

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Gülcan TARLA

DOKTORA TEZİ

**ADANA VE MERSİN İLLERİNDE ASMA KISA BOĞUM VİRÜS
HASTALIĞININ BAĞLARDA VE VİRÜS VEKTÖRÜ NEMATODLARDA
SEROLOJİK VE PCR YÖNTEMLERİYLE BELİRLENMESİ**

BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI

170556

ADANA, 2005

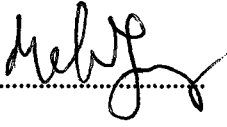
**ADANA ve MERSİN İLLERİNDE ASMA KISA BOĞUM VİRÜS
HASTALIĞININ BAĞLARDA VE VİRÜS VEKTÖRÜ NEMATODLARDA
SEROLOJİK VE PCR YÖNTEMLERİYLE BELİRLENMESİ**

Gülcan TARLA

DOKTORA TEZİ

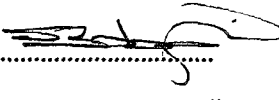
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI

Bu tez 07/02/2005 Tarihinde Aşağıda Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir

İmza : 

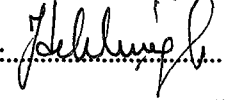
Prof. Dr. M. Asil YILMAZ

DANIŞMAN

İmza : 

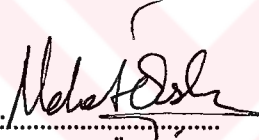
Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU

ÜYE

İmza : 

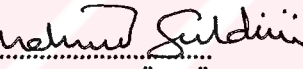
Prof. Dr. Halil ELEKÇİOĞLU

ÜYE

İmza : 

Doç. Dr. Mehmet ÖZASLAN

ÜYE

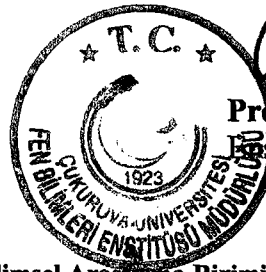
İmza : 

Doç. Dr. Mehmet GÜLDÜR

ÜYE

Bu tez Enstitümüz Bitki Koruma Ana Bilim Dalında Hazırlanmıştır.

Kod No: 881



Prof. Dr. Fikri AKDENİZ
Enstitü Müdürü

**Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FBE.2002. D. 04**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İçindekiler

Öz.....	I
Abstract	II
Teşekkür.....	III
Simgeler ve Kısaltmalar.....	IV
Çizelgeler Dizini.....	VI
Şekiller Dizini.....	VII
1.GİRİŞ.....	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
2.1. Asma Kısa Boğum Virüsünün Genel Özellikleri.....	5
2.2. Asma Kısa Boğum Virüsü ile İlgili Ülkemizde Yapılan Çalışmalar.....	6
2.3. Asma Kısa Boğum Virüsü ile İlgili Dış Ülkelerde Yapılan Çalışmalar.....	9
2.4. Bağlarda Zararlı Vektör <i>Xiphinema</i> 'ların Genel Özellikleri.....	16
2.5. Vektör Nematodlar ile İlgili Ülkemizde ve Dış Ülkelerde Yapılan Çalışmalar.....	16
3.MATERYAL VE METOD.....	22
3.1. Materyal.....	22
3.1.1. Virüs Çalışmalarında Kullanılan Materyaller.....	22
3.1.2. Nematod Çalışmaları İçin Gerekli Materyaller.....	23
3.2. Metod.....	23
3.2.1. Asma Kısa Boğum Virüsü ile İlgili Çalışmalar.....	23
3.2.1.1. Arazide Gözlemler ve Örnek Toplama Çalışmaları.....	23
3.2.1.2. Laboratuvar ve Sera Çalışmaları.....	24
3.2.1.2.(1). DAS-ELISA.....	24
3.2.1.2.(2). Otsu Konukçulara Mekanik İnokulasyon.....	25
3.2.1.3. Bağlarda Virüs ile İlgili Moleküler Çalışmalar.....	26
3.2.1.3.(1). Total RNA Ekstraksiyonu.....	26
3.2.1.3.(2). Reverse Transkription.....	28
3.2.1.3.(3). PCR.....	28
3.2.1.3.(4). Elektroforez.....	29

3.2.2. Nematodlar ile İlgili Çalışmalar.....	30
3.2.2.1. Virüs Vektörü Nematodlar ile İlgili Arazi Çalışmaları.....	30
3.2.2.2. Nematodlarla İlgili Laboratuvar Çalışmaları.....	30
3.2.2.2.(1). Nematodların Topraktan İzolasyonu.....	30
3.2.2.2.(2). Nematodların Bünyesinde Virüsün Serolojik Testlerle Belirlenmesi.....	31
3.2.2.2.(3). Nematodlarda Virüsler ile İlgili Moleküler Çalışmalar.....	32
3.2.2.2.(4). Nematodların Daimi Preparatlarının Yapılması ve Teşhis Edilmesi.....	32
4. ARAŞTIRMA BULGULAR VE TARTIŞMA.....	33
4.1. Asma Kısa Boğum Virüsü ile İlgili Çalışmalar.....	33
4.1.1. Arazide Gözlemler ve Örnek Toplama Çalışmaları.....	33
4.1.2. Laboratuvar Çalışmaları.....	36
4.1.2.1. DAS-ELISA.....	36
4.1.2.2. PCR.....	40
4.1.3. Mekanik İnokulasyon Çalışmaları.....	42
4.2. Nematodlar İle İlgili Çalışmalar.....	44
4.2.1. Virüs Vektörü Nematodlar ile İlgili Arazi Çalışmaları.....	44
4.2.2. Laboratuvar Çalışmaları.....	46
4.2.2.1. Nematodların Topraktan İzolasyonu.....	46
4.2.2.2. Serolojik Çalışmalar.....	52
4.2.2.3. Nematodlarda Virüsler ile İlgili Moleküler Çalışmalar..	53
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....	73
EKLER.....	74

ÖZ

DOKTORA TEZİ

**ADANA VE MERSİN İLLERİNDE ASMA KISA BOĞUM VİRÜS
HASTALIĞININ BAĞLARDA VE VİRÜS VEKTÖRÜ NEMATODLARDA
SEROLOJİK VE PCR YÖNTEMLERİYLE BELİRLENMESİ**

Gülcan TARLA

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI**

Danışman : Prof. Dr. Mehmet Asil YILMAZ

Yıl: 2005, Sayfa:81

Jüri : Prof. Dr. Mehmet Asil YILMAZ

Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU

Prof. Dr. İ. Halil ELEKÇİOĞLU

Doç. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Doç. Dr. Mehmet GÜLDÜR

Bağcılık ülkemizde önemli bir tarım sektörüdür. Türkiye’de toplam mevcut bağ üretim alanı 565.000 hektar ve ortalama üretim 6.46 ton/ha dır. Ancak üretim miktarı diğer Akdeniz ülkelerinden elde edilen ürün miktarından daha düşüktür. Bunun temel nedeni özellikle Asma kısa boğum virüsü (GFLV) olmak üzere bölgemizde bağlara zarar veren virüs hastalıklarıdır. Bu hastalıklar içerisinde GFLV en önemli yeri işgal etmekte, aşı ve vektör nematodlarla taşınmaktadır. Ülkemizde bağlarda vektör nematodlar ve virüs-nematod ilişkisi konusunda yeterince detaylı araştırma yapılmamıştır.

Bu çalışmada Adana ve Mersin çevresindeki bağ bitkilerinde ve vektör nematodların bünyesinde GFLV’nin varlığı ve bulunduğu alanlar serolojik ve moleküler yöntemler ile araştırılmıştır. Araziden getirilen toplam 384 bağ örneğinden 63 (% 16.4) tanesinin virüs ile bulaşık olduğu DAS-ELISA yöntemiyle saptanmıştır.

Vektör nematod *Xiphinema index* Thorne et Allen’in bulunduğu bağ alanları ve bunların populasyon yoğunlukları saptanmıştır. Bağlarda bitkilerin rizosfer bölgesinden alınan 307 adet toprak örneğinden sırasıyla 66’sında (% 21.5) *X. index* ve 275’inde (% 89.6) *Xiphinema pachtaicum* (Tulaganov) bulunmuştur. GFLV yalnızca *X. index* türü nematodlarda serolojik olarak ve RT-PCR yöntemi ile saptanmıştır.

Buna ek olarak, laboratuvar koşullarında GFLV mekanik inokulasyon testleriyle çok sayıda otsu indikatör bitki arasında yalnızca *Nicotiana benthamiana* Domin.’ya taşınmıştır.

Anahtar kelimeler: Bağ, GFLV, ELISA, PCR, *Xiphinema*,

ABSTRACT

PhD THESIS

THE DETECTION of GRAPEVINE FANLEAF VIRUS in GRAPEVINE and ITS VECTOR NEMATODES USING by SEROLOGICAL and PCR METHODS in ADANA and MERSİN REGIONS

Gülcan TARLA

DEPARTMENT of PLANT PROTECTION
INSTITUTE of NATURAL and APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY of ÇUKUROVA

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Asil YILMAZ

Year: 2005, page: 81

Jury : Prof. Dr. Mehmet Asil YILMAZ

Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU

Prof. Dr. Halil ELEKÇİOĞLU

Doç. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Doç. Dr. Mehmet GÜLDÜR

The production of grapevine is important agricultural sector in Turkey. The total grapevine area is 565.000 hectare and the mean production is 6.46 ton/ha in Turkey. But, the production is lower than the other Mediterranean countries. The main reason of low yield is the effects of virus diseases on the host especially grapevine fanleaf virus (GFLV) in our region. It has been the most important virus among them and transmitted by graft and vector nematodes. There is not enough detailed research on the vector nematode and virus relation in Turkey.

In this study, determination of GFLV and their occurrence areas were studied by serological and molecular techniques in grapevine and vector nematodes in Adana and Mersin Provinces. It is found that 63 (16.4 %) samples from total 384 grapevine samples collected from vineyards were infected with virus by DAS-ELISA method. The occurrence areas of vector nematodes and their population densities in the GFLV infected vineyards were detected. Of 307 soil samples collected from the rhizosphere of grapevine, 66 (21.5 %) and 275 (89.6 %) were positive for *Xiphinema index* Thorne et Allen and *X. pachtaicum* Tulaganov, respectively. GFLV is found only in *X. index* by DAS-ELISA and RT-PCR.

In addition to this, GFLV is transmitted only to *Nicotiana benthamiana* Domin. among lots of weedy indicator plants by mechanical transmission.

Key Words: Grapevine, GFLV, ELISA, PCR, *Xiphinema*

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bana yol gösteren, araştırmanın düzenlenmesi, gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesi sırasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Asil YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin çalışma konusunun belirlenmesinde vermiş olduğu değerli katkılarından dolayı Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Sayın Doç.Dr.Mehmet ÖZASLAN'a, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi öğretim üyesi Sayın Prof.Dr.Halil ELEKÇİOĞLU'na, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm hocalarıma ve tüm çalışanlarına, laboratuvar çalışmalarında yardımlarından dolayı Yük.Zir.Müh. Behçet Kemal. ÇAĞLAR'a ve Mustafa Kemal Üniversitesi'nde Yrd.Doç.Dr. Çiğdem ULUBAŞ'a, Adana'da Ç.Ü. Döner Sermaye bağlarındaki çalışmaların yürütülmesiyle ilgili yardımlarından dolayı sayın Ramazan PARLAR'a, çalışma süresince ilgi ve yardımlarını esirgemeyerek araç teminini sağlayan İçel Tarım İl Müdürlüğü ve Tarsus Tarım İlçe Müdürlüğü çalışanlarına, sabır ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili eşim Şener, kızım Çağla ve oğlum Çağdaş'a ve maddi desteklerinden dolayı Ç.Ü. Bilimsel Araştırmaları Destekleme Birimi ve Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü'ne ve çalışanlarına teşekkürlerimi borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

µl	micro liter
AMV	Arabis Mosaic Virus
AP	Alkaline phosphatase
ArMV	Arabis Mosaic Virus
AVB	Arracacha Virus
BSA	Bovine Serum Albumin
bp	base pair
cc	cubic centimeter
cDNA	complementer DNA
CLRV	Cherry Leafroll Virus
CP	Coat Protein
DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich ELISA
Dk	Minute
DNA	Deoksiribo Nucleic Acid
dNTP	Deoksi Nucleotide Tree Phosphate
DP	Dichloropropene
EDTA	Ethylendiamino Tetra-Acetic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
F(ab') ₂	antibody fragment
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
g	gram
GFkV	Grapevine Fleck Virus
GFLV	Grapevine Fanleaf Virus
GLRV	Grapevine Leafroll Virus
GLRV-I	Grapevine Leafroll Associated Virus-I
GLRV-III	Grapevine Leafroll Associated Virus-III
GLRVs	Grapevine Leafroll Associated Viruses
GNV	Grapevine Necrotic Virus

GVA	Grapevine Virus A
IC-RT-PCR	Immuno Capture Reverse Transcriptase PCR
kg/ha	kilogram/hectare
KOAc	Potassium acetate
MeBr	methyl bromide
MgCl	Magnesium Chloride
ml	milliliter
M	Molar
mm	milimeter
NaOAc	Sodium acetate
nm	nanometer
RNA	Ribo Nucleic Acid
PBRSV	Patato Black Ringspot Virus
PBS	Phosphate Buffer Salt
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pr1	Primer 1
Pr2	Primer 2
rpm	round per minute
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SLRV	Strawberry Latent Ring Spot Virus
TAE	Tris-acetate EDTA
TAF	triethanolamin Formaldehyde
TBRV	Tobacco black ring virus
Tris-HCl	Tris-Hidrochloride

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge No	Sayfa No
Çizelge 3.1. Mekanik inokulasyonlarda kullanılan otsu indikatör bitkiler.....	26
Çizelge 4.1. Örneklerin alındığı yerlere göre 2002-2003 yıllarında toplam alınan örnek sayısı, Asma kısa boğum virüsü ile bulaşık örnek sayısı ve bulaşıklık oranı (%)......	37
Çizelge 4.2. Araştırmanın yürütüldüğü alanlarda 2002-2003 yıllarında bağlardan alınan toprak örneklerinde saptanan <i>Xiphinema</i> cinsi nematod türleri ve bulaşıklık oranları (%)......	46
Çizelge 4.3. Mersin ilinde 2002-2003 yıllarında bağ alanlarından alınan toprak örneklerinde saptanan <i>Xiphinema</i> cinsi nematod türleri ve bulaşıklık oranı (%)......	47
Çizelge 4.4. Tarsus ilçesinde 2002-2003 yıllarında bağ alanlarından alınan toprak örneklerinde saptanan <i>Xiphinema</i> cinsi nematod türleri ve bulaşıklık oranı (%)......	48
Çizelge 4.5. Adana-Balcalı'da 2002-2003 yıllarında bağ alanlarından alınan toprak örneklerinde saptanan <i>Xiphinema</i> cinsi nematod türleri ve bulaşıklık oranları (%)......	49
Çizelge 4.6. Araştırmanın yürütüldüğü alanlarda 2002-2003 yıllarında <i>Xiphinema index</i> ile bulaşık toprak örneklerinde populasyon (ortalama $\pm$ standart hata) yoğunluğu (t-testi, p=0.05)......	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 3.1. Araştırmada örneklerin alındığı il ve ilçeler.....	24
Şekil 3.2. DAS-ELISA ile teslemelerde pozitif sonuç veren örneklerin plate üzerinde gözle görülebilen sarı renk oluşumu.....	25
Şekil 3.3. Mekanik inokulasyonlarda kullanılmak üzere iklimlendirme odasında yetiştirilen otsu indikatör bitki fideleri.....	26
Şekil 4.1. Asma kısa boğum virüsü ile bulaşık asma sürgününde zigzag görünüm ve boğum kısalması.....	34
Şekil 4.2. Asma kısa boğum virüsü ile bulaşık asma sürgününde yassılaşıma.....	34
Şekil 4.3. Asma kısa boğum virüsü ile bulaşık bitki yaprağında sararma (A), yaprakta şekil bozukluğu ve kenar diş sayısının artması (B).....	35
Şekil 4.4. Asma kısa boğum virüsü ile bulaşık omcada salkımların seyrek tutumu ve irili ufaklı dane teşekkülü (boncuklanma).....	35
Şekil 4.5. Asma kısa boğum virüsü ile bulaşık yaprakta tipik mozaikleşme (A), damar bandlaşması ve simetri bozulması (B).....	36
Şekil 4.6. Adana-Balcalı'dan alınan, bağdan ve 2 nematod örneğinden ekstrakte edilen GFLV F-13 ırkının RNA-2 preparatının RT-PCR ile çoğaltılan 780 bp'lik bir sekansının agaroz jel (% 1) elektroforezde oluşturduğu bandlar; 1 ve 2: <i>Xiphinema index</i> , 3: sağlıklı örnek (negatif kontrol), 4: bağ örnekleri, M: Marker.....	41
Şekil 4.7. Asma kısa boğum virüsü ile aşılanan <i>Nicotiana benthamiana</i> test bitkilerinin yapraklarında klorotik lokal lezyonlar.....	43
Şekil 4.8. Asma kısa boğum virüsü ile aşılanan <i>Nicotiana benthamiana</i> test bitkisinin yaprağında klorotik lokal lezyonların yakından görünümü.....	43
Şekil 4.9. Nematod ile bulaşık bağ bitkilerde kılcal köklerinin azalması.....	45

1. GİRİŞ

Anavatanı Anadolu olarak bilinen asmanın (*Vitis vinifera* L.) geçmiş arkeolojik bulgulara göre binlerce yıl öncesine dayanmaktadır. Asma bitkisinin kültüre alınması M.Ö. 6000-6500 yıllarında Anadolu ve Kafkasya'da başlamış ve buradan da tüm dünyaya yayılmıştır (Çelik ve ark., 1998). Ülkemizde bağcılık tarımsal bir işkolu olarak önemini korumaktadır. Ülkemizde taze yada kuru üzüm olarak veya bir çok sanayi kolunda (pekmez, şarap, sirke vs.) hammadde olarak tüketilen üzüm, şeker, nitrojen, mineral maddeler ve vitamin içeren önemli bir gıda maddesidir.

Türkiye'de 2003 yılı verilerine göre mevcut bağ alanı 565.000 hektar ve üzüm üretimi de 3.6 milyon ton dolayındadır (Anonymous, 2003a). Ortalama üretim 6.46 ton/ha üretim ile diğer Akdeniz ülkelerinden daha düşüktür. Ülkemizde bağcılığın istatistiksel rakamlara göre son 30 yıldır giderek gerilediği bilinen bir gerçektir. FAO kayıtlarına göre ülkemiz 1970 yılında dünyanın 3. büyük üzüm üreticisi iken 1990'lı yılların başlarında 12. sıraya gerilemiştir. (Anonymous, 2003a).

Ülkemizde Akdeniz Bölgesi bağ üretimi bakımından ikinci sırada yer almaktadır. Bölgenin yüksek kesimi geç yetişen çeşitler ve denize yakın ova kesimi ise erken yetişen çeşitlerin üretimi bakımından önem kazanmıştır. Bu bölge üzümlerin olgunlaşması bakımından Türkiye'nin en erkenci bölgesidir. Çalışmanın yürütülmüş olduğu illerden biri olan Mersin yaklaşık 19.000 ha ve 175.000 ton üzüm üretimiyle bölge bağcılığında önemli bir yere sahiptir (Anonymous, 2003b). Diğer bir il olan Adana ise yaklaşık 5.000 ha ve 33.000 ton üzüm üretimi ile bölgeye katkı sağlamaktadır (Anonymous, 2003c).

Çok sayıda araştırmacının rapor ettiği üzere verim düşüklüğünün başlıca nedeni, bitkilerin bir çok virüs ve virüs benzeri hastalıklardan etkilenmesidir. Bağlarda hijyenik önlemlerin (sanitasyon) zayıf olması ise bu hastalıkların oluşmasında en önemli etkidir (Tekinel ve ark., 1971; Azeri, 1983; Martelli, 1987; Özasan ve Yılmaz, 1995; Çağlayan, 1997; Yılmaz ve ark., 1997; Akbaş ve Erdiller, 1998; Köklü ve ark., 1998; Çiğsar ve Yılmaz, 2000).

Bitki virüslerinin büyük çoğunluğunun doğal konukçusu yabani bitkilerdir. Ancak genellikle yalnızca kültür bitkilerine taşındıkları zaman üreticilerin yada virologların dikkatini çekmektedir. Virüsler bitkiler arasında taşınmasında genellikle bir böcek bazen bir fungus yada nematod gibi vektör organizmaya gereksinim duymaktadır (Stuart, 2003). Ülkemizde bağlarda üretimi sınırlayan faktörlerin başında virüslerin ayrı önemi vardır. Bazı patojenlerin neden oldukları zararlar ihmal edilebilir olmasına rağmen sadece bilimsel merak nedeniyle araştırılmaktadır. Buna karşılık özellikle nepovirüsler verim ve kalite kaybına neden olan önemli hastalık etmenleridir (Martelli, 1999). Bağlarda virüs hastalıklarının salkım ve dane ağırlığı üzerine % 37.9 ile % 45.0 oranlarında etki yaptığı saptanmıştır (Özaslan, 1998a). Virüsler infeksiyondan çok uzun zaman sonra çevre, konukçu ve patojen ilişkilerine bağlı olarak gözle görülebilir belirtiler yada latent olarak infeksiyon oluşturabilirler. Bu durumda omcanın virüs yada virüslerle bulaşık olup olmadığı yapılacak detaylı ve pahalı laboratuvar çalışmalarıyla ortaya konulabilmektedir.

Ülkemizde bağ virüsleriyle ilgili çalışmalar 1950'li yıllarda başlamıştır. Serolojik ve biyolojik indekslemeler ile yapılan çalışmaların sonucunda Türkiye'de bu güne kadar bağlarda 14 virüs hastalığının bulunduğu saptanmıştır (Akdoğan, 1956; Erdiller, 1982; Martelli, 1987; Azeri ve ark., 1988; Gürsoy, 1988; Akbaş ve Erdiller, 1993; Özaslan, 1991, 1993, 1995; Çiğsar, 2002). Akdeniz, İç Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde bulunan bazı illerimizdeki bağlarda yapılan araştırmalar sonucunda özellikle yaygın olan virüs hastalıkları içerisinde Asma kısa boğum virüsünün (GFLV) % 46.9'ya varan bulaşıklık oranı ile ilk sırada yer aldığı belirlenmiştir (Akdoğan, 1956; 1958; 1965; Erdiller, 1982; Martelli, 1987; Azeri ve Fidan, 1988; Gürsoy, 1988; Özaslan ve ark., 1991, 1993, 1995; Akbaş ve Erdiller, 1993; Azeri ve Çiçek, 1995; Çiğsar ve Yılmaz, 1998; Köklü, 1999; Çiğsar, 2002; Çiğsar ve ark., 2002;). Asma kısa boğum virüsü dünyada *V. vinifera*'nın ekonomik olarak en çok öneme sahip olan çift partiküllü, pozitif yüklü ve tek sıra dizilimli bir nepovirüsdür (Goheen, 1977, 1989). Dünyada GFLV'nin genetiksel dizilimi oldukça çeşitlilik gösterir (Serghini ve ark., 1990; Sanchez ve ark., 1991; Esmenjaud ve ark., 1994; Brandt ve ark., 1995). Nükleotid dizilimi % 8–12

arasında olup amino asit dizilimi ise % 2-4 arasında değişiklik gösterir. Bu durum virüsün yelpaze yapraklılıktan, yapraklarda sarı mozaikleşme yada damar bandlaşması gibi simptomlarındaki çeşitliliğinin genetiksel yapısından kaynaklanabileceğini desteklemektedir (Krake ve ark., 1999). Başka bir araştırmaya göre ise *V. vinifera*'dan elde edilen GFLV'nin 14 farklı izolatu arasında nükleotid diziliminde % 13 ve amino asit diziliminde ise yine % 13'e varan farklılık kaydedilmiştir (Naraghi-Arani ve ark., 2001).

Asma kısa boğum virüsü tüm çeşitler üzerinde genel olarak ürün kaybına, ürünün kalitesinin bozulmasına ve bulaşık olan bitkilerin ömürlerinin kısalmasına neden olmaktadır (Çiğsar, 2002; Fuchs, 2003). Ancak ülkemizde bu güne kadar başarıya ulaşmış bir virüs hastalığı mücadele programı oluşturulmamıştır. Bunun doğal sonucu olarak virüs hastalıkları bitkilerin ömrünün kısalmasına, ürünün kalitesinde azalmalara, generatif sürenin ve materyallerin azalmasına, aşı tutma oranının azalmasına ve aynı zamanda üründe şeker içeriğinin dolayısıyla da pazar değerinin düşmesine neden olmaktadır (İnal, 1983; Martelli ve Savino, 1988; Özaslan ve ark., 1991; Akbaş ve ark., 1993). Meyve verimi üzerine etkileri konusunda ülkemizde yapılan çalışmalarda verim düşüklüğünün Kahramanmaraş ili bağlarında % 45.4, Gaziantep'de % 37.8 ve Kilis'de ise % 43.0 dolayında olduğu bildirilmiştir (Özaslan ve ark., 1991; 1993; 1998).

