



Tarım Bilimleri Dergisi

Tar. Bil. Der.

Dergi web sayfası:
www.agri.ankara.edu.tr/dergi

Journal of Agricultural Sciences

Journal homepage:
www.agri.ankara.edu.tr/journal

Elma Mozaik Ilarvirusu Türkiye ve Ukrayna İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu

Filiz ERTUNÇ^a, Didem CANİK^a, Alina GOSPODARYK^b, Irena Genadiyivna BUDZANIVSKA^b, Valery Petrovytch POLISCHUK^b

^a Ankara University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, 06110, Ankara, TURKEY

^b Taras Shevchenko National University, Virology Department, Kiev, UKRAINE

ESER BİLGİSİ

Araştırma Makalesi — Bitkisel Üretim

Sorumlu Yazar: Filiz ERTUNÇ, e-posta: ertunc@agri.ankara.edu.tr, Tel: +90(312) 596 11 17

Geliş tarihi: 22 Mayıs 2010, Düzeltmelerin gelişi: 17 Mayıs 2011, Kabul: 19 Temmuz 2011

ÖZET

Ülkemiz elma ve fındık üretimini kısıtlayan en önemli etmenlerden biri de Elma mozaik ilarvirüsü (*Apple mosaic ilarvirus*; ApMV) dur. Etmenin üretim materyali ile taşınması, ülkemizde yumuşak çekirdekli, fındık ve yağ gülü plantasyonlarında giderek yayılmasına neden olmaktadır. Ele alınan bu çalışma kapsamında ülkemiz fındık ve elma ekim alanlarında, hastalığa ait izolatlar toplanmış ve patojenin varlığı, DAS-ELISA ve RT-PCR çalışmaları ile ortaya konmuştur. 2008 ve 2009 yıllarında Ukrayna'nın elma üretim alanlarında örnekleme yapılmış ve toplanan bu izolatlar, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nde koleksiyondaki ApMV izolatları ile karşılaştırılmıştır. Enfekteli örneklerden total RNA izolasyonu, silika yöntemi kullanılarak yapılmış ve RT-PCR'da 262 bp uzunluğunda PCR ürünü elde edilmiştir. Tüm PCR ürünleri, *Hinf I*, *BamH I*, *Ava I*, *EcoR I*, *Ssp I*, *Rsa I*, *Hind III*, *Hinc II* enzimleri enzimatik kesime maruz bırakılmış ve bunlardan sadece *Ava I*, *BamH I*, *Hinf I*, *Ssp I* enzimleri ile kesim sağlanmıştır. Yapılan analiz sonucunda Türk izolatlarının 9 genotipe ayrıldığı tespit edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda Türk izolatlarının değişik oldukları, buna karşılık Ukrayna elma izolatlarının oldukça benzer oldukları belirlenmiştir. Her iki ülkeye ait elma izolatları baz dizileri karşılaştırıldığında ise oldukça benzer oldukları saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: Elma Mozaik Ilarvirüsü; Türkiye; Ukrayna

Molecular Characterization of *Apple mosaic virus* in Turkish and Ukrainian Isolates

ARTICLE INFO

Research Article — Crop Production

Corresponding author: Filiz ERTUNÇ, e-mail: ertunc@agri.ankara.edu.tr, Tel: +90(312) 596 11 17

Received: 22 May 2010, Received in revised form: 17 May 2011, Accepted: 19 July 2011

ABSTRACT

One of the most important factors that limit the production of apple and hazelnut in Turkey is *Apple mosaic ilarvirus* (ApMV). The pathogen is easily distributed with vegetative plant materials and it is gradually spreading in both pome fruits, hazelnut and oil rose plantations in Turkey *Apple mosaic virus* isolates were collected from

mainly apple and hazelnut grown areas and presence of the pathogen was detected by DAS-ELISA and RT-PCR amplification. Surveys were conducted to apple plantations of Ukraine during the years 2008-2009 and ApMV infected samples were collected. These isolates were compared with the isolates maintained at Ankara University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection. Silica method was applied for total RNA isolation and 262 bp long PCR products were obtained in RT-PCR tests. All of the isolates were subjected to enzymatic cleavage by *Hinf I*, *BamH I*, *Ava I*, *EcoR I*, *Ssp I*, *Rsa I*, *Hind III*, *Hinc II* restriction enzymes and only with *Ava I*, *BamH I*, *Hinf I*, *Ssp I* enzymes cuttings were accomplished and phylogenetic analysis was performed. Phylogenetic analysis result showed that Turkish isolates of ApMV were composed of 9 and Ukrainian apple isolates were composed of 6 genotypes. When sequence data of apple isolates of both countries were compared, homology in sequences were detected.

Keywords: *Apple mosaic ilarvirus*; Turkey; Ukraine

© Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi

1. Giriş

Ülkemiz giderek artan nüfusu nedeniyle modern ve entansif üretim yollarını aramakta, bu nedenle de sürekli olarak yeni varyeteler ve ürünler, marketlerde yerini almaktadır. Son yıllarda ihracatımızda da önem arz etmesi nedeniyle meyvecilik alanında reform niteliğinde uygulamalara geçilmiş, damla sulamanın ve işçiliği azaltan bodur meyve çeşitlerinin yayılması, meyve üretim alanlarının artmasına neden olmuştur.

