gren M. 2000. Simplified sample preparation method and one tube RT-PCR for grapevine viruses. Extended Abstracts 13TH Meeting of ICVG, Adelaide, Australia. P 148.
- Shanmugathan N. and Fletcher G. 1982. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to detect Fanleaf Virus in grapevines grown in containers. *Plant Disease*, 66, 704-707.
- Tekinel N., Dolar M. S., Nas Z., Bilgin N., Salih H. ve Salcan Y. 1972. Akdeniz Bölgesi bağlarında Bulaşık Soysuzlaşma (Fanleaf)'nın araştırılması. *Bitki Koruma Bülteni*, 11: (4) 225-246.
- Turturo C., Pasquale S., Dong Y., Michele D., Angelantonio M., Vito S. and Martelli G.P. 2005. Genetic variability and population structure of Grapevine Leafroll-Associated Virus 3 isolates. *Journal of General Virology*, 86, 217-224.
- Yılmaz M.A., Yurtmen M.İ., Çiğsar İ. and Özaslan M. 1997. A Survey of grapevine viruses in Turkey. 12th Meeting of the ICVG. Extended Abstracts, Lisbon, Portugal, 113.