

Detection of Viruses in Aegean Region Grapevines

Aydan Kaya*

Serpil Erilmez*

*Bornova Ziraî M¼cadele Araştırma İstasyonu, İzmir/ TÜRKİYE, aydankaya@yahoo.com

Accepted for publication October 8, 2014

ABSTRACT

This study was conducted to determine virus diseases on grapes in İzmir and Manisa provinces in 2007-2010 using serological and molecular methods. In addition to this, detection and identification of grapevine viruses on samples from Çanakkale and Denizli in 2009-2010 were performed.

To identify of viruses in grapevine production areas in the four provinces, the samples were collected from plants showing virus symptoms. Sampling was done 2 times a year in the spring and in the autumn. In the spring, shoot and leaf samples were taken from annual shoots of plants with virus like symptoms (yellow mosaic, vein clearing, ringspot, vein banding, fasciations, zigzag growth, shortening of internodes, abnormal branching). In the autumn, reddish and rolling downwards leaf samples from annual shoots were collected. Totally 746 samples were taken from plants with virus like symptoms in surveyed area in 2007-2010.

Identification of viruses was performed using serological and molecular methods. DAS-ELISA test results showed that the plants were infected with GFLV, GFkV, ArMV, GLRaV 1, 2, 3 and 4-9 viruses. PCR analysis confirmed DAS-ELISA results. In PCR tests, bands for GFLV, GFkV, ArMV, GLRaV 1, 2, 3 and 4 were obtained.

Keywords: Grapevine, grapevine viruses, survey, ELISA, PCR

Ege Bölgesi Bağlarında Virüs Hastalıklarının Belirlenmesi

ÖZET

Bu çalışma 2007 ve 2010 yıllarında İzmir ve Manisa illerinde bağ alanlardaki virüs hastalıklarını serolojik ve moleküler yöntemlerle belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Ayrıca 2009 ve 2010 yıllarında Çanakkale ve Denizli illerinden gelen sorunlar nedeniyle bu illerden de örnek alınarak virüs tanıları yapılmıştır.

Çalışma alanını kapsayan 4 ilde bağlarda bulunan virüsleri tanılamak için virüs belirtisi gösteren bitkileri toplamak amacıyla güdümlü örnekleme yapılmıştır. 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 örnekler toplanmıştır. 2007 ve 2010 yıllarında survey alanında virüs belirtisi gösteren asma bitkilerinden toplam 746 örnek alınmıştır.

Hastalık etmenlerinin tanınması serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak yapılmıştır. DAS-ELISA testi sonucu asma bitkilerinde GFLV, GFkV, ArMV, GLRaV 1, 2, 3 ve 4-9 enfeksiyonu olduğu saptanmıştır. PCR

analiz sonuçları, DAS-ELISA sonuçları ile paralel olmuş ve birbirini doğrulamıştır. PCR çalışmalarında, GFLV, GFkV, GLRaV 1,2,3 ve 4'e ait bantlar elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Asma, asma virüsleri, survey, ELISA, PCR.

GİRİŞ

Dünyada bağcılık için en elverişli iklim kuşağında yer alan ülkemiz çok eski ve köklü bir bağcılık kültürüne sahiptir. Arkeolojik bulgulara göre, asma türünün ilk olarak Kafkasya ve Anadolu'da kültüre alındığı ve zamanla buradan dünyanın hemen her yerine dağıldığı kabul edilmektedir.

Ülkemiz istatistiklere göre, dünya ülkeleri arasında, bağ alanı yönünden İspanya, Fransa ve İtalya'dan sonra 4.sırada (540.000 ha), yaş üzüm üretimi yönünden ise 5. (3.923.040 ton) sıradadır. Ülkemiz bölgeleri arasında ise; gerek alan (1.416.747da), gerekse üretim (1.517.968ton) açısından ilk sırayı Ege Bölgesi almaktadır (% 29). Türkiye bağcılığı iller bazında değerlendirildiğinde ise, hem alan (563.496 da) hem de üzüm üretimi (1.080.043 ton) yönünden % 51 oranı ile Manisa ilk sırada yer almaktadır. Bunu %33 ile Denizli ve %10 ile İzmir takip etmektedir (TÜİK, 2010).