2007 yılı verilerine göre dünya da ve ülkemizde en fazla yetiştirilen yumuşak çekirdekli meyve türü elmadır. Ülkemiz 2,266,437 tonluk elma üretimi ile Çin, USA ve İran'dan sonra 4. sırada olup, dünya elma üretiminin de % 3.4 ü ülkemizde gerçekleşmektedir. Elmada ülkemizde elde edilen verim değerleri ise 20 ton ha⁻¹ olup bu değer 13.65 ton ha⁻¹ olan dünya ortalamasının çok üzerindedir. Ülkemizde başlıca yetiştirilen elma çeşitleri sırasıyla Starking, Golden Delicious, Granny Smith ve Amasya'dır (Köksal et al 2010).

Dünya fındık üretiminde ülkemiz 1. sırada olup, 499,000 ton üretimle, dünya fındık ihtiyacının % 61.5 u ülkemizde gerçekleşmiş bulunmaktadır. Fındık verimimiz ise, 1,247.5 kg ha⁻¹ olarak gerçekleşmiş olup; bu değer 1,329.8 kg ha⁻¹ olan dünya ortalamasının altında bir değerdir. Üretilen elmanın 2006 yılı verilerine göre, 8,586 tonu ihraç edilirken, üretilen fındığımızın 124,204 tonu iç fındık olarak ihraç edilmekte ve ülke ekonomisine 741,761,000 dolar katma değer sağlanmaktadır (Köksal et al 2010).

Yurdumuzda yumuşak çekirdekli, sert çekirdekli ve yağ gülü üretiminde problem olan viral etmenlerden biri de Elma mozaik ilarvirüsü (*Apple mosaic ilarvirus*: ApMV) 'dur (Ulubaş & Ertunç 2003; Çağlayan et al 2003; Gümüş et al 2008; Yardımcı & Culal 2009). ApMV *Bromoviridae* familyası, *İlarvirus* cinsi içinde yer almakta olup, *İlarvirus* cinsi, serolojik karakterlerine göre 3 alt gruba ayrılmıştır. ApMV, İlarvirus cinsinin altgrup 3'ünde yer almaktadır. Etmen vejetatif olarak üretim materyali, budama, aşı gözü ve polen ile yayılmakta ve üründe azalmaya neden olmaktadır. Doğal konukçuları elma, gül, fındık, at kestanesi, ahududu, böğürtlen, şerbetçi otu ve tüm sert çekirdekli olup bunlar üzerinde sistemik mozaik, halkalı lekeler, beneklenme şeklinde belirtiler oluşturmakta ayrıca latent olarak kalabilmektedir (Brunt et al 1996). Virus mekaniksel olarak, aşı ve köklerin birbiri ile teması ile taşınmakta, tohum ile taşınmamaktadır, partikülleri yuvarlak olup, 25-29 nm boyutlarındadır. Genomu ss RNA olup 3 parçalıdır. Virus partikülü içinde bir adet subgenomik mRNA tespit edilmiş olup (RNA 4), bu dizilimin örtü proteini (coat protein-CP) geninden sorumlu olduğu belirlenmiştir (Brunt et al 1996). RNA 1 ve RNA 2'nin sekansları Shiel & Berger (2000), RNA 3'ün sekansı Shiel et al (1995), RNA 4'ün sekansı Alrefai et al (1994), Sanchez-Navarro & Pallas (1994) tarafından tamamlanmıştır. RNA1, 3476 nükleotid uzunluğunda büyük ORF (Open Reading Frame-Açık Okuma Alanı); RNA 2, 2979 nükleotid

uzunluğunda tek ORF (Shiel & Berger 2000); RNA 3, 2056 nükleotid uzunluğunda ve 2 ORF kodlar. İlk ORF hareket (putative movement) proteini, 2. ise örtü proteini (CP) kodlar ve ayrıca subgenomik mRNA oluşturarak (RNA 4) CP'nin devamını oluşturur. RNA 4, 885 nükleotid uzunluğundadır. Etmenin örtü proteini 25.056 dalton büyüklüğündedir. İlarviruslarda CP'nin, RNA'nın korunmasında ve enfeksiyonun başlamasında önemli rol oynadığı saptanmıştır (Sanchez-Navarro & Palas 1997). Avusturalya'da şerbetçi otu üzerinde saptanmış bulunan İlarviruslar üzerinde yapılan bir çalışmada, ApMV'nin *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) izolatlarından oldukça farklı olduğu saptanmıştır (Sanchez-Navarro & Palas 1997). ApMV'nin diğer Bromoviridae familyası üyeleri ile benzerliklerinin olmadığı belirlenmiştir (Alrefai et al 1994). ApMV izolatları ile yapılan çalışmalara göre, etmenin sekanslarının birbirinden oldukça farklı dizilimde oldukları belirlenmiştir (Alrefai et al 1994; Guo et al 1995; Shiel et al 1995).

Ülkemizde fındık ekim alanlarındaki viral enfeksiyonlar üzerindeki ilk çalışmalar, Akbaş et al (2004) tarafından yapılmış olup, bu çalışmada Batı Karadeniz Bölgesinden toplanan virüs enfekteli izolatları PNRSV ve ApMV açısından serolojik teste tabi tutulmuş ve bazı izolatların sadece ApMV ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Etmenin varlığı ülkemizde kiraz (Gümüş et al 2005), *Rubus canescens* (Yabani böğürtlen) (Sökmen et al 2008), elma (Çağlayan et al 2003; Akbaş & İlhan 2005; Yılmaz et al 2006; Yardımcı et al 2006; Dursunoğlu & Ertunç 2008) Isparta yağ gülünde (Yardımcı & Cural 2009) DAS-ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Etmenin yurdumuzda ilk kez moleküler olarak RT-PCR yöntemi ile saptanması Ulubas & Ertunç (2003) tarafından gerçekleştirilmiştir.

