

İndirekt Enzime-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ile Kayısı Yaprak Doku Disklerinde Plum Pox Potyvirus (PPV)'nin Tanılanması

İ. Özer Elibüyük¹

Geliş Tarihi : 13.03.2001

Özet: Plum Pox Potyvirus (PPV) ile enfekteli kayısı yapraklarından bir mantar delici yardımıyla 2, 3.5, 5 ve 6 mm çaplı diskler kesilmiştir. Bu farklı çaptaki yaprak diskleri ELISA tabakalarındaki kuyucuklara 1, 2, 3 ve 4'er tane olacak şekilde konulmuştur. Denemede, PPV ile enfekteli yaprakların belirtili ve belirtilsiz dokuları kullanılmıştır. Çalışmada diskler için 37° C'de 4 saat ve 4° C'de bir gece olmak üzere iki inkübasyon sıcaklık derecesi kullanılmıştır. Yaprak disk sayısı ve büyüklüğü arttıkça absorbens değerinin de arttığı gözlenmiştir. Dört saat 37° C'lik bir inkübasyon periyoduna bırakılan disklerin absorbens değerleri bir gece 4° C'de bırakılanlardan biraz daha yüksek olarak bulunmuştur. Ayrıca, belirtili yerlerden alınan disklerin belirtilsizlerinden daha yüksek absorbens değeri verdiği görülmüştür. Bütün koşullarda enfekteli disklerin absorbens değerleri sağlıklılarından en az iki kat daha yüksek olmuştur

Anahtar Kelimeler: Plum Pox Potyvirus, kayısı, yaprak doku diskleri

Detection of Plum Pox Potyvirus (PPV) in Leaf Tissue Disks of Apricot by Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Abstract: The Plum Pox Potyvirus (PPV) infected leaf disks of 2, 3.5, 5 and 6.5 mm in diameter were cut of the leaf by cork borer. Leaf disks in different diameters were placed into the wells in the ELISA plate in increased numbers, starting with one till 4 folds. In this assay, symptomatic and asymptomatic leaves of infected trees were used. In the assay, two incubation times for disks as 37° C at hr and 4° C in overnight was used. It is observed that as number and size of leaf disks increase, the absorbance values were also increased. Absorbance values of incubation period of 37° C was greater than that of overnight. In addition, absorbance values of disks from symptomatic area was all times found a bit greater than that asymptomatic disks. Results are found to be similar both leaf disks of apricots and plums. In all conditions, absorbance values of the infected disks were at least two times greater than that of healthy ones.

Key Words: Plum Pox Potyvirus, apricot, leaf tissue disks

Giriş

Plum Pox Potyvirus'u (PPV) başta kayısı (*Prunus armeniaca* L.), erik (*P. domestica* L.), şeftali (*P. persica* L.), kiraz (*P. avium* L.) ve vişne (*P. cerasi* L.) olmak üzere kültür, süs ve yabani sert çekirdekli bitkilerin (*Prunus* spp.) en tehlikeli hastalığıdır (Brunt ve ark. 1996, Nemchinov ve Hadidi 1996, Crescenzi ve ark. 1997). Virus, bu bitkilerin yaprak, meyve, meyve çekirdeği ve çiçeklerinde belirti oluşturmaktadır (Németh 1986, Desvignes 1999). PPV ile enfekteli kayısı ağaçlarının yapraklarında klorotik halka ve bantlar, anormal renk değişiklikleri ile şekil bozuklukları; meyvelerin üzerlerinde halka veya çizgi şeklinde lekeler, çukurluklar, nekrozlar, mezokarp dokularında kararmalar ve şekil bozuklukları ; meyve çekirdeklerinin ise çekirdek renginden daha açık veya koyu, şekilsiz veya genellikle halka şeklinde lekeler görülmektedir (Giunchedi ve ark. 1977).

PPV 20'den fazla yaprak biti türüyle non-persistent olarak ve vegetatif üretim materyalleriyle taşınmaktadır.

PPV enfeksiyonu dünyada ilk kez 1918 yılında Bulgaristan'da görülmüş ve günümüze kadar özellikle Avrupa ve Akdeniz ülkelerinin hemen hemen tümüne

yayılmıştır. Şu an bu ülkeler dışında virus ABD, Şili, Hindistan ve Kanada'da da bulunmaktadır (Németh 1994, Roy ve Smith 1994, Desvignes ve ark. 1999, <http://www.cfia-acia.aqr.ca>).