Üreticiler için asıl sorunu virüs vektörü nematodlar oluşturmakta ve bunların sayesinde virüsler çok uzun yıllar toprakta varlığını sürdürebilmektedir (Derek ve Stuart, 2001). Bağlarda GFLV'nin yayılması bulaşık materyal ve doğada yalnızca vektörleri olan nematodlar tarafından gerçekleştirilmektedir (Savino, 1998). Bazı özel virüs izolatlarının yalnızca belirli bir nematod türü ile taşıyıyor olabilmesi hastalık etmeni ile vektörünün arasında birbirine özelleşmenin var olduğunu göstermektedir (Ploeg ve ark., 1992a,b). Asma kısa boğum virüsünün epidemiolojisinde vektör nematodlar virüsü bitkiden bitkiye yayarlar ve virüs yeni bir çevreye (biotipe) bulaştığında bir rezervuar olarak önemli rol oynarlar (Arias ve ark., 2000). Ülkemizde daha önceden nematod türleri arasında *Xiphinema index* Thorne et Allen'in GFLV'yi taşıdığı bildirilmesine rağmen (Martelli, 1991) bu konuda detaylı herhangi bir çalışma yapılmamıştır (Yılmaz, 1999). Bitki virüslerinin

bir nematod tarafından taşınmasına dair ilk kayıt GFLV'nin *X. index* tarafından taşınmasıdır (Hewitt ve ark., 1958). Virüsün taşınması hem *X. index* hem de *Xiphinema italiae* Meyl ile olmasına rağmen *X. index* daha etkilidir (Martelli ve Savino, 1988; Avgelis, 1997). Vektör nematodun 15 dakikadan az bir süre içinde hastalıklı bitki köklerinde beslenmesiyle virüsü yeniden bünyesine alması ve bunu takiben hiç beslenmeksizin 8 aya kadar bünyesinde barındırması mümkün olmaktadır (Taylor ve Robertson, 1975). Ancak, nematodların deri değiştirme dönemlerinde kütikulasının erimesi sırasında virüs kaybolmakta ve erginlerde virüs yumurtalara geçememektedir. Bunu takiben nematod her bir larva döneminde beslenme yoluyla yeniden virüsü bünyesine almaktadır. Vektör *X. index* sorunu ile mücadele amacıyla asma omcaları sökülerek uzaklaştırılmış olsa bile asma köklerinin bir kısmı toprakta kalmakta ve bunun sonucu en az 5 yıl süreyle bu kökler ve nematodlar hastalık kaynağı olarak hizmet etmeye devam etmektedir (Raski ve ark., 1965).

Bu çalışma ile, Adana ve Mersin illeri çevresindeki bağ üretim alanlarında zarara neden olan GFLV'nin ve vektör nematodların yayılma alanları ile yoğunlukları belirlenmiştir. Ayrıca bu hastalık bitkilerde ve vektör nematodların bünyesinde serolojik ve moleküler yöntemler ile saptanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**2.1. Asma Kısa Boğum Virüsünün Genel Özellikleri**

Asma kısa boğum virüsü Comoviridae familyasında nepovirüs cinsine dahil genellikle tek zincirli, pozitif duyarlıkta, RNA-1 ve RNA-2 olarak isimlendirilen iki adet RNA içeren, yaklaşık 30 nm çapında ($1 \text{ nm}=10^{-10} \text{ m}$, $1 \mu\text{m}=10^{-6} \text{ m}$) izometrik yapıya sahip olup bağlarda bilinen en eski virüs hastalıklarından birisidir. Ülkemizin hemen her bölgesinde yaygın olarak bulunmaktadır. Virüs aşıyla, mekanik inokulasyon ve nematodlar ile bulaşabilmektedir. Özellikle kumsal topraklarda, sıcak ve güneşli iklimlerde asmaları ölüme götürebilecek kadar tehlikeli olabilmektedir. Virüs çoğunlukla bulaşık olduğu asmalarda hızlı geriye ölüm yerine yavaş gelişen ve ürün üzerinde önemli kayıplara neden olan bir enfeksiyon seyrine sahiptir. Duyarlı *V. vinifera* çeşitlerinde Avrupa için zarar ortalama % 50, sofralık çeşitlerde ise irili ufaklı dane oluşumu nedeniyle üzümün ticari değerinin düşmesiyle % 80'e kadar yükselebilmektedir (Anonymous, 1999). Bütün *V. vinifera* varyeteleri bu virüse karşı duyarlıdır. Bu virüsün bağlı olduğu gurup tarafından bağlarda oluşturulan simptom tiplerine göre virüs ilkbahar sararmaları (mozayiklenme), damar bandlaşması ve odun anormallikleri (yada gerçek FAN LEAF) olmak üzere 3 farklı ırk altında toplanabilmektedir (Martelli, 1991). İnfekteli bitkilerde virüsün damar bandlaşması meydana getiren ırkı bazı asma varyetelerinin yapraklarında sarı damar bandlaşma belirtileri oluşturmaktadır. Bazı ırkları ise yaprak sararmaları, sarı mozaik ve şekil bozulmaları yapmaktadır. Yaprak damarları anormal gelişerek yaprağın yelpaze görünümü almasına neden olmaktadır. Yaprakların sapında yassılaşma ve birbirine yapışık iki sap oluşabilmektedir. Bir noktadan birden fazla yaprak yada sap oluşumu, sekonder gözlerin sürmesi gibi anormallikler sıkça rastlanan simptomlardır. Bazı asma çeşitlerinde yaprak sapındaki sinüs açısı büyüyerek yaprak ufalmakta ve darlaşmaktadır. Sürgünlerde ise daha kısa ve muntazam olmayan boğum araları oluşmaktadır. Çubuklarda zigzag gelişme, yassılaşma ve çatallaşmalar, çift dal, ikiden fazla dal oluşumu, çift koltuk oluşumları bu virüs için karakteristik

özelliklerdir. Ayrıca bağlarda yan dallar ana dallardan yaklaşık 90 derecelik bir açıyla çıkarken GFLV ile bulaşık omcalarda bu açıda daralmalar sonucu sapan çatalı oluşumları da gözlenebilmektedir. Bitki ince ve sık sürgünler verdiği için çalimsı bir görünüm almaktadır. Ayrıca bu hastalıkta karşılıklı çift göz ile salkımlarda, danelerde ve yaprak sapında yassılaşımlar yaygın olarak görülmektedir. Bu virüsün gövde çukurlaşma (stem pitting ve wood pitting) belirtileri oluşturan ırkları da bulunmaktadır. Salkımlarda dane silkme, dane bağlayamama ve irili ufaklı dane oluşumu (boncuklanma) ve danelerde seyremler görülmektedir (Anonymous, 1999).

2.2. Asma Kısa Boğum Virüsü ile İlgili Ülkemizde Yapılan Çalışmalar

Ülkemizde bağ virüsleri ile ilgili simptomolojik, serolojik ve biyolojik indeksleme ve az sayıda da olsa son yıllarda moleküler düzeyde bazı çalışmaların yapılmıştır. Ancak bu çalışmalarda genellikle bağ virüslerinin hangi bölgelerde ve ne oranda bulundukları araştırılmış olup bu virüslerin vektörleri, yayılma ve taşınma yolları hakkında detaylı araştırma yapılmamıştır.

Akdoğan (1956; 1958, 1965), Trakya ilinde Tekirdağ-Mürefte bağlarında yaygın olarak bulunan virüs hastalığını fizyolojik problemlerden ayırmak için çeşitli araştırmalar yapmış, hastalıktan korunma yolları ve simptomolojisi ile ilgili bilgiler vermiştir. Araştırmacı söz konusu bağlarda zararlı GFLV'yi simptomolojik olarak saptamış ve onu 'Bulaşık Soysuzlaşma' olarak adlandırmıştır.

Tekinel ve ark. (1971), biyolojik indeksleme ile Kilis iline ait bağlarda Burdur, Siyah Dimriti, Azezi, Dımışkı ve İzmir Çekirdeksizi çeşitlerinden bazı bitkilerde dejeneratif enfeksiyonla, Mersin iline ait bağlarda Royal Terheyden çeşidinde enasyon, İzmir Çekirdeksizi çeşidinde GFLV ve Vein Banding virüs ve virüs benzeri hastalıklarını ortaya koymuşlardır.

Azeri (1983), İzmir ve Manisa bağlarında Sultani çekirdeksiz çeşidinde gözlemsel olarak yaptığı çalışmalarda bir çok virüs hastalığının yanı sıra GFLV'yi de saptamıştır ve bu virüsün enfeksiyon oranını % 100 olarak belirlemiştir. Ayrıca otsu ve odunsu test bitkileri üzerinde indeksleme çalışmaları da yapmıştır.

İnal (1983), Yapıncak çeşidinden GFLV ile infekteli ve sağlıklı klonların çeşitli Amerikan asma anaçları üzerine aşılanarak, asmaların gelişme durumu ve ürün miktarını araştırmış ve infekteli asmaların sağlıklılara göre % 6.4-88.9 oranda daha az geliştiğini, ürün kaybının da % 49.8-95.1 arasında değiştiğini bildirmiştir.

Martelli (1987), ülkemizde Ankara, Kalecik, Nevşehir, Adana, Pozantı, Tarsus, Gaziantep, Burdur, Dinar, İzmir, Efes, Bornova, Menemen, Kemalpaşa, Bergama, Çanakkale, Tekirdağ, Şarköy, Havza ve Edirne çevresindeki bağ alanlarında yapmış olduğu geniş kapsamlı bir survey çalışmasında, bağlarda GFLV, Yaprak kıvrılması (GLRaV), Odun kırışıklığı (Rugose Wood Complex), Gövde çukurlaşması (Stem Pitting), Damarlarda renk açılması (Grapevine Fleck Virus) ve Enasyon hastalıklarının varlığını simptomolojik olarak saptamıştır.

Azeri ve Fidan (1988), İzmir ve Manisa illerinde GFLV ve GLRV virüslerini indikatör bitkiler üzerinde yaptıkları indekslemelerle ortaya koymuşlardır.

Özaslan ve ark. (1991), Kahramanmaraş iline ait bağlarda yaptıkları çalışmalarda GFLV, GLRV-I, GLRV-III, GFkV ve AMV'ünü ELISA testleriyle saptamışlardır. Bölgede en yaygın virüsün GFLV olduğunu, bunu GLRV-III'ün izlediğini ve bu virüslerin bağlarda yaklaşık olarak % 45.0 oranında ürün kayıplarına neden olduğunu saptamışlardır.

Akbaş ve Erdiller (1993), Ankara ilinde yapmış oldukları araştırmalar sonucunda bağlarda bir çok virüs hastalığının yanı sıra GFLV'nin de varlığını ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar GLRV-III'ün *Vitis* indikatör bitkilerine indeksleme çalışmaları yapmış ve GFLV'yi ise serolojik ve simptomolojik olarak belirlemişlerdir.

Özaslan ve ark. (1993), Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ndeki illerde yetiştirilmekte olan bağlarda yaptıkları çalışmalarda GFLV, GLRV-I, GLRV-III, GFkV ve ArMV virüslerini ELISA ve *Vitis* indikatörleri üzerine indekslemelerle saptamışlardır.

Azeri ve Çiçek (1995), Tekirdağ'da Bağcılık Araştırma Enstitüsü'nde bulunan ve anaç olarak üretilen çeşitlerde GFLV ve GLRaV'nin varlığını odunsu

indikatör bitkiler üzerine yapmış oldukları indeksleme çalışmalarıyla ortaya koymuşlardır.

Nogay ve ark. (1995), Marmara Bölgesi'nde yapmış oldukları çalışmalarında, ticari bağ alanları ve Amerikan asma anaçlıklarında virüs hastalıkları ile bunların yaygınlık oranlarını araştırmışlardır. Gözlemsel olarak yaptıkları sayımlar sonucunda, hastalık oranının % 11.1 olduğunu ve test edilen 71 adet örnekten 35' inde GFLV ile ArMV hastalık etmenlerinin saptamışlardır.

Özaslan (1995), Adana, Tarsus, Gaziantep, Şanlıurfa ve Adıyaman illerinde yetiştirilen bağlarda zararlı virüs hastalıklarının serolojik ve biyolojik yöntemlerle saptanması konusunda yapmış olduğu doktora çalışmasında, bağ alanlarında GFLV, GLRV-III, GLRV-I, GNV, AMV ve GFkV hastalıklarını indeksleme ve ELISA testiyle saptamıştır. Tüm illerden alınan örnekler içerisinde en yaygın virüs hastalığının GFLV olduğunu ortaya koymuştur.

Özaslan ve Yılmaz (1995), Adana, Tarsus, Gaziantep, Adıyaman ve Şanlıurfa illerindeki bağlarda yapmış oldukları çalışmaları sonucunda en yaygın virüs hastalığının GFLV olduğunu belirlemişlerdir.

Yılmaz ve ark. (1997), Çukurova bölgesinde bağlarda yaptıkları sürvey çalışmaları sonucunda GFLV, AMV, Grapevine Leafroll-associated viruses (GLRaV-1,-3,-7), Strawberry latent ringspot virus (SLRV), Fleck virus (GFkV), Corky Bark ve GVA virüslerini saptamışlardır.

Akbaş ve Erdiller (1998), Karaman, Konya ve Nevşehir illeri ve çevresinde 344 adet örnekte yapmış oldukları biyolojik ve serolojik olarak testlemeler sonucunda bağ örneklerinin ArMV, GFLV, GLRV, RpRSV, SLRSV ve TBRV ile infekteli olduğunu ve en yaygın olan virüsün GFLV (% 39.5) olduğunu bildirmişlerdir.

Çiğsar ve Yılmaz (1998), Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde bağ virüs hastalıklarının ELISA ile saptanmasıyla ilgili olarak yaptıkları araştırmalarında en yaygın virüs hastalıklarının sırasıyla GLRaV-1, GVA, GLRaV-3, GFLV ve GFkV olduğunu saptamışlardır.

Köklü ve ark. (1998), Trakya Bölgesi'nde yaptıkları bir surveyde ELISA yöntemiyle 165 adet örneğin % 14.5'inin GFLV ile bulaşık olduğunu bildirmişlerdir.

Köklü (1999), Trakya Bölgesi bağlarında Asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının karakterizasyonu ve surveyi üzerine çalışma yapmıştır. Bu bölgede bulunan bağ alanlarında en önemli 6 üzüm çeşidinde diğer bazı virüs hastalıklarının yanı sıra GFLV'yi de saptamıştır.

Buzkan ve Walker (2001), infekteli asma bitkilerinde GFLV'nin güvenilir teşhisi için iki farklı RNA ekstraksiyon yöntemini kıyaslamışlardır. Çalışmaları sonucunda silika partikül süspansiyonu yönteminin asmalarda daha başarılı olduğunu ortaya koymuşlardır.

Çiğsar (2002), Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Nevşehir ili bağlarında 1999-2002 yılları arasında bağ virüs ve virüs benzeri hastalıklar üzerine yapmış olduğu doktora çalışmasında almış olduğu 1001 adet örneğin % 8.1'inin GFLV ile bulaşık olduğunu bildirmiştir. Araştırmacı ayrıca, Elazığ ilinde bu virüsün yoğun olduğunu (% 46.9) ve topladığı tüm çeşitlere ait örneklerin bu virüsle belirli oranlarda bulaşık olduğunu saptamıştır. Ayrıca araştırmacı otsu konukçulara yaptığı mekanik inokulasyonlar sırasında biri Nevşehir (N-66), diğeri Adıyaman (A-34) orjinli nepovirüs cinsine giren iki yeni virüs izole etmiştir.

Çiğsar ve ark. (2002), Güneydoğu ve İç Anadolu bölgelerinde bazı bağ virüs ve virüs benzeri hastalıkların varlığını araştırmak üzere yürütmüş oldukları çalışmalarında GFLV'nin yaygınlığını % 10.7 olarak saptamışlardır.

2.3 Asma Kısa Boğum Virüsü ile İlgili Dış Ülkelerde Yapılan Çalışmalar

Ülkemizde ve dünyada uzun yıllardan beri bağlarda zararlı virüs hastalıkları ile ilgili çok sayıda çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar özellikle 1960'lı yıllardan sonra yoğunluk kazanmıştır. Bağlarda 1998'e kadar saptanan virüs sayısı 46 civarındadır. Bunlara ek olarak 5 viroid ve 4 virüs benzeri hastalık etmeni daha saptanmıştır (Martelli; 1987, 1991, 1999).

Hewitt (1953, 1954), Amerika’da ilk olarak Santa Clara vadisinde 1948 yılında ortaya çıkan ve giderek artan cüceleşme, sürgünlerde kısıalma, yapraklarda benekleşme, şekil bozuklukları, çiçek dökümleri, ilk dönemlerde boğumlar arasında kısıalma, zigzag sürgün ve çift nodyum oluşumu gibi belirtiler oluşturan etmenin GFLV olduğunu ancak çift nodyum oluşumu ve kısa boğumun bazen normal asmalarda da görülebildiği halde özellikle 8-11’inci boğumlardaki bu kısılmanın GFLV için tipik semptom olduğunu belirtmiştir.

Hewitt ve ark. (1965), Kaliforniya’da sarı mozaik ve damar bantlaşması hastalıklarının GFLV olduğunu saptamışlardır.

Hewitt ve Gifford (1965), bağlarda GFLV’nin anaç ve aşı kalemleri ile yayıldığını ve bağların temiz topraklarda ve virüsten ari çubuklarla kurulması gerektiğini bildirmişlerdir.

Cory ve Hewitt (1968), bağlarda GFLV ile infekteli bitkilerden topladığı polen ve tohumlarla yapmış olduğu testlerden pozitif sonuç aldığını bildirmiştir.

Hewitt (1968a), Amerikan *Vitis* türlerinin ve bunların *V. vinifera* ile melezlerinin GFLV’nin de içerisinde bulunduğu Avrupa kökenli nepovirüslere karşı dayanıklılık göstermediğini saptamıştır.

Hewitt ve ark. (1970), GFLV’nin otsu ve odunsu indikatör bitkiler üzerine zorda olsa inokule edilebileceğini ve serolojik testlerle belirlenebileceğini bildirmişlerdir.

Rives (1970), *Vitis rupestris* cv. Du LOT (Saint George) bitkisinde GFLV’nin eliminasyonu çalışmalarında infekteli bitkinin 163 gün süreyle 38 °C’de termoterapiye tutulduğunda başarı sağlandığını ortaya koymuştur.

Vuittenz (1970), GFLV’nin dünyanın bütün bölgelerinde rapor edildiğini bildirerek, bu virüsün mekanik olarak otsu test bitkilerine taşınabildiğini ancak bunun her zaman mümkün olmadığını ve en iyi otsu konukçu test bitkisinin *Chenopodium quinoa* Wild. olduğunu belirtmiştir. Bu virüsün indekslenmesinde *V. rupestris* x *V. riparia* melezlerinin kullanılabileceğini, *Vitis* indikatörleri üzerinde cüceleşme, sinüs açısında büyüme, yaprak deformasyonları, zigzag sürgün oluşumları, nodyumlarda şişme ve karakteristik petiolar açık yaprak görünümü

oluşturduğunu rapor etmiştir. Bu virüs partiküllerinin nepovirüs grubuna bağlı, yaklaşık 30 nm çapında olduğunu ve *X. index* ile taşındığını bildirmiştir.

Sarıc ve Wricher (1975), GFLV'nin *Chenopodium amaranthicolor* Coste et Reyn. yapraklarında lokal lezyon veren kısımlarında az, ancak sistemik olarak infekteli kısımlarında ise çok sayıda virüs partiküllerinin bulunduğunu bildirmişlerdir.

Abrasheva (1976), GFLV ile bulaşık bağlarda sağlıklıya oranla sürgün uzunluğunun % 40 ve verimin % 60 azaldığını saptamışlardır.

Quacquarelli ve ark. (1976), GFLV'nin saf preparasyonunda serolojik olarak ayrılmayan sedimentasyon katsayısı 50; T (top), 86; M (medium) ve 120 S; B (bottom) olan komponentlerini saptamıştır. Bunlardan M ve B komponentlerinin % 0.30 ve % 42 oranlarında RNA içerdiğini belirlemiş ve infeksiyonun genellikle B komponenti ile oluştuğunu ve RNA'nın tek sarmallı (single stranded) 2.4×10^6 (RNA-1) ve 1.4×10^6 (RNA-2)'den oluştuğunu rapor etmişlerdir. Buna ilaveten kapsid proteinin tek parça ve moleküler ağırlığının 54 000 dalton olduğunu belirlemişlerdir.

Uyemoto (1976), GFLV için *C. quinoa*'nın duyarlı bir test bitkisi olduğunu belirtmiştir.

Goheen (1977), ABD, Avrupa, Güney Afrika, Avustralya, Yeni Zelanda, Meksika ve Güney Amerika'da bağlarda GFLV ile bulaşık bitkilerin meyvelerinin düzensiz olgunlaştığını ve aşı yoluyla hastalığın taşındığını bildirmiştir. Ayrıca hastalıkla bulaşık bitkilerde zamanla çalılma eğiliminin olduğunu bildirmiştir.

Murant (1981), nepovirüslerin coğrafik olarak dağılımının sınırlı olmakla birlikte grubun hemen bütün üyelerinin önemli ekonomik kayıplara neden olduğunu saptamıştır.

Dodds ve ark. (1984), bitkilerde virüs hastalıklarının saptanmasında çeşitli yöntemler kullanmışlardır. Konukçu bitkiler üzerinde oluşan hastalık belirtilerinin, konukçu sayısının, hastalığa neden olan virüsün in vitro vektör ilişkilerinin ve diğer taşınma özelliklerinin veya farklı tipte serolojik testlerin yanı sıra son yıllarda virüsün kapsid protein ve genom yapısının virüslerin tanınmasında kullanılan metodlar olduğunu belirtmişlerdir.

Walter ve ark. (1984), GFLV'nin ELISA testiyle testlenebileceğini saptamışlardır.

Monet (1985), GFLV'nin ELISA testiyle tanınmasında asma sürgünlerinin iyi bir kaynak olabileceğini bildirmiştir.

Savino ve ark. (1985), Tunus'da bağlarda GFLV benzeri semptom oluşturan ve mekanik inokulasyon ile taşınan bir virüs hastalığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar bu virüs hastalığının GFLV ve AMV ile serolojik olarak ilişkili olduğunu ancak GFLV'nin serolojik bir varyantı olarak kabul edilen yeni bir virüs olduğunu saptamışlardır.

Huss ve ark. (1987), GFLV'nin monoklonal antiserumunu üreterek virüsün ırklarını saptamışlardır. Bu çalışmada 41 ayrı izolatu belirlemişlerdir.

Walter ve Etienne (1987), vegetasyon periyodu dışında GFLV'nin ve ArMV'nin ELISA testi ile teşhisi için yapraklar, saçak kökleri ve kabuk dokusunun kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Testlerde ekstraksiyon sırasında nikotin solüsyonu yerine PBS yada Tris-HCl tamponunun kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Martelli ve Savino (1988), bağların GFLV ile bulaşık olması sonucu ömrünün kısaldığını, ürünün kalitesinde ve verimde % 80'e varan azalmalara neden olduğunu saptamışlardır.

Tanaka (1988), Japonya'da bağlarda zararlı virüs hastalıklarından GFLV, GFkV ve GLRV'yi sera koşullarında bazı *Vitis* türlerine ait indikatörler üzerinde yaptıkları indekslemelerle belirlemişlerdir. Ayrıca GFLV'nin otsu indikatörlerden *C. quinoa* ve *Gomphrena globosa* L. üzerine mekanik inokulasyonunun çok zor olduğunu bildirmiştir.

Fortusini ve ark. (1989), mantarimsı kabuk ve/veya gövde çukurlaşması belirtisi gösteren toplam 16 adet asma bitkisinde nepovirüsler ve closterovirüsler için partiküller saptamışlardır.

Fuchs ve ark. (1989), GFLV'nin bazı izolatlarının satelit virüse sahip olduğunu belirtmişlerdir. Nepovirüslerin teşhisinde ELISA'nın yaygın olarak kullanıldığını, PCR ve moleküler hibridizasyon yöntemlerinin de çok uygun yöntemler olduğunu bildirmişlerdir.

Ohtsu (1989), GFLV ile indekslenen indikatör *St. George* bitkisinde farklı koşullarda meydana gelen simptom gelişimlerini incelemiştir. Bitkilerin 20/17 °C (gündüz/gece) sıcaklıklarda simptom oluşturmadağını fakat inokulasyondan 40-50 gün sonra yaprakların asimetrik olduğunu ve tipik yelpaze görünümlü yaprakların oluştuğunu bildirmiştir. Çalışmanın sonucunda GFLV indekslemesi için uygun sıcaklık koşullarının 28/23 °C (gündüz/gece) olduğunu saptamıştır.

Walter ve ark. (1990), bağlarda virüs hastalıklarının indekslenmesinde yeşil-aşılama tekniğinin normal aşlamadan daha hızlı olduğunu, hastalık belirtilerinin daha kısa sürede ortaya çıktığını, bu tekniğin zaman, işgücü ve yer kullanımını azalttığını belirtmişlerdir.

Conti (1991), bağ virüslerinin purifikasyonunda asma dokusunun yüksek oranda okside edici maddeler bulundurması nedeniyle zorluk çekildiğini bildirmiştir.

Luisoni (1991), bağlarda virüslere uygulanan DAS-ELISA tekniğinin başarılı bir yöntem olduğunu bildirmiştir.

Milne (1991), elektron mikroskop preparatlarının hazırlanması ile nepovirüslerin gözlenmesinde dikkat edilecek hususlar ve elektron mikroskop tekniklerini ortaya koymuştur.

Walter (1991), nepovirüslerin teşhisinde ELISA'nın yaygın olarak kullanılan güvenilir bir metot olduğunu belirtmiştir. PCR ve moleküler hibridizasyon yöntemlerinde çok uygun yöntemler olduğunu ortaya koymuştur.

Walter ve Bernard (1991), Fransa'da bağlarda GFLV ve ArMV gibi nepovirüslerle mücadele etmek amacıyla klonal seleksiyon yoluyla bu virüslere dayanıklı kültür asmaları elde etmek üzere bazı çeşitler alınarak virüsten arındırılmıştır. Daha sonra bu aday bitkilerin testlendiğini ve vektörün bulunmadığı kumlu topraklarda çoğaltılarak ticari olarak üretim yapan fidancılık işletmelerine dağıtıldığını bildirmişlerdir.

