

Prunus Yapraklarında Prunus Necrotic Ring Spot (PNRSV) ve Apple Chlorotic Leaf Spot (ACLSV) Virüslerinin Dağılımı

Hikmet Murat SİPAHIOĞLU⁽¹⁾ Mustafa USTA⁽¹⁾ Bülent POLAT⁽¹⁾
Mustafa OCAK⁽¹⁾ Orçun Burak ŞAVUR⁽¹⁾

Geliş Tarihi: 25.10.2004

Öz: Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)'ü ile infekteli *Prunus mahaleb* ve Apple chlorotic leafspot virus (ACLSV)'ü ile infekteli şeftali (*P. persica* L.) yapraklarının farklı bölgelerinden alınan doku diskleri bu virüslerin yaprak dokusundaki dağılımlarını belirlemek amacı ile sırasıyla enzyim-linked immunosorbent assay (ELISA) ve reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) teknikleri ile analiz edilmişlerdir. Gerçekleştirilen ELISA testleri sonucunda her iki virüsünde yaprak ayasında yaprak sapı bölgesinde daha konsantrite oldukları ve konukçu yapraklarında düzensiz bir dağılım gösterdikleri tespit edilmiştir. Aynı yaprak bölgelerinin kullanıldığı RT-PCR testlerinde ise her iki virüsün genetik materyalinin tüm yaprak bölgeleri için birbirine yakın ölçülerde amplifikasyon ürünleri oluşturduğu belirlenmiş ve testlenen yaprak bölgeleri arasında viral konsantrasyon bakımından bariz farklılıkların olmadığı saptanmıştır. RT-PCR testi sonuçlarından elde edilen kesin, net ve dengeli teşhisi ifade eden bantlar, ACLSV ve PNRSV virüslerinin *Prunus* yapraklarının testlenen tüm bölgelerinde homojen bir dağılım sergilediğini göstermiştir. Her iki virüs, kullanılan test yöntemine göre konukçularında farklı dağılım sergilemişlerdir. Elde edilen bulgular ışığında PNRSV ile ACLSV'nin konukçularındaki dağılımını belirlemede ELISA testi ile PCR testi arasında bir korelasyon saptanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: *Prunus* necrotic ringspot virüs, Apple chlorotic leaf spot virüs, ELISA, RT-PCR, PNRSV, ACLSV

Distribution of Prunus Necrotic Ringspot (PNRSV) and Apple Chlorotic Leaf Spot Viruses (ACLSV) in *Prunus* Leaves

Abstract: Leaf discs taken from different canopy and leaf sites of Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) infected *Prunus mahaleb* and Apple chlorotic leafspot virus (ACLSV) infected peach (*P. persica*) tree were analyzed for the determination of virus distribution in leaf tissues by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) techniques. The ELISA results suggest high virus concentration of PNRSV and ACLSV at the basal leaf section of the lamina and uneven virus distribution in their host leaves. Clear and relatively balanced amplification bands were obtained when the same leaf sections were analyzed by RT-PCR. No conspicuous differences were found in terms of viral concentrations among the leaves tested. Amplification bands of RT-PCR test results suggest homogeneous distribution of both viruses in tested *Prunus* leaves. Both viruses were exhibited different patterns of distribution in their hosts according to the detection method used. No correlation was found between ELISA and RT-PCR tests in determining the distribution of both viruses.

Key Words: *Prunus* necrotic ringspot virus, Apple chlorotic leaf spot virus, ELISA, RT-PCR, PNRSV, ACLSV

Giriş

PNRSV ve ACLSV sert çekirdeklielerde ekonomik açıdan en önemli virüsler arasında yer almaktadırlar. Sebep oldukları zararın boyutu meyvenin türü ve çeşidine, virüs ırkının virülensliğine, karışık infeksiyon durumlarında ise virüs kombinasyonlarına göre değişmektedir (Nemeth 1986).