Yurdumuzda PPV ilk kez Sahtiyancı (1969) tarafından eriklerde Edirne'de simptomatolojik olarak belirlenmiştir. Sonra Kurçman (1973), 1972 yılında Ankara'da iki bahçede erik ve kayısı ağaçlarında Sharka virus hastalığını bir yıllık GF 305 şeftali çöğürlerine kabuk aşılama yöntemi vasıtasıyla ortaya koymuştur. Yürektürk (1984), Marmara Bölgesi'nde Bilecik, Bursa, İstanbul, İzmit, İzmit, Sakarya ve Tekirdağ illerinde 1976-1982 yılları arasındaki surveyleri sonucu az sayıda kayısı, erik ve şeftalinin Sharka virusu ile enfekteli olduğunu kaydetmiştir. Erdiller (1988), Ankara'da kayısı ve eriklerde PPV enfeksiyonunu belirlemiştir. Elibüyük ve Erdiller (1991), Ankara'nın 13 ilçesinde yaptıkları surveyler sonucu kayısı ve eriklerde şarka hastalığına 5 ilçede rastlandığını ve hiç bir şeftali ağacında PPV enfeksiyonu bulunmadığını bildirmişlerdir. Elibüyük ve Erdiller (1995), 7 kayısı ve 6 erik çeşidinin şarka virusuna karşı reaksiyonlarını araştırmışlar ve bunlardan Can erik çeşidinin virusa karşı

¹ Ankara Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Bölümü-Ankara

tolerant olduğunu, Stanley erik çeşidinde yalnızca yaprak belirtileri gösterdiğini; ele alınan diğer çeşitlerin ise virusa karşı hassas olduğunu bildirmişlerdir. Şarka hastalığı bugüne kadar yurdu-muzda ekonomik anlamda kayıplara yol açmamıştır. Ülkemizin en önemli kayısı yetiştiricilik bölgesi olan Malatya'da hastalık bulunmamaktadır (Elibüyük ve Erdililer 1998).

PPV'nin tanısı biyolojik yöntemlerle, elektron mikroskopî yöntemi ile, ELISA ve moleküler tekniklerle yapılmaktadır. Bununla birlikte uygulamasının kolay, ucuz ve etkili olması sebebiyle ELISA, tanı yöntemleri içerisinde en yaygın olarak kullanılanıdır. ELISA yöntemlerinden indirekt ELISA (IE) bitkisel virusların tanısında geniş olarak kullanılmaktadır (Crescenzi ve ark. 1994, Dunez ve ark. 1994). Bununla birlikte, fazla sayıda örnekle çalışıldığında havan ve havaneli ile dokuları ezmek fazla zaman ve iş gücü gerektirmektedir. Bundan dolayı böyle durumlarda tanıda yaprak disklerinin kullanımı bir pratiklik sağlamaktadır (Romaine ve ark. 1981, Menassa ve ark. 1986). Bu çalışmada PPV'nin tanısı için yaprak disklerinin kullanımının uygunluğu test edilmiştir.

Materyal ve Yöntem

Yüksek sıcaklıklar PPV'nin belirtilerini maskeleyeceğinden ve virus konsantrasyonunu düşürdüğünden dolayı örnekler Mayıs ayında toplanmıştır.

Ankara şehir merkezinde 10 adet sağlıklı ve PPV ile enfekteli aynı yaş ve büyüklükteki 10 adet kayısı ağacının yapraklarının hastalık belirtileri gösteren ve göstermeyen kısımlarından bir mantar delici yardımıyla 2, 3.5, 5 ve 6 mm çapında diskler kesilmiştir. Her bir çaptaki disklerden ELISA tabakalarının kuyucuklarına 1, 2, 3 ve 4'er tane konulmuştur. Ostermann ve Hampe (1986). Sonra her bir kuyucuğa içinde % 2 polyvinylpyrrolidone (PVP), % 0.2 bovine serum albumine (BSA) ve % 0.45 sodium diethyldithiocarbamate (Na-DIECA) bulunan kaplama tamponu (pH 9.6) eklenmiştir. Örneklerin bir kısmı 4^o C'de bir gece ve bir kısmı da 37^o C'de 4 saat inkübe edilmişlerdir. ELISA tabakaları yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra kuyulara içerisinde % 2 PVP ve % 0.2 BSA bulunan tuzlu fosfat tamponu (PBS, pH 7.4) ile sulandırılmış PPV antiserumu (1/1000 v/v) konulmuş ve tabakalar 37^o C'de 3 saat inkübe edilmişlerdir. Bu süre sonunda yıkama işleminden sonra antiserumların sulandırıldığı tampon solusyonla sulandırılmış keçide tavşaninkine karşı üretilmiş IgG (goat anti-rabbit IgG) kuyulara konulmuş (1/80000 v/v) 37^o C'de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Yöntemde kuyulara 200 µl sıvı yüklenmiş ve okumalar da 405 nm dalga boyunda yapılmıştır. Negatif kontrol absorban değerinin iki katı ve yukarısında absorban değeri veren örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Uyemoto ve ark. 1989).