Ülkemizde üretilen 3.923.040 ton yaş üzümün yaklaşık %25'i sofralık olarak tüketilirken, %17,5'i çekirdeksiz kuru üzüm ve %15'i çekirdekli kuru üzüm olarak değerlendirilmektedir. Türkiye üzüm ihracatı ile ülke ekonomisi için önemli bir gelir kaynağını oluşturmaktadır.

Asma bitkisi verim ve kaliteyi olumsuz etkileyen çok sayıda virüs ve virüs benzeri etmenlere konukçuluk etmektedir. Dünyada asmalarda 60'a yakın virüs hastalığı kayıtlıdır. Asma virüs hastalıklarının bitki ve ürün üzerindeki etkisi virüsün ırkına, şiddetine ve çevresel koşullara göre değişkenlik gösterir. Hafif ırklar zararlı etkiye sebep olmazlar. Ancak şiddetli ırklar, asmanın zayıflamasına, ölümüne, üründe verim ve kalite kaybına (% 60-80), üretim materyali alımında azalmaya ve pazar değerinin düşmesine neden olurlar. 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 associated 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.

Bu çalışma ile 2007-2010 yıllarında Ege bölgesi bağ alanlarının % 60'ını oluşturan Manisa, İzmir, Çanakkale ve Denizli illeri bağ alanlarından virüs belirtisi gösteren asma örnekleri toplanarak, serolojik ve moleküler yöntemlerle incelenmiş, bu hastalıklar açısından son durumu ortaya konmuştur.

MATERYAL VE METOT

MATERYAL

Çalışmanın ana materyalini, Manisa, İzmir, Çanakkale ve Denizli illerinde bağlarda virüs belirtileri gösteren asma bitkileri, asma virüslerinin tanısında kullanılan ELISA kitleri, primerler ve moleküler analiz için gerekli olan kimyasal maddeleri oluşturmuştur.

METOT

Survey :

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). Tarım il müdürlüklerinden alınan ekiliş alanları, ekolojik faktörler, işgücü ve zaman faktörleri de göz önüne alınarak 2007–2010 yıllarında kontroller yapılmıştır. Örnekleme sırasında ekolojik faktörlerden dolayı farklı virüsleri belirleyebilmek amacıyla birbirinden uzak ve değişik yönlere yerleşim birimleri kontrol edilmiştir.

Surveyler sırasında 4 ile bağlı, 13 ilçe sınırları içerisinde bulunan toplam 189 bağ alanında gözlemler yapılarak yaprak ve sürgün örnekleri alınmıştır.

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 bir yıllık sürgünlerinden yaprak ve sürgün örnekleri toplanmıştır. Sonbahar döneminde ise yine bir 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.

Survey alanında, Manisa ili ve ilçelerinde Yuvarlak çekirdeksiz, İzmir ili Menemen ilçesinde Yuvarlak çekirdeksiz, Kemalpaşa ilçesinde Yuvarlak çekirdeksiz ve şaraplık çeşitler, Urla ilçesinde şaraplık çeşitler (Boğazkere, Öküzgözü, Syrah, Cabernet Sauvignon, Merlot, Bornova Misketi), Menderes ilçesi Oğlananası beldesinde şaraplık çeşitler (Merlot, Syrah, Colombar, Öküzgözü), Efem Çukuru beldesinde ise sofralık çeşitlerden (Alphonse Lavallee) örnek alınmıştır. Çanakkale ili Merkez ilçesinden şaraplık çeşitlerden, Denizli ili Çal ilçesinden Çal karası, Yuvarlak çekirdeksiz, Boğazkere, Öküzgözü, Kınıklı ve Sarayköy ilçelerinden ise Yuvarlak çekirdeksiz çeşitlerinden örnek alınmıştır.