Elma mozaik virusünün direkt olarak dormant fındık dokularından saptanması üzerinde herhangi bir yayın bulunmamaktadır. Sökmen (2008) birer adet fındık ve elma izolatını fasulye bitkisine aktarmış ve bu bitkilerden RNA izolasyonu yaparak, etmeni RT-PCR ile saptamıştır. Akbas &

Değirmenci (2010), çiçek ve fındık meyve dokularından RNA izolasyonu yapmış ve etmeni RT-PCR ile moleküler olarak belirlemiştir.

Hastalığın dünyada fındık ekim alanlarındaki yaygınlığı ve durumu hakkındaki yayınlar sınırlıdır. Polonya'da yapılan bir çalışmada 45 *Corylus avellana* (adi fındık) ve dört Türk fındık çeşidi ApMV yönünden incelenmiş ve yapılan ELISA testleri sonucunda sadece iki çeşitte etmen saptanmış, ayrıca genç yaprakların orta ve yaşlı yapraklara kıyasla daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir (Piskornik et al 2002). Diğer bazı araştırmacılar ise, Polonya'da sıcaklıkların artışı ile belirtilerin maskelendiğini belirtmişler ve fındıkta survey için uygun dönemin Mayıs ayı olduğunu ve bitkideki başlıca belirtilerin halkalı lekeler ve sarı renkli meşe yaprağı formu olduğunu bildirmişlerdir (Kobylyko & Nowak 2006). Fransa'da yapılan bir çalışmada fındık bitkilerinde ApMV enfeksiyonunun fındığın gövde çapı, meyve büyüklüğü ve ürün miktarında önemli ölçüde verim düşüklüğüne neden olduğu belirlenmiştir (Gentit et al 2009). Ülkemizde ise Batı Karadeniz Bölgesindeki fındık plantasyonlarında yapılan bir çalışmada, hastalığın % 28.2 oranında verim düşüklüğüne neden olduğu saptanmıştır (Akbaş & Değirmenci 2009).

Etmenin örtü protein bölgeleri dizilimlerine ait veriler NCBI gen bankasında, çok sayıda olmakla birlikte, yayınlanmış eserler oldukça az sayıdadır. Elde edilen sekansların diğer Bromoviridae üyeleri ile karşılaştırılmaları yapıldığında, bunların hiçbir benzer yönlerinin olmadığı belirlenmiştir (Alrefai et al 1994; Guo et al 1995). Ülkemizden de Malatya iline ait bir elma izolatının, RNA1, RNA 2 ve RNA 3'ün tüm genom sekansları NCBI gen bankasında yer almaktadır (Öksüz et al 2009). Bu çalışma ile ülkemiz tarımında bu denli öneme sahip olan elma ve fındık plantasyonlarında sorun olan ve doğrudan verimi etkileyen ApMV'nun ülkemiz ve Ukrayna izolatları toplanmış, örtü protein dizilim bölgesine göre RT-PCR ile tanıları yapılmış, genom dizilimleri birbirleri ile karşılaştırılarak benzerlikler ortaya çıkarılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Araştırma materyalinin temini

Bu araştırmanın materyalini Ukrayna' da 2008-2009 yıllarında toplanan ApMV bulaşık elma gül ve *Berberis thunbergii* (Kırmızı Berberis) örnekleri ile bölümümüz Viroloji laboratuvarında bulunan ApMV ile bulaşık 14 adet elma ve 44 adet fındık örneği oluşturmuştur. Ayrıca Yeni Zelanda'dan temin edilen 2 adet ApMV ile bulaşık dormant elma örneği de araştırmaya dahil edilmiştir. Fındık izolatları başta Giresun olmak üzere, Düzce, Adapazarı, Samsun, Ordu ve Trabzon illerinden, elma izolatları ise Ankara, Antalya (Korkuteli), Tokat, Bursa, Nevşehir, Konya, Niğde ve Isparta (Eğirdir) illerinden temin edilmiştir.

2.2. DAS-ELISA yöntemi

DAS-ELISA Yöntemi Clark ve Adams (1977)'a göre standart yöntem kullanılmak suretiyle uygulanmıştır. Örnekler, PBS-TPO (0.02M PBS, %0.05 oranında Tween-20 ve % 0.05 oranında PVP 40000 içeren) içinde 1/10 oranında sulandırılarak ezilmiş ve 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra denemeye alınmışlardır. ELISA testinde Agdia firmasına ait antiserum kiti ve pozitif ve negatif kontroller kullanılmış ve firmanın önerdiği ölçüde sulandırma yapılarak, denemeler gerçekleştirilmiştir.

2.3. Toplam RNA izolasyon yöntemleri

2.3.1. Elma ve gül örnekleri için RNA izolasyonu

Elma örnekleri için RNA izolasyonu Menzel et al (2002)'a göre yapılmıştır. Bu amaçla 100 mg yaprak, 1ml ezme tamponu (6M guanidine hidroklorid, 0.2M sodyum asetat pH:5.2, 25mM EDTA, 1M potasyum asetat, %2.5 PVP-40) içinde ezilmiştir. 500 µl'lik homojenat, 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine alınarak, 100µl SDS (%10) ilave edilmiştir. Karışım, 70°C'de ara ara karıştırılarak 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 5 dakika buzda bekletilerek, 13 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvının 300µl si yeni bir tüpe alınarak, üzerine 300µl 6M sodium iodide çözeltisi, 150 µl etanol ve 25 µl (pH: 2) silika (1g ml⁻¹) ilave edilmiştir. Tüp oda sıcaklığında ara ara karıştırılarak inkübe

edildikten sonra 1 dakika 6000 rpm'de santrifüj edilmiş, üst sıvı alınmış ve dipte kalan çökelek 500µl yıkama tamponu (10mM Tris-HCl pH:7.5, 0.05mM EDTA, 50mM NaCl ve %50 etanol) ile çözdürülerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Çökelek 100 µl TE bufferında (10mM Tris-HCl pH: 7.5, 0.1 mM EDTA) çözülmüş ve 70°C'de 4 dakika inkübe edilmiştir. 13,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı yeni bir tüpe alınarak elde edilen RNA'lar, -20°C'de analize kadar muhafaza edilmiştir.