PNRSV ve ACLSV virüslerinin moleküler ve serolojik tekniklerle teşhislerine yönelik dünyada ve son yıllarda da ülkemizde yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Spiegel ve ark. 1996 RT-PCR tekniğini, ELISA ile negatif sonuç veren dormant şeftali ağaçlarında *Prunus necrotic ringspot* virüsünün tanılanmasında kullanmışlardır. Lithium chloride temelli metodu kullanarak kabuk dokularından ekstrakte ettikleri total RNA'yı RT-PCR ile viral genomun çoğaltılmasında kullanmışlardır. Yaklaşık 300 baz çifti uzunluğunda elde ettikleri PCR ürünlerini agaroz jel elektroforez ile analiz etmişler ve ethidium bromide boyaması ile gözlemlenmişlerdir. Bazı durumlarda PCR

ürünleri boyanmış jelde açıkça görülmemiş fakat ³²P işaretli spesifik virüs probu ile yapılan mütakip hybridizasyonda viral genom tespit edilmiştir. Araştırmacılar PCR tekniğinin PNRSV'nin dormant kabuk dokusundan teşhisi için yeterince duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Ulubaş ve Ertunç 2004 Türkiye'nin sert çekirdekli meyve yetiştiriciliğinin yapıldığı farklı bölgelerindeki fidanlıklar ile meyve bahçelerinde bulunan erik, kayısı, nektarin, şeftali, kiraz ve vişne ağaçlarından yaptıkları örneklemelerde 486 bitkisel materyali PNRSV'nin varlığına karşı serolojik ve moleküler yöntemlerle testlemişlerdir. Örneklerdeki PNRSV infeksiyonunu belirlemek için tüm örneklerle uyguladıkları RT-PCR testi sonucunda 51 örneğin PNRSV ile infekteli olduğu belirlenirken DAS-ELISA ile sadece 31 örneğin infekteli olduğunu tespit enzimleri kullanılarak kesim yapılmış ve izolatların filogenetik haritası çıkarılmıştır. Çalışmada RFLP analizleri sonucunda farklı coğrafik lokasyonlardan temin edilen

¹ Yüzcüncü Yıl Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Bölümü-Van

PNRSV izolatları arasında herhangi bir ilişki olmadığı tespit edilmiştir.

Rowhani ve ark. 1995, odunsu bitkilerdeki virüsleri RT-PCR yöntemini kullanarak teşhis etmişlerdir. Araştırmacılar geliştirdikleri yöntemde virüs partiküllerini önce polystyrene bir yüzeyde immobilize etmişler daha sonra PCR tekniğini kullanarak virüslerin teşhislerini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada Prune dwarf, Apple mosaic, Cherry leaf roll, Citrus tristeza ve Grapevine fanleaf virüslerinin teşhisleri başarılı biçimde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ayrıca, değişik PCR tekniklerinin virüs partiküllerinin teşhis etmedeki başarısı da kıyaslanmıştır.

Parakh ve ark. 1995, RT-PCR tekniğini biyolojik indeksleme ve ELISA testi ile eş zamanlı olarak Prune dwarf virüsünün (PDV) teşhisinde kullanmışlardır. RT-PCR tekniğinin PDV'nin teşhisindeki başarısından ötürü sert çekirdekli meyvelerdeki PDV izolatlarının teşhisinde, sağlıklı damızlık materyal elde etmede ve karantina kapsamı çerçevesinde kullanılacak önemli bir teşhis tekniği olduğunu vurgulamışlardır.

Rosner ve ark. 1998, AMV reverse transcriptase enzimini kullanarak immuno capture polymerase chain reaction (IC-PCR) tekniği ile şeftali ağaçlarında PNRSV'nin tanınması için reaksiyon koşullarını araştırmışlardır. 46°C'de gerçekleştirilen RT reaksiyonundan çoğaltılan ürünlerin seviyelerinin 37°C'de önerilen ile karşılaştırıldığında daha yüksek ve ideal olduğunu tespit etmişlerdir.

Myrta ve ark. 2003, Plum pox virüsünün (PPV) M ve D ırkları ile bulaşık kayısı ve şeftali yapraklarının farklı bölgelerinden aldıkları yaprak disklerine uyguladıkları ELISA testleri sonucu simptom göstermeyen yaprakların yanıltıcı negatif sonuçlar verdiğini tespit etmişlerdir. ELISA ve RT-PCR tekniklerinin kullanıldığı bu çalışmada PNRSV ve ACLSV virüslerinin infekteli *Prunus* türlerindeki dağılımı araştırılmıştır.

Knapp ve ark. 1995, halihazırda yaygın biçimde virüs teşhisinde kullanılan ELISA yönteminin semptomatik olmayan yapraklarda kullanıldığında hatırı sayılır ölçüde yanıltıcı negatif sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir.

