

Yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında odun dokusunda zararlı viral etmenlerin saptanması ve dağılım oranlarının belirlenmesi¹

Nevzat BİRİŞİK² Saadettin BALOĞLU³

SUMMARY

Determination of woody tissue attacking viruses and evaluation of their distribution in pome fruit trees

This study has been carried out on apple, pear and quince fruit crops during 2006-2009 in Adana, Kahramanmaraş, Mersin, Niğde and Osmaniye provinces. The aim of the study was to detect *Apple stem grooving virus* (ASGV) and *Apple stem pitting virus* (ASPV) on pome fruits and evaluation of the distribution of those pathogens according to the pome fruit species and inspected regions. During the survey, 619 samples were collected from 134 orchards and, 18.4% of the samples were founded as ASPV, ASGV or ASPV+ASGV infected by ELISA test. The distribution of the diseases was determined as 10.3% ASPV, 5.5% ASGV and 2.6% ASPV+ASGV. The infection rate of the species were determined as 19.4, 18.3 and 17.4% in pear, apple and in quince, respectively. Results showed that the highest distribution of those pathogens is 23.2% in Adana whereas the lowest distribution was detected in Mersin as 11.4%. The presence of these diseases was confirmed also by molecular and biological means.

Key words: ASPV, ASGV, apple, pear, quince, distribution.

ÖZET

Bu çalışma Adana, Kahramanmaraş, Mersin, Niğde ve Osmaniye illerindeki elma, armut ve ayva alanlarında 2006–2009 yılları arasında yürütülmüştür. Çalışmanın amacı; yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında zararlı *Elma gövde çukurlaşma* (*Apple stem grooving virus*: ASGV) ve *Elma gövde yivleşme* (*Apple stem pitting virus*: ASPV) virüs hastalıklarının saptanması ve bu hastalıkların etmenlere, illere ve türlere göre dağılım oranlarının belirlenmesidir. Sürvey çalışmaları sonucunda 134 bahçeden alınan 619 elma, armut ve ayva örneğinin % 18.4 oranında bu hastalık etmenleri ile enfekteli olduğu ELISA testi ile

¹ Bu çalışma 30.06.2009 tarihinde Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından kabul edilen doktora çalışmasının bir bölümüdür.

² Adana Ziraat Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, 01321 Yüreğir, Adana.

³ Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Balcalı, Adana

Yazar (Corresponding author) e-mail: nevzatbir@yahoo.com

Yazının Yayın Kuruluna Geliş Tarihi (Received): 22.07.2010

belirlenmiştir. Hastalık etmenlerinin dağılım oranı sırasıyla ASPV % 10.3, ASGV % 5.5 ve ASPV+ASGV % 2.6, konukçu türlerin enfeksiyon oranları ise armut % 19.4, elma % 18.3 ve ayva % 17.4 şeklinde tespit edilmiştir. Hastalık etmenlerinin % 23.2 ile Adana ilinde en yoğun, %11.4 ile Mersin ilinde ise en az bulunduğu tespit edilmiştir. Bu hastalık etmenlerinin varlığı moleküler ve biyolojik yöntemlerle de doğrulanmıştır.

Anahtar kelimeler: ASPV, ASGV, elma, armut, ayva, dağılım.

GİRİŞ

Yumuşak çekirdekli meyveler grubuna giren elma, armut ve ayva; dünyada olduğu gibi ülkemizde de aşırı sıcak-soğuk iklim koşullarına sahip olan bölgeler dışında her yerde yetiştirilmektedir. Dünyanın yaklaşık 85.000.000 tonluk yumuşak çekirdekli meyve üretimi içerisinde Türkiye 2.800.000 ton civarındaki üretimi ile 5. sırada yer almaktadır (Anonymous 2009a). Türkiye önemli yumuşak çekirdekli meyve üreticisi ülkelerinden olmakla birlikte, bu meyve grubuna giren elma, armut ve ayvanın anavatanlarından biri olarak da ayrı bir öneme sahiptir (Özbek 1978, Ülkümen 1938). Bu çalışmanın yürütüldüğü Adana, Kahramanmaraş, Mersin, Niğde ve Osmaniye illerindeki yumuşak çekirdekli meyve üretimi ise yıllık 350 ton civarında olup bu miktar ülkesel üretimin % 12'sidir (Anonymous 2009b).

Yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliğinde bugüne kadar 14 tanesi latent olmak üzere toplam 39 virüs hastalığının varlığı tespit edilmiştir (Ogawa and English 1991). Bu hastalık etmenlerinden özellikle konukçuları üzerinde belirti oluşturan *Elma mozaik virüsü* (*Apple mosaic virus: ApMV*) ve *Elma klorotik yaprak leke virüsü* (*Apple chlorotic leaf spot virus: ACLSV*) ile ilgili olarak ülkemizde çok sayıda bilimsel araştırma çalışması yürütülmüştür (Akbaş ve İlhan 2005, Özkan ve Kurçman 1976). Fakat latent olarak kabul edilen *Elma gövde yivleşme* (*Apple stem pitting virus: ASPV*) ve *Elma Gövde Çukurlaşma* (*Apple stem grooving virus: ASGV*) virüs hastalıklarıyla ilgili araştırma çalışmaları oldukça yetersizdir (Birişik ve ark. 2008, Çağlayan ve ark. 2006).