2.3.2. Fındık ve Berberis örnekleri için RNA izolasyonu

Fındık ve Berberis örneklerinden RNA izolasyonu, Rott & Jelkman (2001)'a göre yapılmıştır. Bu amaçla 300 mg dal kabuk dokusu, 3 ml ezme tamponu (4M guanidine thiosiyanat, 0.2 M sodyum asetat pH: 5.2, 25mM EDTA, 1 M potasyum asetat, %2.5 PVP-40) içinde ezilmiş, tülbentten süzülüş ve elde edilen öz sudan 500µl, 1.5 ml'lik tüpe alınarak üzerine 100µl SDS (%10), 5µl 2-mercaptoethanol ilave edilmiştir. Karışım, 70°C'de ara ara karıştırılarak 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 5 dakika buzda bekletilerek, 13,000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvının 300µl si yeni bir tüpe alınarak, üzerine 300µl 6M sodiumiodid solüsyonu, 150µl etanol ve 25µl (pH: 2) silika (1g ml⁻¹) ilave edilmiştir. Tüp oda sıcaklığında ara ara karıştırılarak inkübe edildikten sonra 1 dakika 6000 rpm'de santrifüj edilmiş, üst sıvı alınmış ve dipte kalan çökelek 500µl yıkama tamponu (10mM Tris-HCl pH:7.5, 0.05mM EDTA, 50mM NaCl ve %50 etanol) ile çözdürülerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Çökelek 100 µl TE bufferında (10mM Tris-HCl pH: 7.5, 0.1 mM EDTA) çözülmüş ve 70°C'de 4 dakika inkübe edilmiştir. 13,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı yeni bir tüpe alınarak elde edilen RNA'lar -20°C'de analize kadar muhafaza edilmiştir.

2.4. Primer ve RT-PCR uygulaması

PCR amplifikasyonunda, tek aşamalı RT-PCR uygulanmıştır. Laboratuvar koşullarında modifiye edilen PCR karışımı ile ApMV nin örtü protein gen bölgesine spesifik olan ve 262 bp

büyükliğinde bir bölgeyi çoğaltan primer çifti kullanılmış ve bu primere göre PCR döngüleri uygulanmıştır (Menzel et al 2002). PCR karışımı: Oligo (dT) primerler (alt ve üst sıra) 1 μ l (20 pmol μ l⁻¹), dNTP: 1.5 μ l, 10X Taq buffer: 2.5 μ l, MMLV-RT (Fermentas): 0.4 u, RNase inhibitor (Promega): 0.1 u, MgCl₂: 1.5 μ l, Taq DNA polymerase (Fermentas): 1 u, RNase-free su: 15.7 μ l, RNA örneği: 2 μ l. Reaksiyon toplam hacmi ise 25 μ l'dir. Araştırmada kullanılan primer çifti, Sense: 5'-ATC CGA GTG AAC AGT CTA TCC TCT AA-3' Antisense: 5'-GTA ACT CAC TCG TTA TCA CGT ACA A-3' olup, uygulanan termal cycling programı ise 42°C'de 30 dakika (RT aşaması), 95°C'de 15 dakika, 34 döngü 94°C'de 30 saniye 62°C'de 30saniye 72°C'de 1 dakika olarak uygulanmış ve 72°C'de 7 dakika olarak tamamlanmıştır. Tüm RT-PCR ürünleri % 1 lik agarose jelde, 1 saat 100 V elektrik akımında elektroforeze tabi tutulmuş ve işlemi takiben 0.5 μ g ml⁻¹ EtBr çözeltisinde boyanmışlardır.

2.5. Rekstrüksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim

RT-PCR uygulamasında elde edilen ürünler *Hinf I*, *BamH I*, *Ava I*, *EcoR I*, *Ssp I*, *Rsa I*, *Hind III*, *Hinc II* enzimleri ile enzimatik kesime tabi tutulmuşlardır. Bu amaçla 8 μ l PCR ürünü, 0.5 μ l enzim ve 1 ml enzim bufferi bir PCR tüpü içinde karıştırılmış ve 37°C de gece boyu inkübe edilmiştir. Kesim ürünleri %6 lık poliakrilamid dikey jelde (16 ml ddH₂O, 4 ml Akriamid-Bisacrilamid, 400 μ l 50X TAE, 20 μ l TEMED, 200 μ l Amonyum persulfat) 100 V'da 2.5 saat elektroforeze tabi tutulmuş ve sonrasında EtBr ile boyanmışlardır. Enzimatik kesim sonucu oluşan bantlar kaydedilerek, filogenetik analiz yapılmıştır. Filogenetik analizde Jaccard's similarity index programme of Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2 programından (Rohlf 1998) yararlanılmıştır.