Ayrıca hem pozitif kontrol olarak ve hem de yöntemin etkinliğini test etmek amacıyla ele alınan bu 10 ağaçtan alınan PPV belirtileri gösteren ve göstermeyen yaprak

örnekleri ile sağlıklı yaprak örnekleri klasik indirekt ELISA yöntemine tabi tutulmuştur. Bu yöntemde örnekler ilk olarak yine aynı kaplama tamponu ile ezilerek (1/10 g/ml) elde edilen özütler kuyulara konulmuştur. Diğer aşamalar yukarıdaki gibi yapılmıştır (Uyemoto ve ark. 1989).

Bulgular ve Tartışma

Poiak (1995), ELISA ile PPV tanı çalışmalarında en iyi zamanının Ağustos ayına kadar olan süre olduğunu bildirmiştir. Bundan dolayı örnekler Ankara koşullarında havaların virus belirtilerini maskeleyecek kadar sıcak olmadığı ve yapraklardaki PPV belirtilerinin belirgin olduğu Mayıs ayında toplanmış ve bu örneklerle yapılan tanı çalışmalarında Çizelge 1 ve 2'deki sonuçlara ulaşılmıştır. Bu çizelgelerdeki sonuçlar 10 ağaçtan alınan örneklerin absorban değerlerinin ortalamasıdır. Bu sonuçlara göre:

1. Enfekteli ağaçlardan alınan hastalık belirtilerini gösteren ve de göstermeyen disk örnekleri sağlıklılarınkinden en az iki kat daha yüksek absorban değerleri vermişlerdir. Yani bu yöntemle virus başarıyla tanılanmıştır.

Bununla birlikte Çizelge 3'de görüldüğü gibi yaprak dokularının ezilerek (1/10 g/ml) yapıldığı indirekt ELISA çalışmalarında daha yüksek absorban değerleri elde edilmiştir. Şüphesiz yaprak doku disklerinin çevresindeki yarılanmış hücrelerden ezilmişlere göre daha az özsu çıkacağından bu yöntemle antibadilerin virüsü yakalama şansı ezilmiş dokulardan elde edilen özsuoldukine göre daha düşük olacaktır. Nitekim Romaine ve ark. Menassa ve ark. (1986) ile Ostermann ve Hampe (1986) de yapmış oldukları çalışmada yaprak dokularının ezilerek yapıldığı ELISA çalışmalarında daha yüksek absorban değerleri elde edildiğini bildirmişlerdir. Ancak, aynı araştırmacılar bu yöntem ile de virusların başarıyla teşhis edilebileceğini bildirmişlerdir.

2. Hastalık belirtilerini gösteren örneklerin absorban değerleri göstermeyenlerinkine göre daha yüksek olarak elde edilmiştir. Bu da bize hastalık belirtileri gösteren dokularda daha yüksek virus konsantrasyonu olduğunu göstermektedir. Rankovic ve Vuksanovic (1985) ile Baumgartnerova ve ark. (1998) DAS-ELISA yöntemiyle PPV ile enfekteli ancak belirti göstermeyen dokularda virüsü tanıyamamışlardır. Buna rağmen bu yöntem belirtisiz dokularda bile virüsü tanıyabilmiştir.

3. Disk çapı ve sayısı arttıkça elde edilen absorban değerleri de buna paralel olarak yükselmiştir. Virus belirti göstermeyen dokularda 2 mm'lik tek bir diskte bile virüsü tanıyabilmiştir.