Serolojik Yöntemler (DAS-ELISA)

Survey çalışmaları sonucunda ilkbaharda ve sonbaharda asma bitkilerinden alınan yaprak ve sürgünlerdeki virüsleri tespit etmek için DAS- ELISA testi 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 associated closterovirus* 1,2,3,4-9,6,7 (GLRaV 1,2,3,4-9,6,7) tanı kitleri ile BIORBA firmasının prosedürlerine göre DAS-ELISA testleri gerçekleştirilmiştir. GLRaV-5 için ADGEN firmasının önerdiği prosedüre göre DAS-ELISA testleri yapılmıştır.

Bağlarda, ilkbaharda asmaların virüs belirtisi gösteren genç yapraklarından ve sürgünlerin floem kazıntılarında, sonbaharda ise belirti gösteren 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 absorbans değerleri enfekteli olarak değerlendirilmiştir (Erkan ve ark.,1994).

Moleküler Yöntemler

Total Nükleik Asit (TNA) Ekstraksiyonu

TNA ekstraksiyonunda kullanılan tüm malzemeler yapısına uygun olarak ekstrakte edilmiştir. Her izolat için yaklaşık 100 mg yaprak kullanılarak, 1 ml %1 mercapto-ethanol içeren ekstraksiyon tampon çözeltisi varlığında steril örnek poşetleri içinde ezilmiştir. Tüpler ısıtıcıda 70 °C 10 dakika bekletildikten 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 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. Tüpler 70 °C ' de 4 dakika inkube edilen tüpler 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün üst kısmında kalan sıvıdan 100µl alınarak yeni tüplere aktarılmış ve TNA ekstraksiyonu tamamlanmıştır. Örnekler cDNA sentez ve PCR uygulamaları yapıncaya kadar -80°C'de derin dondurucuda saklanmıştır (Foissac et al., 2000).

Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

TNA ekstraksiyonu yapılmış olan örneklerden komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Fermentas firmasından temin edilen cDNA sentez kiti firmanın belirttiği prosedür doğrultusunda kullanılmıştır. Çalışmada ilk olarak ependorf tüplerinin içerisine 2 µl TNA, 1 µl Oligo(dt) primer konulmuş ve RNase free su ile 12µl'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 inhibitörü, 2 µl 10mM dNTP, 1 µl M-MuLV reverse transcriptase eklenerek toplam 20 µl hacme ulaşılmıştır.

Kısa süreli santrifüj uygulandıktan sonra 42 °C'de 60 dakika ve 70 °C'de 5 dakika inkubasyon uygulanarak cDNA sentez aşaması tamamlanmıştır.

PCR Yöntemi

PCR çalışmalarında, GFLV, GFkV, GLRaV-1, 2, 3,4 ve 9 için kullanılan primerler Çizelge 1'de verilmiştir. PCR işlemi Fermentas firmasının önerdiği prosedüre göre 50 µl hacimde yapılmıştır. Steril PCR tüplerine 25 µl 2x PCR master mix, 1 µl primer1, 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. Tüm işlemler boyunca eldiven kullanılmış ve herhangi bir kontaminasyon olasılığını belirlemek için de nükleik asit eklemekten sadece karışımın yer aldığı bir tüpte (su kontrol) PCR programında örneklerle birlikte çoğaltma işlemine tabi tutulmuştur.