Bu hastalık etmenlerinden ASPV, ssRNA yapısına sahip, Flexiviridae familyasının Foveavirus cinsine ait bir etmendir (Mayo ve Brunt 2006). Etmen ipliksi, 800 nm uzunluğunda ve 12–15 nm genişliğinde beş adet ORF (Open Reading Frame)'e sahip, 9293 nükleotidden meydana gelen tek parçalı bir genoma sahiptir (Khan and Dijkstra 2006, Koganezawa and Yanase 1990). ASPV 1940'lı yıllarda ABD'de Virginia Crab ve Spy 227 üzerinde tespit edilmiştir (Guengerich and Millikan 1959). Sonraki yıllarda *Armut damar sararması* (*Pear vein yellowing: PVY*) hastalığının da ASPV tarafından meydana geldiğini rapor etmiştir (Kegler et al. 1976). ASPV herhangi bir vektör, tohum veya polenle taşınmaz fakat aşı, mekanik inokulasyon ve konukçu bitkilerin kök kaynaşması yoluyla bulaşabilmektedir. Etmenle ilgili yapılan çalışmalar sonucunda ASPV'nin elma ve armut yetiştiriciliği yapılan bütün bölgelerde bulunabileceği kabul edilmektedir (Nemeth 1986). Virüs elma ve armut ağaçlarında geriye ölüm, gövde odun dokusunda yivleşme, damar sararması ve aşı noktasından içeriye doğru çukurların (pit) oluşmasına neden

olmaktadır (Desvignes et al. 1990). Minoiu et al. (1986), ASPV ile enfekteli armut bitkilerinde % 13–70 arasında değişen büyüme geriliği tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Dięer bir odun dokusu hastalık etmeni olan ASGV ise ilk kez Lister et al. (1965) tarafından ABD’de rapor edilmiştir. Flexiviridae Familyasının Capillovirus cinsine bağlı ssRNA yapısına sahip bu etmen 600–700 nm uzunluğunda, 12 nm genişliğinde, toplam 6.5 kb genom büyüklüğünde ve iki adet ORF’ye sahip ipliksi bir virüstür (Hirata et al. 2003, Khan and Dijkstra 2006, Murphy et al. 1995). ASGV polen veya herhangi bir vektör böcekle taşınmamakta, fakat mekanik inokulasyon ve aşı yolu ile taşınmaktadır (Nemeth 1986). Toplam 17 familyada geniş bir konukçu dizisine sahip olan ASGV yaygın olarak bulunan bir virüs hastalığıdır (Inouye et al. 1979). Bu etmen yumuşak çekirdekli meyveler dışında Nickel et al. (2001) tarafından kayısı ve kiraz’da, Osvaldo et al. (2002) tarafından Cleopatra mandarininde ve Clover et al. (2003), tarafından kiwi gibi önemli meyve türlerinde rapor edilmiştir. ASGV elma ve armut ağaçlarında geriye ölüm, gövde odun dokusunda çukurlaşma, yapraklarda damar sararması ve aşı noktasında şişmelere neden olmaktadır (Desvignes et al. 1990, Welsh and Uyemoto 1980). Maxim et al. (2004) ASGV’den dolayı elmalarda ağaç boyunda ortalama % 23,4 kısalma ve gövde çapında % 13,7 daralma olduğunu rapor etmişlerdir.

Bu çalışma 2006 ve 2009 yılları arasında Adana, Kahramanmaraş, Mersin, Niğde ve Osmaniye illerinde ASPV ve ASGV hastalık etmenlerinin elma, armut ve ayva alanlarındaki varlığının ve dağılımının ortaya konması amacıyla yürütülmüştür

MATERYAL VE METOT

Çalışmanın ana materyalini sürvey alanlarından alınan bitki örnekleri, buz kutusu, plastik torbalar vb. ile serolojik teşhis çalışmalarında kullanılan enzyeme-linked immunosorbent assay (ELISA) kitleri oluşturmuştur. Ayrıca Reverse Transkripsiyon- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) çalışmalarında Promega (ABD) firmasından temin edilen RNA izolasyon kiti, DNA Polymerase, M-MLV Reverse Transcriptase enzimi ve dNTP’s setleri ile İontek (İstanbul, Türkiye) firmasından temin edilen primerler, mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan buffer ve indikatör bitkiler çalışmanın diğer materyalini oluşturmuştur.

Sürvey yapılacak alanların belirlenmesi ve örnek alınması: Sürvey çalışmaları Bora ve Karaca (1970) tarafından bildirilen basit tesadüfi usule göre ilkbahar ve sonbaharda yapılmıştır. Alınan örnek sayısı bahçe büyüklüğüne bağlı olarak; 5 da’dan küçük bahçelerden üç, 5–10 da olan bahçelerden dört, 10 da’dan büyük bahçelerden ise altı ila on iki arasında olmuştur. Belirlenen ağaçların her dört yönünden 15–20 cm uzunluğunda bir yıllık sürgünler alınmış ve etiketlenerek buz kutusu içinde laboratuara getirilmiştir.

ELISA testleri: ELISA testinde Bioreba (İsviçre) firmasından temin edilmiş olan ASPV ve ASGV antiserumları kullanılmış, firma önerileri de dikkate alınarak

pleytlar önce antiserum ile kaplanmış ve 30°C'de 5 saat inkubasyona bırakılmıştır. Daha sonra 3 kez 3'er dakika PBS-T (Phosphate Buffer Saline-Tween) ile yıkanan pleytlar bitki ekstraktları ile kaplanmış ve 4°C 'de bir gece inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonra yıkama tekrar edilmiş ve yıkanan pleytlar konjugat solüsyonu ile kaplanarak inkübasyona (5 saat 30°C'de) bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra yıkanan pleytlere, substrat ilave edilerek bir saat sonra test pleytların 405 nm dalga boyundaki Titertek ELISA okuyucusunda okunarak tamamlanmıştır. Örnekler, absorbans değerlerinin negatif kontrol değerlerinin ortalamasının üç katından fazla olması durumunda pozitif kabul edilmiştir (Clark and Adams 1977).