2.6. Genom dizilimlerinin ortaya çıkarılması

Elde edilen PCR ürünlerinin genom sekansları Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsünde gerçekleştirilmiştir. Tüm PCR ürünleri burada bir kez daha PCR amplifikasyonuna alınmış, elde

edilen PCR ürünü jelde koşturulmuş ve ürün jelden kesilip alınarak Promega Wizard gel and PCR clean up kiti ile temizlenmiş ve Beckmann-Coulter sekans cihazına uygulanmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

2008-2009 yıllarında Ukrayna-Kiev' de gerçekleştirilen sörveylerde 18 adet elma, 3 adet gül, 2 *Berberis thunbergii*, 3 gürgen, 1 fındık olmak üzere toplam 27 adet bitki örneği toplanmıştır. Bitki örneklerinin üzerlerindeki hakim belirti sistemik mozaik şeklinde olup hastalığın elmalardaki belirtisi Şekil 1'de gösterilmektedir. Ukrayna'da enfeksiyon yöresel elma çeşitlerinde (Pgonagolol (L1T2-2), Champion (L5T2-7), Vrushka (L4T2-1)) tespit edilmesine karşılık, Türkiye'de ise entansif üretim bölgelerinden oluşan araştırma bölgesinde sadece son yıllarında ekim alanı hızla gelişen *Granny Smith* elma çeşidinde saptanmıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada, ülkemizdeki farklı elma çeşitlerinde var olduğu bildirilmesine karşılık (Akbaş & İlhan 2005), bu çalışmada sadece *G. Smith* çeşidinde mevcut ve yaygın olduğu belirlenmiştir. Araştırma bölgesinde ekimi yapılan diğer elma türlerinde (Starking, Golden Delicious ve Fuji) hastalık belirtilerine rastlanmamış ve bunlardan örnekleme yapılmamıştır. Hastalık ayrıca tüm Karadeniz bölgesi boyunca yer alan fındık ekim alanlarında mevcuttur.



Şekil 1-Elma mozaik virüsü'nün elmadaki sistemik mozaik şeklindeki belirtisi

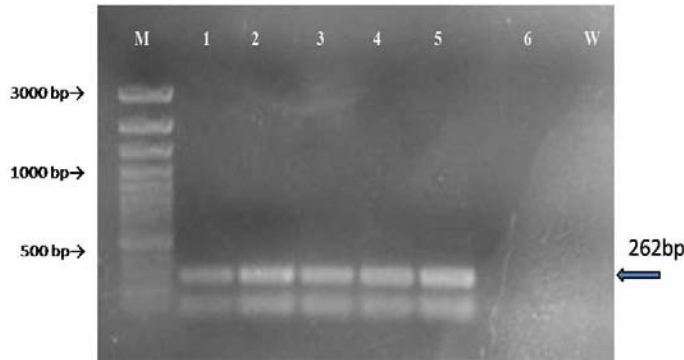
Figure 1-Systemic mosaic symptoms of Apple mosaic virus on apple

ELISA testi sonucunda, Ukrayna elma örneklerinden, 18 elma örneğinin 6'sı, 2 *Berberis thunbergii* örneğinin her ikisi ve 3 gül örneğinin 1'i ApMV antiserumuna karşı pozitif reaksiyon oluştururken, 3 gürgen ve 1 fındık örneğinin hiçbirinde pozitif reaksiyon elde edilmemiştir. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü laboratuvarında ise Türk izolatları olarak 14 adet elma ve 44 adet fındık izolatu mevcut bulunmaktadır. Tüm Türk izolatları ApMV antiserumuna karşı pozitif sonuç vermişlerdir.

Yapılan ön denemelerde, her iki RNA izolasyon yöntemi de, seçilen izolatları uygulanmış ve RNA konsantrasyonunun daha yüksek olması nedeniyle, Türk ve Ukrayna elma ve gül örneklerinden Menzel et al (2002)'a göre yapraktan, *Berberis thunbergii* ve fındık bitkilerinden ise Rott & Jelkman (2001)'a göre, taze sürgün kabuk dokusundan RNA izolasyonu yapılmış ve ApMV örtü protein gen bölgesine göre Menzel et al (2002)'in primeri ve laboratuvarımızda geliştirdiğimiz PCR karışımı ile RT-PCR testine tabii tutulmuşlardır. Orijinal karışım uygulandığında (Menzel et al 2002) zayıf