Çizelge 1. Moleküler yöntemle testlenen asma virüsleri, primerleri ve PCR programları

Hedef Virüs/Primer	Primer Dizilimi	Baz Uzunluğu	Referans
GFLV-V1-F GFLV-C1-R	ACC GGA TTG ACG TGG GTG AT CCA AAG TTG GTT TCC CAA GA	321 bp	Rowhani et al.,1993
GfKv-F GfKv-R	TTCCTCTTCATGAACATGACCGTGG ACAACACAATCCAGAAGGATAC	262 bp	Matus et al.,2008
GLRaV1-F GLRaV1-R	CGA CCC CTT TAT TGT TTG AGT ATG GTT ACG GCC CTT TGT TTA TTA TGG	401 bp	Martin et al.,2005
GLRaV 2-F GLRaV 2-R	ATA ATT CGG CGT ACA TCC CCA CTT GCC CTC CGC GCA ACT AAT GAC AG	332 bp	Martin et al.,2005
GLRaV3-F GLRaV3-R	CGC TAG GGC TGT GGA AGT ATT GTT GTC CCG GGT ACC AGA TAT	546 bp	Turturo et al.,2005
GLRaV4up GLRaV4do	CCAACACTGTCGTGGGTATAAGGAAT CCCAGACACCGGTCTACTACTIA	243 bp	Maliogka et al.,2008
GLRaV9-F GLRaV9-R	CGGCATAAGAAAAGATGGCAC TCATTCACCACTGCTTTGAAC	393 bp	Alkowni et al.,2004

Agaroz Jel Elektroferez Yöntemi

100 ml 1X TAE tamponu içine 1,5 g agaroz konularak mikrodalga fırında 3.5 dakika tutulmuş ve eritilmiştir.

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

Elektroferez işleminden sonra etidium bromide ile boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Etidium boyamadan sonra jel görüntüleme cihazı ile görüntülenmiş ve fotoğrafı çekilmiştir.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Survey Çalışmalarına İlişkin Bulgular

2007 ve 2010 yılları arasında gerçekleştirilen survey çalışmalarında, Manisa, İzmir, Denizli ve Çanakkale illerinden 13 ilçe ve 189 bağda kontroller yapılmış ve 746 omcadan örnek alınmıştır. Surveyler sırasında kontrol edilen il ve ilçeler, bağ sayıları ve alınan örnek miktarları Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Bağ Alanlarındaki Asmalarda Görülen Belirtiler

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, zig zag 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).

Çizelge 2. 2007-2010 yıllarında Manisa, İzmir, Denizli ve Çanakkale illerindeki bağlarda örnekleme yerleri ve alınan örnek sayıları

İl	İlçe	Örneklenen bağ sayısı	Alınan örnek sayısı	
			İlkbahar	Sonbahar
MANİSA	Ahmetli	10	13	10
	Alaşehir	35	97	72
	Salihli	20	18	16
	Sarıgöl	29	37	28
	Turgutlu	15	20	16
Toplam		109	185	142
İZMİR	Kemalpaşa	20	51	50
	Menderes	10	49	73
	Menemen	20	29	24
	Urla	7	25	26
Toplam		57	154	173
DENİZLİ	Çal	5	5	5
	Kınıklı	2	4	6
	Sarayköy	7	10	15
Toplam		14	19	26
ÇANAKKALE	Merkez	9	22	25
Genel Toplam		189	746	



Şekil 1. GFLV ile enfekteli asma yapraklarında sarı lekelenme ve sararma, sürgünlerinde boğum aralarında kısalma ve çatallanma



Şekil 2. GLRaV ile enfekteli asma yapraklarında kızarma ve içe doğru kıvrılma (kırmızı çeşit), sararma ve içe doğru kıvrılma (beyaz çeşit)

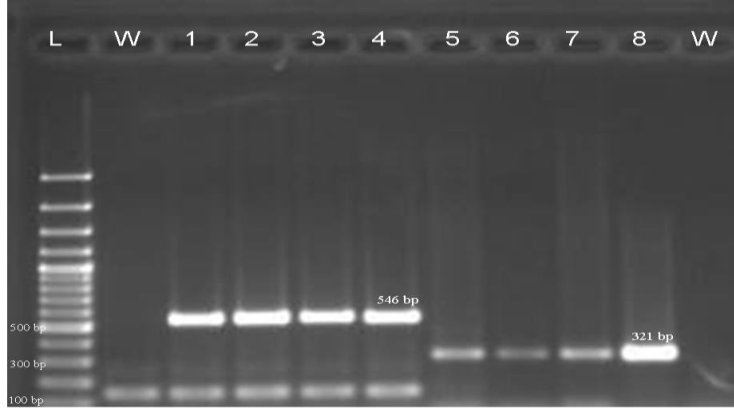
Çizelge 4. 2007-2010 yıllarında İzmir ili ve ilçelerinden alınan örnek sayıları ve DAS-ELISA testi sonucu asma örneklerinde saptanan virüslerin dağılımı