Her ne kadar Marco ve Kohen (1979) disk sayısı ile ELISA okumaları arasında doğrusal bir ilişki bulamamış olsa bile yine Romaine ve ark. (1981), Menassa ve ark. (1986) ile Ostermann ve Hampe (1986) ELISA testlerinde disk sayısı ve büyüklüğü arttıkça absorban değerlerinin de yükseldiğini kaydetmişlerdir.

Çizelge 1. PPV ile enfekteli belirti gösteren ve göstermeyen disklerin ortalama absorbans değerleri (4⁰ ve 37⁰ C' lerde)

Disk çapı (mm)	Disk sayısı									
	1		2		3		4			
	I. S. (°C)	B.li	B.siz	B.li	B.siz	B.li	B.siz	B.li	B.siz	
2	4	0.298	0.275	0.328	0.310	0.440	0.309	0.483	0.396	
	37	0.458	0.312	0.502	0.347	0.540	0.387	0.586	0.507	
3.5	4	0.330	0.298	0.419	0.360	0.481	0.401	0.510	0.425	
	37	0.477	0.340	0.529	0.371	0.581	0.408	0.601	0.552	
5	4	0.340	0.350	0.428	0.390	0.502	0.441	0.542	0.458	
	37	0.498	0.356	0.550	0.397	0.603	0.449	0.638	0.586	
6.5	4	0.397	0.398	0.457	0.415	0.596	0.461	0.639	0.507	
	37	0.541	0.372	0.593	0.427	0.672	0.475	0.688	0.600	

I. S.: İnkübasyon sıcaklığı, B.li: Belirti gösteren, B.siz: Belirti göstermeyen

Çizelge 2. Sağlıklı disklerin ortalama absorbans değerleri (4⁰ ve 37⁰ C' lerde)

Disk çapı (mm)	Disk sayısı							
	1		2		3		4	
	I. S. (°C)	Sağlıklı						
2	4	0.131	0.135	0.140	0.144			
	37	0.144	0.148	0.152	0.155			
3.5	4	0.135	0.142	0.147	0.154			
	37	0.150	0.155	0.158	0.165			
5	4	0.139	0.144	0.149	0.155			
	37	0.159	0.164	0.170	0.176			
6.5	4	0.144	0.149	0.156	0.161			
	37	0.166	0.172	0.177	0.184			

I. S.: İnkübasyon sıcaklığı

Çizelge 3. Sağlıklı ve enfekteli disklerle yapılan klasik indirekt ELISA'da elde edilen ortalama absorbans değerleri (4⁰ ve 37⁰ C' lerde)

İnkübasyon sıcaklığı (°C)	Örnekler		
	Sağlıklı	Belirtili	Belirtisiz
4	0.278	1.248	0.912
37	0.286	1.951	1.288

4.Yaprak disklerinin kaplama tamponu ile birlikte inkübe edildiklerinde inkübasyon sıcaklığı ile süresinin değiştirilmesi (4⁰ C'de bir gece ve 37⁰ C'de 4 saat) ELISA okuma değerlerinde az da olsa farklılıklara yol açmıştır.

Ostermann ve Hampe (1986) yaprak disklerini 4⁰ C'de 4 saat ve 20 saat inkübe etmişler, ancak bunlar arasında absorbans değerleri bakımından bir farklılık bulamamışlardır. Romaine ve ark. (1981) ile Menassa ve ark. (1986) ise denemelerini 37⁰ C'de yürüterek başarılı sonuçlar elde etmişlerdir.

Ayrıca klasik indirekt ELISA'da da yine belirtili dokularla 37⁰ C'de yapılan denemelerde daha yüksek absorbans değerleri elde edilmiştir (Çizelge 3).

Sonuç olarak yapılan çalışmada disklerin 37⁰ C'de 4 saat'lık bir inkübasyon durumunda 6.5 mm'lik disklerden 4'er adet kullanıldığında daha yüksek absorbans değerleri

verdiği görülmüştür. Bu ELISA yöntemiyle zaman ve iş gücünden tasarruf edilerek PPV'nin ELISA ile tanınmasına bir pratiklik kazandırılmaya çalışılmıştır.