Materyal ve Yöntem

Yaprak örneklerinin alınması : PNRSV infekteli *P. mahaleb* bitkisi ile ACLSV infekteli şeftali (*P. persica* L.) bitkisi tacının Temmuz döneminde üst, orta ve alt kısımlarından alınan yapraklar üzerinde Şekil 1a'da görüldüğü gibi dört bölge oluşturulmuş ve bu bölgelerden

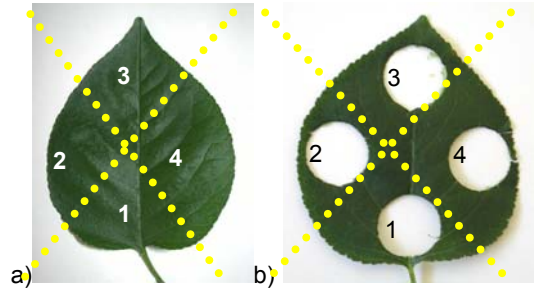
kesilerek ayrılan yaprak diskleri (Şekil 1b) ELISA ve RT-PCR testleri ile ilgili virüslerin yaprak ayasındaki dağılımlarını belirlemek amacıyla testlenmişlerdir. Çalışma konusunu oluşturan izolatlardan PNRSV izolatu Malatya'dan, ACLSV izolatu ise Van'dan temin edilmiştir.

Serolojik test çalışmaları : Bu çalışmada kullanılan serolojik test tekniklerinden olan ELISA testi PNRSV ve ACLSV infekteli bitkilerinin yapraklarından alınan disk şeklindeki dokulara uygulanmıştır. ELISA testi, ilgili kit'lerin temin edildiği AGDIA (PNRSV kiti) ve LOEWE (ACLSV kiti) firmalarının önerdiği prosedürlere göre uygulanmıştır.

Moleküler test çalışmaları:

Bitki total nükleik asit ekstraksiyonu ve komplementer DNA (cDNA) sentezi : Bitki total nükleik asit ekstraksiyonu Foissac ve ark., 2000'nin bildirdiği yöntemine göre yapılmıştır. cDNA sentezi ise Invitrogen firmasından temin edilen SuperScript™ II Rnase H⁻ Reverse Transcriptase (Katalog no: 18064-022) kiti kullanılarak firmanın bildirdiği prosedüre göre gerçekleştirilmiştir.

PCR reaksiyonu: PCR reaksiyonu 50µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Buna göre steril PCR tüpüne 5 µl 10X PCR Buffer (200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 3 µl 25mM MgCl₂, 1µl Primer1 (10µM) (Çizelge 1), 1µl Primer 2 (10µM) (Çizelge 1), 0.4µl *Taq* DNA polimeraz enzimi (5U/µl), 2µl cDNA ve 36.6µl RNase ari su eklenerek, Spiegel ve ark. 1996 ile Menzel ve ark. 2002'nin bildirdiği sıcaklık aralıkları (Çizelge 2) kullanılarak ilgili virüslerin genetik materyallerinin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Oluşan PCR ürünleri elektroforez yapıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.



Şekil 1. PNRSV ve ACLSV ile infekteli bitkilerinin üst, orta ve alt tac bölgelerinden alınan yapraklardan kesilen disklerin örnekleme şekli **a)** yaprak laminasının bölümlere ayrılması, **b)** bölgelere ayrılan yapraklardan testlenmek üzere alınan yaprak diskleri

Çizelge 1. RT-PCR testinde PNRSV ve ACLSV virüslerini teşhis etmede kullanılan spesifik primerlere ait baz dizimleri ve PCR sonrası beklenen fragment uzunlukları

Virüs	Primer ismi	Primer dizisi	Çoğaltılan alanın uzunluğu (bp) ve referans
PNRSV	P1	5'-GAGCTCTGGTCCCCTCAGG-3'	616 (Spiegel ve ark., 1999)
	P2	5'-TCACTCTAGATCTCAAGCAG-3'	
ACLSV	A1	5'-TTCATGGAAAGACAGGGGCAA-3'	677 (Menzel ve ark., 2002)
	A2	5'-AAGTCTACAGGCTATTATTATAAGTCTAA-3'	

Çizelge 2. PNRSV ile ACLSV virüslerine ait genetik materyali çoğaltmada uygulanan sıcaklık aralıkları

Referans	Primer ismi	Döngü	Denatürasyon	Bağlanma	Polimerizasyon
(Spiegel ve ark., 1999)	P1, P2	ilk döngü	3 dk 94 °C	-	-
		40 döngü	30 sn 92 °C	30 sn 54 °C	1 dk 72 °C
		Son döngü	-	-	5 dk 72 °C
(Menzel ve ark., 2002)	A1, A2	ilk döngü	15 dk 95 °C	-	-
		34 döngü	30 sn 94 °C	30 sn 62 °C	1dk 72 °C
		Son döngü	-	-	7 dk 72 °C

PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra ethidium bromide ile boyanmış ve Syngene (Synoptipcs Ltd., Cambridge, GB) marka Jel Dökümantasyon ve Analiz Sistemi ile görüntülenmiştir.