İl	İlçe	İlkbahar												Sonbahar														
		Toplam	Virüslü örnek sayısı											Virüs saptanmayan örnek sayısı	Toplam	Virüslü örnek sayısı									Virüs saptanmayan örnek sayısı			
			GFLV	ToRSV	ArMV	IBRV	SLRSV	RpRSV	GFkV	TRSV	GVA	CLRV	GFLV+GFkV			GFLV+ArMV	GLRaV1	GLRaV2	GLRaV3	GLRaV4-9	GLRaV5	GLRaV6	GLRaV7	1+3		2+3	1+2+3	
İZMİR	Kemalpaşa	51	15	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	4	-	30	50	2	2	19	-	-	-	-	1	1	-	25
	Menderes	49	12	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	26	73	5	6	34	5	-	-	-	-	9	4	10
	Menemen	29	11	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	16	24	-	2	10	-	-	-	-	-	-	-	12
	Urla	25	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21	26	1	1	11	-	-	-	-	3	4	-	6
Genel Toplam		154	38	-	12	-	-	-	3	-	-	-	8	-	93	173	8	11	74	5	-	-	-	4	14	4	53	

Çizelge 3, 4, 5 incelendiğinde, 2007-2010 yıllarında, Manisa ilinde, virüs şüpheli asma bitkilerinden ilkbahar döneminde alınan 185 örneğin, % 46'sı GFLV, % 2.16'sı ArMV, % 3.78'i GFkV ile enfekteli bulunmuştur. Ayrıca örneklerin % 6'sında GFLV ve GFkV'nin, % 3.80'inde GFLV ve ArMV'nin birlikte bulunduğu karışık enfeksiyonlar saptanmıştır. İlkbahar dönemlerinde bağlardan alınan örneklerde test sonuçlarına göre % 46 oranıyla en yaygın virüs olarak GFLV belirlenmiştir. İzmir ilinde ise ilkbahar döneminde alınan 154 örneğin, % 24.67'si GFLV, % 7.79'u ArMV, % 1.94'ü GFkV ile enfekteli bulunmuştur. Ayrıca örneklerin % 5.19'unda GFLV ve GFkV'nin birlikte bulunduğu karışık enfeksiyonlar saptanmıştır. İlkbahar dönemlerinde bağlardan alınan örneklerde test sonuçlarına göre % 24.67 oranıyla en yaygın virüs olarak GFLV belirlenmiştir. Çanakkale ilinden virüs şüpheli asma bitkilerinden ilkbahar döneminde alınan 22 örneğin, % 19'u GFLV, ve % 19'u GFkV ile enfekteli bulunmuştur. İlkbahar dönemlerinde bağlardan alınan örneklerde test sonuçlarına göre yaygın virüsler olarak GFLV ve GFkV belirlenmiştir. Sonbahar dönemlerinde ise % 20 oranı ile GLRV-3 saptanmıştır. Denizli ilinden ise virüs şüpheli asma bitkilerinden ilkbahar döneminde alınan 19 örneğin % 53'ü GFLV ve % 15.8'i GFkV ile enfekteli bulunmuştur. Sonbahar döneminde ise % 11.54' oranında GLRV-3 saptanmıştır. Bölgemizde asma virüsleri ile ilgili yürütülen çalışmalarda; Ege bölgesinde Akdoğan (1958) ve Kepsutlu ve ark.(1962), makroskopik gözlemlerde asmalarda verimsizlik ve durgunluğun bulaşık soysuzlaşma