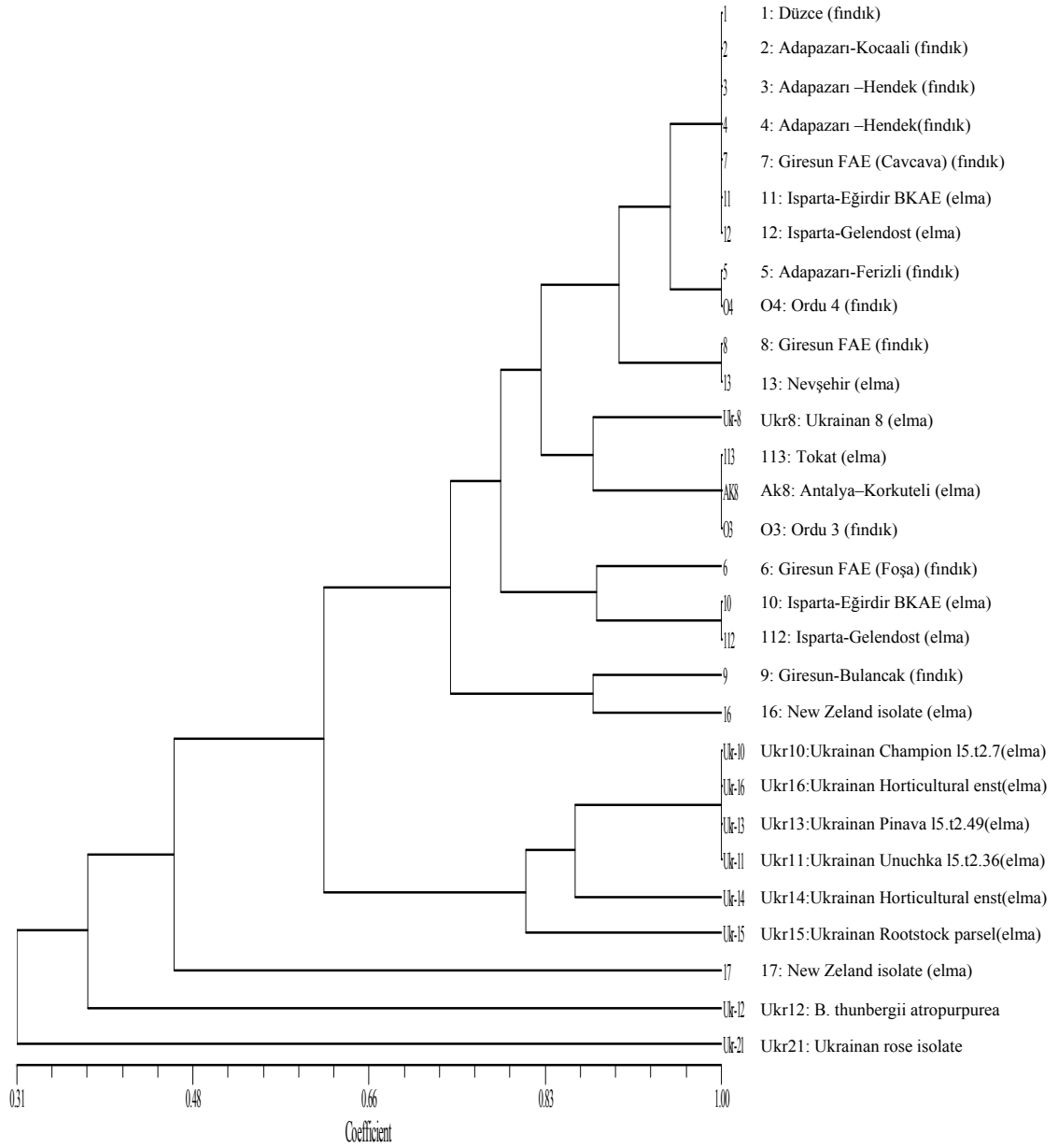
bantlar, tarafımızdan geliştirilen karışım uygulandığında ise daha belirgin ve kuvvetli bantlar elde edilmiştir. İlk araştırmalarda, fındık yapraklarında yoğun olarak bulunan tanen ve diğer polifenoller ile polisakaritler nedeniyle her iki yöntemde göre, yapraktan yapılan izolasyonlarda yeterli oranda RNA izole edilmemiş ancak genç sürgün kabuk dokusuna Rott & Jelkman (2001) yöntemi uygulandığında ise PCR için yeterli RNA'lar elde edilmiştir.

Serolojik olarak etmene karşı pozitif reaksiyon gösteren tüm izolatlarla, RT-PCR analizinde de amplifikasyon gerçekleşmiş ve 262 bp büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir (Şekil 2). Restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesimde, *Hinf I*, *BamH I*, *Ava I*, *SSp I* enzimleri, RT-PCR ürünlerini kesmiş, diğer enzimlerle bir sonuç alınamamıştır. Yapılan filogenetik analizde ise Türk izolatları 9 genotipe ayrılırken, Ukrayna elma izolatlarının 6 genotip'te toplandığı, 4 elma izolatının birbirine oldukça benzer olup aynı genotipte yer aldığı ve Ukrayna gül ve *Berberis thunbergii* izolatlarının elma izolatlarından farklı olup ayrı genotiplerde yer aldıkları görülmüştür.



Şekil 2-Türk ve Ukrayna izolatlarına ait RT-PCR ürünlerinin elektroforez jel görüntüsü 1: Ukrayna *Berberis thunbergii* izolatu, 2: Ukrayna *B. thunbergii* izolatu, 3: Ukrayna gül izolatu , 4: Ukrayna elma izolatu (Vnucka), 5: Türk elma izolatu (Granny Smith), 6:Sağlıklı elma, W: Su kontrol, M: Markör, (Fermentas 100bp plus)

*Figure 2-Electroforetic gel of RT-PCR amplicons of Turkish and Ukrainian isolates 1: Ukraine *Berberis thunbergii* isolate, 2: Ukraine *B. thunbergii* isolate, 3: Ukraine rose isolate , 4: Ukraine apple isolate (Vnucka), 5: Turkish apple isolate (Granny Smith), 6: healthy apple, W: Water control, M: Marker (Fermentas 100bp plus)*



Şekil 3-Türk ve Ukrayna Elma mozaik virüsü izolatlarına ait dendrogram

Figure 3-Dendogram of Turkish and Ukrainian Apple mosaic virus isolates

Score = 388 bits (210), Expect = 7e-113

Identities = 214/216 (99%), Gaps = 0/216 (0%)