Bulgular ve Tartışma

PNRSV infekteli *P. mahaleb*'in yaprak disklerine uygulanan ELISA testi sonuçlarına bakıldığında (Çizelge 3) pozitif reaksiyonların özellikle ağaç tacının alt ve orta kısımlarında yer alan yapraklarda yoğunlaştığı görülmektedir. Ağaç tacının üst bölümündeki yapraklara ait 12 yaprak diskinden 2 tanesinde, orta bölümde yer alan yapraklara ait 12 yaprak diskinden 8 tanesinde ve ağaç tacının alt bölümündeki yapraklara ait 12 yaprak diskinden 10 tanesinden pozitif reaksiyon elde edilmiştir. Infekteli ağaç tacının üst kısımlarındaki yapraklardan alınan disklerden sadece iki tanesinin virüsü teşhise yetecek absorbans değerleri vermesi sezon ortasında

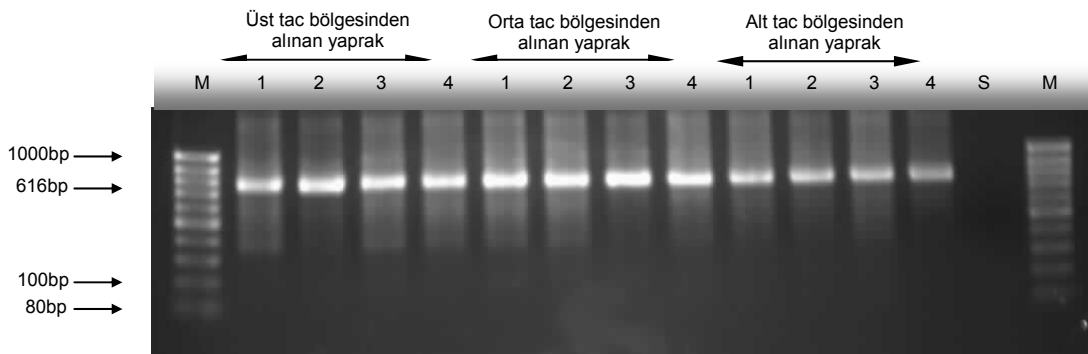
gerçekleştirilen testlerde virüsün ağaç tacında oldukça düzensiz dağılımına işaret etmektedir.

Elde edilen sonuçlara yaprak ayasındaki bölgeler itibarı ile bakıldığında (1. 2. 3. ve 4. bölgeler), ELISA ile testlenen yaprak disklerinden 1. bölgeye ait yaprak disklerinde 6 adet, 2. bölgeye ait yaprak disklerinde 5 adet, 3. bölgeye ait yaprak disklerinde 5 adet ve 4. bölgeye ait yaprak disklerinde ise 4 adet pozitif reaksiyonun olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar itibarı ile ELISA testi verilerine dayanarak virüs konsantrasyonunun 1. bölge olan yaprak sapı bölgesinde yoğunlaştığı görülmektedir.

Ancak aynı yaprak bölgelerine gerçekleştirilen RT-PCR çalışmasında ise farklı sonuçlar elde edilmiştir. Aynı örnekleme yönteminin kullanıldığı RT-PCR testi sonucunda, testlenen bütün yaprak disklerinde homojen virüs konsantrasyonunu ifade eden, birbirlerine yakın düzeylerde boyanan dengeli amplifikasyon bantları elde edilmiştir (Şekil 2).