Moleküler Testlerden Elde Edilen Bulgular

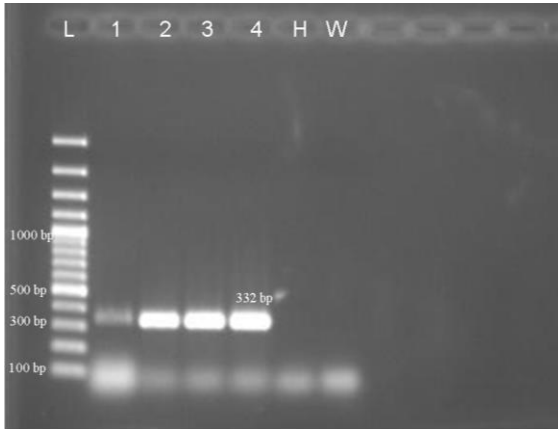
İzmir ve Manisa illerinden toplanan ve DAS-ELISA testi sonucunda GFLV ile enfekteli bulunan asma bitki örneklerinden, PCR çalışmaları sonucunda 321 baz çifti büyüklüğünde DNA bantları elde edilmiştir. GLRaV-3 ile enfekteli asma bitki örneklerinden ise 546 baz çifti büyüklüğünde bantlar görüntülenmiştir (Şekil 3).



L; 100 bp DNA ladder, 1-4; GLRV-3 ile enfekteli örnekler, 5-8; GFLV ile enfekteli örnekler, W; su kontrol

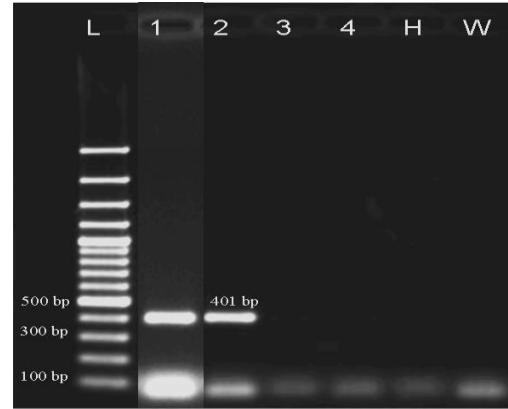
Şekil 3. GLRaV-3 ve GFLV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş fotoğrafı.

PCR çalışmaları sonucunda, GLRaV-2 ile enfekteli asma bitki örneklerinde 332 baz çifti, GLRaV-1 ile enfekteli asma bitki örneklerinden 401 baz çifti büyüklüklerinde DNA bantları elde edilmiştir (Şekil 4,5).



L; 100 bp DNA ladder, 1-4; GLRV-2 enfekteli örnekler, H; sağlıklı kontrol, W; su kontrol

Şekil 4. GLRaV-2 için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş fotoğrafı

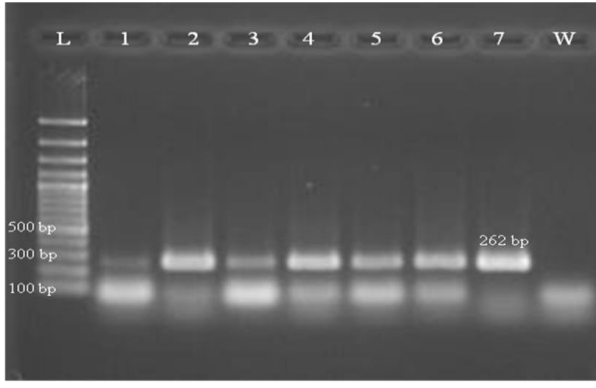


L; 100 bp DNA ladder, 1-4; GLRV-1 ile enfekteli örnek, H; sağlıklı kontrol, W; su kontrol

Şekil 5. GLRaV-1 için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş fotoğrafı