Strand=Plus/Plus

Query 1

TGGAGGATTACGATGAGAGTAATCCGAAAGGTCCGAATCCGATGGACCGAAAGGGTTTCA 60

|||||

Sbjct 167

TGGAGGATTACGATGAGAGTAATCCGAAAGGTCCGAATCCGATGGACCGAAAGGGTTTCA 226

Query 61

AAAAGGACCAACCGAGAGGTTGGCAGTGGGAAGCCCCCTCCAAACACAACCTTTTGATGACT 120

|||||

Sbjct 227

AAAAGGACCAACCGAGAGGTTGGCAGTGGGAAGCCCCCTCCAAACACAACCTTTTGATGACT 286

Query 121

TCGTGAGGAAGTTTAGGTTGGTGTGGAGTTTAAGACGAATTTTCGCCGCTGGTGCGAAAG 180

|||||

Sbjct 287

TCGTGAGGAAGTTTAGGTTGGTATTGGAGTTTAAGACGAATTTTCGCCGCTGGCGCGAAAG 346

Query 181 TCTTTATGAGGGATTTGTACGTGATAACGAGTGAGT 216

|||||

Sbjct 347 TCTTTATGAGGGATTTGTACGTGATAACGAGTGAGT 382

Şekil 4-Türk izolatu (Isparta-Eğirdir) sekansı ile Ukrayna Elma izolatının Blast analizi

Figure 4-Blast analysis of Turkish (Isparta-Eğirdir) and Ukrainian apple isolates

Yeni Zelanda izolatları ise farklı bir genotip olarak gözlenmiştir (Şekil 3). Türk ApMV izolatlarından elma ve fındık izolatları aynı genotiplerde yer almaktadır. NCBI web sitesinde ApMV Ukrayna izolatu FJ752493.1 kodu ile, Türk ApMV izolatları ise GU 939596-GU 939610 kodları ile yer almaktadır. Ukrayna ve Türk elma izolatlarına ait sekanslar birbirleri ile NCBI' da Blast analizi ile karşılaştırıldıklarında, birbirlerine %99 oranında benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. Ancak bizim 143 ve onların 309., bizim 173. ve onların 339. nükleotidlerinde mutasyonlar mevcuttur (Şekil 4).

Ele alınan bu çalışma ile ülkemizde ve Ukrayna'da, başta elma olmak üzere çeşitli

ürünlerde sorun olan ApMV enfeksiyonunun moleküler olarak tanımları yapılmış ve elde edilen sekans dizileri birbiri ile karşılaştırıldığında her iki diziliminde birbiri ile benzer oldukları belirlenmiştir. Yurdumuzda elma mozaik virus hastalığının ELISA ve RT-PCR yöntemi ile tanısı çeşitli araştırmacılar tarafından başarı ile yapılmış (Çağlayan et al 2003; Gümüş et al 2005; Sökmen et al 2008; Akbaş & İlhan 2005; Yılmaz et al 2006; Yardımcı et al 2006; Dursunoğlu & Ertunç 2008; Yardımcı & Culal 2009), hastalığın ilk olarak RT-PCR yöntemi ile saptanması ise Ulubas & Ertunç (2003) tarafından gerçekleştirilmiştir. Ancak ele alınan bu araştırma ile ApMV etmeninin moleküler olarak tanısının yanı sıra

findık ve elma izolatlarında moleküler karakterizasyonu da yapılmış bulunmakta ve Türk izolatları, Ukrayna izolatları ile karşılaştırılarak genomdaki farklılık, tek nükleotid polimorfizm şeklinde ortaya konulmaktadır. Ortaya konan bu bulgular ışığında, özellikle her iki ülkenin karantina servisleri tarafından da rahatlıkla kullanılacak olan, ApMV'nin hızlı ve güvenilir bir şekilde, vegetasyonun her döneminde tespitine yönelik yöntemler belirlenmiş olmaktadır.

4. Sonuçlar

Sonuç olarak, *Elma mozaik virusu* Türkiye ve Ukrayna izolatlarının moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Etmen ülkemizde elma (*Granny smith*), findık ve yağ gülünde yaygındır. RNA izolasyonunda elma örneklerinde Menzel et al (2002) yöntemi, Berberis, gül ve findıkta ise Rott & Jelkman (2001) yöntemi daha başarılı sonuçlar vermiştir. RT-PCR' da, tüm RNA örnekleri, Menzel'in primeri ile affinite göstermiş ve amplifiye olmuşlardır. Amplifikasyon sonucunda, 262 bp büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir. Tüm amplifikasyon ürünleri, *Hinf I*, *BamH I*, *Ava I*, *Ssp I*, *EcoR I*, *Rsa I*, *Hind III*, *Hinc II* enzimleri ile enzimatik kesime tabi tutulmuşlardır. RT-PCR ürünleri, *Hinf I*, *BamH I*, *Ava I*, *Ssp I* enzimleri ile kesime maruz kalmış, diğer enzimlerle bir sonuç elde edilememiştir. Gerçekleştirilen bu araştırma ile Türk izolatları, Ukrayna izolatları ile karşılaştırılarak genomdaki farklılıklar, ortaya konulmaktadır. Yapılan Blast analizinde, her iki ülke izolatlarının birbirine oldukça benzer oldukları ve %99 oranında birbirine benzedikleri saptanmıştır. Ortaya konan bu bulgular ışığında, özellikle her iki ülkenin karantina servisleri tarafında da rahatlıkla kullanılacak olan, ApMV'nin hızlı ve güvenilir bir şekilde, vegetasyonun her döneminde tespitine yönelik yöntemler belirlenmiş olmaktadır.