Çizelge 3. PNRSV infekteli *P. mahaleb* tacının alt, üst ve orta kısımlarından alınan yaprakların ELISA testindeki reaksiyonları

	Ağaç tac'ın üst bölgesinden alınan yapraklar				Ağaç tac'ın orta bölgesinden alınan yapraklar				Ağaç tac'ın alt bölgesinden alınan yapraklar			
	1.bölge disk	2.bölge disk	3.bölge disk	4.bölge disk	1.bölge disk	2.bölge disk	3.bölge disk	4.bölge disk	1.bölge disk	2.bölge disk	3.bölge disk	4.bölge disk
1.tekrar	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2.tekrar	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
3.tekrar	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-



Şekil 2. PNRSV infekteli *P. mahaleb* tac'ının üst, orta ve alt bölümünden toplanan yapraklar üzerindeki dört farklı bölgeden alınan yaprak disklerine uygulanan RT-PCR sonucunda elde edilen bantlar, 1, 2, 3 ve 4 numaralı sıralar yaprak ayasındaki birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü bölgeleri göstermektedir, S. sağlıklı *P. mahaleb*, M. DNA marker

Şekil 2 incelendiğinde tüm yaprak disklerine eş zamanlı uygulanan total nükleik asit ekstraksiyon işlemi sonrası gerçekleştirilen PCR testi sonucunda, en fazla amplifikasyon ürünlerinin bitki tacının orta kısmında yer alan yapraklarda olduğu görülmektedir. Bu bölgede yer alan yapraklara uygulanan PCR sonucunda elde edilen beklenen uzunluktaki (616 bp) bantların aynı boyama süresinde daha fazla boyanması virüsün orta tac bölümündeki yapraklarda daha yoğun olduğunu göstermektedir. Ancak bu farkın diğer yaprak bölgelerine ait bantlar ile kıyaslandığında çok derin bir fark olmadığı da göze çarpmaktadır.

ELISA testi sonrasında pozitif reaksiyonların alt ve orta yapraklarda, PCR sonrasında ise orta ve kısmen de üst yapraklarda ortaya çıktığı belirlenmiştir. Her iki yöntem ile testlenen örneklerden elde edilen sonuçların örtüştüğü nokta, ağaç tacının orta kısmından toplanan yapraklarda virüsün daha konsantre olduğu yönündedir. Ancak her iki test sonucunda elde edilen bulgular ışığında, ağaç tac'ının üst bölgesinden alınan yapraklarda örtüşmediği hatta önemli ölçüde bir ayrışmanın olduğu görülmektedir. ELISA testiyle PNRSV ile infekteli *P. mahaleb*'in yapraklarından az sayıda pozitif reaksiyonla nispeten çok sayıda hatalı negatif sonuçların elde edilmesi, RT-PCR ile testlenen tüm yaprak diskleri için net ve kesin teşhis sonuçlarının elde edilmesi her iki testin güvenilirlik sınırları hakkında önemli ipuçları da vermektedir.

ACLSV ile infekteli *P. persica* bitkisinin aynı tac bölgelerinden alınan yaprak disklerine uygulanan ELISA testi sonuçlarına bakıldığında (Çizelge 4) pozitif reaksiyonların ağaç tacının alt bölümünden alınan yapraklarda yoğunlaştığı, üst ve orta bölümlerden alınan yaprak örneklerinin alt kısımdan alınan yaprak örneklerine oranla çok daha az pozitif reaksiyon verdiği tespit edilmiştir. Çizelge 4 yaprakta oluşturulan bölümlerin ELISA ile testlenmesi açısından incelendiğinde özellikle 1. bölge olarak nitelenen yaprak sapı bölgesinin en yüksek sıklıkta pozitif reaksiyonların olduğu bölge olarak tespit edilmiştir. ELISA testi sonuçları dikkate alındığında ACLSV'nin de özellikle bu bölgede yoğunlaştığını görmek

mümkündür. Ancak RT-PCR testi sonucunda elde edilen bantlar, ELISA'da varılan bu sonuçları doğrulamamıştır. Aynı yaprak bölgelerinin kullanıldığı PCR testi sonucunda oldukça dengeli teşhis sonuçları elde edilmiştir (Şekil 3). Bu bulgu ışığı altında ACLSV'nin infekteli *P. persica*'nın yaprak ayasında homojen dağılım sergilediğini belirtmek mümkündür.