Mekanik inokulasyon: Mekanik inokulasyon çalışmalarında *Chenopodium quinoa*, *C. Amaranticolor*, *Nicotiana occidentalis*, *N. occidentalis* cv. P1, *N. benthamiana* *N. Glutinosa*, *N. tabacum* cvs. White Burley, *Cucumis sativus*, *Phaseolus vulgaris*, *Gomphrena globosa* otsu indikatör bitkiler hastalık belirtilerinin gözlenmesi amacıyla 20±2°C ye ayarlanmış en az 4000 lüks aydınlatma kapasitesine sahip 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olan iklim odalarında muhafaza edilmiştir. Mekanik inokulasyon çalışmalarında 0,01M Fosfat tamponu (1,362 gr KH₂PO₄, 1,781 gr Na₂HPO₄.2H₂O, 10 gr Egg Albumin 1lt için, pH 8.0) kullanılmıştır (Dijkstra and Jager, 1998).

Nükleik asit izolasyonu, PCR ve RT-PCR çalışmaları: Nükleik asit izolasyonu Promega firmasının önerilen DNAase ilave edilmiş kolon kromatografi yöntemi ile yapılmıştır (Kobs 1998). PCR ve RT-PCR çalışmaları Kundu (2002)'e göre yapılmış ve virüsün kılıf proteinine spesifik aşağıda Çizelge 1'de verilmiş olan primerler kullanılmıştır.

Çizelge 1. RT-PCR çalışmalarında kullanılan primerler.

Virüs	Primer	Baz dizisi	Büyükük
ASPV	ASP-C ^a	5'-CTCTTGAACCAGCTGATGGC-3'	264 bp
	ASP-A ^b	5'-ATAGCCGCCCGGTTAGGTT-3'	
	ASP-I ^a	5'-AAGAGAAGACATCCAGATTTG-3	553 bp
	ASP-II ^b	5'-CTATAGCCTCTCCCTTGGT-3'	
ASGV	ASGV-U ^a	5'CCCGCTGTTGGATTTGATACACCTC-3'	499 bp
	ASGV-2 ^b	5'-GGAATTTACACGACTCCTAACCTCC-3'	
	ASGV-4F ^a	5'-GTTCAGTGGGCAAAAAGCTGGTC-3'	574 bp
	ASGV-4R ^b	5'-GACGACACCTTCTCCATGCCTTC-3'	

a= Forward primer (upstream)

b=Reverse primer (Downstream)

RT çalışmalarında 2 µl RNA alınarak içinde 10 pmol primer bulunan 10 µl steril su ile karıştırılmış ve 70°C'de 5 dk inkübe edildikten sonra buz içerisine konmuştur. Daha sonra örneklere RT reaksiyon karışımı (Promega firmasından temin edilen 5,25 µl RNAase ari su, 300 Unite M-MLV reverse transcriptase enzimi, 5 µl M-MLV tamponu, 20 Unite RNAsin enzimi ve 0.2 mM dNTP nükleotid) ilave edilerek 37°C'de 1 saat tutulmuş ve 100°C'de 5 dk ısıtılarak elde edilen cDNA daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

PCR çalışmalarında ise PCR karışımı; Promega firmasından temin edilen 2.5 µl Taq-polymerase tamponu ve 2.5 Unite Taq-polymerase, 10 pmol reverse ve forward primer, 0.2 mM dNTPs ve 1.25 mM MgCl₂ kullanılarak hazırlanmıştır. Daha sonra bu karışım di-ionize su ile 23 µl'ye tamamlanarak üzerine 2 µl daha önce elde edilmiş cDNA ilave edilmiş ve reaksiyon PCR cihazında (eppendorf thermocycler, Almanya) aşağıda belirtilen döngülerde gerçekleştirilmiştir.

ASPV: Toplam 35 döngü olacak şekilde, 94°C'de 45 saniye denatürasyon, ASPV-A/ ASPV-C için 55°C'de 1 dakika, ASPV-I /ASPV-II için ise 62°C'de 45 saniye annealing (primerlerin yapışması) ve 72°C'de 1 dakika extantion (Sarmalın tamamlanması) olacak şekilde ayarlanmıştır.

ASGV: Toplam 35 döngü olacak şekilde; 94°C'de 30 saniye denatürasyon, ASGV-U/ ASGV-2 primerleri için 55°C 45, ASGV-4F /ASGV-4R saniye 62 C 1 dakika annealing ve 72°C'de 1 dk extantion olacak şekilde ayarlanmıştır. Ayrıca her iki virüs için son döngüden sonra 10 dakika 72°C ilave edilerek PCR verimliliği artırılmaya çalışılmıştır

SONUÇLAR

Sürvey çalışmaları 2006, 2007 ve 2008 yıllarında ilkbahar ve sonbahar olmak üzere iki dönemde yapılmıştır. Sürvey sonucunda Çizelge 2'de görüldüğü üzere beş farklı ildeki toplam 134 bahçeden 619 örnek alınmıştır.