Esmenjaud ve ark. (1994), vektör *X. index* içerisinde hem serolojik yöntemle (ELISA) hem de RT-PCR metoduyla GFLV'nin kılıf protein geninin (CP) bir bölümünün saptanması üzerine bir çalışma yapmışlardır. Araştırmacılar 10 adetten daha az sayıda nematod bireyi kullanılmasının ELISA için güvenilir olmadığını ve

negatif sonuç alınabileceğini belirtmişlerdir. Bunun yanısıra bir yada birkaç adet virüsle bulaşık vektör nematod bireyinden total RNA ekstraksiyonu yapılarak RT-PCR metoduyla GFLV'nin kılıf protein geninin (CP) bir bölümünün çoğaltılabildiğini ortaya koymuşlardır.

Rowhani (1992), GFLV ve GLRaV-3'ün infekteli dokularda varlığını ELISA'nın bir modifikasyonu olan F(ab')₂ antibody fragmentleri kullanarak saptamışlardır.

Rowhani ve ark. (1992), nepovirüslerin teşhisinde ELISA'nın yaygın olarak kullanılan güvenilir bir metod olduğunu bildirmiştir.

Fresno ve Arias (1993), ELISA metodu ile yıl boyunca bağ bitkilerinin bütün organlarında nepovirüslerin varlığının ortaya konulabileceğini, fakat taze yaprakların virüs yoğunluğunun yüksek olması ve kolay ezilmesi nedeniyle test için en uygun olduğunu bildirmiştir. Ayrıca bu yöntemle nematod bünyesinde virüsün varlığını saptamışlardır.

Grenan ve ark. (1993), ELISA'nın nepovirüslerin teşhisinde güvenilir bir metod olduğunu bildirmişlerdir.

Walter (1993), nepovirüslerin teşhisinde ELISA yönteminin yaygın olarak kullanıldığını rapor etmiştir.

Boscia ve ark. (1997), ELISA'nın nepovirüslerin tanısında kullanılan güvenilir bir metod olduğunu belirtmişlerdir.

Minafra ve ark. (1997), nepovirüslerin moleküler teşhisinde PCR ve moleküler hibridizasyon yöntemlerinin çok uygun yöntemler olduğunu saptamışlardır.

Walter ve Martelli (1997), GFLV ile bulaşık bitkilerde yaprak simptomlarının yanısıra bazen boğumlar arasında kısılma ve düzensiz gelişmeler, çift boğum, yassılaşma gibi sürgün anormallikleri, salkım sayısında azalma ve küçülmeler, irili ufaklı dane oluşumu gibi simptomların oluştuğunu ortaya koymuşlardır.

Krake ve ark. (1999), GFLV'nin bitki çeşidi ve iklim koşullarına bağlı olarak meydana getirdiği simptomların değiştiğini belirtmişlerdir. Başlangıçtaki benekler yada mozaik simptomların yerine yazın (hastalığın kronik devresinde) yapraklarda sinüs açısının genişlediğini, derinleştiğini ve diş sayısının arttığını saptamışlardır.

Buzkan ve Walker (2001), virüslerle infekteli asma bitkilerinden yüksek kalitede ve miktarda viral RNA elde etmek için iki farklı RNA ekstraksiyon yöntemini mukayese etmişlerdir. Bunlardan silika partikül süspansiyonu metodunu özellikle güç ekstrakte edilen bitkilerde güvenle uygulanabilen bir yöntem olarak başarılı bulmuşlardır.

Naraghi-Arani ve ark. (2001), *V. vinifera*'dan elde edilen GFLV'nin 14 farklı izolatinın genetik dağılımını tanımlamışlardır. İzolatlar arasında nükleotid diziliminde % 13'e kadar ve aminoasit diziliminde ise % 9'e kadar farklılık olduğunu ortaya koymuşlardır.

Dar-Issa ve Iraki (2002), GFLV'yi RT-PCR ve IC-TR-PCR yöntemleriyle testlediklerinde kılıf protein primerleri kullanmaları halinde her iki metod arasında büyük bir farklılık olmadığını saptamışlardır.

Finetti-Sialer ve ark. (2002), İtalya'da Palagiano bağlarında GFLV'yi tespit etmek için fluorescent RT-PCR metodunu uygulamıştır. Kullandığı fluorescent problemlerin virüsün saptanmasında faydalı olduğunu belirtmiştir.

Elleuch ve ark. (2003), Tunus'ta turuncgil ve bağ alanlarında üç farklı viroidin tanısı için en uygun protokol olarak RT-PCR'ı belirtmişlerdir. Bu metodun hastalıklardan ari sertifikalı bitki materyallerinin üretilmesi için kullanılmasının gerektiğini bildirmişlerdir.

Izadpanah (2003), GFLV için potansiyel kaynak bitki olarak köpek dişi ayrığı (*Cynodon dactylon* L.) üzerinde çalışmıştır. Virüsle infekteli köpek dişi ayrığı bitkilerinden *C. quinoa* indikatörlerine mekanik inokulasyon yapmıştır. İnokule edilen 29 *C. quinoa*'dan 17 adedine virüs taşınabilmiş ve bunlardan ancak 5 tanesinde simptom meydana gelmiştir. Diğerlerinde ise simptom gelişimi gözlenmemiştir. Buna benzer bir diğer denemesinde ise 43 adet virüsle infekteli köpek dişi ayrığından *C. quinoa*'ya mekanik inokulasyon yapmıştır. Bunlardan da 14 adedinde virüs taşınabilmiş ancak yalnızca 3 adedinde simptom gelişimi gözlenmiştir.

Maliogka ve ark. (2004), Comoviridae türlerinin ve diğer çift partiküllü bazı virüslerin tanılanması ve tespit edilmesine için nested RT-PCR metodunu kullanmış ve tanılanmanın duyarlılığını arttırdığını belirtmişlerdir. Bu metoda

sınıflandırmada Potato black ringspot virus (PBRSV) ve Cherry leafroll virus (CLRV) etmenlerini nepovirus cinsine dahil etmişler ve Arracacha virus (AVB) etmeninin bunlardan farklı olduğunu saptamışlardır.

2.4. Bağlarda Zararlı Vektör *Xiphinema*'ların Genel Özellikleri

Xiphinema türleri Dorylaimida takımının Longidoridae familyasına bağlı olup kamalı nematodlar olarak bilinirler. Bu cinse ait çoğu ergin bireylerin genel olarak en önemli karakteristik özellikleri; ince ve uzun yapıda vücutlu olması, tabanı tokmak şeklinde uzun styletli olmaları ve dinlenme halindeyken C şeklinde bir görünüme sahip olmalarıdır (Mai ve Mullin, 1996). Bitki patojeni olan türlerin konukçu dizilimi (bir çok meyve ağaçları, çayır ve mera bitkileri vs.) oldukça geniştir. Konukçusunda kök aksamında doğrudan beslenerek ve bazı virüsleri taşımasıyla vektör olarak önemli zarar oluşturmaktadır. Toprakta yoğunlukları az olduğundan dolayı doğrudan zararı çoğu zaman önemsenecek düzeyde olmasa da virüs vektörü olarak bilinen *X. index* virüs hastalığı ile birlikte bağlarda zayıflama, durgunluk ve verimde azalma meydana getirerek % 40'a varan oldukça önemli oranlarda kayıplara neden olabilmektedir (Anonymous, 1999). İlk olarak GFLV'nin *X. index* ile taşındığı Hewitt ve ark. (1958) tarafından rapor etmiştir. Bu nematodlarda ağız boşluğu ile sindirim kanalı arasında muhtelif farklı bölgelerde virüs partikülleri tutulmaktadır. Virüs *X. index*'in hem larvaları ile hem de erginleri ile aktif olarak taşınmaktadır. Nematod birkaç dakika beslenmesi sonucunda bünyesine aldığı virüsü deri değiştirmezse hiç beslenmeksizin aylar sonra bile beslendiği sağlıklı bitkilere aktarabilmektedir (Dropkin, 1988).

2.5. Vektör Nematodlar ile İlgili Ülkemizde ve Dış Ülkelerde Yapılan Çalışmalar

Hewitt ve ark. (1958), GFLV ile nematod ilişkilerini araştırmış ve virüsün Bacco 22 ve Mission LOT indikatörleri üzerine aşı yoluyla ve *X. index* ile taşındığını ilk olarak saptamışlardır.

Kaşkaloğlu (1965), Ege Bölgesi bağlarında yaptığı surveyler sonucunda virüs hastalıklarının verimi etkilediğini ve GFLV'nin *X. index* ve *Longidorus* spp. ile taşındığını ortaya koymuştur.

Yüksel (1966), İzmir ve Manisa illerindeki bağlarda önemli düzeyde zarar yapan GFLV'nin bağlarda varlığını ve *X. index* ile taşındığını saptamıştır.

Hewitt ve Raski (1967), *X. index*'in GFLV'nin yanında Sarı mozaik, Damar bantlaşması ve Arabis mozaik virüslerinin de vektörü olduğunu bildirmişlerdir.

Cohn ve Orion (1970), saksı denemelerinde *X. index*'in bağ bitkilerinde altı ayda gelişmeyi % 34 düzeyinde azalttığını ortaya koymuşlardır.

Weischer (1973), GFLV'nin konukçusu bulunmayan topraklarda vektör *X. index* üzerinde 8 ay canlılığını koruduğunu belirtmiştir. Ayrıca GFLV'nin vektörü olan *X. index* ve *X. italiae*'nin konukçu bulunmayan topraklarda altı hafta sonra virüs taşıma oranlarının % 10'a kadar düştüğünü bildirmiştir. Ayrıca bağlara zarar veren virüs hastalıklarının 7 tanesinin nematodlarla taşındığını saptamıştır.

Taylor ve Robertson (1975), virüs vektörü olan nematodun 15 dakikadan az bir zaman hastalıklı bitki köklerinde beslenmesi sonucu virüsü bünyesine aldığını ve bunu takiben hiç beslenmese bile 8 aya kadar virüsü bünyesinde barındırmasının mümkün olduğunu bildirmişlerdir. Milkus ve ark. (1977), Ukrayna'da GFLV'nin üç ırkının kalem aşısı ve mekanik aşılama ile otsu bitkilere taşınabildiğini ve *X. index* ile de taşındığını bildirmişlerdir. Ayrıca, Ukrayna, Fransa ve Federal Alman ırkları arasında serolojik akrabalık olduğunu ortaya koymuşlardır.

Boquet (1981), *X. index* ile inokule edilen Muscadine çeşidi asmanın GFLV'ye karşı reaksiyonlarını araştırmıştır. Nematod ile taşınan Muscadine çeşidinin GFLV'ye karşı tolerant olduğunu, aynı virüsün aynı asma çeşidine aşı yoluyla bulaştırıldığında bir toleranslığın oluşmadığını belirlemiştir. Sonuçta bu çeşidin GFLV'ye karşı tolerant bir çeşit olmadığını bildirmiştir.

Raski ve ark. (1983), dayanıklılığın ıslahı çalışmalarıyla GFLV'ye tolerant ve *X. index*'e dayanıklı *V. vinifera* varyetelerinin yada *V. vinifera*'dan başka *Vitis* spp.'nin bulunabileceğini belirtmişlerdir. Dayanıklı tür ve varyetelerin geliştirilmesinin nematodla ağır bulaşık, değerli bağ alanlarında virüs ve vektör nematodların mücadelesi konusunda umut verici olduğunu rapor etmişlerdir.

Caudwell ve Dalmasso (1985), bağlara zarar veren virüs ve virüs benzeri hastalık etmenleriyle ilgili olarak 1984 yılına kadar yapılan çalışmaları özetleyerek bu hastalık etmenlerinin vektörleriyle olan ilişkilerini ve epidemiolojilerini anlatmışlardır.

Raski (1988), dünyada bağ üretimi yapılan alanlarda *Xiphinema* cinsine dahil onun üzerinde tür bulunduğunu bildirmiştir. Bunların *Xiphinema americanum* Cobb, *X. nigeriense* Luc, *X. brevicolle* Lordello et Da Costa, *X. diversicaudatum* (Micoletzky) Thorne, *X. index*, *X. italiae*, *X. pachtaicum* Tulaganov, *X. turcicum* Luc ve Dalmasso ve *X. vuittenzei* Luc, Lima, Weischer et Flegg olduğunu saptamıştır.

Raski ve Goheen (1988), bağlarda ürün üzerinde önemli bir etkisi bulunan zararlı GFLV degenerasyon kompleksi ile vektör *X. index*'in 1,3 dichloropropene (DP) ve methyl bromide (MeBr) uygulamasıyla mücadelesine ilişkin çalışmalar yapmışlardır. Şiddetli hastalık gösteren asmaların bulunduğu bir bağda toprak 448 kg/ha oranında MeBr ile fümige edilmiş ve bir başka uygulamada ise 672 kg/ha oranında MeBr kullanılmış ancak burada toprak yüzeyi polietilen örtü ile örtülmemiştir. Bir başka parselde de 1560 kg/ha DP uygulanarak toprak yüzeyi kapatılmamıştır. İki yetiştirme sezonu sonunda uygulama gören toprakların yarısına yeni ve sağlıklı asma bitkileri, diğer yarısına da uygulamadan 6 yıl sonra sağlıklı bitkiler dikildiğinde MeBr uygulanan toprakların % 5'inde ve DP uygulanan toprakların % 36'sında GFLV'nin varlığı saptanmıştır. Fakat her üç uygulamanın da verime olumlu etkisi olduğunu bildirmişlerdir.

Esmenjaud ve ark. (1992)'nin Fransa'da GFLV ile bulaşık 3 bağ alanında toprağın farklı derinliklerinden *X. index*'in yoğunluklarını araştırmışlardır. En düşük nematod yoğunluğunu kireçli topraktan 0-25 cm derinliğinden ve kumlu olan topraklardan ise 0-40 cm derinlikte elde etmişlerdir. Kireçli topraktan en yüksek nematod populasyon yoğunluğunu 1 kg toprakta 5 ile 120 arasında değişen sayıda 55-70 cm derinlikten bulunduğunu saptamışlardır.

Brown ve ark. (1994), Avrupa'da nepoviruslerin ve tobnavirüslerin varlığının küçük alanlarda lokalize olduğunu, Kuzey Amerika'da ise bu virüslerin ve vektörlerinin varlığının geniş alanlarda yaygın olduğunu belirlemişlerdir. Virüs

taşımada özelleşmenin varlığı ile virüs ile tespit edilen vektörünün arasında kuvvetli bir ilişkinin olduğunu ortaya koymuşlardır. Nematod-virüs-bitki kompleks etkileşiminin taşınma spesifitesinin varlığını etkilediğini belirlemişlerdir.

Elekçioğlu ve Uygun (1994), Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yetiştirilen ürünlerde bitki paraziti nematodların varlığı ve dağılımı üzerinde yaptıkları araştırmalarda bağlarda en yaygın türlerin sırasıyla *X. pachtaicum*, *X. index* ve *X. italiae* olduğunu saptamışlardır.

Elekçioğlu ve ark. (1994), Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yetiştirilen 12 farklı bitkide 36 adet nematod türü izole etmişlerdir. Bağlarda *X. index*, *X. pachtaicum* ve *X. italiae* türlerinin bulunduğunu ortaya koymuşlardır.

Garcia-Benavides ve ark. (1994), İspanya'da bağlarda GFLV ile *X. index* arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Araştırmaları sonucunda testledikleri bağ örneklerinin % 12.8 inde GFLV'nin varlığını saptamışlardır. Bu virüsle bulaşık olan bitkilerin ise % 31'inde ise virüs vektörü nematoda rastlamışlardır.

Philis (1994), Kıbrıs'ta *X. index* mücadelesi için kültürel yöntemleri araştırmıştır. Yaptığı denemelerde, bağ tesis edilmeden 40-52 ay önce yalnızca yada rotasyon halinde arpa yetiştirilmesinin lokal alanlarda GFLV'nin doğal vektörü olan bu nematodun popülasyonunu belirlenemeyecek kadar azalttığını bildirmiştir.

Vovlas ve Larizza (1994), virüs vektörü *X. index*'in embriogenik safhaları ve gelişme dönemleri üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Nematodun farklı hayat dönemlerinde vücut uzunluğunun, odontostylet uzunluğunun ve konumunun farklı olduğunu saptamışlardır.

Nogay ve ark. (1995), Marmara Bölgesi'nde yapmış oldukları çalışmaları sonucu bağ topraklarının *X. index*, *X. pachtaicum* ve *Longidorus* spp. ile bulaşık olduğunu belirlemişlerdir.

Avgelis ve Tzortzakakis (1997), 1995 ve 1996 yılları ilkbaharında Yunanistan'ın Samos adasındaki 160 farklı bağda *Xiphinema* cinsi bitki parazitik nematodlar ile GFLV'nin varlığı ve dağılımını araştırmışlardır. İnceledikleri bitki örneklerin % 49'unun *X. pachtaicum*, % 15'inin *X. index* ve % 7'sinin *X. italiae* ile bulaşık olduğunu belirlemişlerdir. Asma kısa boğum virüsünün bulunduğu

bölgelerdeki dağılımının *X. index*'in varlığı ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır.

Martelli (1999), nepovirüslerin her durumda üründe kalitenin ve miktarının düşmesine, asmanın ömrünün ksalmasına, aşı tutma ve köklenmenin azalmasına, olumsuz iklim koşullarına karşı duyarlılığın artmasına neden olduğunu ve ayrıca bağ içerisinde *Xiphinema* ve *Longidorus* gibi, Longidoridae familyasına dahil nematodlarla yayıldığını rapor etmiştir.

Wood (1999), asma nepovirüslerinin uzak mesafelere üretim materyali ile taşınırken bağ içerisinde ise vektör nematodlara bağımlı olduklarından sınırlı bir coğrafi dağılım gösterdiğini bildirmişlerdir.

Fresno ve ark. (2002), Kanarya Adaları'nda 10 yıldan uzun bir süreyle bağlarda GFLV'nin taşınmasını etkileyen faktörleri araştırmışlardır. Toprakta nemin yüksek olmasının ve su serbest filmi tabakasının bulunmasının özellikle nematod vektörlerin daha kolay hareket etmesi açısından önem taşıdığını saptamışlardır.

Elleuch ve ark. (2003), Tunus'ta turunçgil ve bağ alanlarında üç farklı viroidin tanısı için en uygun protokol olarak RT-PCR'ı kullanmışlardır. Bu metodun hastalıklardan ari sertifikalı bitki materyallerinin üretilmesi için kullanılmasının gerektiğini bildirmişlerdir.

Stuart (2003), bitki virüs hastalıklarının nematodlar tarafından taşınmasında moleküler bulgular ile ilgili olarak yapmış olduğu bir derlemesinde virüs hastalıklarına karşı ürünün korunmasında en etkili ve güvenilir yolun bitki virüs hastalıklarının taşınma mekanizmalarının anlaşılması olduğunu bildirmişlerdir.

Hubschen ve ark. (2004), *X. diversicaudatum*, *X. index* ve *X. vuittenezi* için güvenilir bir moleküler teşhis sağlayan türe spesifik primerlerin duyarlılığını ve seçiciliğini araştırmışlardır. Bu metod kullanılarak 200 değişik nematod türün arasında tek bir hedef türün tanılanmasının mümkün olabileceğini belirtmişlerdir.

Moliogka ve ark. (2004), Comoviridae türlerinin ve diğer çift partiküllü bazı virüslerin tanılanması ve tespit edilmesine için nested RT-PCR metodunu kullanmışlar ve tanılanmanın duyarlılığını arttırdığını belirtmişlerdir.



3. MATERİYAL VE METOD**3.1. Materyal****3.1.1. Virüs Çalışmalarında Kullanılan Materyaller**

Çalışmanın ana materyalini Adana ve Mersin illerine ait bağ alanları, GFLV ile bulaşık bitki aksamaları (yaprak, sürgün, meyve), bu örnekleri laboratuvara getirmek için kullanılan polietilen torbalar, etiketler, bağ makası, buz kutusu, derindondurucu, buzdolabı, omcaları işaretlemek için kırmızı spreyci boya, bisturi, DAS-ELISA testleri için tampon çözeltiler (EK 1), antiserum kitleri, ELISA plateleri, havanlar, cam malzemeler, mikropipetler ve pipet uçları oluşturmuştur.

Ayrıca laboratuvar çalışmalarında otsu indikatör bitkilerden *Nicotiana benthamiana* Domin., *N. rustica* L., *N. tabaccum* L., *G. globosa* , *C. amaranticolor*, *C. quinoa* ve *Cucumis sativus* L. materyal olarak kullanılmıştır. Gerek bağ bitki dokusunda gerekse olası vektör nematodların bünyesinde GFLV'nin varlığının saptanmasında MWG-Biotech AG firmasından satın alınan GFLV'nin F13 ırkına ait spesifik deoksiribo nükleotid primerler (oligonükleotidler) kullanılmıştır. Bu primerlerin nükleotid dizilimi aşağıda verilmiştir.

5'-CAA CAA AGA GTT AGC GGC AG-3' (ABF2)

5'-CCA CTA TGC AAT CCA TGG CA-3' (ABR2)

Bunlara ek olarak reverse transkriptase (RT) ve DNA polimerase (Taq) enzimleri, RT buffer, Tag buffer, dNTP, RNA inhibitörü, MgCl ve steril distile su da kullanılmıştır.

Moleküler çalışmalarda elde edilen PCR ürününün elektroforez yöntemi ile testlenmesi için agaroz, TAE buffer (Ek 1), marker (4000 bp), loading dye (orange blue) ve boyama için de etidium bromide solüsyonu kullanılmıştır.

3.1.2. Nematod Çalışmaları İçin Gerekli Materyaller

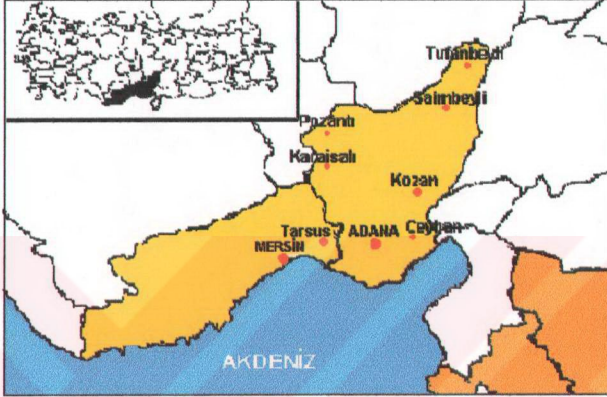
Arazide bağ omcasının kök kısmının yakınındaki (rizosfer) toprak örneğini almak için burgu aleti, bel, toprak örneğini laboratuvara getirmek için polyetilen (nylon) torbalar, etiketler, laboratuvara getirilen bu toprak örneklerinde nematodların elde edilmesi için üçlü çelik elek seti (50, 90 ve 140 mesh'lik), petri kabı, plastik kovalar, ışıklı mikroskop, lam, lamel, ölçü silindiri ve diğer cam malzemeler, gliserin ve immersiyon yağı kullanılmıştır.

3.2. Metod**3.2.1. Asma Kısa Boğum Virüsü ile İlgili Çalışmalar****3.2.1.1. Arazide Gözlemler ve Örnek Toplama Çalışmaları**

Araştırma Adana ve Mersin illeri ve bu illere ait bazı ilçelerde (Şekil 3.1) 2002-2003 yıllarında özellikle yaşlı ve yüksek terbiye kaplama bağlarda yürütülmüştür. Örnekler öncelikle gelişme geriliği, meyvelerde irili ufaklı gelişmeler, yapraklarda sararmalar, mozaik lekelenmeler ve damar bandlaşmaları, sürgünlerde şişkin yada ikiz boğumların teşekkülü ve yassılaşması, boğum aralarının kısalması ve zigzag gelişim gibi GFLV belirtileri olabilecek semptomlar gösteren virüsle infekteli olduğu şüpheli bağlardan alınmıştır. Örnekleme yapılan bağ omcaları kırmızı sprej boya ile işaretlenmiştir. Örnekler Nisan-Mayıs döneminde meyvelerden, taze yaprak ve sürgünlerden, Eylül döneminde ise çubuklardan alınarak nylon torbalar içerisine konulduktan sonra etiketlenerek buz kutusu içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Hastalığın serolojik olarak saptanmasında asma taze yaprakları ve vegetasyon periyodu dışında kabuk dokusu kullanılmıştır.

Araştırmada özellikle yaşlı bağlar dikkate alınarak çalışma süresince Seyhan(Balcalı) (104 adet), Saimbeyli (20 adet), Ceyhan (10 adet), Pozantı (7 adet), Karaisalı (9 adet) ve Kozan (10 adet) olmak üzere Adana merkez ve ilçelerinden,

Mersin (114 adet) ve Tarsus'tan (110 adet) olmak üzere toplam 384 adet örnek getirilmiştir.



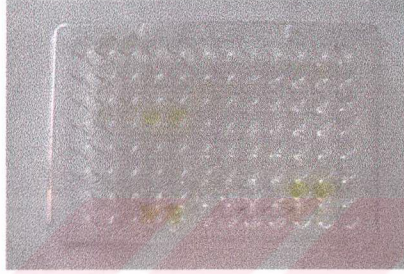
Şekil 3.1. Araştırmada örneklerin alındığı il ve ilçeler.