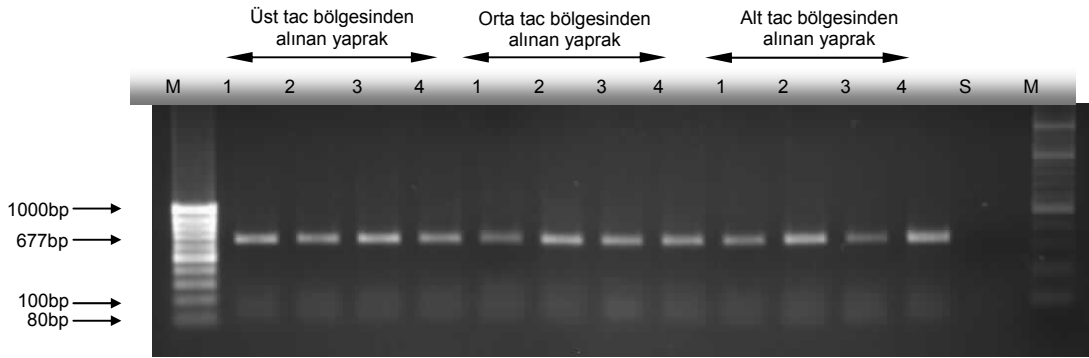
RT-PCR testi ile PNRSV ve ACLSV ile infekteli tüm örneklerden %100 oranında pozitif sonuçlar elde edilirken, ELISA testi ile PNRSV için testlenen infekteli örneklerin %55'inden, ACLSV ile infekteli örneklerin ise %25'inden pozitif reaksiyonlar elde edilmiştir. Elde edilen bulgular ışığında, çalışmada kullanılan PNRSV izolatının konukçusu *P. mahaleb* yapraklarındaki dağılımı ile ACLSV izolatının konukçusu *P. persica* yapraklarındaki dağılımını tespit etmede uygulanan ELISA ve PCR testleri arasında bir korelasyonun olmadığı tespit edilmiştir.

Elde edilen bulgular doğrultusunda sadece ELISA test verilerine dayanarak virüsün yaprak dokusunun neresinde konsantre olduğunu belirlemeye çalışmanın yanıltıcı sonuçlar verebileceği sonucuna varılmıştır. Nitekim Myrta ve ark. 2003'nin yaptıkları bir çalışmada Plum pox virus'un M ırkı ile infekteli bitkiden alınan 100 yaprağa uyguladıkları ELISA testi sonucunda sadece %56 oranında pozitif reaksiyon elde etmişlerdir. Diğer bir ifade ile infekteli bitkilerden alınan ve ELISA yöntemi ile testlenen bitkilerden %44 oranında yanıltıcı negatif sonuçlar elde etmişlerdir. Farklı yöntemlerin kıyaslamalı kullanıldığı diğer bir çalışmada ise Pallas ve ark., 1998 İspanya'nın Murcia bölgesinde yetiştirilen kayısılardaki virüs hastalıklarının surveyinde ELISA testini kullanmışlardır. PNRSV'nin saptanması için ELISA ile testlenen örnekler aynı zamanda moleküler hibridizasyon yöntemi ile testlenince elde edilen infeksiyon oranının % 10 oranında yükseldiğini bildirmişlerdir.

Farklı teşhis yöntemlerinin kullanıldığı bu çalışmada aynı zamanda ELISA ve PCR tekniklerinin patojenleri teşhisteki duyarlılıkları arasındaki fark PCR yöntemi lehine bariz biçimde ortaya çıkmıştır.

Çizelge 4. ACLSV infekteli *P. persica* tacının alt, üst ve orta kısımlarından alınan yaprakların ELISA testindeki reaksiyonları

	Ağaç tac'ın üst bölgesinden alınan yapraklar				Ağaç tac'ın orta bölgesinden alınan yapraklar				Ağaç tac'ın alt bölgesinden alınan yapraklar			
	1.bölge diski	2.bölge diski	3.bölge diski	4.bölge diski	1.bölge diski	2.bölge diski	3.bölge diski	4.bölge diski	1.bölge diski	2.bölge diski	3.bölge diski	4.bölge diski
1.tekrar	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
2.tekrar	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
3.tekrar	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-



Şekil 3. ACLSV infekteli *P. persica* tac'ının üst, orta ve alt bölümlerinden toplanan yapraklardaki dört farklı bölgeden alınan yaprak disklerine uygulanan RT-PCR sonucunda elde edilen bantlar, 1, 2, 3 ve 4 numaralı sıralar yaprak ayasındaki birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü bölgeleri göstermektedir, S. sağlıklı *P. persica* M. DNA marker