Çizelge 2. Sürvey çalışmalarında alınan örneklerin illere, türlere ve yıllara göre dağılımı

İl	Tür	2006		2007		2008		Toplam	
		Bahçe sayısı	Örnek sayısı	Bahçe sayısı	Örnek sayısı	Bahçe sayısı	Örnek sayısı	Bahçe sayısı	Örnek sayısı
Adana	Elma	3	61	3	39	7	34	13	134
	Armut	1	6	2	12	10	36	13	54
	Ayva	1	3	1	3	3	9	5	15
Mersin	Elma	1	4	1	6	7	27	9	37
	Armut	1	3	1	6	5	21	7	30
	Ayva	-	-	1	3	3	9	4	12
Osmaniye	Elma	-	-	2	12	5	18	7	30
	Armut	-	-	1	6	2	6	3	12
	Ayva	-	-	1	3	2	6	3	9
Niğde	Elma	-	-	7	30	5	21	12	51
	Armut	-	-	3	15	3	12	6	27
	Ayva	-	-	2	6	2	6	4	12
K. Maraş	Elma	-	-	16	67	7	30	23	97
	Armut	-	-	4	16	4	16	8	32
	Ayva	-	-	5	19	12	48	17	67
Toplam		7	77	50	243	77	299	134	619

Sürvey çalışmalarında alınan örnekler türler bazında incelendiğinde; elma 349 (%56) örnek sayısı ile en yüksek, armut 155 (%25) örnek ile ikinci, ayva ise toplam 115 (%19) örnek ile en az örnek alınan tür olmuştur. Örneklerin illere göre oranına bakıldığında ise Adana 203 (%32) örnek ile birinci, Kahramanmaraş 196 (%32) örnekle ikinci, Niğde 90 (%15) örnekle üçüncü, Mersin 79 (%13) örnekle dördüncü ve Osmaniye 51 (%8) örnekle beşinci sırada yer almıştır. Örneklerin türlere göre oranına bakıldığında ise elma ilk sırada, armut Kahramanmaraş hariç ikinci, ayva ise son sırada yer almıştır (Çizelge 2). Sürveylerde alınan örneklerin ELISA sonuçlarının illere ve türlere göre dağılımı Çizelge 3'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre toplam 619 örneğin 114 tanesi virüs ile enfekteli bulunmuş olup, ortalama enfeksiyon oranı % 18.4'dir.

Çizelge 3. Sürveylerde alınan örneklerin illere ve türlere göre ELISA sonuçları

İl	Tür	Örnek sayısı	ASPV	ASGV	ASPV ASGV	Enfekteli örnek s.	% enfeksiyon
Adana	Elma	134	14	9	3	26	19.4
	Armut	54	11	6	4	21	38.9
	Ayva	15	-	-	-	-	-
Mersin	Elma	37	2	4	1	7	18.9
	Armut	30	2	-	-	2	6.6
	Ayva	12	-	-	-	-	-
Osmaniye	Elma	30	3	1	1	5	16.6
	Armut	12	2	-	-	2	16.6
	Ayva	9	-	-	-	-	-
Niğde	Elma	51	6	5	4	15	29.4
	Armut	27	-	-	-	-	-
	Ayva	12	-	-	-	-	-
K. Maraş	Elma	97	5	6	-	11	11.3
	Armut	32	5	-	-	5	15.6
	Ayva	67	14	3	3	20	29.8
Toplam		619	64	34	16	114	
% enfek.			10.3	5.5	2.6	18.4	

Analizler sonucunda 64 örneğin ASPV ile enfekteli olduğu ve dağılım oranının %10.3 olduğu belirlenmiştir. Toplam 34 örnekte ASGV bulunmuş ve dağılım oranı %5.5 olarak belirlenmiştir. ASPV+ASGV karışık enfeksiyonun dağılım oranı ise 16 örnekle %2.6 olarak hesaplanmıştır. Ayva örnekleri Kahramanmaraş hariç temiz çıkarken, en yüksek dağılım oranı %38,8 ile Adana ili armut alanlarında tespit edilmiştir.

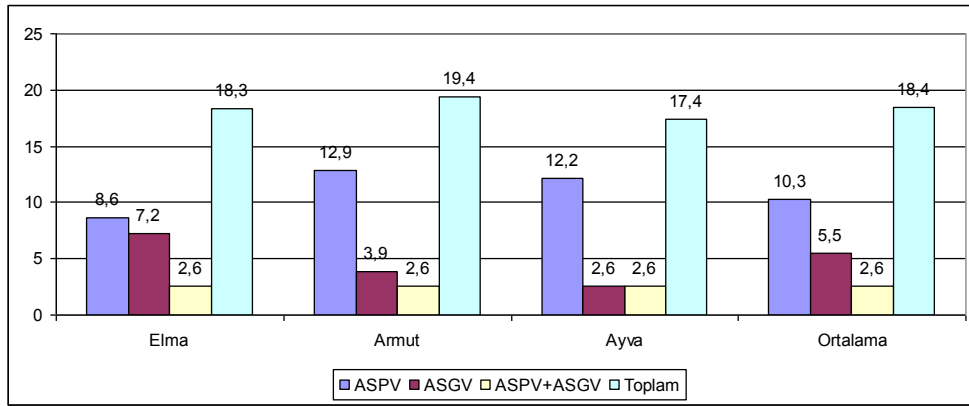
Sürvey çalışmalarında elde edilen örneklerle yapılan ELISA çalışmaları türler bazında değerlendirildiğinde; her üç türdeki dağılım oranlarının birbirine yakın olduğu görülmüştür. Şekil 1'den de anlaşılacağı üzere ortalama %19.4 dağılım oranı ile Armut birinci sırada yer alırken ikinci sırada %18.3 ile elma ve %17.4 ile ayva son sırada yer almıştır. Hastalık etmenlerinin yakalanma oranına bakıldığında Şekil 2'de görüleceği üzere enfekteli bulunan 114 örnek içinde ASPV 64 örnek ve

%56.1 oranıyla birinci sırada yer almıştır. ASGV ise 34 örnekle %29.8'i, ASPV+ASGV karışık enfeksiyonu ise 16 örnek ile %14 yakalanma oranına sahiptir.