3.2.1.2. Laboratuvar ve Sera Çalışmaları

3.2.1.2.(1). DAS-ELISA

Testlemelerde kullanılan ELISA kitleleri, bufferlar ve konsantrasyonlar Loewe ve AGDIA ticari firması tarafından önerildiği şekilde hazırlanmıştır. Havanların içinde bir gram bitki materyali 5 mililitre (ml) örnek tamponu (extract buffer) içerisinde ezilerek test edilen bitkilerin özsuyu elde edilmiştir. Her bir örneğin testlenmesi polystyrene ELISA plakalarında çift kuyucukla (iki tekerrürlü) yapılmıştır. Sonuçlar 405 nm dalga boyunda ELISA okuyucusu kullanılarak okunmuştur. Yapılan testlemelerde pozitif sonuç veren örneklerde plate üzerinde gözle görülebilen sarı renk oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3.2). Aynı örneğe ait çift kuyucuktan elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması aynı plaka üzerinde negatif kontrol olarak konulan örneğin ortalama değerinin iki katından daha yüksek çıkması halinde örnek virüsle infekteli olarak kaydedilmiştir. Testlemelerde pozitif

çıkan bitki örnekleri yeniden testlenmiş ve ikinci defa pozitif sonuç alınanlar GFLV ile bulaşık olarak kaydedilmiştir. Çalışmada kullanılan bitkilerden hastalıkla bulaşık olarak kaydedilen örnekler her testlemede iki tekerrürlü olarak çalışılmıştır.



Şekil 3.2. DAS-ELISA ile teslemelerde pozitif sonuç veren örneklerin plate üzerinde gözle görülebilen sarı renk oluşumu.

3.2.1.2.(2). Otsu Konukçulara Mekanik İnokulasyon

Otsu indikatör bitkileri Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'ne ait 25 ± 1 °C'de ve 12 saat aydınlatmalı iklimlendirme odasında yetiştirilmiştir (Şekil 3.3). Saksılara önceden üzeri sera naylonu kapatılarak methyl bromide (MeBr) ile steril edilen 1:3 kum, 1:3 torf ve 1:3 toprak karışımı konulmuştur. Mayıs-2002 ve Mayıs-2003 döneminde araziden getirilen ve laboratuvarında GFLV ile bulaşık olduğu serolojik olarak belirlenen bağlardan otsu indikatör bitkilere (Çizelge 3.1) mekanik inokulasyon yapılmıştır. Daha sonra bu bitkilere virüsün taşıyıp taşımadığı DAS-ELISA ile kontrol edilmiştir.

İnokulasyon yapmak için taze asma yaprakları % 2.5 nikotin içeren 0.1 M, pH=7.2 olan fosfat tamponu içerisinde ezilmiştir. Elde edilen bu ekstrat karborandum tozu ile tozlanan otsu indikatör bitkilerin yapraklarına hafifçe sürülmüştür. Birkaç dakika bekledikten sonra bitkiler çesme suyuyla zarar verilmeden yıkanmıştır. İnokule edilen bitkiler iklimlendirme odasında bir ay süreyle tutularak virüs belirtileri olup olabileceği belirtilerinin oluşup oluşmadığı günlük olarak gözlenmiştir (Dijkstra ve Jager, 1998).



Şekil 3.3. Mekanik inokulasyonlarda kullanılmak üzere iklimlendirme odasında yetiştirilen otsu indikatör bitki fideleri.

Çizelge 3.1. Mekanik inokulasyonlarda kullanılan otsu indikatör bitkiler

Familya	Tür
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i> L.
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste et Reyn. <i>Chenopodium quinoa</i> Wild.
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i> L.
Solanaceae	<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin. <i>Nicotiana rustica</i> L. <i>Nicotiana tabaccum</i> L.

3.2.1.3. Bağlarda Virüs ile İlgili Moleküler Çalışmalar

3.2.1.3.(1). Total RNA Ekstraksiyonu

Araştırma süresince yapılan DAS-ELISA testleriyle virüsle bulaşık olduğu serolojik olarak belirlenen bağ bitkilerinden total RNA ekstraksiyon çalışmaları Buzkan ve Walter (2001)'e göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır ;

1. Sıvı azot içerisinde -180 °C'de dondurulan bitki ve nematod örnekleri ekstraksiyon buffer (1/1000 oranında 2-mercapto-ethanol ilave edilen) içerisinde parçalanarak ezilmiştir.
2. Bitki örnekleri ekstraktı +4 °C'de 14000 rpm de 3 dakika (dk) süreyle santrifüj edilerek bitkiye ait olan kaba partiküllerin 1 ml'lik eppendorf tüpü içerisinde çökmesi sağlanmış ve daha sonra pellet uzaklaştırılmıştır.
3. Süpernatanta 50 µl % 20'lik Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) ekleyerek vorteks yapılmıştır.
4. Tüpler 65 °C'de ki su banyosunda 30 dk bekletilmiştir.
5. Su banyosundan çıkarılan örneklerle 250 µl Potasyum asetat (KOAc) ilave edilerek vorteks yapılmıştır.
6. Tüpler 20 dk buzda bekletilmiştir.
7. +4 °C'de 14000-20000 rpm de 15 dk süreyle santrifüj edilmiş ve daha sonra pellet uzaklaştırılmıştır.
8. Tüplere 1 µl % 100'lük ethanol ilave edilerek yeni bir eppendorf tüp setine alınmıştır. Her bir eppendorf tüpüne 50 µl Sodyum asetat (NaOAc) eklenerek vorteks yapılmıştır.
9. Yeni bir eppendorf setine her bir materyalin 500 µl si alınarak bir gece +4 °C'de (buzdolabında) bekletilmiştir. Kalan kısmı ise -20 °C'de saklanmıştır.
10. Buzdolabından alınan örnekler +4 °C'de 14000 rpm de 15 dk süreyle santrifüj edildikten sonra süpernatantı uzaklaştırılmıştır.
11. Tüpler filtre kağıdı üzerinde birkaç dk kurutulmuştur.
12. Her bir eppendorf tüpü içerisine 1 ml % 70'lik ethanol eklenmiştir.
13. Örnekler +4 °C'de 14000 rpm de 5 dk süreyle santrifüj edilmiştir.
14. Ethanol uzaklaştırılmış ve eppendorf tüpleri bir filtre kağıdı üzerinde kurutulmuştur.
15. Kurutulan pelletler 50 µl RNAase free su ile resuspanse edilmiş ve vorteks edilmiştir.
16. Yeni bir eppendorf seti hazırlanmış ve resuspanse örneklerden 15 µl alınarak hemen kullanılmak üzere yeni tüpe konulmuştur. Kalan kısmı ise (35 µl) -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.1.3.(2). Reverse Transkription

Gerek bağ yaprak dokusu örneklerinde gerekse bitkilerin rizosfer kısmından elde edilen *X. index* vektör nematodların bünyesinde GFLV'nin varlığı RT-PCR tekniği ile moleküler düzeyde Esmenjaud ve ark. (1994)'nın yöntemine göre belirlenmiştir. Bu çalışmaların ilk aşaması olan Reverse Transkription (RT) kısmında kullanılmak üzere bir RT karışımı hazırlanmıştır. İki adet nematod örneği, bir adet otsu indikatör bitki örneği ve bir su örneği (negatif kontrol olarak) için bu karışıma konulan maddelerin miktarları dört kat olarak aşağıda verilmiştir.

RNA	1 µl	
dNTP	1 µl X 4	4µl
RT	0.125µl X 4	0.5µl
RT buffer	5µl X 4	20µl
RNA inhibitör	0.3µl X 4	1.2µl
H2O	15µl X 4	60µl
Pr1	1µl X 4	4µl
Pr2	1µl X 4	4µl

Bu karışım RNA eklenmeden hazırlanmış olup her bir örnek için etiketlenen eppendorf tüplerine (4 tane) paylaştırılmıştır. En son aşamasında her örneğin RNA'sı örnek tüplerine ayrı ayrı eklenerek Thermal Cycler cihazına yerleştirilmiştir. Daha sonra 42 °C'de 1 saat tutulduktan sonra çıkarılarak PCR işlemine tâbi tutulmuştur.

3.2.1.3.(3). PCR

Bu çalışmaların ikinci aşaması olan PCR kısmında kullanılmak üzere bir PCR karışımı hazırlanmıştır. İki adet nematod örneği, bir adet otsu indikatör bitki örneği ve bir su örneği (negatif kontrol olarak) için bu karışıma konulan maddelerin miktarları dört kat olarak aşağıda verilmiştir.

cDNA	1 µl	
dNTP	1 µl X 4	4µl
Taq	0.3µl X 4	1.2µl
Taq buffer	2.5µl X 4	10µl
MgCl	1.5µl X 4	6µl
H ₂ O	15µl X 4	60µl
Pr1	1µl X 4	4µl
Pr2	1µl X 4	4µl

Hazırlanan PCR karışımı RT ürünü olan cDNA eklenmeden hazırlanmış olup her bir örnek için etiketlenen dört eppendorf tüplerine (4 tane) paylaştırılmıştır. En son aşamasında her örneğin cDNA'sı (RT ürünü) örnek tüplerine ayrı ayrı eklenerek Thermal Cycler cihazına yerleştirilmiştir. Kullanılan PCR döngüleri sırasıyla aşağıda verildiği şekilde uygulanmıştır.

Önce 95 °C'de 2 dk örnekler ısıtılmıştır. Daha sonra

95 °C'de 30 dk

54 °C'de 30 dk

ve 72 °C'de 3 dk olmak üzere 35 döngü uygulanmıştır. En son 72 °C'de 10 dk bekletilerek işlem sonlandırılmıştır.

3.2.1.3.(4). Elektroforez

Çalışmada elde edilen PCR ürününe % 1'lik agaroz jel elektroforez (Ek III) uygulanmıştır (Gallitelli, 1991). Elektrik akımı (100 volt) yardımıyla GFLV'ye ait kılıf protein genin spesifik fragmentleri moleküler ağırlıklarına göre jel üzerinde akım doğrultusunda hareket etmeleri sağlanmıştır. Jel daha sonra etidium bromide ile boyanmış ve çeşme suyu ile yıkanmıştır. Daha sonra UV transilliminator aleti üzerinde polaroid kamera ile fotoğrafı çekilmiş ve jel üzerinde oluşan bandlar marker ile kıyaslaması yapılmıştır.

3.2.2. Nematodlar ile İlgili Çalışmalar**3.2.2.1. Virüs Vektörü Nematodlar ile İlgili Arazi Çalışmaları**

Araştırmanın yürütülmüş olduğu alanlarda özellikle hastalık belirtisi gösteren yaşlı bağ alanlarından olmak üzere farklı bağlardan bağ temsil edebilecek sayıda toprak örnekleri alınmıştır. Virüsle infekteli olduğu laboratuvarda ELISA testi ile belirlenmiş olan bağ omcalarının ve GFLV belirtileri gösteren hastalıklı olması muhtemel bitkilerden kılcal köklerle birlikte rizosferden bel yardımıyla 30-40 cm derinlikten yaklaşık olarak 2 kg toprak örneği alınmıştır. Örnekler polietilen torbalara konularak etiketlenmiş ve incelenmek üzere laboratuvara getirilmiştir. Örnekler temiz büyük bir küvet içerisinde dikkatlice karıştırılarak bunun yarısı çalışmalarda kullanılmış ve kalan diğer yarısı ise muhafaza edilmiştir.

3.2.2.2. Nematodlarla İlgili Laboratuvar Çalışmaları**3.2.2.2.(1). Nematodların Toprakтан İzolasyonu**

Asma kısa boğum virüsü ile infekteli olduğu ELISA testi ile belirlenen hastalıklı bağ omcalarının rizosferinden (toprak+kök) alınan toprak örneklerinde söz konusu virüsün doğal vektörü olabilecek nematodlar araştırılmıştır. Her bir örnekteki vektör nematod bireyleri sayılarak populasyon yoğunlukları belirlenmiştir. Yaklaşık 40 kadar örnekte, *Xiphinema* ve *Longidorus* türleri gibi oldukça büyük nematod türlerinin izole edilmesi için önce petri dish yöntemi kullanılmıştır. Ancak bu metodla söz konusu virüs vektörü nematodların vücut yapılarının daha iri olması nedeniyle yalnızca kısmen elde edilebilmiştir. Daha sonra çalışmalarımızda *Xiphinema* türü nematodların izolasyonu amacıyla önerilen Baermann Huni ve Cobb elek yönteminin bir kombinasyonu modifiye edilerek kullanılmıştır (Flegg, 1967). Bu metod ile getirilen 2 kg toprak örneğinin yarısı ufalanarak yaklaşık olarak 2 litre kadar soğuk suda birkaç dakika elle karıştırılmıştır. Böylelikle soğuk suyun nematodlar üzerinde şok etkisi

yapmasından yararlanılarak kendilerini suya bırakmaları sağlamıştır. Su içerisinde kök parçacıklarının üzerindeki topraklar da elle ezilerek kılcal kökler etrafındaki bireylerin su içerisine geçmeleri sağlanmıştır. Bu süspansiyon önce kaba artıklarının uzaklaştırılması için 50 mesh'lik gözenekleri olan bir elekten geçirilerek başka bir 10 litrelik plastik kaba doldurulmuştur. Plastik kap içerisine bir miktar su eklenerek elle yavaş yavaş karıştırılmış ve böylelikle tüm partiküllerin iyice erimesi sağlanmıştır. Daha sonra yaklaşık 10 saniye kadar süspansiyonun durulmasına izin verilerek 140 µm mesh'lik diğer elekten süzdürülmüştür. Eleğin üzerinde kalan nematodlar tazyikli akan su ile durulanarak bir toplama kabına aktarılmıştır. Yine aynı şekilde birkaç kez su temiz oluncaya kadar aynı elekten yıkama işlemi tekrarlandıktan sonra eleğin üzerinde kalan nematodlar bir toplama kabında toplanmıştır. Elde edilen bu süspansiyon 90 mesh'lik bir elekten süzülerek üzerinde kalan tortu ile beraber cam bir petri kabı içerisine alınmış ve bu şekilde yaklaşık olarak 16 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda elek kaldırılarak cam petri içerisindeki suya geçen nematodlar 100 cc'lik bir ölçü silindire alınmıştır. Burada dört saat kadar bekletildikten sonra ölçü silindirin içerisindeki suyun üst kısmı tabanda 10 cc kalıncaya kadar yavaşça uzaklaştırılmış ve kalan kısmı ise suyun dibine çöken nematodlar ile birlikte 15 cc'lik bir cam tüpe alınmıştır. Bu cam tüp yaklaşık 1-2 saat bekletildikten sonra üste kalan su bir pastör pipeti yardımıyla tahliye edilmiştir. Tüpün dibinde 1 cc su içerisinde toplanan *Xiphinema* cinsi nematodlar mikroskopik yöntemlerle incelenmeye alınmıştır. Böylelikle *Xiphinema* türlerinin bulunduğu alanlar tespit edilmiştir.

3.2.2.2.(2). Nematodların Bünyesinde Virüsün Serolojik Testlerle Belirlenmesi

Araştırmanın yürütüldüğü alanlardan Kasım-2002 döneminde alınan ve *X. index* ile bulaşık olduğu belirlenen toprak örneklerinden izole edilen nematod populasyonlarından her bir örnek için 240 adet birey ışıklı mikroskop altında tek tek toplanmıştır. Bu nematod populasyonlarından elde edilen bireylerin vücutlarında virüs bulundurup bulundurmadığı DAS-ELISA ile test edilmiştir.

Araştırmanın yürütüldüğü alanlarda GFLV'nin direk bitki dokusu içerisinde araştırılmasının yanı sıra, bu virüsün taşınmasında vektör olarak görev yapabilen nematodların bünyesinde virüsün bulunup bulunmadığı serolojik testler yapılarak araştırılmıştır (Fresno ve Arias, 1993).

3.2.2.2.(3). Nematodlarda Virüsler İle İlgili Moleküler Çalışmalar

Araştırma süresince yapılan DAS-ELISA testleriyle virüsle bulaşık olduğu serolojik olarak belirlenen bağ bitkilerin rizosferinden elde edilen vektör nematod örneklerinden total RNA ekstraksiyonu Buzkan ve Walter (2001)'e göre yapılmıştır. Bu çalışmada kullanılan yöntem yukarıda "3.2.1.3. Bağlarda Virüs ile İlgili Moleküler Çalışmalar" isimli bölümde verilmiştir.

3.2.2.2.(4). Nematodların Daimi Preparatlarının Yapılması ve Teşhis Edilmesi

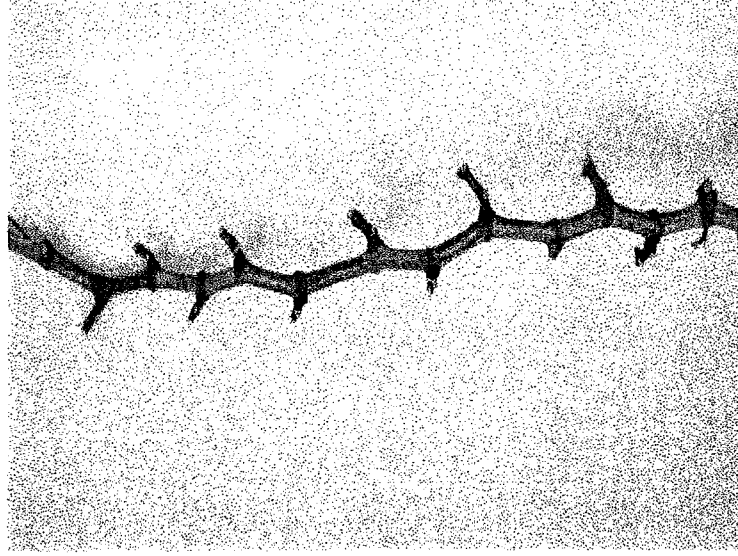
Çalışılan bölgede bağ alanlarından getirilen topraklardan izole edilen nematodların tür düzeyinde teşhis karakterlerinin belirlenmesi amacıyla Hooper (1986)'ın yöntemine göre daimi preparatları yapılmıştır. Bu amaçla topraktan izole edilen nematodlar 65-70 °C'de 30 saniye süreyle ısıtılarak öldürülmüş ve 7 ml formalin (% 40 formaldehide) +2 ml triethanolamin +91 ml saf sudan oluşan TAF çözeltisi içerisinde fikse edilmiştir. Fikse edilen nematodlar önce 20 kısım etanol (% 96'lık), bir kısım gliserin ve 79 kısım saf sudan oluşan birinci çözeltiye alınarak oda sıcaklığında bir petri içerisinde ağzı yarı kapalı olarak bir gün süreyle bekletilmiştir. Ertesi gün 5 kısım gliserin ve 95 kısım etanol içeren ikinci çözelti içerisinde ağzı yarı kapalı olarak bir gün süreyle tutulmuştur. Petri kabındaki sıvı kısım tamamen uçtuktan sonra saf gliserin içerisine alınan nematodlar ışıklı mikroskop altında 10x10 mm büyütmede bir bambu çubuğu yardımıyla tek tek alınarak lam üzerinde etrafı parafilm halka ile çevrili bir damla gliserin içerisinde sabitleştirilip tür teşhisi için hazır hale getirilmiştir.

Nematodların tür teşhisleri Prof. Dr. İ. Halil Elekçioğlu tarafından yapılmıştır.

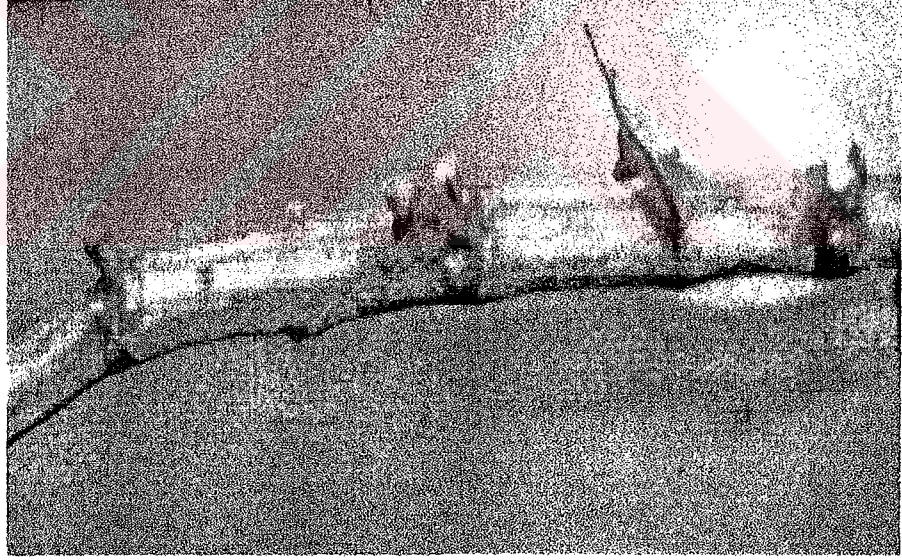
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA**4.1. Asma Kısa Boğum Virüsü ile İlgili Çalışmalar****4.1.1. Arazide Gözlemler ve Örnek Toplama Çalışmaları**

Çalışmanın kapsamı içerisindeki illerde bağ alanlarında Nisan-Mayıs ve Eylül-Ekim aylarında olmak üzere yılda iki kez survey çalışmaları yapılmıştır. Bağlarda virüs hastalığı olabilecek belirtiler gözlenmiştir. Bu bağlardan 2002 ve 2003 yıllarında toplam 384 adet bitki örneği toplanmıştır. Virüs belirtileri gösteren, özellikle yaşlı bağlar dikkate alınarak Adana merkez ve ilçelerinden olmak üzere Seyhan'da 104, Saimbeyli'de 20, Ceyhan'da 10, Pozantı'da 7, Karaisalı'da 9 ve Kozan'da 10 adet ve ayrıca Mersin'de 114 ve Tarsus'ta ise 110 adet örnek alınmıştır. Örnek toplama sırasında düşük verim, gelişme geriliği, meyvelerde irili ufaklı gelişmeler, yapraklarda sararmalar, mozaik desenler ve damar bandlaşmaları, sürgünlerde şişkin yada ikiz boğumların teşekkülü, yassılaşması, boğum aralarının kısalması ve zigzag gelişim gibi belirtilerin olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5). Ayrıca örnek toplama amacıyla yürütülen çalışmalar sırasında bağlarda yelpaze yapraklılık, sarı mozaik ve damar bandlaşması gibi belirtiler göz önünde bulundurulmuştur. Bu farklılıkların virüsün değişik izolatlarının genetiksel yapısının birbirinden farklı olmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Krake ve ark., 1999).

Araştırma sırasında hastalıklı bitkilerde gözlemlenen belirtileri başka araştırmacılar da rapor etmişlerdir. Hewitt (1953, 1954), Amerika'da ilk olarak Santa Clara vadisinde 1948 yılında ortaya çıkan ve giderek artan cüceleşme, sürgünlerde kısalma, yapraklarda benekleşme, şekil bozuklukları, çiçek dökümleri, ilk dönemlerde özellikle 8-11'inci boğumlardaki bu kısalma, zigzag sürgün ve çift nodyum oluşumu gibi tipik belirtiler oluşturan etmenin GFLV olduğunu bildirmiştir.



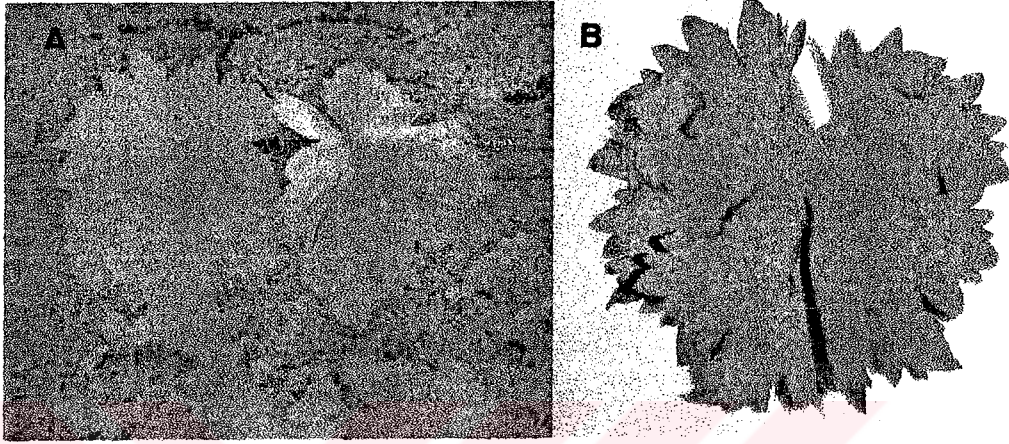
Şekil 4.1. Asma kısa boğum virüsü ile bulaşık asma sürgününde zigzag görünüm ve boğum kısılması.



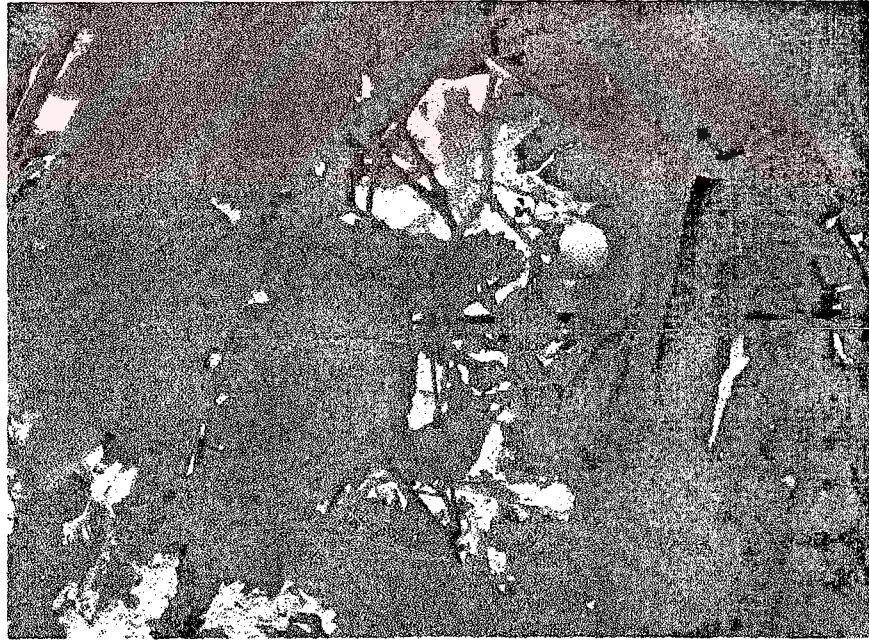
Şekil 4.2. Asma kısa boğum virüsü ile bulaşık asma sürgününde yassılaşma.