Kaynaklar

- Baumgartnerova, H., H. Slovakova and W. Petrusova, 1998. Relationship between concentration of Plum Pox Virus and content of pigments in virus-infected symptomatic apricot leaves. *Acta Virologica*, 42 (4) 216-218.
- Brunt, A. A., K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs and L. Watson, 1996. *Viruses of Plants*, CAB International, 1484 pp.
- Crescenzi, A., L. D'Aquino, S. Comes, M. Nuzzaci, and P. Piazzola, 1997. Characterization of the sweet cherry isolate of Plum Pox Potyvirus. *Plant Disease*, 81: 711-714.
- Desvignes, J. C. 1999. *Virus Diseases of Fruit Trees*. Editions Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Legumes, 202 pp.
- Dunez, J., M. Ravelonandro and T. Candresse, 1994. Plum Pox: Advances in research on the disease and its causal agent, and possible means of control. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 24: 537-542.
- Elibüyük, İ. Ö. and G. Erdiller, 1991. Studies on incidence and identification of sharka disease on apricots, plums and peaches in Ankara Province. VI. *Phytopathology Congress of Turkey*, No: 6 411-415 pp.

- Elibüyük, İ. Ö. and G. Erdiller, 1995. The susceptibility of some apricot and plum varieties to Plum Pox (sharka) virus. x. international symposium on apricot culture. Acta Horticulturae, No: 384, 549-552 pp.
- Elibüyük, İ. Ö. and G. Erdiller, 1998. Researches on virus diseases of stone fruit trees in Malatya region. VIII. Phytopathology Congress of Turkey, Türkiye Fitopatoloji Derneği Yayınları, 8: 8.
- Erdiller, G. 1988. Investigation on the causes of fruit dropping of apricot and plum trees in Ankara province. Journal of Turkish Phytopathology, 17(3) 98.
- Giunchedi, L., R. Credi, A. Albertini, G. Colorio, and C. Nicoli. 1977. Sensibilità Varietale dell'Albicocco e di Diverse del Genere Prunus alla Virosi Vaiolatura ad Anello. Estratto da "Esperienze e Ricerche"-Nuova Serie-Vol. VI. <http://www.cfia-acia.agr.ca>
- Kurçman, S. 1973. Nachweis des Scharka-Virus an Aprikosen und Pflaumenbaumen in Ankara. J. Turkish Phytopath., 2(3).
- Marko, S. and S. Cohen, 1979. Rapid detection and titer evaluation of viruses in pepper by enzyme-linked immunosorbent assay. Phytopathology, 69, 1259-1265.
- Menassa, R., K. M. Makkouk. and A. A. Abbasher, 1986. Detection of Zucchini Yellow Mosaic Virus in intact leaf disks and tissue extracts by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Phytopathology, 115, 152-159.
- Nemchinov, L. and A. Hadidi, 1996. Characterisation of the sour cherry strain of Plum Pox Virus. Phytopathology 86, 575-580.
- Ne-meth, M. 1986. Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees. Martinus Nijhoff / Dr. W. Junk Publishers, 841 pp.
- Németh, M. 1994. History and Importance of Plum Pox in Stone-Fruit Production. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 24, 525-536.
- Ostermann, W. D. and D. Hampe, 1986. Nachweis pflanzenpathogener Viren mit Hilfe des ELISA unter Verwendung von Blattgewebescheiben. Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz, 22 (1-9) 9-17.
- Polak, J. 1995. Reliability of detection and relative concentration of Plum Pox Virus determined by ELISA in a peach tree during the vegetation period. Journal of Plant Disease and Protection, 102, 16-22.
- Rankovic, M. and S. Vuksanovic, 1985. Possibilities and problems in diagnosing sharka on apricot by the ELISA technique. Zastita Bilja, 36 (2) 161-166.
- Romaine, C. P., S. R. Newhart and D. Anzola, 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay for plant viruses in intact leaf tissue disks. Phytopathology, 71, 308-312.
- Roy, A. S. and I. M. Smith, 1994. Plum Pox Situation in Europe. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 24, 515-523.
- Sahtiyancı, Ş. 1969. Virus de la Sharka Ches la Prunier. Bulletin Phytosan, FAO, 17 (3) 69.
- Uyemoto J. K, C. F. Luhn, W. Asai, R. Beede, J. A. Beutel and R. Fenton, 1989. Incidence of Ilarviruses in young peach trees in California. Pl. Dis., 73, 217-220.
- Yürektürk, M. 1984. Marmara Bölgesinde Sert Çekirdekli Meyvelerde Görülen Sharka Virus Hastalığı Üzerinde Araştırmalar. Atatürk Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü, 37 s.