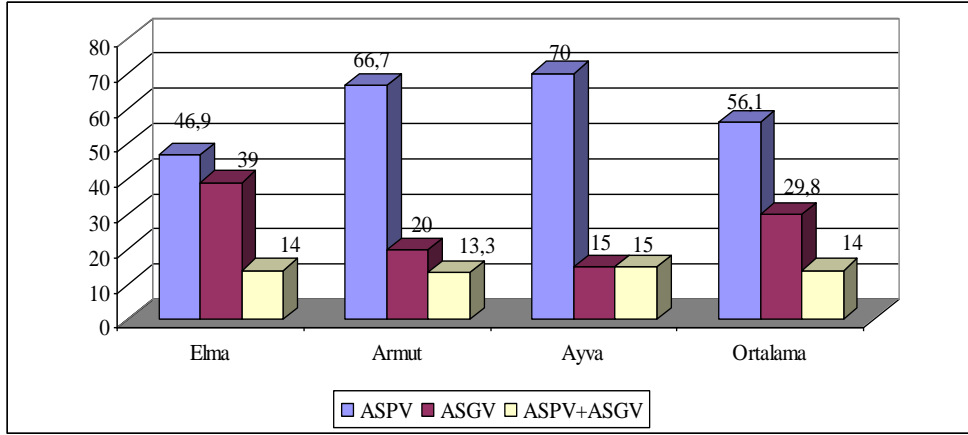
Sürvey çalışmaları türler bazında değerlendirildiğinde toplam 349 elma örneğinden 64'nün bir veya iki virüsle enfekteli olduğu belirlenmiştir. Bu örneklerin 30 tanesinde ASPV (%8.6), 25 tanesinde ASGV (%7.2) ve 9 adet elma örneğinde de ASPV+ASGV (%2.6) karışık enfeksiyon tespit edilmiştir (Şekil 1). Şekil 2'de görüldüğü üzere toplam 64 adet enfekteli elma örneğinin %46.9'u ASPV, %39'u ASGV ve %14'ü ise karışık enfeksiyon (ASPV+ASGV) ile enfekteli bulunmuştur.

Çalışmada toplam 155 armut örneği alınmış ve bu örneklerin 30 tanesi enfekteli bulunmuştur (Şekil 1). Bu armut örneklerinden 20'si ASPV (%12.9), 6'sı ASGV (%3.9) ve 4 bitki ise karışık enfeksiyonla (%2.6) Şekil 2'de görüldüğü gibi hastalıklı örneklerin %66.7 ASPV, %20'si ASGV ve %13.3'ü ise karışık enfeksiyonu ile enfekteli bulunmuştur.

Ayva ile ilgili olarak sürvey çalışmaları kapsamında toplam 115 örnek alınmıştır. DAS-ELISA çalışmaları sonucunda ASPV 14 (%12.2), ASGV ve karışık enfeksiyon ise 3'er örnekte (%2.6) tespit edilmiştir. Enfekteli 20 adet ayva örneği içerisinde Şekil 2'de görüldüğü üzere ASPV %70 ASGV ve karışık enfeksiyon ise %15 oranında eşit olarak belirlenmişlerdir.

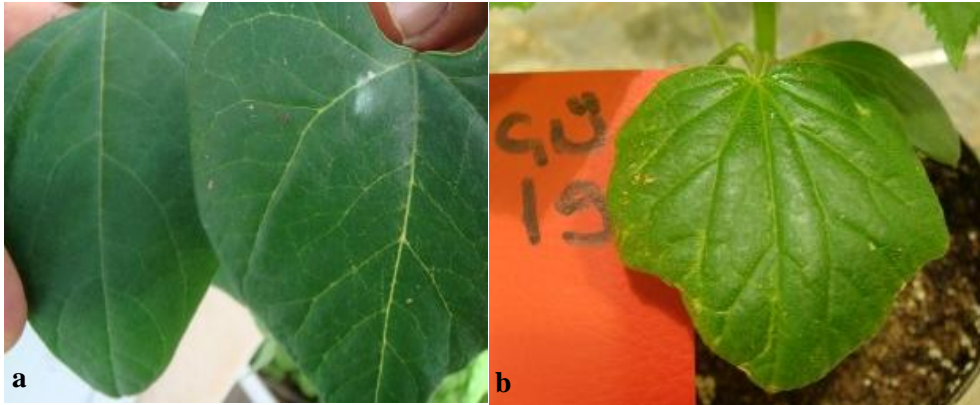


Şekil 1. ELISA sonuçlarına göre türler bazında % enfeksiyon oranları ve genel ortalama.



Şekil 2. Türler bazında enfekteli örneklerdeki hastalık oranları.

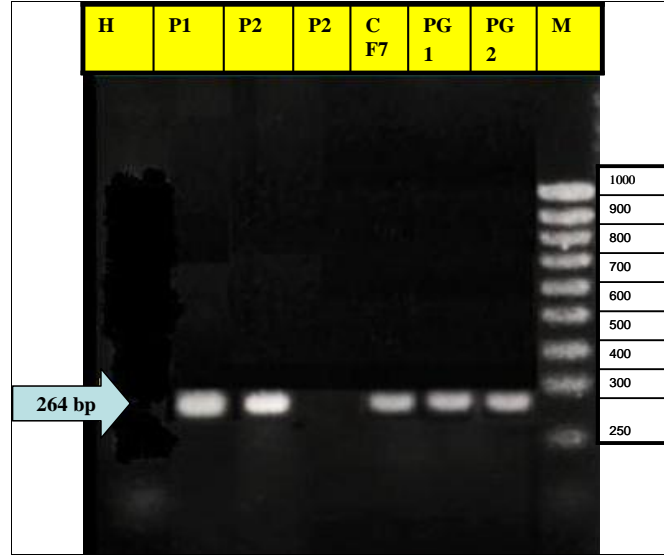
Çalışma boyunca alınan örneklerden bir kısmı için ELISA sonuçlarının doğrulanması açısından otsu indikatörler üzerine mekanik inokulasyon yapılmıştır. Bu çalışmalar neticesinde *Chenopodium amaranticolor*, *Nicotiana occidentalis* P1, *N. glutinosa*, *N. tabacum* cv. White Burley ve *Gomphrena globosa* olmak üzere toplam 5 indikatör bitkide herhangi bir belirti gözlenmemiştir. Fakat *Phaseolus vulgaris*, *Cucumis sativus* *N. occidentalis*, *N. benthamiana* ve *C. quinoa* üzerinde inokulasyondan 15-20 gün sonra ASPV ve ASGV virüslerine ait belirtiler gözlenmiştir. Özellikle *P. vulgaris* bitkisinde ASGV enfeksiyonu sonucu meydana gelen damar açılması (Şekil 3a) ve ASPV enfeksiyonu sonucu *C. sativus* üzerinde oluşan damar açılması belirtileri etmenlerin varlığını teyit etmiştir (Şekil 3b).