Krake ve ark. (1999), GFLV'nin bitki çeşidi ve iklim koşullarına bağlı olarak meydana getirdiği belirtilerinin değiştiğini belirtmişlerdir. İlkbahar aylarındaki benekler yada mozaik belirtilerinin yerine yazın (hastalığın kronik devresinde) yapraklarda sinüs açısının genişlediğini, derinleştiğini ve diş sayısının arttığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada da ilkbaharda (Nisan-Mayıs) hastalıklı bitkilerin

yapraklarında görülen mozaik desenlerle beneklenmelerin yazın hava sıcaklıklarının artmasıyla giderek kaybolduğu gözlenmiştir.



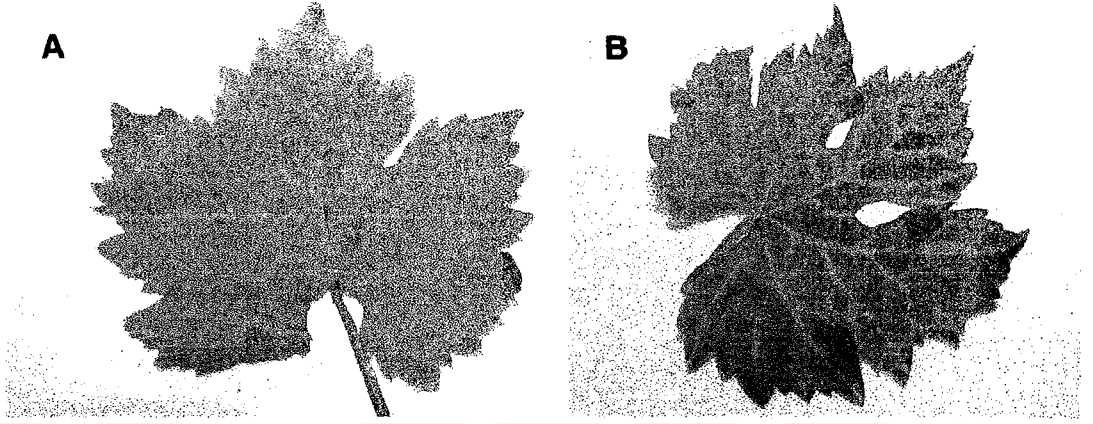
Şekil 4.3. Asma kısa boğum virüsü ile bulaşık bitki yaprağında sarıma (A), yaprakta şekil bozukluğu ve kenar diş sayısının artması (B).



Şekil 4.4. Asma kısa boğum virüsü ile bulaşık omcada salkımların seyrek tutumu ve irili ufaklı dane teşekkülü (boncuklanma).

Walter ve Martelli (1997), GFLV ile bulaşık bitkilerde yaprak belirtilerinin yanı sıra bazen boğumlar arasında kısalma ve düzensiz gelişmeler, çift boğum, yassılaşıma gibi sürgün anormallikleri, salkım sayısında azalma ve küçülmeler, irili

ufaklı dane oluşumu gibi belirtilerin oluştuğunu bildirmişlerdir. Akdoğan (1956, 1958, 1965), bağlarda zarar oluşturan GFLV'yi semptomolojik olarak saptamış ve adını 'Bulaşık Soysuzlaşma' koymuştur.



Şekil 4.5. Asma kısa boğum virüsü ile bulaşık yaprakta tipik mozaikleşme (A), damar bandlaşması ve simetri bozulması (B).

Araştırma süresince bağ alanlarında yürütülmüş olan örnek toplama çalışmalarında benzer belirtilere rastlanmıştır. Bunlardan alınan örneklerin serolojik testlemeleri sonucunda çoğunlukla GFLV ile bulaşık olduğu saptanmıştır. Ancak aynı tip belirtilere sahip olup GFLV ile bulaşık çıkmayanların ise başka tür virüs ve benzeri diğer hastalıklarla enfekteli olduğu düşünülmektedir. Serolojik ve biyolojik indekslemeler ile yapılan çalışmaların sonucunda Türkiye’de bu güne kadar bağlarda 14 virüs hastalığının bulunduğu saptanmıştır (Akdoğan, 1956; Erdiller, 1982; Martelli, 1987; Azeri ve ark., 1988; Gürsoy, 1988; Akbaş ve Erdiller, 1993; Özaslan, 1991, 1993, 1995; Çiğsar, 2002).

4.1.2. Laboratuvar Çalışmaları

4.1.2.1. DAS-ELISA

Asma kısa boğum virüsünün de üyesi olduğu nepovirüslerin coğrafi dağılımı sınırlı olmasına rağmen bu grubun hemen hemen tüm üyeleri önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Murrant, 1981). Araziden getirilen bitki dokusu

örneklerinde GFLV'nin varlığı Clarks ve Adams (1977)'in yöntemi kullanılarak DAS-ELISA (Ek II) ile belirlenmiştir. Araştırmanın yürütüldüğü alanlardaki bağlardan toplanarak testlenen örneklerde saptanan GFLV'nin bulaşıklık oranları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Karaisalı ve Kozan'dan alınan bağ örnekleri GFLV ile bulaşık çıkmamıştır. Adana-Balcalı'dan 20 adet örnek (% 19.2), Pozantı'dan 2 adet örnek (% 28.6), Ceyhan'dan 2 adet örnek (% 20.0), Saimbeyli'den 5 adet örnek (% 25.0), Mersin'den 17 adet örnek (% 14.9) ve Tarsus'tan 17 adet örnek (% 15.5) GFLV ile bulaşık olarak belirlenmiştir. Görüldüğü üzere araziden getirilen toplam 384 bitki örneğinden 63 (% 16.4) tanesinde DAS-ELISA yöntemiyle virüs saptanmıştır.

Araştırmanın yürütüldüğü alanlarda GFLV ile bulaşık olduğu DAS-ELISA yöntemi ile tespit edilen örneklerden elde edilen optik densiteler çizelgeler halinde verilmiştir (Ek IV-A, IV-B, IV-C, IV-D, IV-E, IV-F, IV-G ve IV-H).

Çizelge 4.1. Örneklerin alındığı yerlere göre 2002-2003 yıllarında toplam alınan örnek sayısı, Asma kısa boğum virüsü ile bulaşık örnek sayısı ve bulaşıklık oranı (%).

Örnek alınan yer	Örnek sayısı	Bulaşık örnek sayısı	Bulaşıklık oranı (%)
Adana-Balcalı	104	20	19.2
Pozantı	7	2	28.6
Ceyhan	10	2	20.0
Karaisalı	9	---	---
Saimbeyli	20	5	25.0
Kozan	10	---	---
Mersin	114	17	14.9
Tarsus	110	17	15.5
Toplam	384	63	16.4

Araştırma sırasında 2001 yılında ilkbahar ve sonbahar aylarında Mersin-Tarsus'a bağlı Tekke, Bağcılar, Kürkcü, Nacarlı ve Yanpar köylerine ait olan 177 adet yaprak ve sürgün örneklerinden LOEWE firmasından satın aldığımız antiserumla yaptığımız testlerden pozitif sonuç alınamamıştır. Bu örneklerden testlemelerde negatif gibi görünen (reaksiyon göstermeyen) 56 tanesi hem LOEWE firmasından satın aldığımızla hem de elimizdeki ikinci bir antiserumla (Dr. İlyas Çiğsar'dan temin edilen) yeniden testlemeye tabii tutulmuştur. Hastalıkla bulaşık olan 5 örnek yalnızca ikinci antiseruma pozitif reaksiyon göstermiştir. İkinci antiserumla açık bir şekilde pozitif reaksiyon göstermesi sonucu Loewe firmasının antiserumlarının kullanılmasından vazgeçilmiştir. Araştırmada 2001 yılında Loewe firmasının antiserumları ile testlenen 177 adet örnek değerlendirilmeye alınmamıştır. Serolojik testlemelere 2002-2003 yıllarında araziden getirilen yeni örneklerle AGDİA firmasından getirilen üçüncü bir antiserum ile devam edilmiştir. Tarsus bölgesine ait 2002 yılında alınan toplam 9 adet örnek (5+4) GFLV ile bulaşık olarak saptanmıştır. Aynı testleme sırasında daha önceden pozitif olarak değerlendirdiğimiz ancak titeri düşük bulduğumuz Pozantı ve Ceyhan'dan getirilen örnekler de (2+2) yine GFLV saptanmıştır. Böylelikle Mayıs 2002 döneminde her iki antiserumdan (ikinci ve üçüncü) elde edilen sonuçların birbirine benzer olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışma sonuçları incelendiğinde GFLV bulaşıklık oranların en yüksek % 28.6 ile Pozantı'da olduğu ve Karaisalı ve Kozan'dan alınan bağ örneklerinin GFLV ile bulaşık olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Virüsle bulaşık olan alanların arasında oransal bakımdan çok büyük farklılık olmadığı serolojik testler ile belirlenmiştir. Bu virüsün tanılanmasında serolojik testlerin uygun ve başarılı olduğu daha önceden bir çok araştırmacı tarafından da bildirilmiştir. Dar-Issa ve Iraki (2002)'de serolojik testlerin GFLV'nin tanılanması için kullanılan en iyi testler olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde GFLV'nin ELISA ile testlenebileceği Walter ve ark. (1984) tarafından da bildirilmiştir. Yine bu virüsün serolojik yöntemlerle etkili bir şekilde belirlendiği ve kullanılan ELISA teknikleri içerisinde DAS-ELISA yönteminin başarılı olduğu bir çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Luisoni, 1991; Rowhani, 1992; Grenan ve ark., 1993; Walter, 1993; Boscia ve

ark., 1997). Hastalığın serolojik olarak saptanmasında asma taze yaprakların iyi sonuç verdiği ve kabuk dokusunun kullanılmasıyla da virüsün kolaylıkla tespit edilebildiği belirtilmiştir (Monette, 1985; Martelli, 1991; Fresno ve Arias, 1993).

Nogay ve ark. (1995), Marmara Bölgesi'nde DAS-ELISA testi kullanarak yapmış oldukları araştırmaları sonucunda hastalık oranının % 11.1 olduğunu ve test edilen 71 adet örnekten 35'inde GFLV ile ArMV hastalık etmenlerinin bulunduğunu bildirmişlerdir. Akbaş ve Erdiller (1998), Karaman, Konya ve Nevşehir illerinde bulunan bağ alanlarında yaptıkları çalışmada DAS-ELISA yöntemiyle testledikleri 344 adet örnekte en yaygın virüs hastalığının GFLV olduğunu (% 39.5) ve bunu sırasıyla TBRV ile GLRaVs'lerin izlediğini belirtmişlerdir. Köklü ve ark. (1998), Trakya Bölgesi'nde yaptıkları surveyde ELISA yöntemiyle 165 adet örneğin % 14.5'inin GFLV ile bulaşık olduğunu bildirmişlerdir. Çiğsar ve ark. (2002), Güneydoğu ve İç Anadolu bölgelerinde bazı bağ virüs ve virüs benzeri hastalıkların varlığını araştırmak üzere yürütmüş oldukları çalışmalarında GFLV'nin yaygınlığını ELISA testi ile % 10.7 olarak saptamışlardır. Çiğsar (2002), Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Nevşehir ili bağlarında 1999-2002 yılları arasında virüs ve virüs benzeri hastalıklar üzerine yapmış olduğu çalışmasında ELISA testi sonuçlarına göre almış olduğu 1001 adet örneğin % 8.1'inin GFLV ile bulaşık olduğunu bildirmiştir.

Araştırmanın yürütüldüğü alanlarda hastalıklı bitkilerin sürgün uzunluklarında sağlıklılara göre belirgin kısaltmalar görülmüştür. Abrasheva (1976), yaptığı çalışmasında GFLV ile bulaşık bağlarda oransal olarak sürgün uzunluğunun % 40.0 ve verimin 2.5 kat azaldığını saptamıştır. Bu gözlemler meyve verimi üzerinde de görülmüştür. Martelli ve Savino (1988), bağların GFLV ile bulaşık olması sonucu ömrünün kıaldığını, ürünün kalitesinde ve verimde % 80'e varan azalmalara neden olduğunu ortaya koymuştur. Özaslan ve ark. (1993, 1998), Gaziantep'te % 37.8 ve Kilis'de ise % 43.0 dolayında verim düşüklüğünün olduğunu bildirilmiştir. Martelli (1999), nepovirüslerin her durumda üründe kalite ve miktarının düşmesine, asmanın ömrünün kısaltılmasına, aşı tutma ve köklenmenin azaltılmasına, olumsuz iklim koşullarına karşı duyarlılığın artmasına neden olduğunu rapor etmiştir.

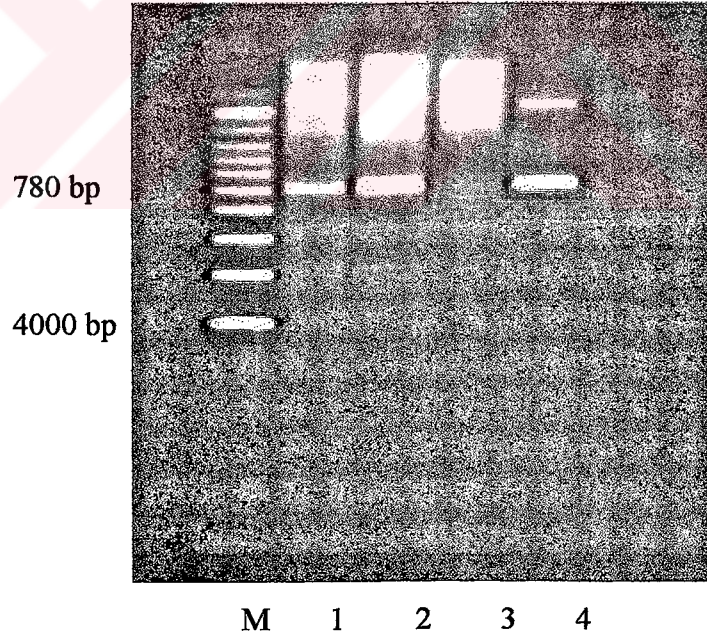
Elde edilen sonuçlar daha önce GFLV ile ilgili yapılmış olan araştırmalar ile karşılaştırıldığında bulaşıklık oranları bakımından büyük farklılık olmadığı anlaşılmaktadır. Benzer çalışmalar yapılması durumunda uygun antiserum kullanılması, elde edilecek sonuçların güvenilirliği açısından büyük önem taşımaktadır. Bağların bu virüs ile bulaşık olması sonucu bitki gelişimi ve üründe önemli kayıplara neden olduğu anlaşılmaktadır.

4.1.2.2. PCR

Laboratuvar çalışmaları sonucunda virüs ile enfekteli olduğu saptanan bağ bitki örneği ve bu bağ bitkilerinin rhizosfer kısmından alınan olası vektör nematodların bünyesinde GFLV'nin varlığı Polimerase Chain Reaction (PCR) tekniği ile moleküler düzeyde de araştırılmıştır. Bu çalışmada enfekteli bağ bitkisinde ve iki nematod örneğinde GFLV'nin F-13 ırkının RNA-2 sinin 780 bp uzunluğundaki bir sekansı çoğaltılmıştır. Agaroz jel (% 1) elektroforezde, RNA preparatı band oluşturmuştur (Şekil 4.6). Gerek GFLV ile infekteli bağ bitkisinden gerekse vektör nematodlardan elde edilen ekstrakt kullanılarak yürütülen PCR testlerinde GFLV'nin F-13 ırkına özgü 780 bp uzunluğundaki DNA bandları elde edilmiştir (Şekil 4.6).

Moliogka ve ark. (2004), Comoviridae türlerinin ve diğer çift partiküllü bazı virüslerin tanınması ve tespit edilmesine için nested RT-PCR metodunu kullanmışlar ve tanınmanın duyarlılığını arttırdığını belirtmişlerdir. Elleuch ve ark. (2003), Tunus'ta turuncgil ve bağ alanlarında üç farklı viroidin tanısı için en uygun protokol olarak RT-PCR'ı belirtmişlerdir. Bu metodun hastalıklardan ari sertifikalı bitki materyallerinin üretilmesi için kullanılmasının gerektiğini bildirmişlerdir. Dar-Issa ve Iraki (2002), GFLV'yi RT-PCR ve IC-TR-PCR yöntemleriyle testlemişlerdir. Kılıf protein primerleri kullanmaları halinde her iki metod arasında büyük bir farklılık görülmediğini bildirmişlerdir. Finetti-Sialer ve ark. (2002), İtalya'da Palagiano bağlarında GFLV'yi tespit etmek için fluorescent RT-PCR metodunu uygulamıştır. Kullandığı fluorescent problemlerin virüsün tespitinde faydalı olduğunu belirtmiştir. Nepovirüslerin teşhisinde PCR ve

moleküler hibridizasyon yöntemlerinin de çok uygun yöntemler olduğu bildirilmiştir (Minafra ve ark. 1997; Walter, 1991; Fuchs ve ark., 1989). Çiğsar (2002), Güneydoğu Anadolu bölgesi ve Nevşehir ili bağlarında 1999-2002 yılları arasında bağ virüs ve virüs benzeri hastalıklar üzerine yapmış olduğu doktora çalışmasında birçok nepovirüsün tanısında ve karakterizasyonunda PCR yöntemini kullanmıştır. Bu yöntemin nepovirüslerin teşhisinde uygun olduğu bildirmiştir Dodds ve ark. (1984), bitkilerde virüs hastalıklarının saptanmasında çeşitli teknikleri kullanmışlardır. Konukçu bitkiler üzerinde oluşan hastalık belirtilerinin, konukçu sayısının, virüsün in vitro vektör ilişkilerinin ve diğer taşınma özelliklerinin veya farklı tipte serolojik testlerin yanı sıra son yıllarda virüsün capsid protein ve genom yapısının virüslerin tanınmasında kullanılan metodlar olduğunu belirtmişlerdir.



Şekil 4.6. Adana-Balcalı'dan alınan, bağdan ve 2 nematod örneğinden ekstrakte edilen GFLV F-13 ırkının RNA-2 preparatının RT-PCR ile çoğaltılan 780 bp'lik bir sekansının agaroz jel (% 1) elektroforezde oluşturduğu bandlar; 1 ve 2: *Xiphinema index*, 3: sağlıklı örnek (negatif kontrol), 4: bağ örnekleri, M: Marker.

Virüsün tanısında kullanılan RT-PCR yöntemi alışıla gelmiş diğer simptomolojik (gözlemsel) veya indekslemeye dayalı olan yada serolojik metodlara

göre daha avantajlıdır. Bunlar simptomolojik çalışmalardaki yanılgıların olmaması, biyolojik indeksleme çalışmalarında kullanılan çok sayıda bitkiye ve mekana ve ayrıca simptom gelişimi için gerekli uzun bir bekleme dönemine ihtiyaç duyulmamasıdır. Buna ek olarak serolojik testlemelerde bulaşık bitkide virüs yoğunluğunun az olması nedeniyle negatif yada şüpheli sonuçların alınması mümkün değildir. PCR metoduyla hedeflenen organizmanın varlığına dair kısa zamanda ve kesin sonuç alınmaktadır.

4.1.3. Mekanik İnokulasyon Çalışmaları

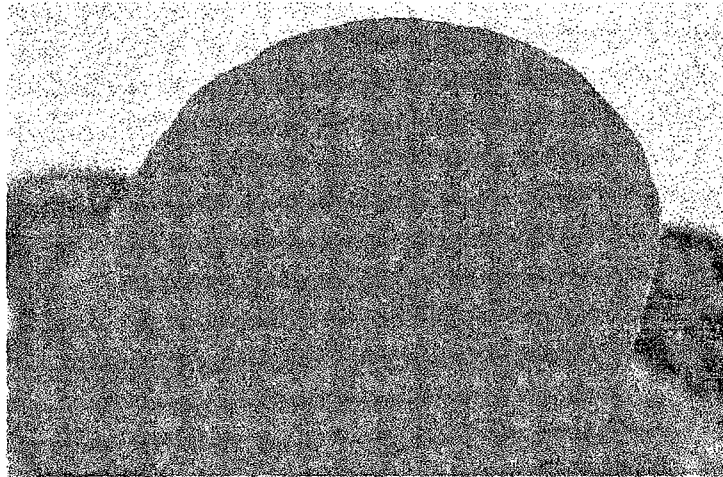
Yapılan testler sonucu GFLV ile bulaşık olduğu belirlenen örneklerden 57 tanesi biyolojik indekslemeye tabii tutulmuştur. Bu örnekler Adana-Balcalı bölgesine (19 örnek), Mersin bölgesine (20 adet örnek) ve Tarsus bölgesine (18 örnek) aittir. Mekanik olarak inokule edilen bu otsu indikatörlerden 13 adedinde pozitif sonuç alınmıştır. İndikatör bitkilerde GFLV bulaşıklığı serolojik olarak da belirlenmiştir (Ek IV-H). Bu çalışmalar sonucunda her örnek için dört tekerrür ve bir kontrol olarak aşılana otsu indikatör bitkilerden yalnızca *N. benthamiana* 'ların yapraklarında belirgin klorotik lokal lezyonlara rastlanmıştır (Şekil 4.7 ve 4.8). Bu belirtiler ise bitki gelişimi ile birlikte yaklaşık 8-10 gün içerisinde kendiliğinden kaybolmuştur. Kullanılan diğer indikatör bitkilerde ise virüsten kaynaklanabilecek belirgin belirtiler izlenmemiştir.

Bu güne kadar bir çok araştırmacı GFLV'nin otsu ve odunsu indikatör bitkilere mekanik inokulasyon çalışmalarının sonuçlarını bildirmişlerdir (Uyemoto 1976; Tanaka, 1988; Özaslan, 1995; Çiğsar, 2002). Vuittenez (1970), GFLV'nin mekanik olarak otsu test bitkilerine taşınabildiğini ancak bunun her zaman mümkün olmadığını ve en iyi otsu konukçu test bitkisinin *C. quinoa* olduğunu belirtmiştir. Asma kısa boğum virüsünün indekslenmesinde *V. rupestris* x *V. riparia* melezlerinin kullanılabileceğini, *Vitis* indikatörleri üzerinde cüceleşme, sinüs açısında büyüme, yaprak deformasyonları, zigzag sürgün oluşumları, nodyumlarda şişme ve karakteristik petiolar açık yaprak görünümü oluşturduğunu rapor etmiştir. Uyemoto (1976), GFLV için *C. quinoa*'nın duyarlı bir test bitkisi olduğunu

belirtmiştir. Tanaka (1988), Japonya’da bağlarda zarar oluşturan virüs hastalıklarını, sera koşullarında bazı *Vitis* spp. ait indikatörler üzerinde yaptıkları indekslemelerle GFLV, GFkV ve GLRV’yi saptamışlardır. Aynı şekilde mekanik inokulasyon çalışmaları sonucunda GFLV’nin otsu indikatörlerden *C. quinoa* ve *G. globosa* üzerine zorlukla taşındığını bildirmiştir.



Şekil 4.7. Asma kısa boğum virüsü ile aşılanan *Nicotiana benthamiana* test bitkilerinin yapraklarında klorotik lokal lezyonlar.



Şekil 4.8. Asma kısa boğum virüsü ile aşılanan *Nicotiana benthamiana* test bitkisinin yaprağında klorotik lokal lezyonların yakından görünümü.

Hewitt ve ark. (1970), aynı şekilde otsu ve odunsu indikatör bitkiler üzerine GFLV'nin zorlukla taşındığını belirtmişlerdir. Saric ve Wricher (1975), GFLV'nin *C. amaranthicolor* yapraklarında lokal lezyon veren kısımlarında az, ancak sistemik olduğunu, infekteli kısımlarında ise çok sayıda virüs partiküllerinin bulunduğunu bildirmiştir. Izadpanah (2003), GFLV için potansiyel rezervuar bitkisi olarak köpek dişi ayrığı (*Cynodon dactylon* L.) üzerinde araştırmalar yapmıştır. Virüsle infekteli Köpek dişi ayrığı bitkilerinden *C. quinoa* indikatörlerine mekanik inokulasyon yapmıştır. İnokule edilen 29 *C. quinoa*'dan 17 adedine virüs taşınabilmiş ve bunlardan ancak 5 tanesinde semptom meydana geldiğini bildirmiştir. Diğerlerinde ise semptom gelişimi gözlenmemiştir. Buna benzer bir diğer denemesinde ise 43 adet virüsle infekteli köpek dişi ayrığından *C. quinoa*'ya mekanik inokulasyon yapmıştır. Bunlardan da 14 adedinde virüs taşınabilmiş ancak yalnızca 3 adedinde semptom gelişimi gözlenmiştir. Buna göre serolojik çalışmaların daha kolay ve verimli olduğu görülmüştür. Bu nedenle biyolojik çalışmalara paralel olarak serolojik çalışmalarında yapılması uygun görülmüştür.

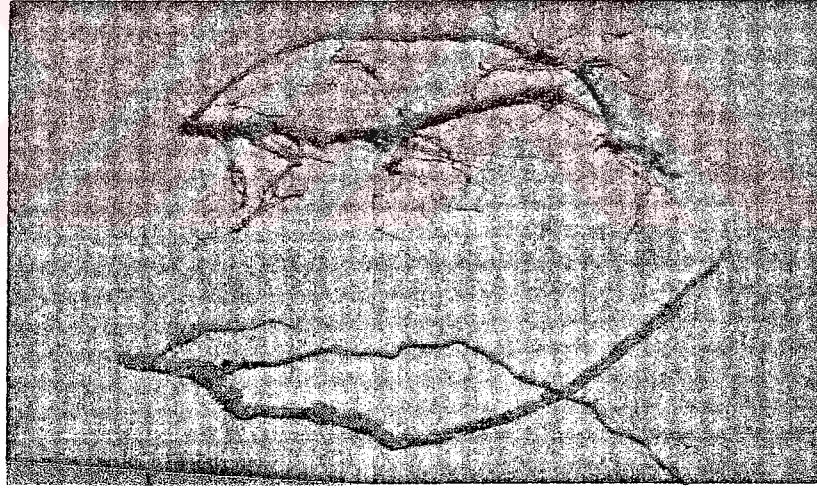
Görüldüğü üzere bu virüsün otsu indikatör bitkilere mekanik inokulasyonlar ile taşınması oldukça güçtür. İnokule edilen bitkilerde oluşan semptomlar ise bitki gelişimi ile birlikte kısa süre sonra kendiliğinden kaybolmaktadır.