Sonuç

PNRSV ve ACLSV virüslerinin infekteli *Prunus* konukçularının yapraklarındaki dağılımını ELISA ve PCR test yöntemleri ile tespit etmeye yönelik yapılan çalışmada ELISA verilerinin, virüslerin konukçuları olan sırasıyla *P. mahaleb* ve *P. persica* yaprak ayalarında dağılımı hakkında güvenilir sonuçlar vermediği tespit edilmiştir. Farklı yaprak bölgelerine uygulanan ELISA testleri sonucunda yanıltıcı negatif sonuçlar alınırken aynı yaprak bölgelerine uygulanan RT-PCR testleri sonucunda testlenen tüm örnekler için şüphesiz, net ve nispeten dengeli pozitif sonuçlar elde edilmiştir. PCR testleri sonucunda elde edilen bantların ethidium bromide ile boyanma yoğunluğuna bakılarak testlenen yaprak bölgeleri arasında bariz farklılıklar olduğunu söylemek mümkün değildir. Bu verilere dayanarak *Prunus* yapraklarında PNRSV ve ACLSV virüslerinin dağılımını tespit etmede kullanılan ELISA ve PCR yöntemleri arasında doğrusal bir ilişki olmadığı tespit edilmiştir.

Kaynaklar

- Foissac, X., L. Savalle-Dumas, P. Gentit, M. J. Dulucq and T. Candresse, 2000. Polyvalent detection of Fruit tree Tricho, Capillo and Faveaviruses by Nested RT-PCR Using degenerated and inosine containing primers (PDO-RT-PCR). *Acta Horticulturae*, 357: 52-59.
- Knapp, E., A. Camara-Machado, H. Puhlinger, Q. Wang, V. Hanzer, B. Weiss, H. Kättinger and M. Lamier Camara Machado, 1995. Localization of fruit tree viruses by immunotissue printing in infected shoots of *Malus* sp. and *Prunus* sp. *J. of Virological Methods*, 55: 157-173.
- Menzel, W., W. Jelkmann and E. Maiss, 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99: 81-92.
- Myrta, A., O. Potere, F. Ismaeli and D. Boscia, 2003. PPV Distribution on *Prunus*: Experiences of Diagnosis With ELISA. *Options Mediterraneennes*, 45: 107-110.

- Nemeth, M. 1986. *Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees*. Akademia Kiado, Budapest 841 s.
- Pallas, V., M. L. Badenes and G. Llacer, 1998. Requirements for the stone fruit certification programme in Spain. *Options Mediterraneennes*, 19: 129-133.
- Parakh, D. R., A. M. Shamloul, A. Hadidi, S. W. Scott, H. E. Waterworth, H. E. Howell and G. I. Mink, 1995. Detection of Prune dwarf Iarvirus from infected fruits using reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Horticulturae*, 386: 421-430
- Rosner, A., Y. Shibolet, S. Spiegel, L. Krisbai and M. Kölber, 1998. Evaluating The Use of Immunocapture and Sap-Dilution PCR for The Detection of *Prunus* necrotic ringspot virus. *Acta Horticulture*, 472. 17th Int. Symp. on Fruit Virus Diseases.
- Rowhani, A., L. Maningas, S. Lile, D. Daubert and A. Golino, 1995. Development of Detection System for Viruses of Woody Plants based on PCR Analysis of Immobilized Virions. *The American Phytopathological Society*, Vol.85 No.3.
- Spiegel, S., S. W. Scott, V. Bowman-Vance, Y. Tam, N. N. Galiakparov and A. Rosner, 1996. Improved detection of *Prunus* necrotic ringspot virus by the polymerase chain reaction. *European Journal of Plant Pathology*, 102: 681-685.
- Spiegel, S., Y. Tam, L. Maslenin, M. Kolber, M. Nemeth and A. Rosner, 1999. Typing *Prunus* necrotic ringspot virus isolates by serology and restriction endonuclease analysis of PCR products. *Annals of Applied Biology*, 135(1):395-400. *Symposium on Apricot Culture and Decline* 10th September 2001 Avignon, France.
- Ulubaş, Ç., F. Ertunç, 2004. RT-PCR detection and molecular characterisation of *Prunus* necrotic ringspot virus isolates occurring in Turkey. *J. Phytopathology*, 152: 498-502.

İletişim adresi:

Murat SİPAHİOĞLU
Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Bitki Koruma Bölümü, 65080-Van
Tel-Fax: 0-432-225 18 67
e-mail:hmsipahi@yyu.edu.tr