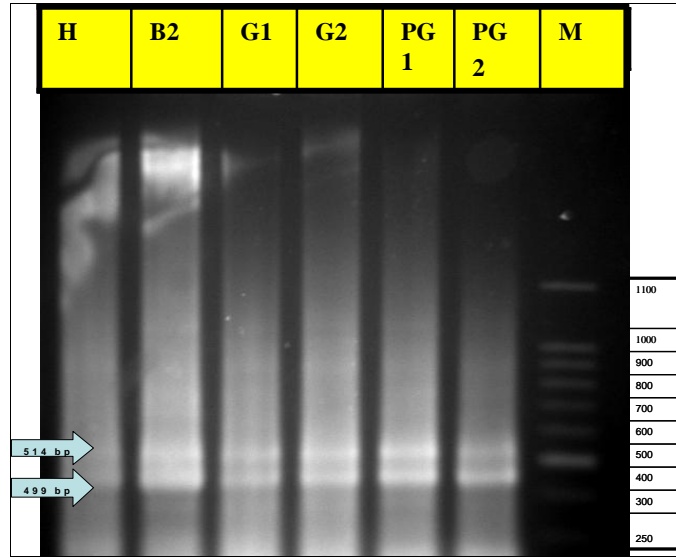
Şekil 3. ASGV enfeksiyonu sonucu *P. vulgaris* (a) ve *C. sativus* (b) üzerinde meydana gelen damar açılması belirtisi.

Serolojik ve biyolojik olarak teşhis edilen hastalık etmenleri aynı zamanda moleküler teknikler ile de belirlenmiştir. Kundu (2002) tarafından belirtilen metotla yapılan RT-PCR çalışmaları neticesinde elde edilen DNA ürünleri %1,5 agaroz

jelde yapılan elektroforez çalışmaları sonucunda ASPV için 264 bp, ASGV için ise 514 ve 499 bp büyüklüğünde DNA bantları elde edilmiştir (Şekil 4,5).



Şekil 4. ASP-C ve ASP-A primerleri ile elde edilen 264 bp'lik DNA bandına ait Agaroz jel elektroforez görüntüsü. M:Markır, P1, P2 ASPV ve PG1, PG2 ise ASPV+ASGV karışık enfeksiyon, CF7 pozitif kontrol, H:negatif kontrol.



Şekil 5. ASGV-2/ASGV-U 499 bp. ve ASGV/4F ve ASGV/4R 514 bp. primer çiftleri kullanılarak yapılan Multiplex RT-PCR sonucu elde edilmiş ASGV jell profilleri. M:Markır, PG2 ve PG1 ASPV+ASGV karışık enfeksiyon, G1 ve G2 ASGV tek enfeksiyon, B2 pozitif kontrol, H:negatif kontrol.

TARTIŞMA VE KANI

Çalışma sonucunda yumuşak çekirdekli meyvelerde gövde zararlanmalarına neden olan ASPV ve ASGV'nin dağılım oranı %18.4 olarak belirlenmiştir. Ülkemizde bugüne kadar yumuşak çekirdekli meyve türlerinin tamamını içeren bu kapsamda bir sürvey çalışması yapılmamış olmakla birlikte, 2002-2005 yılları arasında Doğu Akdeniz Bölgesi elma alanlarında Birişik et al (2008) tarafından yapılan çalışmada ELISA sonuçlarına göre ApMV, ASGV, ASPV ve ACLSV'nin ortalama dağılım oranı %18.8 olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada, ASGV %5.0 dağılım oranında tespit edilmiş olup sonuçlar arasında benzerlik bulunmaktadır.

Ismaeil et al. (2006) tarafından Suriye'de, elma, armut ve ayva alanlarında yapılan benzer bir çalışmada ELISA sonuçlarına göre ACLSV, ASPV ve ASGV için dağılım oranı % 34 olarak bulunmuştur, Suriye'de yapılan bu çalışmada ACLSV bulaşık örnekler çıkarıldığında ortalama enfeksiyon %22 olup bu çalışmayla ortaya konan enfeksiyon oranıyla örtüşmektedir. Litvanya'da ülke çapında elma ve armut alanlarında yapılan sürvey çalışmasında ise ELISA sonuçlarına göre ortalama dağılım oranı %12, ASGV için % 3.40, ASPV için ise %9.8 olarak bulunmuştur. Aynı örneklere RT-PCR uygulandığında ise ASPV % 70, ASGV ise % 50 oranında tespit edilmiştir (Pupola et al. 2008). Benzer bir durum Birişik ve ark. (2008) elmalarda yapılan çalışmada ortaya çıkmış, %18.8 olan dağılım oranı RT-PCR ve biyolojik indeksleme çalışmaları neticesinde ASGV için %60.8 ASPV için ise %54,5 olarak tespit edilmiştir. Lolic et al. (2007) tarafından Bosna Hersek'te elma ve armut alanlarında yapılan çalışmada RT-PCR analiz sonuçlarına göre ASPV ve ASGV'nin %69 oranında bir yaygınlığa sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu durum bir serolojik yöntem olan DAS-ELISA'nın moleküler ve biyolojik yöntemlere göre daha az hassas olduğu ve gerçek dağılım oranının DAS-ELISA ile belirlenenden yüksek olduğunu göstermektedir.