4.2. Nematodlar İle İlgili Çalışmalar

4.2.1. Virüs Vektörü Nematodlar ile İlgili Arazi Çalışmaları

Araştırmanın yürütüldüğü alanlarda daha önceden gerek GFLV ile bulaşık olduğu saptanmış olan gerekse bulaşık olduğu bilinmeyen alanlardan örnekler alınmıştır. Özellikle yaşlı bağlar dikkate alınarak yapılan çalışmada, bağ bitkilerinin rhizosferinden örnek alımı sırasında nematod ile bulaşık bitkilerde özellikle kılcal köklerinin azaldığı, kahverengileştiği ve soyulduğu gözlenmiştir (Şekil 4.9). Ayrıca düşük verim, bağlarda yer yer kurumalar veya cıızlaşmalar, gelişme geriliği ve sararmalar gibi nematod kaynaklı olabilecek semptomlara da rastlanmıştır.

Asma kısa boğum virüsü nepovirüs grubuna dahil ve longidorid nematod olan *X. index* ile taşınmaktadır (Avgelis, 1997; Martelli ve Savino, 1988). Bu nematodun bitkilerde beslenmesi çok ciddi zararlara ve hatta kök sisteminin tamamen çürüyerek ölmesine neden olabilmektedir. Kök uçlarının ölmesinin hemen ardından bitkinin yeni kök uçlarının dallanması görülür. Ancak yeni kök uçları da nematod tarafından saldırıya uğramaktadır. Bu durum asmanın verimini ve gücünü azaltır. Asma köklerinin *X. index* için toprakta iyi bir besin ve virüs inokulum kaynağı olmaları ve uzun bir süre yaşayabilen yapılarının bulunması, pestisitlerin zayıf penetre olması ve dağılımının yine zayıf olması, toprakta vektörün daha derin kesimlerde bulunması gibi pek çok nedenden dolayı vektör mücadelesinde nematisit ve fungusit kullanımı başarısız olmaktadır (Raski ve ark., 1983; Raski ve Goheen, 1988).



Şekil 4.9. Nematod ile bulaşık bağ bitkilerde kılcal köklerinin azalması.

Nematodların bitkilerin kök aksamında beslenmeleri sonucu meydana getirdikleri zarardan dolayı bitki gelişimi geri kalmaktadır. Cohn ve Orion (1970), yapmış oldukları saksı denemelerinde *X. index*'in bağ bitkilerinde altı ay süresinde gelişmeyi % 34 düzeyinde azalttığını belirlemişlerdir. Raski ve ark. (1983), ise bitki gelişimi ile ilgili olarak dayanıklılığın ıslahı çalışmalarıyla GFLV'ye tolerant ve *X. index*'e dayanıklı *V. vinifera* varyetelerinin yada *V. vinifera*'nın dan başka *Vitis* spp.'nin bulunabileceğini belirtmişlerdir. Bunların geliştirilmesinin nematodla ağır

infekteli bağ alanlarında virüsten ve vektör nematodlardan kaynaklanan sorunun çözümü konusunda umut verici olduğunu bildirmişlerdir.

4.2.2. Laboratuvar Çalışmaları

4.2.2.1. Nematodların Toprakta İzolasyonu

Gerek GFLV ile infekteli olduğu ELISA testi ile belirlenen hastalıklı bitkilerin rhizosferinden alınan gerekse tesadüfi olarak bağlardan alınarak laboratuvara getirilen toprak örneklerinde söz konusu virüsün doğal vektörü olabilecek *Xiphinema* türleri ve bunların bulunduğu alanlar belirlenmiştir (Çizelge 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5).

Araştırmanın yürütüldüğü alanlarda 2002 ve 2003 yıllarında alınan toplam 307 adet toprak örneğinin 66'sinin (% 21.5) *X. index* ile, 275'ünün (% 89.6) ise *X. pachtaicum* ile bulaşık olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Araştırmanın yürütüldüğü alanlarda 2002-2003 yıllarında bağlardan alınan toprak örneklerinde saptanan *Xiphinema* cinsi nematod türleri ve bulaşıklık oranları (%).

Örnek alınan yer	Toplam örnek sayısı	<i>Xiphinema index</i>		<i>Xiphinema pachtaicum</i>	
		Bulaşık örnek sayısı	Bulaşıklık (%)	Bulaşık örnek sayısı	Bulaşıklık (%)
Adana-Balcalı	87	21	24.1	83	95.4
Pozantı	2	---	---	2	100.0
Ceyhan	2	---	---	2	100.0
Saimbeyli	4	---	---	2	50.0
Tufanbeyli	10	---	---	9	90.0
Koza	10	---	---	8	50.0
Mersin	103	20	19.4	96	93.2
Tarsus	89	25	28.1	73	82.0
Toplam	307	66	21.5	275	89.6

Görüldüğü üzere *X. index* ile en çok bulaşıklık 25 örnek ile (% 28.1) Tarsus'ta saptanmıştır. Bunu Adana-Balcalı (% 24.1) ve Mersin (% 19.4) izlemektedir. Ceyhan, Saimbeyli, Tufanbeyli ve Kozan'dan alınan toprak örneklerinde *X. index*'e rastlanmamıştır.

Ayrıca yine Çizelge 4.2'de görüldüğü üzere *X. pachtaicum* ile en çok bulaşık bağ alanlarına 2'şer örnek ile (% 100.0) Pozantı ve Ceyhan'da saptanmıştır. Bunu Adana-Balcalı (% 95.4), Mersin (% 93.2), Tufanbeyli (% 90.0), Tarsus (% 82.0), Saimbeyli (% 50.0) ve Kozan (% 50.0) izlemektedir.

Mersin ilinden Resul, Evrenli, Musalı, Çelebili, Doruklu, Buluklu, Kerimler köylerinden ve Alata Araştırma İstasyonu'ndan 2002-2003 yıllarında bağ alanlarından alınan toplam 103 adet toprak örneğinin 20'sinin (% 19.4) *X. index* ile ve 96'sının (% 93.2) *X. pachtaicum* ile bulaşık olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Mersin ilinde 2002-2003 yıllarında bağ alanlarından alınan toprak örneklerinde saptanan *Xiphinema* cinsi nematod türleri ve bulaşıklık oranları (%).

Örnek alınan yer	Toplam örnek sayısı	<i>Xiphinema index</i>		<i>Xiphinema pachtaicum</i>	
		Bulaşık örnek sayısı	Bulaşıklık (%)	Bulaşık örnek sayısı	Bulaşıklık (%)
Resul köyü	29	9	31.0	27	93.1
Evrenli köyü	8	---	---	7	87.5
Musalı köyü	5	---	---	4	80.0
Çelebili köyü	6	---	---	4	66.7
Doruklu köyü	6	4	66.7	6	100.0
Buluklu köyü	16	2	12.5	16	100.0
Kerimler köyü	27	5	18.5	26	96.3
Alata Arş.İst.	6	---	---	6	100.0
Toplam	103	20	19.4	96	93.2

Resul (% 31.0), Doruklu (% 66.7), Buluklu (% 12.5) ve Kerimler köylerinden (% 18.5) getirilen toprak örneklerinin *X. index* ile bulaşık olduğu ortaya

konulmuştur. Yine Doruklu ve Buluklu köylerinden ve Alata Araştırma İstasyonu'ndan bağ alanlarından getirilen toprak örneklerinin tamamının (% 100.0) *X. pachtaicum* ile bulaşık olduğu ortaya konulmuştur.

Tarsus ilçesinde 2002-2003 yıllarında bağ alanlarından alınan toplam 89 adet toprak örneğinin 25'inin (% 28.1) *X. index* ile ve 73'ünün (% 82.0) *X. pachtaicum* ile bulaşık olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.4). Bağcılar, Evcı ve Nacar köylerinden getirilen örneklerde sırasıyla % 36.7, % 36.4 ve % 37.5 oranında *X. index* ile bulaşık olduğu saptanmıştır. Bağcılar, Çamlıyayla, Tekke ve Yanpar köylerinden getirilen örneklerin tamamının (% 100.0) *X. pachtaicum* ile bulaşık olduğu ortaya konulmuştur.

Çizelge 4.4. Tarsus ilçesinde 2002-2003 yıllarında bağ alanlarından alınan toprak örneklerinde saptanan *Xiphinema* cinsi nematod türleri ve bulaşıklık oranları (%).

Örnek alınan yer	Toplam örnek sayısı	<i>Xiphinema index</i>		<i>Xiphinema pachtaicum</i>	
		Bulaşık örnek sayısı	Bulaşıklık (%)	Bulaşık örnek sayısı	Bulaşıklık (%)
Bağcılar köyü	30	11	36.7	30	100.0
Evcı köyü	22	8	36.4	17	72.3
Eliyeşiller	6	---	---	2	33.3
Çamlıyayla	4	---	---	4	100.0
Dedeler köyü	4	---	---	3	75.0
Tekke Köyü	1	---	---	1	100.0
Nacar Köyü	16	6	37.5	11	68.8
Kürkçü Köyü	4	---	---	3	75.0
Yanpar Köyü	2	---	---	2	100.0
Toplam	89	25	28.1	73	82.0

Adana-Balcalı'da Ç.Ü. Döner Sermaye bağ alanlarından 2002-2003 yıllarında alınan toplam 87 adet toprak örneğinin 21'inin (% 24.1) *X. index* ile ve 83'ünün (% 95.4) *X. pachtaicum* ile bulaşık olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Adana-Balcalı'da 2002-2003 yıllarında bağ alanlarından alınan toprak örneklerinde saptanan *Xiphinema* cinsi nematod türleri ve bulaşıklık oranları (%).

Örnek alınan yer	Toplam örnek sayısı	<i>Xiphinema index</i>		<i>Xiphinema pachtaicum</i>	
		Bulaşık örnek sayısı	Bulaşıklık (%)	Bulaşık örnek sayısı	Bulaşıklık (%)
Adana-Balcalı	87	21	24.1	83	95.4

Ayrıca GFLV'nin vektörü olan *X. index*'in 2002-2003 yıllarında populasyon yoğunluğu saptanmıştır (Çizelge 4.6). İlk yılda vektör nematodla bulaşık olarak saptanan 26 adet örnekte nematod yoğunluğu ortalama 37.5 ± 6.64 birey/kg ve ikinci yılda ise 40 adet örnekte nematod yoğunluğu ortalama 34.8 ± 6.83 birey/kg nematod olarak belirlenmiştir. Her iki yılda toplam 66 adet toprak örneği *X. index* ile bulaşık bulunmuştur. Bu örneklerin 25 adedi Tarsus'tan, 21 adedi Adana-Balcalı'dan ve 20 adedi Mersin'den alınmıştır.

Çizelge 4.6. Araştırmanın yürütüldüğü alanlarda 2002-2003 yıllarında *Xiphinema index* ile bulaşık toprak örneklerinde populasyon (ortalama $\pm$ standart hata) yoğunluğu (t-testi, $p=0.05$).

Yıl	N	Ortalama (birey/kg toprak)
2002 (Max-Min)	26	37.5 ± 6.64 (3-124)
2003 (Max-Min)	40	34.8 ± 6.83 (3-241)

Ülkemizde ve yurtdışında daha önceden bir çok araştırmacı *Xiphinema* cinsi nematodlar ile ilgili değişik araştırmalar yapmışlardır. Bu araştırmalarda elde edilen populasyon yoğunlukları bizim çalışmamızda saptanan sonuçlara yakın değerlerdedir. Ülkemizde yapılanlar genellikle survey amaçlı olup çok az sayıdadır.

Yüksel (1966), İzmir ve Manisa illerindeki bağlarda önemli zarar yapan GFLV'nin *X. index* ile taşındığını ve araştırma bölgesindeki bağlarda varlığını bildirmiştir.

Hewitt ve Raski (1967), *X. index*'in GFLV'nin yanında Sarı mozaik, Damar bantlaşması ve Arabis mozaik virüslerinin de vektörü olduğunu bildirmişlerdir.

Weischer (1973), GFLV'nin konukçusu bulunmayan topraklarda vektör *X. index* üzerinde 8 ay canlılığını koruduğunu belirtmiştir. Asma kısa boğum virüsü'nün vektörü olan *X. index* ve *X. italiae*'nin konukçu bulunmayan topraklarda altı hafta sonra virüs taşıma oranlarının % 10'a kadar düştüğünü bildirmiştir. Ayrıca bağlara zarar veren virüs hastalıklarının 7 tanesinin nematodlarla taşındığını rapor etmiştir.

Taylor ve Robertson (1975), virüs vektörü olan nematodun 15 dakikadan az bir zaman hastalıklı bitki köklerinde beslenmesi sonucu virüsü bünyesine aldığını ve bunu takiben hiç beslenmese bile 8 aya kadar virüsü bünyesinde barındırmasının mümkün olduğunu bildirmişlerdir. Raski (1988), dünyada bağ üretimi yapılan alanlarda *Xiphinema* cinsine dahil onun üzerinde tür bulunduğunu bildirmiştir. Bunların *X. americanum*, *X. brevicolle*, *X. diversicaudatum*, *X. index*, *X. italiae*, *X. mediterraneum*, *X. pachtaicum*, *X. turcicum* ve *X. vuittenezi* olduğunu belirtmiştir.

Gerek bağların köklerinde ektoparazit olarak gerekse virüs vektörü olarak zarar oluşturan *X. index* ve diğer *Xiphinema* türleriyle kimyasal ilaç kullanılarak mücadele edilmesi oldukça güçtür. Raski ve Goheen (1988), bağlarda ürün üzerinde önemli düzeyde zarar oluşturan GFLV degenerasyon kompleksi ile vektör *X. index*'in 1,3 dichloropropene (DP) ve MeBr uygulamasıyla mücadelesine ilişkin çalışmalar yapmışlardır. Şiddetli hastalık gösteren asmaların bulunduğu bir bağda toprak 448 kg/ha oranında MeBr ile fümige edilmiş ve bir başka uygulamada ise 672 kg/ha oranında MeBr kullanılmış ancak burada toprak yüzeyi polietilen örtü ile örtülmemiş, bir başka parselde de 1560 kg/ha DP uygulanarak toprak yüzeyi kapatılmamıştır. İki yetiştirme sezonu sonunda uygulama gören toprakların yarısına yeni ve sağlıklı asma bitkileri, diğer yarısına da uygulamadan 6 yıl sonra sağlıklı bitkiler dikildiğinde MeBr uygulanan toprakların % 5 inde ve DP uygulanan

toprakların % 36'sın da GFLV'nin varlığı saptanmıştır. Fakat her üç uygulamanın da verime olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir.

Esmenjaud ve ark. (1992), Fransa'da GFLV ile bulaşık 3 bağ alanında toprağın farklı derinliklerinden *X. index*'in yoğunluklarını araştırmışlardır. En düşük nematod yoğunluğunu kireçli toprakta 0-25 cm derinliğinden ve kumlu olan topraklarda ise 0-40 cm derinlikten elde etmişlerdir. Kireçli toprakta en yüksek nematod populasyon yoğunluğunun 5 ile 120 (birey/kg toprak) arasında değişen sayıda 55-70 cm derinlikte bulunduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada da görüldüğü üzere alınan örneklerde nematod populasyon yoğunlukları toprak yapısına ve derinliğine bağlı olarak büyük farklılık göstermektedir. Araştırmacıların belirledikleri populasyon yoğunlukları bu çalışmanın sonucu elde edilen sonuçlara yakın değerler içermektedir.

Elekçioğlu ve Uygun (1994), Doğu Akdeniz bölgesinde yetiştirilen başat ürünlerde bitki paraziti nematodların varlığı ve dağılımı üzerinde yaptıkları araştırmalarda bağlarda en yaygın türlerin sırasıyla *X. pachtaicum*, *X. index* ve *X. italiae* olduğunu bildirmiştir. Elekçioğlu ve ark. (1994), Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yetiştirilen 12 farklı bitkide 36 adet nematod türü belirlemişlerdir. Bağlarda *X. index*, *X. pachtaicum* ve *X. italiae* türlerinin bulunduğunu saptamışlardır.

Garcia-Benavides ve ark. (1994), İspanya'da bağlarda GFLV ile *X. index* arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Araştırmaları sonucunda testledikleri bağ örneklerinin % 12.8'inde GFLV'nin varlığını tespit etmişler ve bu virüsle bulaşık olan bitkilerin % 31'inde ise virüs vektörü nematoda rastlanmıştır.

Philis (1994), Kıbrıs'ta *X. index* mücadelesi için kültürel yöntemleri araştırmıştır. Yaptığı denemelerde, bağ tesis edilmeden 40-52 ay önce yalnızca yada rotasyon halinde arpa yetiştirilmesinin lokal alanlarda GFLV'nin doğal vektörü olan bu nematodun populasyonunu belirlenemeyecek kadar azalttığını belirtmiştir.

Nogay ve ark. (1995), Marmara Bölgesi'nde yapmış oldukları çalışmalarında, bağ topraklarının *X. index*, *X. pachtaicum* ve *Longidorus* spp. ile bulaşık olduğunu bildirmişlerdir.

Avgelis ve Tzortzakakis (1997), 1995 ve 1996 yılları ilkbaharında Yunanistan'ın Samos adasındaki 160 bağda *Xiphinema* cinsi bitki parazitik nematodlar ile GFLV'nin varlığı ve dağılımını araştırmışlardır. İnceledikleri bitki örneklerinin % 15 inde *X. index* ve % 7 sinde *X. italiae* ile bulaşık olduğunu belirlemişlerdir. Asma kısa boğum virüsünün bulunduğu bölgelerdeki dağılımının *X. index*'in varlığı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Fresno ve ark. (2002), Kanarya Adaları'nda 10 yıldan uzun bir süreyle bağlarda GFLV'nin taşınmasını etkileyen faktörleri araştırmışlardır. Toprakta nemin yüksek olmasının ve su serbest filmi tabakasının bulunmasının özellikle vektör nematodların daha kolay hareket etmesi açısından önem taşıdığını belirtmişlerdir.

4.2.2.2. Serolojik Çalışmalar

Nematoloji laboratuvarındaki çalışmalar sonucunda Bahar-2002 döneminde Adana-Balcalı'da Ç.Ü. Döner Sermaye İşletmesine ait bağ alanlarından GFLV bulaşık bitkilerin rhizosferinden getirilen 7 adet toprak örneğinden nematod izolasyon çalışmaları sonucunda hem *X. index* hem de *X. pachtaicum* nematodları elde edilmiştir. *X. index* populasyonlarına ait bireylerden ışıklı mikroskop altında tek tek olmak üzere her bir örnek için 20 adet alınarak vücutlarında virüs bulundurup bulundurmadığı DAS-ELISA ile test edilmiştir. Aynı 7 adet örnekten ve GFLV ile infekteli ancak *X. index* bulaşık olmayan farklı 27 adet örnekten izole edilen *X. pachtaicum* populasyonlarına ait bireylerden yine aynı yöntemle her örnek için 100-200 adet alınarak birlikte testlenmiştir. Ancak bu testlemelerden negatif sonuç alınmıştır. Olası vektör nematodlardan serolojik yöntemlerle GFLV'nin tanınması ile ilgili çalışmalara Bahar-2003 döneminde de devam edilmiştir. Bu dönemde Mersin, Tarsus ve Adana-Balcalı bölgesine ait toplam 40 adet toprak örneğinin *X. index* ile bulaşık olduğu saptanmış olup bunlardan 7 adedinde aynı zamanda bitkide de GFLV saptanmıştır. Hem GFLV hem de *X. index* bulaşık olan bu örneklerin 5 tanesinden *X. index* populasyonları elde edilmiştir. Bu nematod örneklerinden ışıklı mikroskop altında tek tek olmak üzere 5, 17, 29, 179 ve 240

adet birey toplanmıştır. Bu örnekler DAS-ELISA ile çift tekerrürlü olarak test edilmiştir. Bu 5 adet örnekten yalnızca 2 tanesinden pozitif reaksiyon gözlenmiştir (Ek IV-G). Diğer 3 adet örnek negatif sonuç vermiştir.

Bağlarda virüs hastalıklarından GFLV'nin *X. index* ile taşındığı bir çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Hewitt ve ark., 1958; Dias ve Harrison, 1963; Kaşkaloglu, 1965; Yüksel, 1966; Milkus ve ark., 1977; Elekçioğlu ve Uygun, 1994; Martelli, 1999). Fresno ve Arias (1993), DAS-ELISA yöntemi ile vektör nematod bünyesinde GFLV'yi tespit etmişlerdir. Virüsün taşınması hem *X. index* hem de *X. italiae* ile olmasına rağmen *X. index* daha etkilidir (Avgelis, 1997; Martelli ve Savino, 1988).

Esmenjaud ve ark. (1994), vektör *X. index* içerisinde hem serolojik yöntemle (ELISA) hemde RT-PCR metoduyla GFLV'nin kılıf protein geninin (CP) bir bölümünün saptanması üzerine çalışma yapmışlardır. Araştırmacılar 10 adetten daha az sayıda nematod bireyi kullanılmasının ELISA için güvenilir olmadığını ve negatif sonuç alınabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada da fazla sayıda vektör nematod bireyi kullanıldığında pozitif sonuç alınmıştır.

Brown ve ark. (1994), Avrupa'da nepoviruslerin ve tobnavirüslerin varlığının küçük alanlarda lokalize olduğunu ancak Kuzey Amerika'da ise bu virüslerin ve vektörlerinin varlığının geniş alanlarda yaygın olduğunu saptamışlardır. Virüs taşınma özelleşmesiyle virüs ile vektörünün arasında kuvvetli bir ilişkinin olduğunu ortaya koymuşlardır. Nematod-virüs-bitki kompleks etkileşiminin taşınma özelleşmesini etkilediğini belirtmişlerdir.

4.2.2.3. Nematodlarda Virüsler İle İlgili Moleküler Çalışmalar

Laboratuvar çalışmalarında araziden getirilen hastalıklı bağ bitkilerinin rhizosfer kısmından elde edilen olası vektör nematodların bünyesinde GFLV'nin varlığı PCR tekniği ile moleküler düzeyde de araştırılmıştır. Böylece yukarıda "4.1.2.2. PCR" başlığı altında ve Şekil 4.6 verildiği gibi DAS-ELISA testinden pozitif sonuç alınan iki adet vektör *X. index* örneğinden (179 ve 240 adet) elde

edilen ekstrakt kullanılarak yürütülen PCR testlerinde 780 bp çiftlik GFLV'nin F-13 irkına özgü DNA bandları elde edilmiştir.

Esmenjaud ve ark. (1994), vektör *X. index* içerisinde hem serolojik yöntemle (ELISA) hemde RT-PCR metoduyla GFLV'nin kılıf protein geninin (CP) bir bölümünün saptanması üzerine çalışma yapmışlardır. Araştırmacılar bir yada birkaç adet virüsle bulaşık vektör nematod bireyinden total RNA ekstraksiyonu yapılarak RT-PCR metoduyla GFLV'nin kılıf protein geninin (CP) bir bölümünün çoğaltılabildiğini rapor etmişlerdir.

Elleuch ve ark. (2003), Tunus'ta turuncgil ve bağ alanlarında üç farklı viroidin tanısı için en uygun protokol olarak RT-PCR'ı belirtmişlerdir. Bu metodun hastalıklardan ari sertifikalı bitki materyallerinin üretiminde kullanılmasının gerektiğini bildirmişlerdir. Dar-Issa ve Iraki (2002), GFLV'yi RT-PCR ve IC-TR-PCR yöntemleriyle testlemişlerdir. Kılıf protein primerleri kullanmaları halinde her iki metod arasında büyük bir farklılık görülmediğini bildirmişlerdir. Finetti-Sialer ve ark. (2002), İtalya'da Palagiano bağlarında GFLV'yi saptamak için fluorescent RT-PCR metodunu uygulamıştır. Kullandığı fluorescent problemlerin virüsün belirlenmesinde faydalı olduğunu belirtmiştir. Nepovirüslerin teşhisinde PCR ve moleküler hibridizasyon yöntemlerinin çok uygun yöntemler olduğu bildirilmiştir (Minafra ve ark., 1997; Walter, 1991; Fuchs ve ark., 1989). Çiğsar (2002), Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Nevşehir ili bağlarında 1999-2002 yılları arasında bağ virüs ve virüs benzeri hastalıklar üzerine yapmış olduğu doktora çalışmasında nepovirüslerin tanısında ve karakterizasyonunda PCR yöntemini kullanmıştır.

Stuart (2003), bitki virüs hastalıklarının nematodlar tarafından taşınmasında moleküler bulgular ile ilgili olarak yapmış olduğu bir derlemesinde virüs hastalıklarına karşı kültür bitkilerinin korunmasının en etkili ve güvenilir yolunun bitki virüs hastalıklarının taşınma mekanizmalarının anlaşılması olduğunu belirtmişlerdir.

Böylece yapılan bu doktora çalışmasıyla ile ülkemizde ilk defa GFLV'nin vektör nematodu olan *X. index*'in bünyesinde virüsünün varlığı PCR tekniği ile moleküler düzeyde belirlenmiştir.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Mevcut bilgilerin ışığında, bu çalışmadan elde edilen sonuçların ve önceki çalışmalardan elde edilen bulgularının birlikte değerlendirilmesiyle aşağıdaki görüş, sonuç ve önerilere varılmıştır.