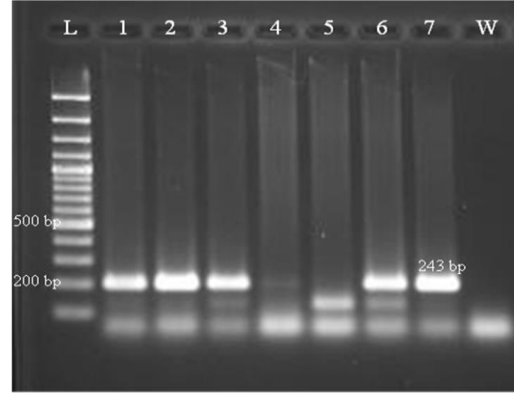
PCR analizleri ile, GFkV ile enfekteli asma bitki örneklerinden 262 baz çifti büyüklüğünde DNA bantları elde edilmiştir (Şekil 6).

DAS-ELISA testinde GLRaV 4-9 antiserumu ile pozitif reaksiyon veren asma bitki örneklerine GLRaV-4 ve GLRaV-9'a ait primerler kullanılarak PCR analizleri yapılmıştır. PCR çalışmaları sonucunda, asma bitki örneklerinde GLRaV-4 için 204 baz çifti büyüklüğünde DNA bantları elde edilmiştir (Şekil 7). GLRaV-9 primerleri ile yapılan PCR analizlerinde ise bant elde edilmemiştir.



L ; 100 bp DNA ladder, 1-7; GFkV enfekteli örnekler, w; su kontrol

Şekil 6. GFkV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş fotoğrafı



L ; 100 bp DNA ladder, 1,2,3,6,7 ;GLRV-4 enfekteli örnekler, w; su kontrol

Şekil 7. GLRaV-4 için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş fotoğrafı

Asma virüslerinin tanımlanmasında 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); GLRaV-3 Turturo et al (2005); GLRaV-1 ve 2 Martin et al (2005); GFkV, Matus et al. (2008) ve GLRaV-4 Maliogka et al. (2008)'un önerdiği primerler kullanılarak RT-PCR yöntemi uygulanmış ve aynı sonuçlar elde edilmiştir.