Yapılan teşhis çalışmaları sonucunda her üç yumuşak çekirdekli meyve türünde de ASGV ve ASPV'nin bulunduğu ve dağılım oranlarının türler arasında çok büyük fark göstermediği görülmüştür. Hastalık etmenleri arasında ASPV'nin (%56.1) ASGV'ye (%29.8) oranla yaklaşık iki kat daha yaygın bulunduğu karışık enfeksiyon oranlarının ise türler arasında çok fark göstermediği belirlenmiştir. Karışık enfeksiyon oranının ise türlere göre %14-15 arasında olduğu belirlenmiştir.

ASPV %70 ile en çok ayva'da, ASGV %39.0 oranla en yaygın olarak elma örneklerinde belirlenmiştir (Şekil 3). Elde edilen sonuçlara göre ASPV'nin yumuşak çekirdekli meyvelerde ASGV'ye oranla daha yaygın bir halde bulunduğu görülmüştür. ASPV özellikle ayvada ASGV'den yaklaşık dört kat, armutta ise ASGV'den üç kat daha yaygın olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Nedeni tam olarak açıklanamamakla beraber genellikle yumuşak çekirdekli meyvelerde ASPV ASGV'ye oranla daha yaygın olduğu bilinmektedir. Nitekim bu çalışmayla elde edilen sonuçlar, Litvanya'da Pupola et al. (2008) tarafından yapılan çalışma elde edilen sonuçlar ile paralellik arz etmektedir. Benzer bir durum Huaiqiong and Ruxi

(1996), Çin'in Sichuan bölgesi armut alanlarında yaptıkları çalışmada ASPV %61,5 oranında, ASGV'nin ise %43.2 oranında bulunması ile de ortaya konmuştur. Bu durum ülkemizde yumuşak çekirdekli meyve virüs hastalıkları içerisinde ASPV'nin ASGV'den daha büyük yaygın olduğunu, dolayısıyla ASPV'nin daha önemli bir tehdit olarak öne çıktığını göstermektedir.

Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde özellikle bazı örnekleme alanlarında hiçbir enfekteli örneğe rastlanmazken, bazı bahçelerde çok yüksek enfeksiyon oranları olduğu gözlenmiştir. Bu durumunun hastalık etmenleriyle bulaşmanın büyük çoğunlukla fidan üretim aşamasında olmasından kaynaklandığı düşüncesini doğrulamaktadır. Benzer bir durum Kundu (2003) tarafından yapılan çalışmada Çek Cumhuriyeti elma üretim alanlarında da tespit edilmiştir. Pupola et al. (2008) tarafından Litvanya'da yapılan çalışmada Mramonaja gibi yerli bir armut çeşidinde herhangi bir enfeksiyon tespit edilmezken, Avrupa'da oldukça yaygın olan Conference armut çeşidinde ELISA sonuçlarına göre %50 ASPV enfeksiyonu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar hastalık etmenlerinin daha çok enfekteli üretim materyali ile yayıldığını göstermektedir.

Ülkemizde yumuşak çekirdekli meyve virüsleri konusunda yapılan çalışmalar daha çok elma ile ilgilidir. Bu çalışmayla armut ve ayva türlerinde ilk kez planlı bir sürvey çalışması yapılmış ve bu türlerde ASPV ve ASGV'nin varlığı ülkemiz için ilk kez ortaya konmuştur.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK-TOVAG 106O303 projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir. Destek ve yardımlarından dolayı TÜBİTAK'ın çok değerli yöneticilerine ve çalışanlarına teşekkür ediyorum.

KAYNAKLAR

- Akbaş B. and İlhan D. 2005. Widespread Distribution of *Apple mosaic virus* on Apple in Turkey. *Plant Disease* 89 (9): 1010.
- Anonymous 2009a. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>. (Erişim tarihi: 27.04.2009)
- Anonymous 2009b. <http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim tarihi: 27.04.2009)
- Birişik N., Myrta A., Hassan M. and Baloğlu S. 2008. A Preliminary Account on Apple Viruses in Mediterranean Region of Turkey. XX International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops - Fruit Tree Diseases. *Acta Horticulturae*, 781: 125-130.
- Bora T. ve Karaca İ. 1970. Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yardımcı Ders Kitabı. No. 167. Ege Üniversitesi Matbaası: 8.s.