- 1- Yürütülen arazi gözlemleri sonucu bağlarda GFLV'nin oluşturduğu belirtiler belirlenmiştir. Virüs hastalıklı omcalarda genellikle gelişme geriliği, meyvelerde irili ufaklı gelişmeler ile dane tutumunun az olması, yapraklarda sararmalar, mozaik lekelenmeler, deformasyonlar ve damar bandlaşmaları, sürgünlerde ise şişkin yada ikiz boğumların teşekkülü ve yassılaşması, boğum aralarının kısalması ve zigzag gelişim gibi değişik belirtiler oluşturmaktadır. Bununla birlikte virüs hiçbir belirti vermeden de (latent) bitki bünyesinde varlığını sürdürebilmektedir.
- 2- Araştırmanın yürütüldüğü bağ alanlarından toplanarak testlenen 384 adet bitki örneğinden 63 (% 16.4) tanesinin DAS-ELISA yöntemiyle GFLV ile bulaşık olduğu saptanmıştır. Arazideki gözlemlere göre bitkilerde yüksek oranda GFLV varlığının tahmin edilmesine rağmen bu rakam gerçekte % 16.4 oranında olması, bize araştırmanın yürütüldüğü bağ alanlarında virüs belirtileri gösteren farklı virüs yada virüs benzeri patojenlerin de yaygın olabileceği sonucunu vermektedir.
- 3- Bağ alanlarından alınan örneklerden DAS-ELISA yöntemi kullanılarak GFLV ile bulaşık olduğu belirlenmiş olanlardan 57 adedinin otsu indikatör bitkilere mekanik inokulasyon çalışmaları yapılmıştır. İnokule edilmiş indikatör bitkilere yapılan serolojik testler sonucunda bunların 23 adedinde GFLV'nin varlığı saptanmıştır. Ancak yalnızca aşılanan *N. benthamiana* test bitkilerinin yapraklarında geçici bir süre klorotik lokal lezyonlara rastlanmıştır. Diğer indikatör bitkilerde ise virüsten kaynaklanabilecek belirgin belirtilere rastlanmamıştır.
- 4- Çalışma alanlarında *Xiphinema* türleri ve bunların yaygın olduğu alanlar belirlenmiştir. Alınan toplam 307 adet toprak örneğinin 66'sının (% 21.5)

X. index ile, 275'inin (% 89.6) ise *X. pachtaicum* ile bulaşık olduğu belirlenmiştir.

- 5- Nematod türlerin virüsü taşıyıp taşımadığı alınan bağ toprağından ekstrakte edilen nematodlar kullanılmak suretiyle serolojik testlerin yanı sıra moleküler düzeyde çalışılmıştır. Bağlarda ve vektör nematodların bünyesinde GFLV'nin varlığı RT- PCR tekniğı ile moleküler düzeyde de belirlenmiştir. Asmanın anavatanı olarak kabul edilen ülkemizde araştırmanın yürütüldüğü Adana ve Mersin illerinde daha önceden yapılan çalışmalarda GFLV'nin tamsında yalnızca serolojik yöntemlerle otsu ve odunsu indikatör bitkiler kullanılmıştır. Bu çalışmada GFLV'nin saptanmasında moleküler yöntemler de kullanılarak daha ileri teşhis metodu uygulanmıştır. Testler sonucu GFLV'nin yalnızca *X. index*'in bünyesinde bulunduğu belirlenmiştir. Bu konu ile ilgili olarak bazı araştırmacıların yapmış oldukları çalışmalarda, serolojik testlemelerde GFLV'nin tespitinde güvenilir bir sonuç alabilmek için 10 adetten daha çok sayıda ergin vektör nematod bireyine ihtiyaç duyulmasına rağmen bu metodla yalnızca tek bir ergin nematod bireyinin yeterli olabileceğı belirtilmiştir. Bu durum gelecekte gerek henüz bilinmeyen diğer vektör nematodlarda gerekse *X. index*'te virüsün bünyeye alınması ve tutulması ile ilgili hassas çalışmaların yapılabilmesi için umut vericidir.
- 6- Bu araştırma süresince yapılan gözlemler sonucu çalışmanın yürütüldüğü illerdeki bağ alanlarında üretim tekniklerinin hala geleneksel yöntemlerle yapıldığı gözlenmiştir. Gerek virüs hastalıklarının gerekse diğer hastalık etmenlerinin yoğun olarak görülmesiyle, üreticilerin yetiştiriciliğın her aşamasında hijyenden uzak oldukları izlenmiştir. Özellikle üreticilerin yeni kurulan bağlarda kullandıkları fidanları civarda bulunan eski ve yaşlı bağlardaki hastalıklı anaçlardan almaları hastalıkların insan eliyle yayılmasına en iyi örnek oluşturmaktadır.
- 7- Yalnızca ticari bağlarda değil aynı zamanda Tarım İl Müdürlüklerinin fidanlıklarından alınan bağ örneklerinde de GFLV ile bulaşık bitkiler saptanmıştır. Bu durum bağ üreticilerine dağıtılan Amerikan asma anaçları

üzerine aşıllı bağ fidanlarının da yine eski usul yöntemlerle yetiştirildiğini göstermektedir.

- 8- Virüs vektörü nematodlar ile ilgili arazi çalışmaları sonucunda *X. index* ile bulaşık omcaların kök ve toprak üstü aksamında nematodların oluşturduğu belirtiler belirlenmiştir.
- 9- Araştırmanın yürütüldüğü illerdeki bağ alanlarının içerisinde veya özellikle sınırlarda incir ağaçlarının dikili olduğu görülmüştür. İncir ağaçlarının kök kısmından alınan toprak örneklerinden vektör nematod olan *X. index* ile bulaşık olduğu saptanmıştır. Bir bitki hastalığının yayılmasında vektör görevi gören organizmaların yanı sıra hastalığa konukçuluk yapan diğer otsu yada odunsu bitkilerde büyük rol almaktadır. Bu bitkiler ekonomik açıdan önem taşımasalar bile hastalık etmeninin bölgede devamlılığının sağlanması ve sağlıklı konukçu kültür bitkilerine bulaştırmaları bakımından büyük önem arz etmektedir. Ayrıca bunlar hastalığı taşıyan vektörleri için de besin ve barınak oluşturmaktadır. Söz konusu nematodlara konukçu olabilecek bitki türleri belirlenmeli ve bu faktörler göz önüne alınarak yeni bağ alanları tesis edilmelidir. Ayrıca bağ alanlarında bulunan yabancı otlar ile mücadele edilmesi gerekmektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, örneğin köpek dişi ayrığının GFLV'nin konukçusu olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle bağ alanlarında yaygın olan yabancı otların bu virüsün konukçusu olup olmadığının belirlenmesi ile ilgili çalışmaların yapılması gerekmektedir.
- 10-Araştırmanın yürütüldüğü alanlarda yada ülkemizin bağ yetiştiriciliği yapılan diğer bütün bölgelerinde eski usul yetiştirme yöntemlerinden vazgeçilmesi gerektiği sonucuna varılmaktadır. Bağlarda görülen virüs hastalıklarının çoğunluğu bu geleneksel yetiştirme yöntemleri yüzünden diğer bitkilere ve uzak mesafelere kolaylıkla taşınabilmektedir. Yeniden tesis edilen bağlarda anaç olarak sağlıklı üretim materyalleri kullanılması, hastalıkların bulaşmaması için hijyen koşullarına uyulması ve tüm ülkemizi içine alan bitki sertifikasyon programına bir an önce geçilmesi artık bir zorunluluk haline gelmiştir. Bitki hastalıklarıyla mücadelede yalnızca

patojeni hedef alan savaş yöntemleriyle başarıya ulaşmak mümkün olmamaktadır. Hastalıkla mücadelede patojenin aktivitesi üzerine etki eden içerisinde bulunduğu tüm diğer koşulları da düşünerek buna göre mücadele edilmelidir.

Sonuç olarak, GFLV'nin sorun oluşturduğu alanlarda bilindiği gibi virüs hastalıklarının kontrolü için sağlıklı üretim materyali kullanılması dışında henüz uygun bir metod bulunamamıştır. Ülkemizde bağcılığın yeniden canlandırılması ve geliştirilmesi için klasik üretim metodlarının yerine modern bağcılık sistemi özendirilerek yerleştirilmelidir. Bunun yanı sıra bağlardaki zararlı ve hastalık etmenlerinin ve bu etmenlerin yakın ve uzak mesafelere yayılmasında etkin rol oynayabilen vektörlerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bazı araştırmacılar yapmış oldukları çalışmalarda virüsler için kullanılan moleküler yöntemin benzerini *X. index*'in de içinde bulunduğu bazı virüs vektörü nematodların tür düzeyinde tanımlanması için kullanmışlardır. İki yüz kadar farklı tür içerisinde hedef nematod türlerinin seçici ve duyarlı bir şekilde tanımlanabilmesine izin veren bu yöntem virüslerle mücadelede kolaylıklar sağlayacaktır. Yeni bağ tesis edilecek alanların önceden yapılacak toprak tahlilleriyle virüs vektörü nematodlarla bulaşık olup olmadığı belirlenebilmektedir. Böylece GFLV gibi önemli düzeyde ekonomik kayıplara yol açabilen virüslere vektör olduğu bilinen nematodlarla bulaşık alanlara bağ tesisinden vazgeçilerek temiz alanlara bağ tesis edilmelidir. Günümüzde Avrupa Birliği, ABD ve diğer bazı ülkelerde olduğu gibi, ülkemizde de üreticilere sağlıklı fidan ve üretim materyalinin temini, bunların fidan üreticilerine dağıtılması ve fidan üretiminin her aşamasının kontrol edilmesine dayanan sertifikasyon programlarının uygulamaya bir an önce koyulması gerekmektedir. Bu sertifikasyon çalışmalarının virüs hastalıklarının yayılmasına hizmet eden doğal vektörler olan nematodlarla bulaşık olmayan bölgelerde yürütülmesi gerekmektedir. Virüs vektörü nematodların ülkemizde varlığı ve dağılımının araştırılarak virüs-vektör ilişkisinin ortaya konulması, sertifikasyon çalışmaları için bir ön koşul olup alt yapının hazırlanmasına temel oluşturmaktadır. Nematodlara dayanıklı anaç elde edilmesi konusunda transgenik bitki yetiştirilmesi ile ilgili gelişmeler nematod ile mücadele bakımından umut vermektedir. Buna karşın muhtemelen insan sağlığına zarar

verebileceği konusunda kuşkular bulunmaktadır. Günümüzde bağlarda sertifikasyon çalışmalarının başarıyla uygulandığı ülkelerde bu çabalar sonucunda giderek artan oranda üretim ve kalite sağlanmıştır. Gerekli önlemler bir an önce alınarak uygulamaya geçilmezse, Türk kültürünün geleneğinin bir parçası olan bağcılık ölü bir işkolu olarak kaybolan değerlerimiz arasında yerini alacaktır.



KAYNAKLAR

- ABRASHEVA, P., 1976. Effect of Fanleaf Virus on the Growth and Fruit Bearing of Grapevine. *Rastitelna Zashchita* 24 (12): 37-39. *Rev. Pl. Path.* 56; 3145.
- AKBAŞ, B. and ERDİLLER, G., 1993. Researches on Grapevine Virus Diseases and Determination of Their Incidences in Ankara, *Türkiye. Journal of Turkish Phytopath. Soc.* V. 22(2-3): 47-54.
- _____, 1998. Karaman, Konya ve Nevşehir İli Bağ Alanlarında Görülen Virüs Hastalıkları. *Türkiye VIII. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri*. Ankara, 21-25 Eylül 1998, s. 149-157.
- AKDOĞAN, N., 1956. Kısa Boğum (Degeneressans Infecteus). Sakarya Ziraat Mücadele Enstitüsü Halk Broşürleri No: 5 İstanbul. 6. s.
- _____, 1958. Kısa Boğum "Bulaşık Soysuzlaşma". Ziraat Vekaleti T.E.S.C. 102.
- _____, 1965. Bağlarda Bulaşık Soysuzlaşma (Kısa Boğum) ve Korunma Çareleri. Yenilik Basımevi, İstanbul 8 s.
- ANONYMOUS, 1999. Bağ Entegre Mücadele Teknik Talimatı. T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı. Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Ankara 1999.
- _____, 2003a. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistical Database 2003, <http://faostat.fao.org>
- _____, 2003b. Mersin Tarımı Master Planı. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı. Mersin Tarım İl Müdürlüğü, Mersin. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı. Proje ve İstatistik Şube Müdürlüğü, Ankara.
- _____, 2003c. Adana İli Tarımsal İstatistik Verileri.
- ARIAS, M., FRESNO, J. and BELLO, A., 2000. Virus-Vector Nematodes and Grapevine Fanleaf Nepovirus. <http://www.scri.sari.ac.uk/rjn/arias.htm>.
- AVGELIS, D. and TZORTZAKAKIS, E.A., 1997. Occurrence and Distribution of *Xiphinema* Species and Grape Fanleaf Nepovirus in Vineyards of the Greek Island of Samos. *Journal of Nematologia Mediterranea*. V. 25, N.2: 177-182.

- AZERİ, T., 1983. Ülkemiz Bağcılığında Virüs Sorunu ve Virüssüz Bağ Üretim Programı. Yıllık 1 (1): 61-69.
- _____ and FİDAN, Ü., 1988. Virus and Virus-Like Diseases Effecting Grapevine and Growing Virus-Free Grapes in the Aegean Coast. *Proc. of the V. Congress of Turk. Phyt. Soc.* Oct.1988, Antalya, Türkiye.
- _____ ve ÇİÇEK, Y., 1995. İntrodüksiyon ve Klon Seleksiyonuyla Elde Edilmiş Bazı Bağ Çeşitleri ve Anaçlarındaki Virüs ve Virüs Benzeri Hastalıkların Saptanmasına Yönelik Araştırmalar. *VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi.* Adana. 26-29 Eylül 1995, s. 374-377.
- BOSCIA, D., DIGIARO, M., FRESNO, J., GRIEF, C., GRENNAN, S., KASSEMAYER, H.H., PROTA, V.A., and SEQUERIA, O.A., 1997. ELISA for Detection and Identification of Grapevine Viruses. (WALTER, B., Ed.). Sanitary Selection of the Grapevine. Les Colloquies, No: 86. INRA. Paris. p. 129-155.
- BOUQUET, R., 1981. Resistance of Grapevine Fanleaf Virus in Muscadine Grape Inoculated with *Xiphinema index*. *Plant Diseases* Vol. 65 No:10.
- BUZKAN, N. ve WALKER, M.A., 2001. İnfekteli Asmalarda Asma Kısa Boğum Virüsünün Güvenilir Teşhisi İçin RNA Ekstraksiyon Yöntemlerinin Kıyaslanması. *Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri.* Tekirdağ, 3-8 Eylül 2001, s.496-505.
- BRANDT, S., IBI, M. and HIMMLER, G., 1995. Capsid Protein Gene Sequence of Austrian Isolate of GFLV. *Archives of Virology* 140: 157-164.
- BROWN, D.J.F., HALBRENDT, J.M., JONES, A.T., TAYLOR, C.E. and LAMBERTI, F., 1994. An Appraisal of Some Aspects of the Ecology of Nematode Vectors of Plant Viruses. *Journal of Nematologia Mediterranea*. V. 22, N.2: 253-263.
- CAUDWELL, A. and DALMASSO, A., 1985. Epidemiology and Vectors of Grapevine Viruses and Yellow Diseases. *Phytopathologia-Mediterranea*. Aug. 1985. v.24(1-2): 170-176 Abs.

- CLARK, M.F. and ADAMS, A.N., 1977. Characteristics of Microplate Method of Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay for the Detection of Plant Viruses, *J. Gen. Virol.*, 34: 475-483.
- CONTI, M., 1991. Virus Purification, Ultra Density Gradient Centrifugations. How to Work in Laboratory. *Special Text. in ICAMAS*, Valenzano BA/ Italy No. 77 p. 98.
- CORY, L. and HEWITT, B., 1968. Some Grapevine Viruses in Pollen and Seeds. *Phytopathology* Vol. 58 (9): 1316-1320.
- COHN, E. and ORION, D., 1970. The Pathological Effect of Representative *Xiphinema* and *Longidorus* Species on Selected Host Plants. *Nematologica*. 16: 423-428.
- ÇAĞLAYAN, K., 1997. Incidence of Grapevine Leafroll, GVA and Tomato Black Rinsspot Virus in the Vineyards of Hatay Province. *Journal of Turkish Phytopathology*. 26: 121-128.
- ÇELİK, H., AĞAOĞLU, Y. S., FİDAN, Y. MARAŞLI, B. ve SÖYLEMEZOĞLU, G., 1998. Genel Bağcılık. Sun Fidan A. Ş. Mesleki Kitaplar Serisi: 1, Ankara.
- ÇİĞSAR, İ. ve YILMAZ, M.A., 1998. Güneydoğu Anadolu Bölgesi Bağlarında Görülen Virüs Hastalıklarının Serolojik Yöntemlerle Saptanması. *Türkiye VIII. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri*. Ankara, 21-25 Eylül 1998, s. 154-157.
- _____ and YILMAZ, M.A., 2000. Detection of Grapevine Viruses by Serological Methods in South-east Anatolia. In: *Proceedings 13 the Meeting of ICVG*, p. 143. ICVG. Adelaide (AU).
- _____, 2002. Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Nevşehir İlinde Bağlarda Zararlı Virus ve Virus Benzeri Hastalıkların Biyolojik ve Serolojik Yöntemlerle Saptanması ve İki Yeni Nepovirüsün Karakterizasyonu. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 111 s. (yayınlanmamış).
- _____, G.P. MARTELLI and DIGIARO, M., 2002. Sanitary Status of Grapevines in South-eastern and Central Anatolia (Turkey). *OEPP/EPPO Bulletin* 32: 471-475.
- DAR-ISSA, O. and IRAKI, N., 2002. Technical Sheet. No.23. UNESCO Biotechnology Center at Bethlehem University.

- DIJKSTRA, J. and JAGER, C.P., 1998. Practical Plant Virology: Protocol and Exercises (Springer Lab. Manuel). Springer-Verlag. 459s.
- DEREK, J. F.B. and STUART, A. M., 2001. Institute of Biology. *Biologist*, 48: 35-40.
- DIAS, H. F. and HARRISON, B. D., 1963. The Relation Between Grapevine Fanleaf, Grapevine Yellow Mosaic and Arabis Mosaic Viruses. *Ann. Appl. Biol.* 51: 97-105.
- DODDS, J.A., MORRIS, T.J. and JORDAN, R.L., 1984. Plant Viral Double-Stranded RNA *Annual Review of Phytopathology*, 22: 151-168.
- DROPKIN, V.H., 1988. Introduction to Plant Nematology. Second Edition, Department of Plant Pathology. University of Missouri, Columbia. A Wiley-Interscience Publication. 299 p.
- ELEKÇİOĞLU, İ.H., OHNESORGE, B., LUNG, G. and UYGUN, N., 1994. Plant Parasitic Nematodes in the Eastern Mediterranean Region of Türkiye. *Nematol. Medit.* 22: 59-63.
- _____, and UYGUN, N., 1994. Occurrence and Distribution of Plant Parasitic Nematodes in Cash Crops in Eastern Mediterranean Region of Türkiye. *9 Th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*. Kuşadası-Aydın-Türkiye p. 409-410.
- ELLEUCH, A., FAKHTAKH, H., JENDOUBI, L., BESSAIES, N. and MARRAKCHI, M., 2003. OEPP/EPPO, Bulletin. 33: 369-374.
- ERDİLLER, G., 1982. Kısa Boğum Hastalık Etmeninin Morfolojik ve Serolojik Özellikleri ve Standart Irklarla Karşılaştırılması Üzerinde Araştırmalar. A.Ü. Zir. Fak. Yayınları. 834 Bil. Araş. ve İncelemeler 496 s.
- ESMENJAUD, D., ABAD, P., PINCK, L. and WALTER, B., 1994. Detection of region of Capsid Protein Gene of Grapevine Fanleaf Virus by RT-PCR in the Nematode Vector *Xiphinema index*. *Plant Disease* 78: 1087-1090.
- _____, WALTER, B., VALENTIN, G., GUO, Z.T. and CLUZEAU, D., 1992. Vertical Distribution and Infectious Potential of *Xiphinema index* (Thorne et Allen, 1950) (Nematoda: Longidoridae) in Fields Affected by Grapevine Fanleaf Virus in Vineyards in the Champagne Region of France. *Agronomie*. 12: 395-399.

- FLEGG, W., 1967. Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes. Reference Book 402. Edited by J.F. Southey 1986.
- FINETTI-SIALER, M. and CIANCINO, A., 2002. Detection of GFLV in *Xiphinema index* with DNA-Based Fluorescent Probes. <http://www.infns.org/cd2002/VISKAS/108.PDF>.
- FORTUSINI, A., CINQUANTA, S. D. and BELLI, G., 1989. Mixed Infections of Nepo and Closteroviruses Associated of Corky Bark and Stem Pitting in Grapevine. *Proceed. 9th Meeting ICGV*, Kiryat Anavim, Israel, Sept., 1987: 131-134.
- FRESNO, J. and ARIAS, M., 1993. Detection of Grapevine Fanleaf Virus (GFLV) in Vineyards Along the Whole Years and in its Vector Nematode *Xiphinema index*. *Proc. 11th Meeting of ICGV*, Montreux, 6-9 September 1993, p. 148-149.
- _____, ARIAS, M. and BELLO, A., 2002. Grapevine Management, Virus Vector Nematode Populations and GFLV: an Approach to Disease Epidemiology. <http://www.infns.org/cd2002/VISKAS/511.PDF>.
- FUCHS, M., 2003. Transgenic Resistance: State of the Art and Perspectives. *14th ICGV Conference*, Locorotondo, 12-17th September, p. 221-223.
- _____, PINCK, M., ETIENNE, L., PINCK, L. and WALTER, B., 1991. Characterization and Detection of Grapevine Fanleaf Virus by Using cDNA Probes. *Phytopath.* V:81(5): 559-565.
- _____, PINCK, M., SERGINI, M.A., RAVELONANDRO, M., WALTER, B. and PINCK, L., 1989. The Nucleotid Sequence of Satellite RNA in Grapevine Fanleaf Virus, Strain F 13. *J.Gen. Virology* 70: 955-962.
- GALLITELLI, D., 1991. Electrophoresis in Plant Virology. Seminar Note. Held. in Valenzano BA/ITALY 21. st Feb. 1991. For the Participants of the Course on "New Developments in Advanced Virus Diagnosis". 13 p.
- GARCIA-BENAVIDES, P., LOPEZ-ROBLES, J., FRESNO, J. and ARIAS, M., 1994. Correlation Between *X. index* and the Grapevine Fan Leaf Virus Disease in Vineyards of Castalli Leon (Central Spain). *Nematol. Medit.* 22: 21-24.

- GOHEEN, A.C., 1977. Virus and Virus-like Diseases of Grapes. *Hort. Science.*, 12: 465-469.
- _____, 1989. Virus Diseases of Grapevine Selection. *American Journal of Enoloji and Viticulture Science* 40: 67-72.
- GRENNAN, S., LEGUAY, M., BONNET, A. and BOIDRON, R., 1993. ELISA for Detection fer ArMV and GFLV in Grapevine: Schedule of 3 years of control Tests. *Proc. 11th Meeting of ICGV*. Montreux, 6-9 September 1993.134 p.
- GÜRSOY, Y.Z., 1988. Vein Necrosis: A New Virus Like Diseases in Turkish Vineyards. *Journal of Turkish Phytopath. Soc.* V. 17(1): 43-46.
- HEWITT, B.W., 1953. Virus Diseases of Grapevine. Plant Diseases. The Year Book of Agriculture. p. 744-753.
- _____, 1954. Some Virus and Virus-Like Diseases of Grapevines. *Bull. Calif. Dep. Agric.*43: 47-64.
- _____, RASKI, D.J. and GOHEEN, A.C., 1958. Nematode Vector of Soil-borne Fanleaf Virus of Grapevine. *Phytopat.* Vol. 48: 586-594.
- _____ and GIFFORD, E.N., 1965. Symptoms for Identifying Fanleaf in Dormant Grapevines. *The Bulletin of Dept. Agric.* Vol. XLV 11: 49-252.
- _____ and RASKI, D.J. 1967. Factors Limiting Crop Production 6 Grapes. *Span.* 10(1): 6-59. Abs.
- _____, 1968a. Ege Bölgesi Bağ Virüs Problemlerinin İncelenmesi ve Bağ Damızlık Programı. Ziraî Araştırma ve İntroduksiyon Merkezi, Çeviri yayınları. No: 2, İzmir.
- _____, MARTINELLI, G., DIAS, H.F. and TAYLOR, R.H., 1970. Grapevine Fanleaf Virus. C.M.I./A.A.B. *Description of Plant Viruses* No: 28.
- HUBSCHEN, J., KLING, L., IPACH, U., ZINKERNAGEL, V., BOSSELUT, N., ESMENJAUD, D., BROWN, D., NEILSON, V.E.R., 2004. European Journal of Plant Pathology 110: 79-778.
- HUSS, B., MULLER, S., SOMMERMEYER, G., WALTER, B. and VAN REGENMORTEL, M.H.V., 1987. Grapevine Fanleaf Virus Monoclonal Antibodies: Their Use to Distinguish Different Isolates. *Journal of Phytopath.* (Germany, F.R.).v.119(4): 58-370. Abs.