Teşekkür

Bu araştırmayı 107O323 kodlu Türkiye-Ukrayna İkili işbirliği projesi çerçevesinde destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Alrefai R H, Shiel P J, Domier L L, D' Arcy C J, Berger P H & Kobran S S (1994). The nucleotide sequence of apple mosaic virus coat protein no similarity of with other Bromoviridae coat protein genes. *Journal of General Virology* **75** (10): 2847-2850
- Akbaş B, İlhan D & Atlamaz A A (2004). Preliminary Survey of Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Viruses in Turkey. Proceedings of 6 th Int. Congress on Hazelnut. 14-18 June, Tarragona-Reus, Spain.
- Akbaş B & İlhan D (2005). Widespread distribution of *Apple mosaic virus* on apple in Turkey. *Plant Disease* **89** (9): 1010
- Akbaş B & Değirmenci, K (2009). Incidence and natural spread of ApMV on hazelnut in west Black Sea coast of Turkey and its effects on yield. *Journal of Plant Pathology* **91** (3):767-771
- Akbaş B & Degirmenci, K (2010). Simultaneous detection of Apple mosaic virus in cultivated hazelnuts by one-tube RT-PCR. *African Journal of Biotechnology* **9** (12):1753-1757
- Brunt A, Crabtree K, Dallwitz M, Gibbs A & Watson L (1996). *Viruses of Plants*, CAB International, 1484 p
- Clark M & Adams A M (1977). Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* **34**: 475-483
- Çağlayan K, Ulubaş Ç, Gazel M & Jelkmann W. (2003). First report on molecular identification of apple viruses in Turkey. *Journal of Turkish Phytopathology* **32** (2): 57-61
- Dursunoğlu S & Ertunç F (2008). Distribution of *apple mosaic ilarvirus* in Turkey. *Acta Horticulturae* **781** :131-135
- Gentit P, Brans Y & Ramat C (2009). Susceptibility of a range of hazelnut cultivars to apple mosaic virus. *21 st Int. Cong. on Virus and other Graft Transmissible Disease of Fruit Crops*. 5-1- July 2009, Neustadt, Germany
- Guo D, Maiss E, Adam G & Casper R (1995). Prunus necrotic ringspot ilarvirus: nucleotid sequence of the relationship to other ilarviruses based on coat protein comparison. *Journal of General Virology* **76** (5): 1073-1079
- Gümüş M, Paylan I, Al-Rwahneh M & Mryta A. A (2008). Preliminary survey for viruses and viroids of western Anatolia cherry industry in Turkey. *Acta*

- Horticulturae* (Proceedings of the fifth International Cherry Symposium, Bursa, 6-10 Haziran 2005): 943-945
- Kobylko T & Nowak B (2006). Detection and occurrence of *Apple mosaic virus* in hazelnut in south-east Poland. *Journal of Plant Pathology* **88** (1): 122
- Köksal İ, Okay Y, Demirsoy L, Demirsoy H, Sedar Ü, Tuna N & Özüpek Ö (2010). Meyve üretimi geliştirilme yöntem ve hedefleri. *Türkiye Ziraat Mühendisliği 7. Teknik Kongresi* (4-8 Ocak 2010 Ankara) 457-476
- Menzel N, Jelkman W & Maiss E (2002). Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant m-RNA as internal control. *Journal of Virological Methods* **99**: 89-92
- Öksüz T, Sipahioğlu H M & Usta M (2009). Direct submission to NCBI, Locus no: GU 048907
- Piskornik Z, Kobylko T, Nowak B(2002). Detection of Apple mosaic virus (ApMV) on hazelnut (*Corylus sp.*) in Poland. *Phytopathologica Polonica* **23**: 31-37
- Rohlf F J (1998). NTSY Spc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version.2. Applied Biostatistics Inc
- Rott M E & Jelkman W (2001). Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry, adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR) and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal Plant Pathology* **107** :411-420
- Sanchez-Navarro J A & Pallas V (1994). Nucleotide sequence of Apple mosaic ilarvirus RNA 4. *Journal of General Virology* **75**(61) :1441-1445
- Sanchez-Navarro J A & Pallas V (1997). Evolutionary relationship in the ilarviruses nucleotid sequence of *Prunus necrotic ringspot virus* RNA-3. *Archives of Virology* **14**: 749-763
- Shiel P J, Alrefai R H, Domier L L, Kobran S S & Berger P H (1995). The complete sequence of *Apple mosaic virus* RNA-3. *Archives of Virology* **140** :1247-1256
- Shiel P J & Berger P H (2000). The complete nucleotid sequence of ApMV RNA1 and RNA 2: ApMV is more closely related to *Alfalfa mosaic virus* than to other İlarviruses. . *Journal of General Virology* **81**: 273-278
- Sökmen M A (2003). A preliminary study on molecular differentiation of apple and hazelnut isolates of *Apple mosaic virus* (ApMV). *Journal of Turkish Phytopathology* **32** (3): 115-123
- Sökmen M A, Yılmaz N D K, Mennan H & Sevik M A (2005). Natural weed hosts of *Apple mosaic virus* in hazelnut orchards in Turkey. *Journal of Plant Pathology* **87** (3): 239-242
- Ulubaş Ç & Ertunç F (2003). The Use of RT-PCR for specific detection of *Apple mosaic virus* (ApMV) in apple. *Journal of Turkish Phytopathology* **32** (2): 91-97
- Yardımcı N, Çevik B & Eryiğit H (2006). Detection of *apple mosaic virus* on apple cultivars in south-west Turkey by ELISA and RT-PCR methods. *Proceedings, 20th Int. Symposium On Virus And Virus-Like Diseases Of Temperate Fruit Crops*, 22-26 Mayıs 2006, Antalya
- Yardımcı N & Culal H (2009). Occurrence and incidence of *Prunus Necrotic Ringspot Virus*, *Arabis Mosaic Virus* and *Apple Mosaic Virus* in oil rose in lakes region of Turkey. *New Zealand Journal of Crop And Horticultural Science* **37** (2): 95-98
- Yılmaz N D K, Yanar Y, Kadioğlu I & Yanar D (2005). Study on distribution of *Apple mosaic virus* in apple orchards in Tokat province. *19 Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* **20** (3): 12-15