- Clark M.F. and Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzymelinked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J. of Gen. Virol.* 34: 475-483.
- Clover G.R.G., Pearson M.N., Eliot D.R., Tang Z., Smales T.E. and Alexander J.R. 2003. Characterization of a strain of *Apple stem grooving virus* in *Actinidia chinensis* from China. *Plant Pathology*, 52 (3): 371
- Çağlayan K., Serçe Ç.U., Gazel M. and Jelkman W. 2006. Detection Of Four Apple Viruses by ELISA and RT-PCR Assay in Turkey. *Turk. J.of Agr. for.* 30: 241-246.
- Desvines C.J., Boyê R., Cornaggia, Grasseau N., Hurt S. and Wtarworth H. 1999. *Virus Diseases of Fruit Trees*. Citfl. Paris. 202p.
- Dijkstra J. and Jager C.P. 1998. *Practical Plant Virology. Protocol and Exercises*. Newyork. 458p.
- Guengerih H.W. and Milikan D.F. 1959. Reaction of ownroot trees of Spy 227 and Virginia Crab to infection with the stem pitting virus. *Plant. Dis.Repr.* 254: 30-31.
- Hirata H., Lu X., Yamaji Y., Kagiwada S., Ugaki, M. and Namba S. 2003. A single silent substitution in the genome of *Apple stem grooving virus* causes symptom attenuation. *Gen Virol* (84): 2579–2583.
- Huaiiong L. and Ruxi C. 1996. The identification of virus diseases for the leading pear cultivars grown in Sichuan. *South China Fruits*. 25 (4):44
- Inouye N., Maeda T. and Mitsuhata K. 1979. Citrus Tatter Leaf Virus Isolated from Lily. *Annals of the Phytopatological Society of Japan*. 45:712-720.
- Ismail F. Al-Jabor K., Myrta A. ,Mando M. J., Al-Saadoun E., Hassan M. and Al-Chaab S. 2006. Viruses of pome fruit trees in Syria. *EPP0 Bulletin*. Volume 36, p 65.
- Kegler H., Kleinhampel H. and Verderevskaia T. 1976. Investigation on pear stony pit virus. *Acta. Horticult.* 67: 209-218.
- Khan J.A. and Dijkstra J. 2006. *Handbook of Plant Virology*. Food Products Press. New York, London, Oxford 452p.
- Kobs G. 1998. Isolation of RNA from Plant, Yeast and Bacteria. *Promega notes*.68:28. http://www.promega.com/pnotes/68/7381_28/7381_28_core.pdf. 28.04.2009.
- Kogonezawa H. and Yanase H. 1990. A new type of elongated virus isolated from apple trees containing the stem pitting agent *Plant Dis.* 74:610
- Kundu J.K. 2002. The application of RT-PCR Assay for the Detection of *Apple Stem Pitting Virus* and *Apple Stem Grooving Virus* in Four Apple Cultivars. *Plant Protection Science*. Vol.38-1:13-17.
- Kundu J.K. 2003. The Occurrence of *Apple Stem Pitting* and *Apple Stem Grooving* viruses Within Field-Grown Apple Cultivars Evaluated by RT-PCR. *Plant Protect. Sci.*39; 88-92.
- Lister R.M., Bancroft J.B. and Nadakavukaren M.J. 1965. Some sap-transmissible viruses from apple. *Phytopathology*. 55:859-870.

- Loliç B., Myrta A. and Krstic U.B. 2007. Pome Fruit Viruses in Bosnia and Herzegovina. *Pesticidi i Fitomedicina* . 22(2): 165-172.
- Maxim A., Zagrai L., Zagrai I. and Isac M. 2004. Studies on the Influence of Apple Stem Grooving Virus on Tree Growth of Various Apple Cultivars in the Nursery. XIX International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops - Fruit Tree Diseases. *Acta Horticulture*. 657: 41-44.
- Mayo and Brunt 2006. Plant virus taxonomy (Khan J.A and Dijkstra J.) *Handbook of Plant Virology*. Food Products Pres. New York, Oxford : 11-22.
- Minoiu N., Vladinu D., Pattantus K., Cracium C., Cracium V., Parnia P. and Stirban M. 1986. Investigations on Pear Vein Yellows In Nursery. XIII International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases. *ISHS Acta Horticulturae* 193: 77-82.
- Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarsiv A.W., Martelli G.P., Mayo M.A. and Summers M.D. 1995. *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses*. The six Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer. Vienna. P 586.
- Nemeth M. 1986. *Virus, Mycoplasma and Riketsia Diseases of Fruit Trees*. Akademia Kiado. Budapest. 840p.
- Nickel O., Fajardo T.V.M. and Jelkmann W. 2001. Sequence analysis of the capsid protein gene of an isolate of *Apple stem grooving virus*, and its survey in Southern Brazil. *Fitopatol. bras.*, Sept, 26,(3): 655-659.
- Ogowa M. J. and English H. 1991. *Diseases of Temperate Zone Tree Fruit and Nut Crops*. University of California. USA: s,74-84.
- Osvaldo L., Gian P.A., Vera M. and Addolarato C. 2002. An Isolate of *Apple stem grooving virus* Associated with Cleopatra Mandarin Fruit Intumescence. *Fitopatol. bras*, 28 (1): 54-58.
- Özbek S. 1978. Özel Meyvecilik (Kışın Yaprğını Döken Meyve Türleri). Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, , Adana. No: 128, Ders kitabı: 11
- Özkan M. ve Kurçman S. 1976. Orta Anadolu Elma Bahçelerinde Görülen Virüs Hastalıkları. *Bitki Koruma Bülteni*. 16 (2): 106-115.
- Pupola N., Kâle A. and Orocko-Bicevska I. 2008. Occurence of Viruses in Apple and Pear Orchards in Latvia. Conference on “Sustainable Fruit-Growing: From Plant to Product” http://www.lvai.lv/Konference/pdf/D-Jurmala2008_labots.pdf. 01.06.2009.
- Ülkümen L. 1938. Malatya'nın Mühim Meyve Çeşitleri Üzerinde Morfolojik, Fizyolojik ve Biyolojik Araştırmalar. *Yüksek Ziraat Enstitüsü Çalışmaları*, Sayı: 65, Ankara.
- Welsh M.F. and Uyemato J.K. 1980. Differentiation of syndromes caused in apple by graft-transmissible, Xylem affected agents. *Phytopatholgy*, 70: 349-352.