- İNAL, S., 1983. Bağ Virüs Hastalıkları. Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü Yayınları. 24: 9-33.
- IZADPANA, K., ZAKI-AGHL, M., ZHANG, Y.P., DAUBERT, S.D. and ROWHANI, A., 2003. Bermuda Grass as a Potential Reservoir Host for Grapevine Fanleaf Virus. *Plant Disease*. 87: 1179-1182.
- KAŞKALOĞLU, N., 1965. Bağlarda Kısa Boğum Hastalığı ve Teşhis Metodları. Zir. Müc. Haberler Bülteni. Yıl 4, Sayı:81
- KÖKLÜ, G., DIGIARO, M. and SAVINO, V., 1998. A Survey of Grapevine Viruses in Turkish Thrace. *Phytopathologia Mediteranea* 37: 140-142.
- _____, BALOĞLU, S., YILMAZ, M.A. and ÖZASLAN, M., 1998. Trakya Bölgesi Bağlarında Şaraplık Çeşitlerde Asma Kısa Boğum Virüsünün Yaygınlığının Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. *Türkiye VIII. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri*. Ankara, 21-25 Eylül 1998, s. 328-330.
- _____, 1999. Trakya Bölgesi Bağlarında Asma Yaprak Kıvrılma Virüs Hastalığının Karakterizasyonu ve Surveyi. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, 142 s. (yayınlanmamış).
- KRAKE, L.R., STEELE SCOTT, N., REZAIAN, M.A. and TAYLOR, R.H., 1999. Graft-Transmitted Diseases of Grapevines. Collingwood, Victoria: *CSIRO Publishing*. Collingwood, Australia, 137 s..
- LUISONI, E., 1991. Serological Test in Plant Virology. Item No 46. for Plant Virologists. In ICAMAS Valenzano BA/ITALY No, V. 55, 45 p.
- MAI, W.F. and MULLIN, P.G., 1996. Plant-Parasitic Nematodes, a Pictorial Key to Genera. Comstock Publishing Associates a Division of Cornell University Press, Ithaca and London. 277 p.
- MALIOGKA, V., DOVAS, C.I., EFTHIMIOU, K. and KATIS, N.I., 2004. Detection and Differentiation of Comoviridae Species Using a Semi-nested RT-PCR and a Phylogenetic Analysis Based on the Polymerase Protein. *J. Phytophology* 152: 404-409.
- MARTELLI, G.P., 1987. Virus and Virus-like Diseases of Grapevine in Turkey. A Report to the Government of Turkey. Published by FAO: Rome 1987.

- _____, 1991. Virus and Virus-Like Diseases of Grapevine in the Mediterranean Area. A Textbook Prepared for the Students of Instituto Agronomico Mediterraneo in Bari/ Italy.
- _____, 1999. Infectious Diseases and Certification of Grapevine (MARTELLI, G.P. and DIGIARO, M., Eds.), *Options Mediterranean's* 29. CIHEAM/EC-DG-I. p. 47-64.
- _____ and SAVINO, V.C., 1988. Fanleaf Degeneration. In Compendium of Grape Diseases. (PEARSON R.C. and GOHEEN, A.C., Eds.) *American Phytopathological Society*, St. Paul, MN, p. 48-49.
- MILKUS, B.N., SHTERENBERG, D.M. and BEREZOSKAYA, E.A., 1977. Strains of Grapevine Fanleaf Virus in the Ukrainian. *Rew. of Plant. Path.* V: 58: 13-33.
- MILNE, R.G., 1991. Electron Microscopy Techniques for Virologist. Sample Preparation, Examination and Discussion. A Special Item for Nepoviruses. Handbook, ICAMAS Valenzano BA/ITALY No,V.100 p.65 (unpublished).
- _____, 1993. Electron Microscopy of in Vitro Preparations. In Diagnosis of Plant Virus Diseases. Edited by R.E.F. Matthews.
- MINAFRA, A., GREIF, C. and ROMERO, J., 1997. Molecular Tools for the Detection of Grapevine Viruses (B. Walter Editor). Sanitary Selection of The Grapevine. Les Colloques, No: 86, INRA, Paris. p. 157-170.
- MONET, P.L., 1985. Use of Grapevine Shoot Tip Cultures for Detection of Fanleaf Virus by Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *Can. J. Plant. Sci. Rev. Phytotechnie. Ottawa.* V. 65(4): 445-450 abs.
- MURANT, A.F., 1981. Nepoviruses. (E. KURSTAK, Ed.). Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. Elsevier/Nort-Holland Biomedical Pres, p.198-238.
- NARAGHI-ARANI, P., DAUBERT, S. and ROWHANI, A., 2001. Quasispecies Nature of the Genome of Grapevine Fanleaf Virus. *Journal of General Virology.* 82: 1791-1795.
- NOGAY, A., AĞDACL, M. ve GÜRSOY, Y.Z., 1995. Marmara Bölgesinde Bağlarda ve Amerikan Asma Anaçlıklarında Görülen Virüs Hastalıklarının ve

- Vektörlerinin Saptanması Üzerine Araştırmalar. *VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi*. Adana. 26-29 Eylül 1995, s. 247-251.
- OHTSU, Y., 1989. Altered Middle Lobe Shape of Leaf Permits Rapid Diagnosis of Grapevine Fan Leaf in Grapevine Cv. St. George. *Ann. of the Phytopath. Soc. of Jap.* 55(4): 445-450 Abs.
- ÖZASLAN, M., BALOĞLU, S. ve YILMAZ, M.A., 1991. Kahramanmaraş Bölgesinde Lokal Olarak Yetiştirilen Üzüm Çeşitlerinde Virüs Hastalıkları. *VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi*. Bildiriler, (401-406 S), Türkiye Fitopatoloji Derneği
- _____, BALOĞLU, S. and YILMAZ, M.A., 1993. Virus Diseases of Grapevine in South-eastern Anatolian Region in Türkiye. *11.Th Proc. of Icvg*. Montreux, Switzerland. No: 62 Ep. p. 122.
- _____, 1995. Adana, Tarsus, Gaziantep, Şanlıurfa ve Adıyaman Bölgelerinde Yetiştirilen Bağlarda Zararlı Virüs Hastalıklarının Serolojik ve Biyolojik Yöntemlerle Saptanması. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü., Doktora Tezi, 102 s. (Yayınlanmamış).
- _____, ve YILMAZ, M.A., 1995. Adana, Tarsus, Gaziantep, Şanlıurfa ve Adıyaman Bölgelerinde Yetiştirilen Bağlara Zarar Veren Virüs Hastalıkları. *VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi*. Adana. 26-29 Eylül 1995, s. 306-312.
- _____, 1998. The Effect of Virus Diseases on the Yield of Grapevine in Gaziantep and Kilis Provinces in Türkiye. (YILMAZ, M. and GERA, A., Eds.). *Proceeding of 1. Israeli-Turkish Workshop on Detection of Virus Diseases by Advanced Techniques & Control*. Ç.Ü. Basımevi. Adana-Turkey. 9 s..
- PHILIS, J., 1994. Cultural Practices for the Control of *Xiphinema index* in Cyprus. *Journal of Nematologia Mediterranea*. V. 22, N.2: 125-126.
- PLOEG, A.T., BROWN, D.J.F and ROBINSON, D.J., 1992a. Acquisition and Subsequent Transmission of Tobacco Rattle Virus Isolates by *Paratrichodorus* and *Trichodorus* Nematode Species. *Neth. J.Plant.* 98: 291-300.

- _____, BROWN, D.J.F. and ROBINSON, D.J., 1992b. The Association Between Species of *Trichodorus* and *Paratrichodorus* Vector Nematodes and Serotypes of Tobacco Rattle Tobravirus. *Ann. Appl. Biol.* 121: 619-630.
- QUACQUARELLI, A., GALLITELLI, D., SAVINO, V. and MARTELLI, G.P., 1976. Properties of Grapevine Viruses. *Journal of General Virology*, 32 (3): 349-360.
- RASKI, D. J., 1988. Dagger and Needle Nematodes. Pp. 56-59 in *Compendium of Grape Diseases*, (PEARSON, R.C. and GOHEEN, A.C., Eds.), American Phytopathological Society Press, St Paul, Minnesota. 93 p.
- _____, D. J., Hewitt, W.B., Goheen, A.C., Taylor, C.E. and Taylor, R.H., 1965. Survival of *Xiphinema index* and Reservoir of Fanleaf Virus in Fallowed Vineyard Soil. *Nematologica*. 11: 349-352.
- _____ and GOHEEN, A.C., LIDER, L.A. and MEREDITH, C.P., 1983. Strategies Against Grapevine Fanleaf Virus and Its Nematode Vector. *Plant Disease*, 67: 335-339.
- _____ and GOHEEN, A.C., 1988. Comparison of 1,3 Dichloropropene (Dp) and Methyl Bromide for Control of *X. index* and Grapevine Fanleaf Degeneration Complex. *Ame. Jour. of Enolog. and Viticulture*. 39(4): 334-336. Abs.
- RIVES, M., 1970. Chimaeras and The Like. In: (FRAZIER, N.W., Ed.), *Virus Diseases of Small Fruits and Grapevines*. University of California, Berkeley, pp. 255-256.
- ROWHANI, A., 1992. Use of F(ab')₂ Antibody Fragment in ELISA for Detection of Grapevine Viruses. *Am. J. Enol. Vitic.*, 43(1): 38-40.
- _____, WALKER, L. and ROKNI, S., 1992. Sampling Strategies for Detection of Grapevine Fanleaf Virus and the Grapevine Strain of Tomato Ringspot Virus. *Vitis*, 31: 35-44.
- SAVINO, V., CHERIF, C. and MARTELLI, G.P., 1985. A Natural Serological Variant of Grapevine Fanleaf Virus. *Phytopath. Medit.*, 24: 29-34.
- _____, 1998. Grapevine Certification in Italy. *Ders Notları*, IAM-B.
- SARIC, A. and WRISCHER, M., 1975. Fine Structure Changes in Different Host Plants Induced by Grapevine Fanleaf Virus. *Phytopat. Z.* 84: 97-104. Abs.

- SANCHEZ, F., CHAY, C., BORJA, M., ROWHANI, A., ROMERO, J. BRUENING, G. and PONZ, F., 1991. cDNA Sequence of the Capsid Protein Gene and 32 Untranslated Region of a Fanleaf Isolate of *Grapevine Fanleaf Virus*: Nucleic Acid Research 19, p. 5440.
- SERGHINI, M.A., FUCKS, M., PINCK, M., REINBOLT, J., WALTER, B. and PINCK, L., 1990. RNA 2 of Grapevine Fanleaf Virus: Sequence Analysis and Coat Protein Cistron Location. *Journal of General Virology* 71: 1433-1441.
- STUART, A.M., 2003. Molecular Determinants of the Transmission of Plant Viruses by Nematodes. *Molecular Plant Pathology* (2003), 4(3): 211-215.
- TANAKA, H., 1988. Virus Infection of Grapevine Rootstock Varieties in Japan. *Bulletin of the Fruit Tree Res. Sta. Tsukuba, Ibaraki. Japan. No. 15*: 83-91 Abs.
- TAYLOR, C.E. and ROBERTSON, W.M., 1975. Acquisition, Retention and Transmission of Viruses by Nematodes. In: *Nematode Vector of Plant Viruses* (F.LAMBERTI, C.E.TAYLOR AND J.F. SEINHORST, Eds.) Plenum Press, pp. 253-276.
- TEKİNEL, N., DOLAR, M.S., NAS, Z., BİLGİN, N., SALİH H. ve SAYILGAN, Y., 1971. Akdeniz Bölgesi Bağlarında Bulaşık Soysuzlaşma (Fan Leaf)'nın Araştırılması. *Bitki Koruma Bülteni* Cilt II (4): 225-247.
- UYEMOTO, J.K., 1976. Use of *C. quinoa* in Indexing for Grapevine Fanleaf Viruses. *Plant Disease Reporter*. Vol. 60 No: 6.
- VAN KAMMEN, A. and DE JAGER, C.P., 1978. CHI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No. 197.
- VOVLAS, N. and LARIZZA, A., 1994. Embryogenic Patterns and Developmental Stages of the Virus-Vector Nematode *X. index* 9th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union. Kuşadası- Aydın- Türkiye, 1994.
- VUITTENEZ, A., 1970. Fanleaf of Grapevine. Pages 217-22 in: *Virus Diseases of Small Fruits and Grapevine*. (N.V. FRAIZER, Ed.) ,University of California, Berkeley.

- WALTER, B., 1991. New or Improved Procedures for the Detection and Identification of Viruses or Agents or Virus-like Diseases of Grapevine and for Diagnosis. Proc. 10th Meeting of ICGV. Montreux, Switzerland, 6-9 September 1993. p. 127-130.
- _____, 1993. Advances in Grapevine Virus Diseases Diagnosis since 1990. *Proc. 11th Meeting of the ICGV*. Montreux, Switzerland, 6-9 September 1993. p. 127-130.
- _____, VUITTENEZ, A., KUSZALA, J. STOCKY, G., BURCKARD, J. and VAN REGENMORTEL, H.V., 1984. Serological Detection of Fanleaf Viruses of Grapes by ELISA. *Agron. Sci. Prod. Veg. Environ.* Paris. INRA. V.4(6): 527-534.
- _____ and ETIENNE, L., 1987. Detection of the Grapevine Fanleaf Viruses Away from the Period of Vegetation. *Journal of Phytopath.* (Germany, F.R.) v. 120(4): 355-364. Abs.
- _____ and MARTELLI, G.P., 1997. Clonal and Sanitary Selection of Grapevine. (WALTER, B., Ed.), Sanitary Selection of Grapevine. Protocol for Detection of Viruses and Virus Like Diseases. Les Colloques, No:86, INRA, Paris. p. 43-95.
- _____, BASS, P., LEGIN, L., MARTIN, C., VERNON, R., COLLAS, A. and VASSELLE, G., 1990. The Use of A Green-grafting Technique for the Detection of Virus-like Diseases of the Grapevine. *Journal of Phytopathology*, 128: 137-145.
- _____ and BERNARD, R., 1991. Update on Resistance Breeding in Grapes in France: European Prospective. *Progres Agricole et Viticole*. 108 (15-16): 331-333 Abs.
- WOOD, K.R., 1999. Nepovirus Isolation and RNA Extraction. (FOSTER, G.D. and TAYLOR S.C., Eds) *Methods in Virology. Plant Virology Protocols. From Virus Isolation to Transgenic Resistance*. Humana Press. Inc., Totawa NJ. 81: 197-204.

- YÜKSEL, H., 1966. İzmir ve Manisa Bağlarında Kısa Boğum Hastalığının Vektörü *Xiphinema index* (Longidoridae)'in Durumu Üzerinde Araştırma. *Bitki Koruma Bülteni* Cilt 6(1): 31-34.
- YILMAZ, M.A., YURTMEN, M., ÇIĞSAR, İ. and ÖZASLAN, M., 1997. A Survey of Grapevine Viruses in Turkey. *12 th Proc. of Icvg*. Lisbon, Portugal. 28 Sep/2 Oct, 1997.
- _____, 1999. Imported Viruses Diseases of Crops in Çukurova Region & Quarantine System of Turkey. (YILMAZ, M.A. and GERA, A., Eds.), Proceeding of the 1 st Israeli-Turkish Workshop on Detection of Virus Diseases by Advanced Techniques & Control. Adana, Turkey. 22-29 August, 1999. p.3-26.

ÖZGEÇMİŞ

Mersin ilinin Tarsus ilçesinde 1970 yılında doğdum. Adana ilinde ilk ve Orta öğrenimimi tamamladıktan sonra 1984-1987 yıllarında Adana Erkek Lisesi'nde lise eğitimimi tamamladım. 1988 yılında Çukurova Üni. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünü kazandım ve 1992 yılında mezun oldum. Mezun olduğum yıl aynı fakültenin yüksek lisans sınavını kazandım. Bir yıl YADİM'de yabancı dil eğitimi gördüm. Milli Eğitim bakanlığının 1994 yılında yurtdışında lisans üstü eğitim sağlamak amacıyla açmış olduğu sınavı kazanarak yurt içi dil eğitimi amacıyla 8 ay Orta Doğu Teknik Üniversitesi'nde İngilizce eğitim kursunu başarıyla tamamladım. Mustafa Kemal Üni., Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Ana Bilim Dalında 1996-97 bahar eğitim döneminde Yüksek Lisans sınavını kazandım. Kasım 1997 tarihinde Fen bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak M. Kemal Üni. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde Arş. Gör. olarak göreve başladım. Şubat 1999 yılında yüksek lisans eğitimimi tamamladım ve aynı dönemde Ç.Üni. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Ana Bilim Dalında doktora eğitimime başladım. Evli ve iki çocuk sahibiyim.

EK I

DAS-ELISA TESTLERİNDE KULLANILAN TAMPON ÇÖZELTİLER

1. Phosphate Buffer Saline (PBS) (1 l, pH=7.4)

NaCl	8.0 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	2.9 g
KCl	0.2 g
NaN ₃	0.2 g

2. Kaplama Tamponu (1 l, pH=9.6)

Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.93 g
NaN ₃	0.2 g

3. Konjugate Tamponu (1 l, , pH=7.4)

PBS(1X)	1 l
Tween-20	0.5 ml
PVP	20.0 g
BSA	2.0 g

4. Ekstraksiyon Tamponu

PBS(1X)	1 l
Tween-20	0.5 ml
PVP	20.0 g
Tris-HCL	60.0 g

5. Substrat Tamponu

Diethanolamine	97 ml.
NaN ₃	0.2 g

5. Yıkama Tamponu

PBS(1X)	1 l
Tween-20	0.5 ml

EK II

DAS-ELISA (Clark ve Adams, 1977)

Plate üzerindeki her çukura 100 µl kaplama tamponu (pH=9.6) içerisinde seyreltilmiş IgG eklenir ve 37 °C’de 4 saat inkübe edilir.



Yıkanır.

Her çukura 100 µl ekstraksiyon tamponu (pH=7.4) içerisinde örnek eklenir ve 4 °C’de 1 gece inkübe edilir.



Yıkanır.



Her çukura 100 µl konjuguate tamponu (pH=7.4) içerisinde örnek seyreltilmiş alkaline fosfataz enzimi ile işaretli IgG eklenir ve 37 °C’de 4 saat inkübe edilir.



Yıkanır.



Her çukura 100 µl substrat tamponu (pH=9.8) içerisinde henüz hazırlanmış P-nitrophenyl phosphate substratı eklenir.



Oda sıcaklığında 30 dakika bekletilir.



405 nm’de fotometrik ölçüm yapılır.

EK III

ELEKTROFOREZ (AGAROS JEL) ile RNA ANALİZİ

1 gr agaroz 99 ml 1 x TAE tampon çözelti içerisinde çözündürülür. Karışım bir mikrodalga fırında yada ısıtıcı alet üzerinde eriyinceye kadar ısıtılır. Hacim tekrar ölçülür ve kaybolan sıvı su eklemek suretiyle yeniden tamamlanır. Çözelti biraz soğumaya bırakılır. İlyınca hava kabarcığı oluşturmadañ jel küvetine dökülür ve tarak yerleştirilir. Bir saat kadar donması beklenir. İyice donunca tarak dikkatlice çıkartılarak örnek kuyucukları oluşturulur. Jel içerisinde TAE buffer dolu olan elektrofotez tankına yerleştirilir. Buffer miktarı jeli örtecek kadar olmalıdır. Cihaz sabit 100 voltta 1 saat çalıştırılır. Daha sonra tankın içerisindeñ çıkarılan jel bir küvet içerisinde % 0.1 lik ethidium bromid solüsyonu ile shaker üzerinde boyanır. Çeşme suyu ile fazla boya yıkanır ve UV transilliminator aleti üzerinde polaroid kamera ile fotoğrafı çekilir.

Aşağıda elektroforez işleminde kullanılan tampon çözeltiler ve pH değerleri verilmektedir.

a-Agaroz Jel (% 1'lik)

Agarose	1 gr
TAE tamponu	99 ml

b-TAE Tamponu (pH=7.2)

Tris	40 mM
Sodium Acetate	20 mM
EDTA	1 mM

c-Yükleme (Loading) Tamponu

Ficoll	% 10
SDS	% 0.5
Bromophenol Blue	% 0.06
Orange-G	% 0.06

d-Boyama (Staining) Solüsyonu

Ethidium bromide	1mg/l
------------------	-------

EK IV-A. Adana-Balcalı'daki başlardan 2002-2003 yıllarında alınan örneklerden Asma kısa boğum virüsü ile bulaşık olanların optik densitesi

Örnek numarası	ELISA okuma değeri (OD ₄₀₆)	Negatif kontrol ortalaması (OD ₄₀₆)	Pozitif kontrol ortalaması (OD ₄₀₆)
1	0.911	0.232	2.511
2	0.852	0.232	2.511
3	0.544	0.232	2.511
4	0.898	0.232	2.511
5	0.913	0.232	2.511
6	0.842	0.232	2.511
7	0.711	0.232	2.511
8	1.422	0.232	2.511
9	1.877	0.232	2.511
10	0.517	0.057	3.241
11	1.750	0.057	3.241
12	0.144	0.057	3.241
13	0.161	0.057	3.241
14	2.247	0.057	3.241
15	0.219	0.081	0.597
16	0.561	0.081	0.597
17	0.306	0.081	0.597
18	0.411	0.081	0.597
19	0.354	0.081	0.597
20	0.268	0.081	0.597

EK IV-B. Pozantı ilçesine ait bağlardan 2002-2003 yıllarında alınan örneklerden Asma kısa boğum virüsü ile bulaşık olanların optik densitesi

Örnek numarası	ELISA okuma değeri (OD ₄₀₅)	Negatif kontrol ortalaması (OD ₄₀₅)	Pozitif kontrol ortalaması (OD ₄₀₅)
1	0.117	0.048	2.563
2	0.504	0.048	2.563

EK IV-C. Ceyhan ilçesine ait bağlardan 2002-2003 yıllarında alınan örneklerden Asma kısa boğum virüsü ile bulaşık olanların optik densitesi

Örnek numarası	ELISA okuma değeri (OD ₄₀₅)	Negatif nontrol ortalaması (OD ₄₀₅)	Pozitif kontrol ortalaması (OD ₄₀₅)
1	0.262	0.048	2.563
2	0.314	0.048	2.563

EK IV-D. Saimbeyli ilçesine ait bağlardan 2002-2003 yıllarında alınan örneklerden Asma kısa boğum virüsü ile bulaşık olanların optik densitesi

Örnek numarası	ELISA Okuma değeri (OD ₄₀₅)	Negatif kontrol ortalaması (OD ₄₀₅)	Pozitif kontrol ortalaması (OD ₄₀₅)
1	0.128	0.048	0.544
2	0.124	0.048	0.544
3	0.126	0.048	0.544
4	0.130	0.048	0.544
5	0.096	0.048	0.544

**EK IV-E. İçel ilindeki başlardan 2002-2003 yıllarında alınan örneklerden
Asma kısa boğum virüsü ile bulaşık olanların optik densitesi**

Örnek numarası	ELISA okuma değeri (OD₄₀₅)	Negatif kontrol ortalaması (OD₄₀₅)	Pozitif kontrol ortalaması (OD₄₀₅)
1	0.342	0.069	2.924
2	0.191	0.069	2.924
3	0.176	0.069	2.924
4	0.181	0.069	2.924
5	0.165	0.069	2.924
6	0.255	0.069	2.924
7	0.142	0.069	2.924
8	0.178	0.069	2.924
9	0.229	0.069	2.924
10	1.239	0.069	2.924
11	0.144	0.069	2.924
12	0.164	0.069	2.924
13	0.139	0.069	2.924
14	0.150	0.069	2.924
15	1.684	0.069	2.924
16	0.207	0.069	2.924
17	0.354	0.069	2.924

EK IV-F. Tarsus ilçesine ait bağlardan 2002-2003 yıllarında alınan örneklerden Asma kısa boğum virüsü ile bulaşık olanların optik densitesi

Örnek numarası	ELISA okuma değeri (OD₄₀₅)	Negatif kontrol ortalaması (OD₄₀₅)	Pozitif kontrol ortalaması (OD₄₀₅)
1	0.918	0.211	1.944
2	0.542	0.211	1.944
3	0.511	0.211	1.944
4	0.802	0.211	1.944
5	0.912	0.211	1.944
6	0.844	0.211	1.944
7	0.747	0.211	1.944
8	1.558	0.211	1.944
9	1.311	0.211	1.944
10	0.162	0.081	0.597
11	0.347	0.081	0.597
12	0.173	0.081	0.597
13	0.308	0.081	0.597
14	0.185	0.081	0.597
15	0.236	0.081	0.597
16	0.202	0.081	0.597
17	0.192	0.081	0.597

EK IV-G. Adana-Balcalı'daki 2002-2003 yıllarında Asma kısa boğum virüsü ile bulaşık bağlardan alınan toprak örneklerden izole edilen *Xiphinema index*'in optik densitesi

Örnek numarası	ELISA okuma değeri (OD ₄₀₅)	Negatif nontrol ortalaması (OD ₄₀₅)	Pozitif kontrol ortalaması (OD ₄₀₅)
1	0.235	0.057	3.241
2	0.354	0.057	3.241

EK IV-H. Adana-Balcalı'daki 2002-2003 yıllarında Asma kısa boğum virüsü ile inokule edilen otsu indikatör bitki *Nicotiana benthamiana*'ların optik densitesi

Örnek numarası	ELISA okuma değeri (OD ₄₀₅)	Negatif nontrol ortalaması (OD ₄₀₅)	Pozitif kontrol ortalaması (OD ₄₀₅)
1	0.388	0.057	3.241
2	0.483	0.057	3.241
3	0.344	0.089	1.511
4	0.454	0.089	1.511
5	0.283	0.089	1.511
6	0.622	0.089	1.511
7	0.244	0.089	1.511
8	0.281	0.089	1.511
9	0.312	0.089	1.511
10	0.355	0.089	1.511
12	0.477	0.089	1.511
13	0.511	0.089	1.511