LİTERATÜR LİSTESİ

- Acheche, H., Fattouch, S., M'hırsı, S., Marzoukı, 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., 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., İlhan, D. 2007. Occurence and Distribution of Grapevine Leafroll Associated Viruses 1,2,3, and 7 in Turkey. *J. Phytopathol.* 155:122-124.
- Akbaş, B., Kunter, B., İlhan, D. 2009. Influence of Leafroll on Local Grapevine Cultivars in Agroecological Conditions of Central Anatolia Region. *Horticultural Science*, 97-104.
- Alknownı, R. Rowhani, A., Daubert, S., 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 Virussuz Bağ Üretim Programı. Bornova Zir. Müc. Araş. Enst. Md.lüğü, Yıllık, 1 (1) : 61-69.
- Azeri, T., Çiçek, Y. 1995. İntrodüksiyon 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., 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.
- Buzkan, N., Walker M.A. (2001). İnfekteli Asmalarda Asma Kısa Boğum Virüsünün (GFLV) Güvenilir Teşhisi İçin 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., Ben-Dov, Y. 2010. First Report of the Occurrence of Grapevine Leafroll Associated Virus-5 in Turkish Vineyards. *J. Phytopathol.* 158: 448-449
- 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.
- Çağlayan, K., Gazel, M. H. 1998. Asma Virüslerinin Saptanmasında F (Ab') 2 Antibadi Fragmentlerinin Kullanımı. *Türkiye VIII. Fitopatoloji Kongresi*, 21-25 Eylül, Ankara. 158-161
- Çiğşar, İ. 2002. Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Nevşehir İllerinde Bağlarda Zararlı Virüs ve Virüs Benzeri Hastalıklarının Biyolojik ve Serolojik Yöntemlerle Saptanması ve İki Nepovirüsün Karakterizasyonu. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. Pp:111.
- Dığıaro, M., Martelli, G.P., 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., 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.
- 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 Irklarla 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.
- Foissac, X., Svanella-Dumas, L., Gentit, P., Dulucq, M.J., Candresse, T., 2001. Polyvalent Detection of Fruit Tree Tricho, Capillo And Foveaviruses 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 Quinoa And Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa). *Plant Disease Rep.* 63, 962-965.
- Güçerli, P. Brugger J.J 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 II)'nin Bazı Üzüm Çeşitlerinde Elisa İle Saptanması. *VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi* 7-11 Ekim 1991, İzmir, 397-400.
- Gürsoy, Y.Z., Yorgancı, Ü., Erkan, S. 1988. Horozköy Ve Çevresindeki Bağlarda Görülen Virüs Hastalıkları Üzerinde Ön Çalışmalar. *III. Bağcılık Ve Şarapçılık Sempozyumu*, Bildiri Özetleri, 1988, Bursa.
- Habılı, N., Krake, L.R., Barlas, M., Rezaian, M.A., (1992). Evaluation of Biological Indexing dsRNA Analysis in Grapevine Virus Elimination. *Annals Applied Biology* 121, 277-281.
- Hewitt, W.B., 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., Baloğlu, S. 2000. Determination Of Incidence Of Grapevine Leafroll Associated Viruses İn Some Grapevine Varieties Grown İn Thrace Region. *The Journal Of Turkish Phytopathology* 29 (2-3), 85-94.
- Maliogka, V.I., Dovas, C.I., Katis, N.I., 2008. Generic And Species-Specific Detection Of Viruses Belonging To An Evolutionary Distint Lineage Within The Ampelovirus Genus. *Journal Of Virological Methods* 154, 41-47.
- Martin, R.R., Eastwell, K.C., Wagner,A., Lamprecht,S., I. E. Tzanetakis, 2005.Survey For Viruses Of Grapevine İn Oregon And Washington. *Plant Disease* Vol:89 No:7,763-766.
- Matus, J.T., Vega,A., Loyola, R., Serrano,C., Cabrera, S. Arce-Johnson P. 2008. Phytoplasma And Virus Detection İn Commercial Plantings Of Vitis Vinifera Cv. Merlot Exhibiting Premature Berry Dehydration. *Electronic Journal Of Biotechnology*, Vol: 11, No.5
- Özaslan, M., Yılmaz, M.A., (1994). Virus Diseases Of Grapevine İn Southeastern Anatolian Region İn Türkiye. 9 *Th. Congress Of The Mediterranean Phytopathological Union*, Kuşadası-Aydın, Türkiye,Pp.425-427.
- Ramsdell, D.C., Andrews, R.W., Gillet, J.W., Morris, C.E., 1979. A Comparison Between Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa) And Chenopodium Quinoa For Detection Of Peach Rosette Mosaic Virus İn ‘‘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., Folk, B.W., 1993. Development Of A Polymerase Chain Reaction Technique For The Detection Of Grapevine Fanleaf Virus İn Grapevine Tissue. *Phytopathology* 83 (7), 749-753.
- Rowhani, Bıardı, L., Jonson, R., Saldarelli, P., Zhang, Y.P., Chin, J. ,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., Fletcher, G., 1982. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay To Detect Fanleaf Virus İn Grapevines Grown İn Containers. *Plant Disease*, 66, 704-707.
- Tekinel, N., Dolar, M. S., Nas, Z., Bilgin, N., Salih, H., 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., Martelli G.P., 2005.Genetic Variability And Population Structure Ofgrapevine Leafroll-Associated Virus 3 Isolates. *Journal Of General Virology*, 86, 217-224.
- TÜİK, 2010. Türkiye İstatistik Kurumu. <http://www.tuik.gov.tr>. (Erişim Tarihi: 01 Temmuz 2012).
- Yılmaz, M.A., Yurtmen, M.İ Çiğsar, İ., Özaslan, M., 1997. A Survey Of Grapevine Viruses İn Turkey. *12 Th Meeting Of The Icvg*. Extended Abstracts, Lisbon, Portugal, 113.